



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Estudi de dos mecanismes moleculars implicats en l'expressió local d'mRNAs en plasticitat sinàptica

Raül Ortiz Hernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Estudi de dos mecanismes moleculars implicats en l'expressió local d'mRNAs en plasticitat sinàptica

Raül Ortiz Hernández

2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
Doctorat en Biomedicina

Estudi de dos mecanismes moleculars implicats en l'expressió local d'mRNAs en plasticitat sinàptica

Memòria presentada per Raül Ortiz Hernández per optar al títol de doctor per la Universitat de
Barcelona

Carme Gallego González (Directora)

Raül Ortiz Hernández (Doctorand)

Jesús Ureña Bares (Tutor)

Raül Ortiz Hernández

2017

Resum

La regulació local de la síntesi proteica permet a la neurona respondre ràpidament a senyals sinàptiques, és un element fonamental de la plasticitat sinàptica i està alterat en moltes patologies neuronals. La síntesi de moltes proteïnes sinàptiques és un procés regulat de forma local, mitjançant estructures conegudes com a grànuls d'RNA. La creació i transport d'aquests grànuls i la traducció dels mRNAs que contenen són processos regulats amb una alta resolució espacial i temporal.

Al primer capítol d'aquesta tesi s'estudia la retenció d'introns en mRNAs transportats a dendrites. La retenció intrònica és un tipus d'*splicing* alternatiu molt poc estudiat, però del qual s'estan descobrint casos recentment. Estudis d'altres laboratoris troben diversos introns retinguts a mRNAs localitzats a dendrites, i molts d'aquests esdeveniments de retenció intrònica tenen una funció al transport i control de la traducció d'mRNAs. En el present treball s'estudia la retenció de l'intró 16 a l'mRNA madur de *CaMKII α* . Aquesta nova isoforma d'*splicing* es troba al citoplasma de les neurones, sent detectada a dendrites, grànuls d'RNA i sinaptoneurosomes de cervell i cultius neuronals. Aquesta subpoblació d'mRNAs amb l'intró 16 es localitza preferencialment a zones distals de les dendrites de forma dependent d'activitat sinàptica. Staufen2, proteïna relacionada amb el transport d'mRNAs, interacciona amb l'intró 16 i estabilitza l'mRNA que el conté. Aquesta isoforma de *CaMKII α* que conté l'intró 16 participa en el transport de les isoformes completament processades per *splicing*.

El segon capítol d'aquesta tesi estudia KIS. Aquesta proteïna interacciona amb Stathmin, un modulador del citoesquelet de tubulina. A més, estudis preliminars van trobar KIS a grànuls d'RNA i estimulant la traducció en neurites a través del 3'*UTR* de *β -actina*. En el present treball s'exploren els mecanismes fisiològics i moleculars pels quals KIS afecta la plasticitat sinàptica a neurones hipocampals i corticals. La disminució dels nivells de KIS compromet el desenvolupament de les espines dendrítiques, altera les dinàmiques del citoesquelet d'actina i disminueix la capacitat de resposta postsinàptica. L'absència de KIS produeix una disminució significativa als nivells de les subunitats de receptor AMPA GluR1 i GluR2, i de la proteïna d'assemblatge PSD-95. Aquesta disminució és depenent de la presència del repressor traduccional CPEB3, KIS és capaç de modular l'acció de CPEB3 sobre la creació de protrusions i la traducció de l'mRNA de *GluR2*. A nivell molecular, KIS interacciona amb CPEB3 i provoca la seva dissociació de l'mRNA, permetent la seva poliadenilació i traducció. El nostre estudi aporta així nova informació sobre els mecanismes de control de la traducció d'mRNAs i de les dinàmiques del citoesquelet d'actina, en el context de la plasticitat sinàptica.

Resumen

La regulación local de síntesis proteica permite a la neurona responder rápidamente a señales sinápticas, es un elemento fundamental en la plasticidad sináptica y está alterado en muchas patologías neuronales. La síntesis de muchas proteínas sinápticas es un proceso regulado de manera local, mediante estructuras conocidas como gránulos de RNA. La creación y transporte de estos gránulos y la traducción de los mRNAs que contienen son procesos regulados con alta resolución espacial y temporal.

En el primer capítulo de esta tesis se estudia la retención de intrones en mRNAs transportados a dendritas. La retención intrónica es un tipo d'*splicing* alternativo poco estudiado, pero del que se están descubriendo nuevos casos recientemente. Estudios de otros laboratorios encuentran diversos intrones retenidos en mRNAs localizados en dendritas, y muchos de estos acontecimientos de retención intrónica tienen una función en el transporte y control de la traducción de mRNAs. En el presente trabajo se estudia la retención del intrón 16 en el mRNA maduro de *CaMKII α* . Esta nueva isoforma d'*splicing* se encuentra en el citoplasma de las neuronas, siendo detectada en dendritas, gránulos de RNA y sinaptoneurosomas de cerebro y de cultivos neuronales. Esta subpoblación de mRNAs con el intrón 16 se localiza preferencialmente en zonas distales de las dendritas, de forma dependiente de actividad sináptica. Staufen2, proteína relacionada con el transporte de mRNAs, interacciona con el intrón 16 y estabiliza el mRNA que lo contiene. Esta isoforma de *CaMKII α* que contiene el intrón 16 participa en el transporte de las isoformas completamente procesadas por *splicing*.

En el segundo capítulo de esta tesis se estudia KIS. Esta proteína interacciona con Stathmin, un modulador del citoesqueleto de tubulina. Además, estudios preliminares encontraron KIS en los gránulos de RNA y estimulando la traducción en dendritas a través del 3'*URT* de *β -actina*. En el presente trabajo se exploran los mecanismos fisiológicos y moleculares por los que KIS afecta a la plasticidad sináptica en neuronas hipocámpales y corticales. La disminución en los niveles de KIS compromete el desarrollo de las espinas dendríticas, altera las dinámicas del citoesqueleto de actina y disminuye la capacidad de respuesta postsináptica. La ausencia de KIS produce una disminución significativa de los niveles de las subunidades de receptor AMPA GluR1 y GluR2, y de la proteína de ensamblaje PSD-95. Esta disminución es dependiente de la presencia del represor traduccional CPEB3. KIS es capaz de modular la acción de CPEB3 sobre la creación de protrusiones y la traducción del mRNA de *GluR2*. A nivel molecular, KIS interacciona con CPEB3 y promueve su disociación del mRNA, permitiendo su poliadenilación y traducción. Nuestro estudio aporta así nueva información sobre los mecanismos de control de la traducción de mRNAs y de las dinámicas del citoesqueleto de actina, en el contexto de la plasticidad sináptica.

Summary

Local regulation of protein synthesis allows neurons to rapidly alter the proteome in response to synaptic signals, an essential mechanism in synaptic plasticity that is altered in many neurological diseases. Synthesis of many synaptic proteins is under local control and much of this regulation occurs through structures termed RNA granules. Creation, transport, and translation of mRNAs contained in RNA granules are processes regulated with high spatial and temporal resolution.

In the first chapter of this doctoral thesis, we study intron retention in mRNAs transported to dendrites. Intron retention is a type of alternative splicing poorly studied, but recently new events are being discovered. Studies from other laboratories show lots of introns retained in mRNAs localized in dendrites, and some of those retentions are related to mRNA transport and translation control. In the present work, we study the retention of intron 16 in *CaMKII α* mature mRNA. This new splicing isoform is transported from nuclei to neuron cytoplasm, and its found in dendrites, RNA granules and sinaptoneuroosomes from brain and cortical cultures. This mRNA subpopulation containing intron 16 is localized preferentially in distal dendrites, in a synaptic activity dependent manner. Staufen2, a well-known protein related with mRNA transport, interacts with intron 16 and stabilizes the mRNA that retains it. Intron 16 containing *CaMKII α* isoform participates in the transport of totally spliced *CaMKII α* mRNAs.

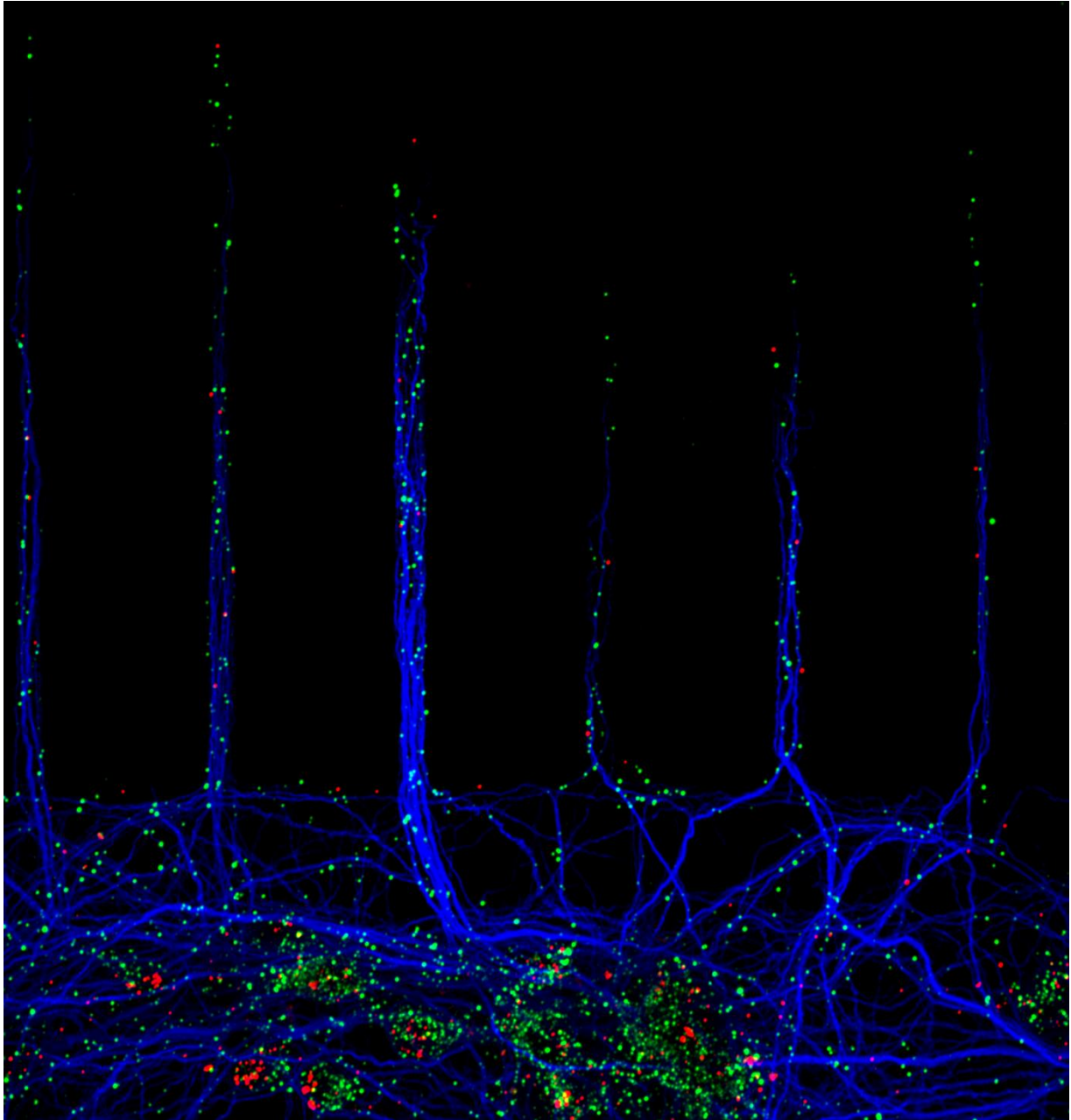
In the second chapter we study KIS. This protein interacts with Stathmin, a known modulator of microtubules. Preliminary studies found KIS in RNA granules stimulating translation in dendrites through *β -actin* 3'UTR. In the present work, we explore the physiological and molecular mechanism by which KIS affects synaptic plasticity in hippocampal and cortical neurons. Decreasing KIS levels compromises dendritic spines development, alters actin cytoskeleton dynamics and diminish postsynaptic responsiveness. The absence of KIS promotes a significant decrease in the levels of AMPA subunits GluR1 and GluR2, and in scaffolding protein PSD-95. This decrease depends on the presence of translational repressor CPEB3. KIS modulates CPEB3 repression on protrusion and *GluR2* mRNA translation. At the molecular level, KIS interacts with CPEB3 and promotes its dissociation from mRNA, allowing its polyadenylation and translation. Our study provides insight into mRNA translation control mechanism and cytoskeletal dynamics in the context of synaptic plasticity.

Índex

Capítol 1	11
Introducció	13
1. Introns i <i>splicing</i>	13
2. Retenció intrònica	13
3. Transport a dendrites i control de la traducció d'mRNAs	18
4. CaMKII α	23
Objectius	27
Resultats	29
1. Retenció intrònica a mRNAs transportats a dendrites	29
2. Anàlisi del desequilibri intrònic de CaMKII α	30
3. Caracterització del transcrit de CaMKII α que reté l'intró 16	33
4. Localització subcel·lular de la isoforma de CaMKII α que reté l'intró 16	35
5. Interacció de l'intró 16 de CaMKII α amb la proteïna d'unió a mRNA Staufen2	38
6. Els nivells de mRNA de CaMKII α que contenen intró 16 responen a estímuls sinàptics	41
7. Staufen2 regula els nivells de l'mRNA de CaMKII α que conté l'intró 16 modulant la seva estabilitat	44
8. L'expressió exògena de l'intró 16 afecta la distribució i expressió de l'mRNA de CaMKII α	47
Discussió	49
1. La retenció de l'intró 16 de CaMKII α genera una nova isoforma d' <i>splicing</i> de CaMKII α que és exportada al citoplasma	49
2. L'intró 16 de CaMKII α confereix l'mRNA diferents interactors i localització subcel·lular	50
3. Els nivells d'mRNA de CaMKII α que reté l'intró 16 responen a estímuls sinàptics	52
4. Staufen2 estabilitza l'mRNA de CaMKII α que conté l'intró 16	56
5. L'intró 16 de CaMKII α afecta el transport de l'mRNA sense intró	56
Conclusions	57
Capítol 2	59
Introducció	61
1. Plasticitat sinàptica	61
2. Citoesquelet en el context de les espines dendrítiques	62
3. Control de la traducció local de proteïnes	63
4. KIS	65
Objectius	66
Resultats	67
1. KIS afecta a la correcta formació de l'arbre dendrític i de les espines dendrítiques	67
2. Els efectes de KIS sobre les espines dendrítiques afecten la funcionalitat de les seves sinapsis	71
3. La disminució en els nivells de KIS afecta el rati de traducció de PSD-95 i de receptors AMPA a neurones	72
4. KIS modula la repressió traduccional provocada per CPEB3	76
5. KIS dissocia CPEB3 i el seu 3'UTR diana, afectant la repressió de la poliadenilació	78

Discussió	81
Conclusions	85
Mètodes	87
1. Cultius primaris, transfecció i fixació	87
2. Cultius de línies cel·lulars, transfecció, producció de virus i infecció	88
3. Experiments d'imatge, SpineJ i FociJ	89
4. Electrofisiologia	90
5. Producció de DNA, clonatges i vectors	90
6. Extracció d'RNA, RT-PCR i qPCR	92
7. Primers utilitzats per PCR quantitativa	93
8. Primers utilitzats per PCR semiquantitativa	95
9. Immunofluorescència	95
10. <i>Western blot</i>	96
11. Immunoprecipitació de proteïnes marcades amb FLAG	97
12. Immunoprecipitació de proteïnes endògenes de cervell	97
13. <i>Crosslinking</i> i immunoprecipitació amb el sistema MS2 (<i>MS2 Binding sequence-MS2 coat protein</i>)	98
14. Purificació de grànuls d'RNA de cervell	98
15. Obtenció de sinaptoneurosomes funcionals	99
16. Obtenció de sinaptoneurosomes de cèl·lules corticals per filtració	99
17. smFISH	100
18. Assajos Luciferasa	100
19. Anàlisi BONCAT de traducció <i>de novo</i>	100
20. Biotinilació de proteïnes de superfície	101
21. Assaig de longitud de les cues de poliadenines	101
Referències	103
Annexos	115

Capítol 1



Una fracció de l'mRNA de *CaMKII α* reté l'intró 16 i és estabilitzada per Staufen2

Introducció

1. Introns i *splicing*

Tot i que fa més de trenta anys del descobriment dels introns ^{1,2} es coneix molt poc de les seves funcions. El fet que les seqüències d'RNA que codifiquen per a proteïna (exons) estiguin interrompudes per introns representa un cost material i energètic enorme per a les cèl·lules eucariotes, a més, defectes en el procés d'*splicing* poden causar malalties ³. Per tant, la seva presència i manteniment durant l'evolució ha de comportar avantatges compensatoris.

S'han demostrat diverses funcions contingudes als mateixos introns. A nivell de DNA, els introns poden contenir seqüències derivades de transposons que funcionen com a promotors de RNA polimerasa II, de forma que un intró pot iniciar la transcripció de ncRNA independentment de l'activitat del promotor del gen ⁴. L'ús que fa la cèl·lula d'aquests ncRNA transcrits des d'introns també ha estat estudiat, el fet de compartir locus genòmic amb el transcrit que prové del promotor normal del gen fa que l'estat de la cromatina, i per tant de part de la regulació transcripcional, estigui compartida entre l'mRNA i el ncRNA. Aquest fet és útil si la funció del ncRNA recau sobre el mateix gen que el conté. Per exemple, s'ha demostrat la funció de ncRNA intrònics sobre el patró d'*splicing* o sobre l'estabilitat de l'mRNA del mateix gen ^{5,6} o fins i tot sobre la seva traducció ⁷. Els introns també poden funcionar com a fons alternatives de miRNA, els anomenats mirtrons poden tenir vies de síntesi diferents de les canòniques, i són produïts a partir de l'intró un cop aquest ha sigut escindit de l'RNA per *splicing* ⁸.

Tot i les funcions que exerceixen per si mateixos, el propòsit més obvi i estudiat dels introns és diversificar el proteoma. Mitjanant *splicing* alternatiu un mateix gen pot donar lloc a multitud d'mRNAs madurs diferents, codificant per a proteïnes amb funcions variables ⁹. Aquest mecanisme s'associa a diferents funcions específiques a diferents teixits, codificades pel mateix gen amb diferent patró d'*splicing*, i és tan important que succeeix virtualment a tots els gens que tenen més d'un exó ¹⁰. Existeixen múltiples tipus d'*splicing* alternatiu, tots ells es basen en el manteniment o l'exclusió de seqüències presents al pre-mRNA durant el seu processament, donant lloc a varietat d'mRNA madurs ¹¹. Aquesta selecció de seqüències no només afecta la part de l'mRNA que codificarà per proteïna, sinó que també pot afectar les regions no traduïdes a 3' o 5' (3' o 5' *UTR*, de les seves sigles en anglès *UnTranslated Regions*). D'aquesta manera l'*splicing* alternatiu no només diversifica el proteoma, sinó també el control de la seva expressió espaciotemporal ^{12,13}. L'*splicing* alternatiu succeeix a tots els teixits, però està especialment estès al sistema nerviós, a més, els casos d'*splicing* detectats a aquests teixits estan més conservats que en altres, suggerint que participen en processos importants ¹⁴.

2. Retenció intrònica

En descobrir la presència d'introns als gens eucariotes, el fet que la seva eliminació pogués no ser cent per cent eficient es va hipotetitzar de seguida ¹⁵. Aquest fenomen, conegut com a retenció intrònica, succeeix quan un intró es transcriu en el context d'un pre-mRNA però durant el procés d'*splicing* no és reconegut com a intró, i per tant roman a l'mRNA madur, sigui o no exportat al citoplasma. Investigacions recents

apunten al fet que la retenció d'introns succeeix a molts transcrits ^{16,17}, tot i això, és un camp d'estudi molt recent i hi ha pocs casos en què es conegui la funció de l'intró retés. Actualment s'estudia activament i moltes hipòtesis interessants s'estan investigant en paral·lel (per a revisions, Buckley et al. 2014; Wong et al. 2016).

2.1. *Splicing* extranuclear

Fa més d'una dècada, es va demostrar que les plaquetes acumulen durant la seva formació transcrits de IL1b que retenen un intró. Les plaquetes es formen per gemmació i no tenen nucli, tot i així són capaces de processar l'intró retés a l'mRNA de IL1b quan reben un estímul, donant lloc a l'mRNA canònic de IL1b i a la proteïna sencera i funcional ²⁰.

Excepte aquest cas en cèl·lules anucleades, les evidències per a la capacitat de dur a terme *splicing* fora del nucli són escasses i molt discutides. Tot i això, a cèl·lules molt grans i polaritzades com les neurones, la possibilitat de retenir introns i generar diferents espècies d'mRNA madur a les dendrites en resposta a diferents estímuls locals té beneficis obvis i aportaria a les neurones flexibilitat i capacitat de resposta localitzada. L'evidència més forta en aquest sentit prové de la demostració de la capacitat d'*splicing* de dendrites aïllades del seu cos cel·lular i transfectades amb mRNAs reporters que contenen un intró ²¹. Aquest estudi demostrava també la presència de factors d'*splicing* a les dendrites de neurones, i la seva capacitat de processar i traduir a proteïna un mRNA amb un intró retés.

Estudis més recents han analitzat la presència de components d'un subtipus d'spliceosoma fora del nucli. Els introns processats per aquest spliceosoma representen aproximadament un 0.3% del total d'introns, i l'estudi argumenta que, en contraposició al grup majoritari d'introns, aquests serien processats al citoplasma ²². Aquesta possibilitat contra el dogma de l'*splicing* cotranscripcional i nuclear ha estat qüestionada ²³⁻²⁶. Tot i així, la possibilitat d'un mecanisme alternatiu d'*splicing* citoplasmàtic roman oberta.

2.2. Control post-transcripcional dels nivells d'mRNA

Es coneixen multitud d'exemples sobre la regulació de l'expressió de gens a nivell transcripcional, es pot argumentar que és la principal via de què disposa la cèl·lula per controlar els nivells dels diferents mRNAs. Tot i això, diversos aspectes del destí dels transcrits són regulats a nivell post-transcripcional. Com s'ha comentat, els *UTRs* dels mRNAs contenen informació que afectarà no només l'expressió espaciotemporal dels mRNAs que els contenen, sinó també la seva estabilitat. Recentment s'ha descobert que la retenció intrònica també pot jugar un paper controlant l'expressió dels gens que els contenen de diferents maneres.

En el procés de diferenciació neuronal, per exemple, la proteïna PTBP1 s'expressa a nivells alts en cèl·lules mare neuronals i molt poc a neurones diferenciades. Diversos estudis han comprovat l'efecte de PTBP1 sobre gens importants per a la pre i postsinapsis ^{27,28}. PTBP1 promou la retenció de determinats introns, particularment d'aquells situats al 3' dels gens importants per a les neurones madures. D'aquesta

manera, PTBP1 i la retenció intrònica que genera regulen post-transcripcionalment l'expressió de proteïnes a estadis de la diferenciació on encara no són necessàries.

A banda del context de diferenciació neuronal, la retenció intrònica s'ha demostrat recentment important per a permetre a la neurona madura modular ràpidament els nivells d'expressió de diversos gens en resposta a estímuls. Les ràtios de transcripció de la RNA polimerasa II són d'1-4 Kb / minut, i molts gens, especialment neuronals, tenen més de 100 kb. El ràpid canvi en expressió gènica en resposta a estímuls^{29,30}, ha de partir llavors d'algun tipus de reservori. Estudis recents³¹ demostren que gran quantitat d'introns són retinguts a mRNAs madurs i segrestats al nucli, formant un dipòsit que, gràcies a la ràpida cinètica de l'*splicing*, respon molt més ràpid a estímuls que la transcripció. Arribat el moment, l'intró es processa i l'mRNA madur s'allibera al citoplasma.

2.3. Afectació de la funció del gen que reté l'intró

Hi ha evidències disperses però concloents que alguns introns, retinguts a l'mRNA madur, poden ser exportats al citoplasma i afectar la funció del gen que els codifica. El gen de canal de potassi activat per calci *KCNMA1* té moltes isoformes d'*splicing*, algunes de les quals inclouen l'exó anomenat "STREX", d'aquestes, un ~20% retenen un intró i són exportades al citoplasma de la cèl·lula. Quan els nivells de la isoforma que reté l'intró disminueixen via transfecció d'un siRNA que hibrida amb la seqüència intrònica, la quantitat total de proteïna que conté el casset "STREX" baixa més d'un 60%, sobretot a les dendrites de les neurones. Aquesta baixada també afecta a la resposta electrofisiològica de la cèl·lula³². El fet que eliminar un 20% de les molècules d'mRNA afecti un 60% de la proteïna total, i que aquest efecte estigui concentrat a les dendrites, apunta que l'intró retés té un efecte sobre la població total d'mRNAs, no només sobre les molècules que el contenen. Aquests resultats quadrarien amb una funció de l'intró retés similar a les que tenen els ncRNAs que s'han descrit anteriorment.

Un cas similar afecta el gen *BK(Ca)*, que també reté un intró a l'mRNA madur d'algunes de les seves isoformes, representant un 10% de les molècules d'mRNA totals. Com al cas anterior, la transfecció d'un siRNA contra l'intró retés afecta als nivells de proteïna total. És interessant que aquesta afectació és encara més important a les espines dendrítiques, arribant a una reducció del 50% de la colocalització de BK(Ca) amb un marcador d'espines³³. Aquesta forta reducció provocada per la inhibició de només un 10% de l'mRNA torna a suggerir una funció de l'intró retés sobre la resta de mRNAs, actuant com a ncRNA.

A un tercer estudi es proposa un mecanisme més general que podria explicar els resultats anteriors, en què una fracció d'mRNA que reté un intró afecta una població molt més gran d'mRNAs totalment processats³⁴. Analitzant els introns que troben retinguts al citoplasma identifiquen elements ID, un tipus de seqüències curtes i repetides provinents de retrotransposons, els SINES³⁵. Fusionant aquests elements ID a gens reporters i transfectant-los a neurones troben que són suficients per localitzar a dendrites els mRNAs als que estan fusionats. La sobreexpressió d'aquests elements ID no només provoca la seva localització a dendrites, sinó que competeix amb la localització dels introns retinguts endògens de manera peculiar. Així, la sobreexpressió

de l'ID element de l'intró de *CaMKIIβ* impedeix la localització de l'mRNA que reté l'intró de *CaMKIIβ* i de *FMR1*, demostrant que algunes de les vies de transports d'aquests elements ID són compartides entre diversos introns. Altres, en canvi, són més específiques, ja que la sobreexpressió dels elements ID trobats als introns retinguts dels gens *GABRG* o *GRIK1* localitzaven a dendrites els seus mRNAs, però no competien amb la localització dels mRNAs intrònics endògens de *CaMKIIβ* ni de *FRM1*.

2.4. Diversificació del proteoma lligat a control de l'expressió

En general, l'*splicing* alternatiu és una manera de diversificar el proteoma, però les cèl·lules també l'utilitzen per controlar els nivells d'expressió de molts gens. Aquests mecanismes són especialment importants a l'hora de regular gens relacionats amb l'*splicing*³⁶ però succeeix a molts mRNAs de diferents famílies. El mecanisme utilitzat es basa en la inclusió o exclusió d'un exó que contingui un codó de terminació prematur (*PTC*, de l'anglès *Premature Termination Codon*). Les cèl·lules tenen un mecanisme, anomenat *NMD* (*Nonsense-Mediated decay*) pel qual, després de la primera ronda de traducció, si hi ha una unió exó-exó després del codó de terminació, l'mRNA és degradat ràpidament per evitar la producció de proteïnes truncades, potencialment deletèries per la cèl·lula³⁷.

En descobrir-se aquest mecanisme es va pensar que consistia exclusivament en un sistema de seguretat, que evitava traduir proteïnes provinents d'mRNAs amb errors. Però cada cop hi ha més evidències de l'ús de l'*NMD* com a control de l'expressió de gens, o com a mecanisme de control de la quantitat de proteïnes que s'obtidran d'un mRNA donat, ja que l'*NMD* permet una primera ronda de traducció abans de la degradació³⁸. Si l'intró conté codons de terminació i l'mRNA té unions exó-exó *downstream* de l'intró retingut, aquest mRNA traduirà una proteïna truncada i seguidament es degradarà. Aquesta retenció intrònica lligada a l'*NMD* s'ha observat com a mecanisme de degradació d'mRNAs que ja no eren necessaris per a la cèl·lula³⁹.

Més interessant encara, hi ha evidències de l'ús de retenció intrònica per a expressar variants proteiques que fan falta a una finestra de temps molt curta. Recentment s'ha demostrat que el gen *Robo3* expressa la forma amb l'*splicing* acabat (*Robo3.1*) i una isoforma que reté el penúltim intró (*Robo3.2*)⁴⁰. *Robo3.1* és un receptor de membrana expressat a la punta de l'axó neuronal, promovent atracció envers proteïnes senyalitzadores extracel·lulars⁴¹. És molt important per guiar el creixement de l'axó perquè sigui capaç de creuar la *midline*, però, un cop creuada, l'axó ha de sentir repulsió envers mateixa *midline* per tal de poder seguir avançant i no retrocedir. L'intró retingut a l'mRNA de *robo3.2* silencia la seva pròpia traducció fins que rep els estímuls propis de la *midline*. Un cop traduït, genera la mateixa proteïna que *robo3.1* però amb una part intracel·lular més curta, provocant repulsió en comptes d'atracció.

El fet que l'intró retingut a *Robo3.2* silenciï la seva pròpia traducció fins que l'axó travessa la *midline*, unit al fet que aquest mRNA es traduirà poques vegades, permet a la cèl·lula elaborar una resposta a una finestra espaciotemporal molt concreta. Aquí veiem un cas de retenció intrònica en què l'intró silencia la traducció, codifica per una

proteïna amb funció oposada a l'expressada per l'mRNA sense intró, i promou un control estricte dels nivells d'expressió d'aquesta proteïna.

Un cas similar afecta el principal exportador d'mRNAs del nucli al citosol, la proteïna Tap (codificada pel gen *Nxf1*). L'intró 10 d'*Nxf1* es reté i conté un *CTE* (de l'anglès, *Constitutive Transport Element*), que és reconegut per la mateixa proteïna Tap, exportant així l'mRNA amb l'intró retingut al citoplasma. Tot i que en aquest cas no s'ha estudiat el fenomen en profunditat, la disposició de l'intró retingut i el fet que la resta d'introns es processen de manera normal fa pensar que els seus nivells al citoplasma també es regulen per *NMD* ⁴². Temps després d'aquest estudi, es va descobrir que a neurones hipocampals i corticals, la proteïna truncada resultant de l'mRNA de *Nxf1* que reté l'intró 10 (anomenada sNxf1) està molt expressada a nucli i dendrites neuronals, colocalitzant amb marcadors de grànuls d'RNA com Staufen2. A més, actua com a cofactor de la proteïna sencera *Nxf1*, sent capaç de substituir el seu cofactor canònic, *Nxt1*, modulant en positiu l'expressió d'mRNAs que contenen *CTEs* ⁴³.

Com s'ha explicat per alguns ncRNAs a l'apartat "introns i *splicing*" la cèl·lula aprofita el mateix locus genòmic per transcriure una proteïna i el seu cofactor, regulant només la retenció intrònica, en comptes d'haver de regular dues unitats transcripcionals separades. A més, el fet de retenir l'intró trunca la proteïna, convertint-la en un cofactor, i converteix l'mRNA en candidat per a degradació via *NMD*, modulant efectivament els seus nivells.

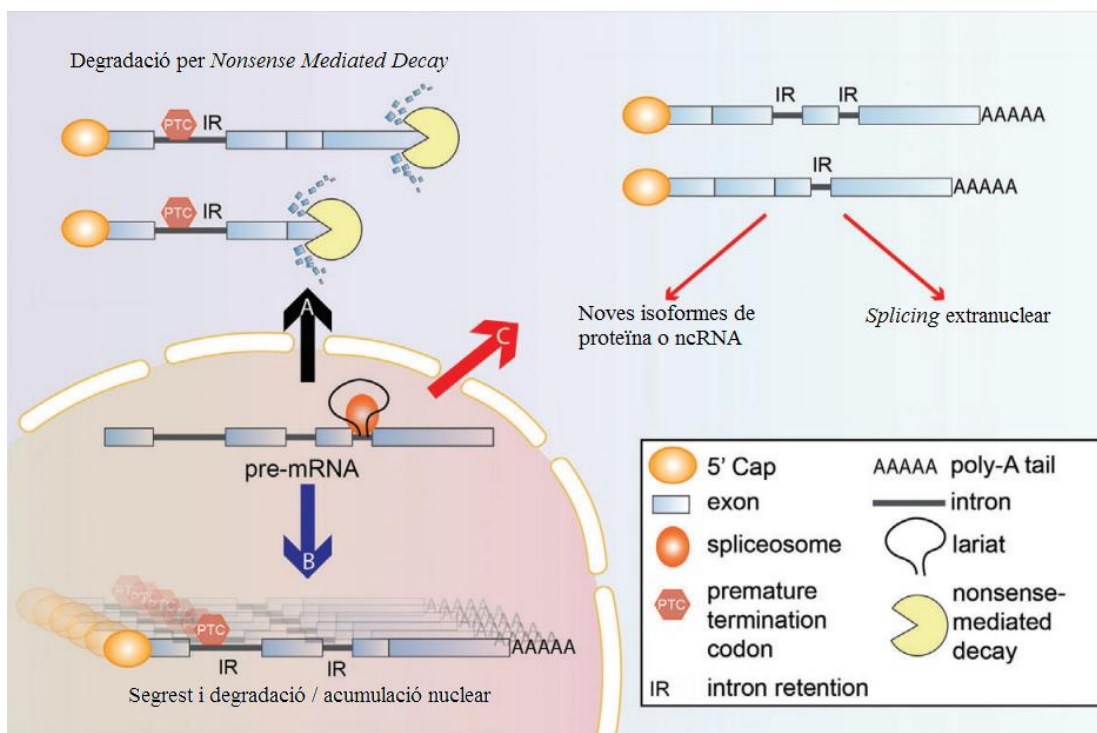


Figura 1. Possibles funcions demostrades per introns retinguts a l'mRNA

Imatge extreta i adaptada de Wong JJ., et al. 2016.

3. Transport a dendrites i control de la traducció d'mRNAs

El 1982 es van descobrir poliribosomes a les dendrites ⁴⁴, i més endavant el 1987 es va demostrar que l'RNA es transportava a les dendrites a neurones hipocampals en cultiu ⁴⁵. Aquest transport d'mRNA té conseqüències a nivell fisiològic, essent fonamental per al desenvolupament neuronal embrionari ⁴⁶, creixement de neurites ⁴⁷ i plasticitat sinàptica ⁴⁸.

Diferents estudis han trobat molts mRNAs localitzats a les dendrites cel·lulars, com *MAP2*, *CaMKII α* , *Arc*, *Shank1-3*, *SAPAP3*, i molts altres ⁴⁹⁻⁵⁴. Més recentment, tècniques d'aïllament i seqüenciació en massa d'mRNA de dendrites separades del soma cel·lular, així com hibridacions *in situ* fluorescents d'alta resolució han permès identificar i validar la presència de ~2500 transcrits diferents a les dendrites i axons de neurones hipocampals ⁵⁵. El fet que una varietat tan gran de mRNAs siguin transportats a dendrites implica una maquinària de transport i localització especialitzada, així com mecanismes dedicats de control de la traducció d'aquests mRNAs. Experiments similars van demostrar també la presència d'introns retinguts a un percentatge significativament alt dels gens pels quals es troben mRNAs a dendrites (~50%) ⁵⁶, suggerint que els mRNAs amb introns retinguts juguen un paper important o bé en el transport d'mRNAs o bé en la regulació local del proteoma neuronal.

3.1. Elements en CIS

El propi mRNA afecta la definició del seu lloc de transport i traducció, a la seva seqüència de nucleòtids un mRNA pot contenir informació important per al seu destí. Normalment, aquests elements de localització (*LE*, *Localization Element*) estan situats al 3'UTR. Tot i que es coneixen multitud d'mRNAs transportats a dendrites, caracteritzar un *LE* és molt difícil, i les aproximacions moltes vegades no són prou properes al context real *in vivo*. Per exemple, el 3'UTR de *CaMKII α* està molt estudiat, i s'ha demostrat necessari per a la seva localització a dendrites, però diferents estudis troben diferents *LE*, i els resultats *in vitro* no sempre concorden amb els *in vivo* ⁵⁷⁻⁶¹.

Això pot ser degut a les aproximacions utilitzades per a demostrar la competència dels *LE*, que acostumen a basar-se en gens reporters fusionats a la seqüència que es vol analitzar. La limitació principal d'aquesta tècnica és que aquests gens reporters es processen de forma molt diferent dels gens endògens. Els mRNAs passen per un processament molt complex des que són transcrits fins que surten del nucli, el seu destí subcel·lular es comença a definir abans de l'exportació al citoplasma ⁶². Durant el procés d'*splicing* no només s'eliminen els introns, sinó que complexos proteics són dipositats a les unions exó-exó, i acompanyaran l'mRNA fins que es tradueixi ⁶³. Per al gen de *Drosophila melanogaster* *Oskar*, s'ha demostrat que el seu processament nuclear afecta la seva localització al citoplasma ⁶⁴.

Un altre exemple paradigmàtic de la complexitat del transport a dendrites és el ncRNA *BC1* (*Brain Cytoplasmic RNA 1*), que és capaç de localitzar-se a dendrites neuronals i té una funció important com a modulador local de la traducció ⁶⁵, però quan es fusiona a 3'UTR de diferents gens utilitzats com a reporters, no els hi aporta localització dendrítica. ⁶⁶.

Una altra part de la dificultat associada a la descripció de *LE* és que poden ser reconeguts per les proteïnes efectores de diverses maneres diferents. Algunes proteïnes d'unió a RNA necessiten una seqüència determinada de bases en mRNA de cadena senzilla, un exemple és l'mRNA de *MBP*, conté dos *LEs* curts, d'11 nucleòtids al 3'*UTR* que són anomenats *A2RE* (de l'anglès, *A2 Response Elements*), ja que uneixen la proteïna hnRNPA2. Són necessaris i suficients per localitzar l'mRNA de *MBP* a les prolongacions dels oligodendròcits^{67,68}. El cas del *A2RE* és més aviat una excepció, la complexitat dels *LE* és tal que encara no hi ha un mètode establert per trobar seqüències consens d'unió per a cada proteïna d'unió a RNA, cada cas ha de ser avaluat experimentalment.

En general, les proteïnes d'unió a RNA poden reconèixer una seqüència de nucleòtids, l'estructura secundària que formen, o una combinació d'aquests dos factors, necessitant una seqüència determinada formant una estructura en concret. Els RNAs poden generar estructures per hibridació Watson-Crick, i moltes proteïnes uneixen RNA via dominis d'unió a RNA de doble cadena. S'han descrit diverses estructures, un exemple són els G-quadruplets, que estan presents al 3'*UTR* de molts mRNAs. Uneixen proteïnes d'unió a mRNA com FMRP i estan relacionats amb la localització de multitud de transcrits^{61,69}. Però estructures definides com els G-quadruplets no són la norma, a la gran majoria dels casos és molt difícil trobar la seqüència o estructura diana d'una proteïna d'unió a RNA de doble cadena, i l'única manera és utilitzar estratègies de *crosslinking* i seqüenciació⁷⁰.

Una tercera possibilitat és que el *LE* estigui format per una estructura secundària, com s'ha explicat anteriorment, però que aquesta estigui formada per la hibridació entre dues molècules d'mRNA diferents. Per definició, les seqüències d'mRNA que poden formar estructures secundàries per hibridació intramolecular també les poden formar per hibridació intermolecular. Tot i el fet que, en dendrites, els transcrits semblen viatjar majoritàriament en grànuls que contenen una sola molècula d'mRNA⁷¹, aquest fenomen d'hibridació intermolecular està descrit per a dos mRNAs de *D. melanogaster*, *Bicoid* i *Oskar*, i és indispensable per a la seva correcta localització. Aquesta oligomerització d'mRNAs s'interpreta com a possible pas necessari per a l'estabilització del grànul d'RNA que els transportarà, generant la seqüència de RNA de cadena doble que reconeixeran els factors en *trans*⁷²⁻⁷⁴.

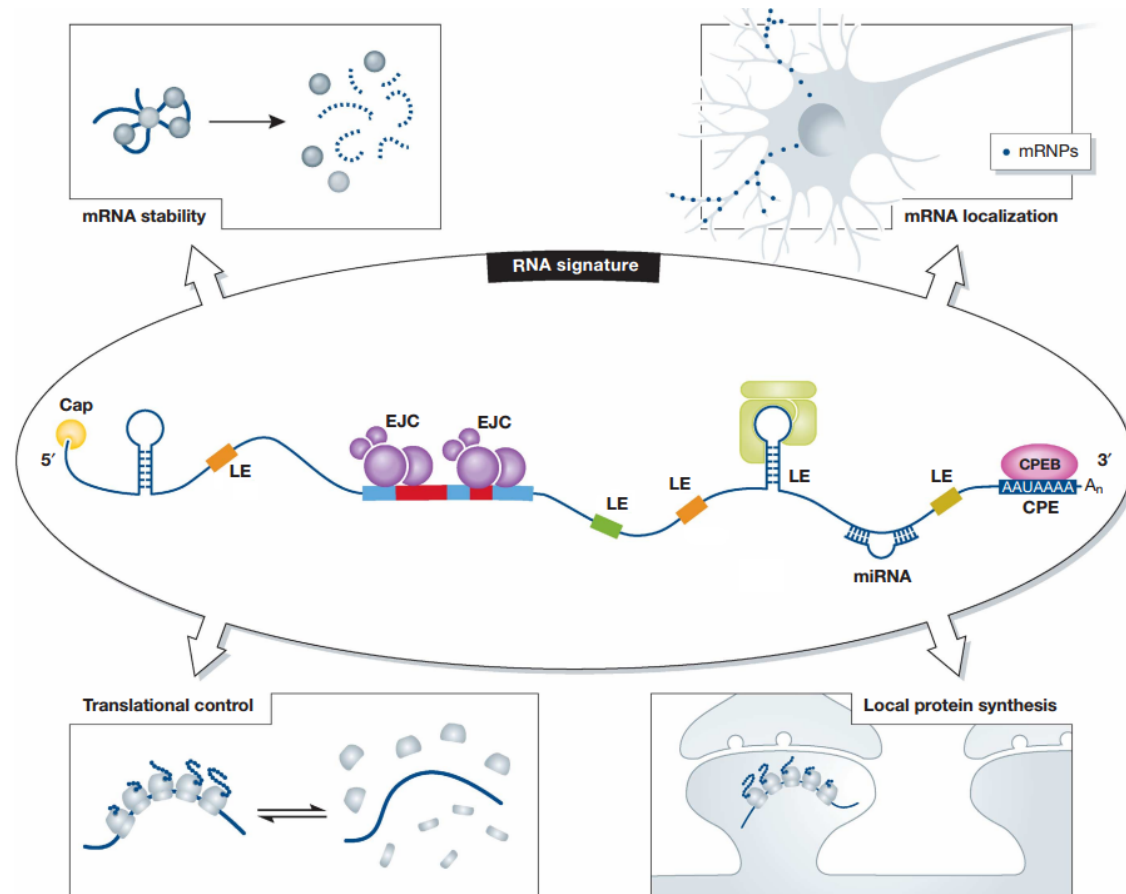


Figura 2. Resum de les diferents característiques presents a la seqüència de l'mRNA i els seus efectes

Imatge extreta i adaptada de Doyle M., et al. 2011.

3.2. Elements en *Trans*. Repressió de la traducció d'mRNAs

Quan es parla de transport o de grànuls d'RNAs s'han de tenir en compte dos aspectes fonamentals, la mateixa estructura que és responsable de la localització de l'mRNA a la regió cel·lular on es necessita ha d'incloure els mecanismes necessaris per inhibir la traducció d'aquest transcrit fins que arribi l'estímul o la localització adient. El descobriment de les estructures que es van anomenar grànuls d'RNA ja mostrava que incloïen mRNAs que eren alliberats i traduïts en resposta a estímul ⁷⁵.

Així, els elements en *trans* que uneixen els LE són responsables del seu transport i directament o indirectament del silenciament de la seva traducció ^{76,77}. Com hem dit a l'apartat anterior, és complicat definir clarament els LE dels UTR, ja que rares vegades són aïllats i detectables analitzant la seqüència de nucleòtids. Més aviat es tendeix a pensar que solapen seqüències i estructures d'RNA, reclutant multitud de proteïnes diferents que col·laboraran a l'hora de modular i localitzar l'mRNA en qüestió ⁷⁸.

CPEB

Un dels mecanismes més importants per a controlar la traducció d'mRNAs és la longitud de la seva cua d'adenines. Al nucli, els pre-mRNAs són tallats i poliadenilats en resposta a seqüències al seu 3'UTR, però la poliadenilació també és controlada i modificada al citoplasma. El model més estudiat són els oòcits de *Xenopus laevis*, on

molts mRNAs s'acumulen amb la traducció reprimida i cues d'unes 40 adenines, que s'allargaran fins a 150 en reentrar l'oòcit al cicle cel·lular, activant la seva traducció.

CPEB és el factor central en el control de la traducció lligada a poliadenilació en mRNAs que contenen *CPEs* (*Citoplasmatic Poliadenilation Element*). Estudis a *X. laevis* demostren que interacciona directament amb aquesta seqüència i coordina un complex proteic que inclou entre altres PARN i Gld2. PARN és una deadenilasa que manté la cua d'adenines curta, Gld2 en canvi és una polimerasa de poliadenines, encarregada d'afegir adenines a la cua de l'mRNA. En condicions normals, l'activitat de PARN sobrepassa la de Gld2 i la cua d'adenines del transcrit es manté curta, però en resposta a estímul, la quinasa Aurora A s'activa i fosforila CPEB. Aquesta fosforilació fa que CPEB expulsi PARN del complex proteic, promovent l'addició d'adenines via Gld2 i la traducció de l'mRNA ⁷⁹. La informació molecular es va descobrir a *X. laevis*, però els components de la maquinària de poliadenilació que interaccionen amb CPEB1 també estan presents a dendrites ⁸⁰⁻⁸². CPEB també promou a dendrites poliadenilació local de mRNAs en resposta a estímul, i s'ha demostrat la seva unió a dineïnes i kinesines, així com el seu transport a dendrites ^{83,84}. La seva manca a ratolins transgènics afecta diferents models de memòria (potenciació a llarg termini i extinció de memòries) que depenen de traducció local de proteïnes ^{85,86}.

ZBP

ZBP1 (*Zipcode Binding Protein 1*) és una de les proteïnes relacionades amb el transport d'mRNAs a dendrites més estudiades, sobretot pel que fa a la seva funció regulant el control de la traducció local de l'mRNA de β -actina. A diferència de CPEB, la unió de ZBP1 a la seva seqüència diana, el *Zipcode*, requereix que aquesta formi una estructura secundària determinada ⁸⁷.

La seva expressió comença durant el desenvolupament neuronal, on ZBP1 s'encarrega de controlar la traducció en resposta a estímul de β -actina als cons de creixement dendrític i axonal ^{88,89}. A neurones madures, la seva expressió és més baixa que durant el desenvolupament, però reté tot i així un rol important, situant l'mRNA de β -actina a la base de les espines dendrítiques ⁹⁰ i modulant la seva traducció local. Es coneix que si es disminueixen els nivells de ZBP1 a neurones via RNA d'interferència, l'aparició de nous fil·lopodis en resposta a estímul (procés dependent de citoesquelet d'actina) disminueix significativament. En la mateixa línia, si se sobreexpressa l'mRNA de β -actina a neurones, aquestes desenvoluparan més fil·lopodis en un procés dependent del *Zipcode Binding Sequence* present al 3'UTR de l'mRNA ⁹¹.

Al context de l'esquina dendrítica o el conus de creixement axonal o dendrític, la resposta a l'estímul extracel·lular necessitarà canvis en la dinàmica al citoesquelet d'actina. Tant el creixement dels axons i dendrites com l'aparició de fil·lopodis i la seva remodelació són processos dependents de polimerització d'actina. Per aquest motiu, tots aquests estímuls enumerats desemboquen en l'activació de la quinasa Src, que fosforila ZBP1 alliberant l'mRNA de β -actina perquè sigui traduït ⁹².

Staufen1/2

A l'igual que CPEB, la família de proteïnes Staufen també està relacionada amb multitud de processos de localització d'mRNAs a diferents organismes, essent descoberta primer a *D. melanogaster* per la seva funció crítica localitzant els mRNAs d'*Oskar* i *Bicoid*, importants per al desenvolupament de l'oòcit⁹³. Però, a diferència d'altres proteïnes d'unió a RNA, Staufen té diversos dominis dsRBDs, que interaccionen amb estructures secundàries d'RNA, contactant amb la cadena de fosfats i els grups -OH. D'aquesta manera, les interaccions d'Staufen amb l'RNA són dependents de la seva estructura, i no de la seva seqüència⁹⁴. Així, no es pot determinar la unió d'un mRNA amb Staufen només mirant la seva seqüència de nucleòtids, tot i que es comencen a discernir les estructures responsables de la unió d'Staufen^{95,96}, la determinació del lloc d'unió a un mRNA en particular requereix tècniques avançades de *crosslinking* i seqüenciació⁷⁰.

A mamífers, existeixen Staufen1 i Staufen2, la primera és ubiqua i la segona s'expressa principalment al cervell. Es creu que les seves funcions són semblants, però afecten grups d'mRNAs diferents, ja que no colocalitzen a neurones.⁹⁷ Staufen és objecte d'estudi per la seva funció al transport d'mRNA a dendrites⁹⁸, és un marcador reconegut de grànuls d'mRNA, i es mou a les dendrites utilitzant el citoesquelet de tubulina⁹⁹.

Tot i que ambdues Staufen1 i Staufen2 tenen un efecte similar sobre la maduració i funcionament de les espines dendrítiques a neurones madures¹⁰⁰, últimament Staufen2 ha rebut més atenció, i s'han descrit els mRNAs que interaccionen amb aquesta proteïna al cervell del ratolí. Mentre els interactors d'Staufen2 sumen uns 1200 mRNAs, el número de transcrits que disminueixen o augmenten en absència d'Staufen2 (via RNA d'interferència) es redueix a 38.^{96,101} La majoria dels mRNAs que copurifiquen amb Staufen2 són transportats a dendrites, i el que sigui important per als nivells de només 38 d'ells suggereix que pot estar regulant multitud de processos relatius al transport d'mRNAs, un dels quals tindria a veure amb l'estabilització dels transcrits. Es coneix que Staufen2 és importada i exportada del nucli cel·lular, interaccionant allà amb RNAs i participant en la seva exportació al citoplasma per diferents vies, algunes de les quals necessiten la seva unió a dsRNA^{102,103}. Aquest fet obre la porta a què Staufen2 pugui funcionar com a adaptador per a l'exportació d'mRNAs, ja que interacciona també amb proteïnes del porus nuclear. També s'ha hipotetitzat que la unió entre Staufen2 i l'mRNA al nucli és el primer pas per a la inclusió d'aquest a grànuls d'RNA, dels quals es coneix que es comencen a formar al nucli i el seu assemblatge termina al citoplasma. Staufen2 podria estar funcionant també com a adaptador, o bé marcar els mRNAs seleccionats per al seu transport.

Pel que fa als grànuls d'RNA que contenen Staufen2, la traducció dels seus mRNAs està controlada, ja que contenen FMRP, DDX6 i components de la maquinària de silenciament dependent de miRNAs RISC, tots ells silenciadors de la traducció d'mRNAs. A més, CBP80 i PABPN1 estan presents a l'immunoprecipitat d'Staufen2, però no eIF4E. Es coneix que aquesta proteïna substitueix les dues primeres en mRNAs que s'estan traduint activament¹⁰¹.

Proteïna	Elements en <i>CIS</i>	Fonts
FMRP	G-quadruplets al 3' <i>UTR</i>	Dicthenberg JB., et al. 2008 Subramanian M., et al. 2011
CPEB	CPEs al 3' <i>UTR</i>	Huang YS., et al. 2003
hnRNPA2	A2REs al 3' <i>UTR</i>	Gao Y., et al. 2008
ZBP	<i>Zipcode element</i> al 3' <i>UTR</i>	Tiruchinaopalli DM, et al. 2003 Eom T., et al. 2003
Staufen1/2	Estructures secundaries a l'RNA	Tang SJ., et al. 2001 Duchanine TF., et al. 2002

Taula 1. Proteïnes d'unió a mRNA

Principals proteïnes relacionades amb el transport d'mRNAs, element en *CIS* que uneixen i principals recursos bibliogràfics.

4. CaMKII α

4.1. Estructura i autoregulació

La família de proteïnes quinases dependent de Calmodulina (CaMK) tenen en comú la necessitat d'unió a calci i Calmodulina (Ca/CaM) per assolir un nivell alt d'activació ¹⁰⁴, són així quinases que detecten els nivells intracel·lulars de calci. Hi ha multitud de quinases dependent de Calmodulina, però el nom de CaMK s'acostuma a utilitzar per a aquelles que tenen més d'un substrat, CaMKK, CaMKI, CaMKII i CaMKIV. Totes elles consisteixen en un domini quinasa, un domini autoregulador i un domini d'unió a Calmodulina extremadament similar entre les tres, les principals diferències són les cues N i C terminal, que participen en la regulació de la localització intracel·lular, l'activitat quinasa, l'adquisició d'independència als nivells de calci i la multimerització. CaMKIV és predominantment nuclear, i fosforila principalment factors de transcripció, essent important per a la transcripció necessària per al manteniment de l'*LTP* (*Long Term Potentiation*) a llarg termini. CaMKI és citoplasmàtica, i s'ha demostrat necessària tant per la creació de l'arbre dendrític neuronal com per al correcte creixement de l'axó. CaMKK està situada *upstream* de CaMKI i CaMKIV i regula la seva activació i adquisició d'independència a Ca/CaM (per a revisió: Wayman, G. A. *et al.* 2008¹⁰⁵).

CaMKII està codificada per quatre gens (α , β , γ i δ) i és l'única proteïna de la família que té al seu C terminal un domini de multimerització, separat del domini autoregulador per una seqüència anomenada *linker*. La principal diferència entre les proteïnes codificades pels quatre gens és la longitud i característiques d'aquest *linker* ¹⁰⁶. Tot i que els quatre gens són expressats a cervell ¹⁰⁷, les formes α i β són les més abundants, exclusives de cervell, i components principals de la densitat postsinàptica.

Les quatre isoformes de CaMKII poden oligomeritzar entre elles, però la majoria de dodecamers de CaMKII a les neurones estan formades per homoenzims o heteroenzims de les subunitats α i β ¹⁰⁸.

El domini de multimerització característic de CaMKII forma dos anells hexamèrics, que s'uneixen formant l'estructura dodecaèdrica final en què CaMKII és funcional. La disposició final del dodecamer consisteix en un anell central format per l'agrupació dels dominis de multimerització de les dotze subunitats que formen l'holoenzim. D'aquest anell emergeixen radialment cap a l'exterior els *linkers*, que separen els dominis de multimerització dels dominis d'unió a Ca/CaM, d'autoregulació, i finalment del domini quinasa ¹⁰⁶. Aquesta disposició confereix a CaMKII un mecanisme d'autoregulació absent a altres membres de la família CaMK. Una subunitat de CaMKII, un cop activada per Ca/CaM, és capaç de fosforilar una altra subunitat del mateix holoenzim a T286 si aquesta també està unida a Ca/CaM. Una subunitat de CaMKII activada per fosforilació a T286 s'autofosforilara a T305 i T306 tanmateix perdí la unió a Ca/CaM ¹⁰⁹, i això impedirà que s'hi uneixi de nou. Així, la CaMKII activada pot regular tant la seva activitat independent dels nivells de calci, com la seva insensibilitat als canvis posteriors en els nivells d'aquest ió.

4.2. Regulador central de l'activitat postsinàptica

L'estimulació d'una sinapsi promou canvis que afecten la seva capacitat de transmissió sinàptica. Després de rebre un determinat estímul sinàptic, multitud de proteïnes es desplacen a l'espina dendrítica, la morfologia d'aquesta es modifica depenent de canvis al citoesquelet, i s'activa la traducció local de proteïnes importants per a la sinapsi. Si aquests estímuls es repeteixen amb una duració i freqüència determinades, l'augment en la força de la sinapsi i en la mida de l'espina que la conté continuaran.

Els diferents mecanismes d'autoregulació de CaMKII permeten que sigui un sensor perfecte dels nivells de calci intracel·lulars presents i passats. Com hem dit, les subunitats del dodecamer que perdin la unió a Ca/CaM retindran activitat independent i insensible als nivells de calci, fins que sigui defosforilada per fosfatases presents a la postsinapsis. D'aquesta manera, l'activitat de CaMKII α dependrà de l'equilibri entre l'actuació de les fosfatases i els increments als nivells de calci intracel·lular que provoquen la seva autofosforilació, actuant per tant com a sensor de la freqüència d'estímuls sinàptics que provoquen entrada de calci a la postsinapsis ¹¹⁰.

L'activitat quinasa de CaMKII és així el canalitzador que activa multitud de processos postsinàptics en resposta a freqüència i amplitud de l'estimulació sinàptica. Entre altres, CaMKII α fosforila diverses subunitats de receptors AMPA i augmenta la transmissió iònica, de la mateixa manera, participa en la translocació de nous receptors AMPA a la membrana sinàptica ¹¹¹. La regió autoinhibidora de CaMKII també uneix NR2B, subunitat de receptor NMDA, aquesta unió separa aquesta regió autoinhibidora de la regió quinasa de CaMKII, resultant en el seu bloqueig en un estat activat, independent d'autofosforilació, proporcionant així CaMKII constitutivament activa a la postsinapsis ¹¹². CaMKII també s'ha demostrat important a l'estructura de l'espina dendrítica, via modulació de proteïnes estructurals com PSD-95 ^{113,114}, i també via citoesquelet d'actina, fosforilant reguladors del citoesquelet ¹¹⁵. CaMKII β conté al seu *linker* un domini d'interacció amb actina, que s'ha demostrat important per la

morfologia de l'espina dendrítica. Aquest domini apropa CaMKII al citoesquelet d'actina de l'espina, on té una funció com a quinasa ¹¹⁶, així com una funció estructural ¹¹⁷.

4.3. Transport del seu mRNA a dendrites

L'abundància i importància de CaMKII a la plasticitat sinàptica han provocat que siguin uns dels gens d'expressió neuronal més estudiats, tant a nivell de proteïna com d'mRNA, com s'ha explicat, les dues isoformes més abundants a cervell són CaMKII α i CaMKII β . Tot i que ambdues proteïnes es localitzen a dendrites i espines dendrítiques, només l'mRNA de *CaMKII α* es transporta a dendrites i es tradueix localment. ⁵². El fet que aquest transport és molt important per a la funció sinàptica ¹¹⁸ va desencadenar el seu estudi en profunditat.

La primera evidència del seu mecanisme de localització ve d'un ratolí *knock in* al qual s'havia introduït el gen reporter *LacZ* seguit del 3'UTR complet de *CaMKII α* . El gen reporter es localitzava i traduïa a dendrites, demostrat que el 3'UTR és suficient per a la traducció local d'aquest mRNA ¹¹⁹. Determinar els *LEs* concrets que actuaven dintre del 3'UTR es va demostrar molt més complex.

Un altre estudi va analitzar el 3'UTR de *CaMKII α* , trobant dues seqüències importants per al transport a dendrites del transcrit. La primera consistia en 94 nucleòtids al començament del 3'UTR, que fusionats a un gen reporter són suficients per a promoure el seu transport a dendrites. A més, l'estudi demostrava la presència d'una seqüència d'unes 650 bases al mig del 3'UTR que inhibeix el transport dendrític, aquesta inhibició es revertida en cas d'estimulació neuronal, i només els plàsmids reporters que contenien ambdós *LEs* (el localitzador i l'inhibidor) mostraven localització diferent en resposta a estimulació ⁶⁰.

Utilitzant una estratègia similar basada en gens reporters, un altre grup va analitzar de nou el 3'UTR de *CaMKII α* i va descobrir un *LE* d'uns 1200 nt situat al mig del 3'UTR ⁵⁷. Aquest *LE* era també suficient per transportar mRNAs de fusió a les dendrites de cèl·lules transfectades. Aquests resultats oposats fen servir tècniques similars donen una idea de la dificultat d'execució i d'interpretació d'aquest tipus d'experiments.

Un altre grup va generar un ratolí *knock out*, en què es va eliminar gairebé tot el 3'UTR de *CaMKII α* del genoma, deixant intacta només el començament, que contenia íntegre el motiu de 94 nucleòtids identificat com a *LE*. Tècniques d'hibridació *in situ* van demostrar que aquesta versió de l'mRNA de *CaMKII α* que contenia només el principi del seu 3'UTR endogen s'expressava a nivells reduïts comparat amb el *wild-type*, però l'efecte més estrident era la distribució de l'mRNA, restringida al soma cel·lular ¹¹⁸. Aquesta aproximació demostrava que un *LE* capaç de localitzar un transgen a dendrites pot no ser competent per intervenir en el transport del gen endogen, o bé que els experiments en què un transgen se sobreexpressa no són prou propers a la situació *in vivo* per a poder ser interpretats correctament.

Més recentment s'han localitzat G-quadruplets, descrits anteriorment a aquest apartat, al 3'UTR de *CaMKII α* . Utilitzant de nou estratègies de sobreexpressió de gens reporters fusionats a 3'UTRs, demostren que eliminant només el G-quadruplet de la seqüència de l'UTR, aquesta perd tota la capacitat de localitzar el transgen a

dendrites. La fusió entre el gen reporter i el G-quadrupelet sol té capacitat de localització, però reduïda en comparació a la fusió amb el 3'UTR de *CaMKII α* complet⁶⁹. Aquesta última dada suggereix la col·laboració complexa entre diversos *LEs* per a localitzar efectivament els transcripts als seus destins subcel·lulars. Els G-quadrupelets són reconeguts per FMRP^{120,121}. Diversos estudis relacionen FMRP amb el control de la traducció local de *CaMKII α* ¹²², per tant, és de suposar que FMRP i els G-quadrupelets formen part de la xarxa de regulació de la localització i traducció de *CaMKII α* .

Estudis paral·lels han estudiat la presència de més senyals de localització al 3'UTR de *CaMKII α* . A la seva part 3' terminal, hi ha dues seqüències consens d'unió a CPEB. De nou, la fusió d'un fragment de 170 nucleòtids contenint les dues dianes de CPEB presents al 3'UTR de *CaMKII α* sembla suficient per localitzar el gen reporter a dendrites. Tot i que no es demostra la unió física de la proteïna amb la seqüència diana, a nivell funcional sembla que CPEB està controlant la poliadenilació, i per tant la traducció, de *CaMKII α* ^{59,80}. Una altra diana, aquest cop per hnRNPA2, ha sigut descrita més recentment al començament del 3'UTR de *CaMKII α* , de nou, l'estudi que l'analitza troba que és suficient per localitzar un gen reporter a dendrites, en aquest cas, demostren la unió física, *in vitro*, de hnRNPA2 a la seqüència *A2RE* concreta present a l'mRNA de *CaMKII α* . A més, demostren que la injecció a la neurona d'un anticòs per bloquejar específicament hnRNPA2 impedeix parcialment la localització a dendrites d'un mRNA marcat amb fluorescència coinjectat⁵⁸.

La família de proteïnes Staufen també s'ha demostrat important en la localització dendrítica de *CaMKII α* . Tot i que hi ha evidències d'estructures candidates, tant Staufen1 com Staufen2 uneixen estructures secundàries, de forma que no existeix una seqüència diana fàcilment identificable. A nivell fisiològic, la disminució dels nivells d'Staufen1 via RNA d'interferència afecta el transport de *CaMKII α* a dendrites¹²³. Recentment s'ha demostrat la relació entre Staufen2 i l'mRNA de *CaMKII α* , la disminució dels nivells d'Staufen2 no sembla afectar la quantitat o estabilitat de l'mRNA de *CaMKII α* , ni tampoc la seva distribució entre el nucli i el citoplasma de la neurona. Aquest fet està demostrat per dues aproximacions ortogonals, transfecció d'un RNA d'interferència contra Staufen2 i detecció de l'mRNA de *CaMKII α* via hibridització *in situ*, i infecció d'un shRNA contra Staufen2 i detecció dels nivells d'mRNAs via RNA-seq^{124,125}. Tot i això, en un estudi d'interacció per immunoprecipitació i RNA-seq, *CaMKII α* era un dels mRNA més abundants a la IP d'Staufen2, apareixent 3 cops més enriquit que a l'input.¹⁰¹

La suma de tots els estudis exposats suggereix que les interaccions que modulen els diferents aspectes del metabolisme citoplasmàtic dels mRNAs conformen una xarxa, on moltes proteïnes d'unió a RNA interaccionen amb el mateix 3'UTR, modulant additivament paràmetres com la seva localització, estabilitat i traducció en resposta a estímuls.

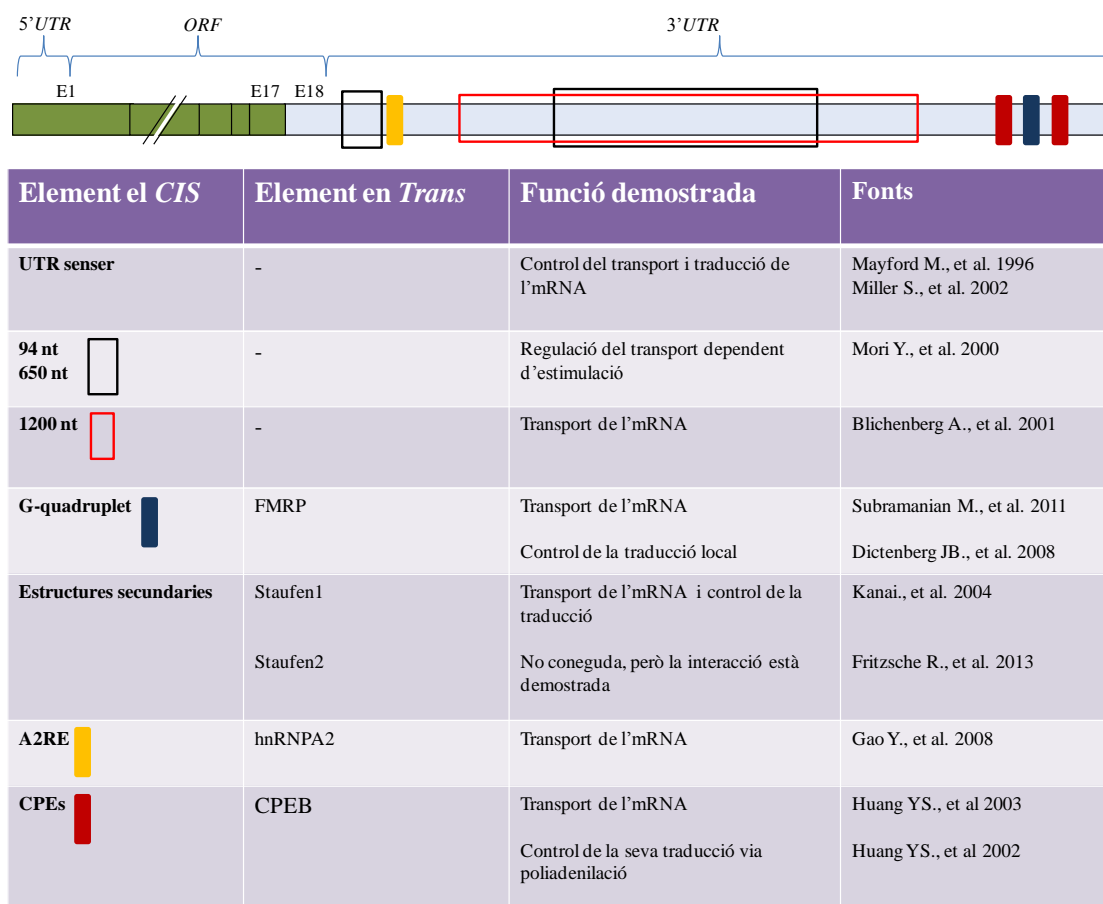


Figura 3. 3'UTR de *CaMKIIα*

Representació del 3'UTR i dels principals elements en *CIS* que hi conté. Resum de les proteïnes de transport d'mRNA que s'hi uneixen i principals fonts bibliogràfiques.

Objectius

- Analitzar la presència d'introns retinguts a mRNAs transportats a dendrites.
- Caracteritzar els mRNAs que contenen l'intró.
- Determinar la funció que els introns retinguts poden estar aportant als mRNAs.

Resultats

1. Retenció intrònica a mRNAs transportats a dendrites

Com que el camp d'estudi principal del grup són els mecanismes de control local de l'expressió d'mRNAs, sempre en el context de neurones excitadores, es va començar per una anàlisi exploratòria de diferents gens. Es van triar els gens de *CaMKII α* , *FMR1* i *GRIA3* per codificar per mRNAs transportats a dendrites en diferents quantitats, *CaMKII α* és l'mRNA més abundant a dendrites, i *FMR1* s'expressa a nivells més baixos. Però per a tots ells la seva traducció local està regulada i respon a estímuls sinàptics ⁵⁵.

La **figura 4A** mostra l'estratègia utilitzada per a la detecció, via retrotranscripció i PCR quantitativa (RT-qPCR), dels introns retinguts a l'mRNA citoplasmàtic. Per a cada intró, es va quantificar una de les seves unions exó-intró (exó_n-intró_n o bé intró_n-exó_{n+1}, la que tingués una millor seqüència per a la reacció de PCR) mitjançant sondes i primers que necessitessin la presència de l'intró i l'exó per poder amplificar. Quan era possible, la sonda anellava justament a la unió, trepitjant seqüència exònica i intrònica. Per corregir per les diferències a l'eficiència de les sondes, cada experiment es va fer relatiu a la detecció amb les mateixes sondes de DNA genòmic, que per definició té tots els introns en quantitats equimolars. Amb aquest sistema es van analitzar, dintre dels gens d'interès, introns dels quals se sabia que eren sotmesos a *splicing* alternatiu i d'altres que eren constitutivament eliminats del pre-mRNA, com a controls (basat en bases de dades com Ensembl).

Als tres gens utilitzats es van detectar desequilibris a la presència d'introns al citoplasma de cèl·lules corticals en cultiu que provenien de cervell embrionari, diferències que es mantenien quan s'analitzava RNA provenint dels seus sinaptoneurosomes (veure mètodes). La **figura 4B** mostra els resultats de la detecció, ja corregits per l'eficiència de les sondes i primers, mostrant que *CaMKII α* reté diferencialment els introns 14 (només a mostres que provenien de teixit embrionari) i 16 (basant la numeració en la isoforma d'*splicing* ENSMUST00000102888, la més abundant al cervell), *FMR1* reté l'intró 14, i *GRIA3* reté l'intró 13. Les unitats són arbitràries, en aquest cas relatives a la mitjana de la quantitat dels introns no retinguts per a cada gen.

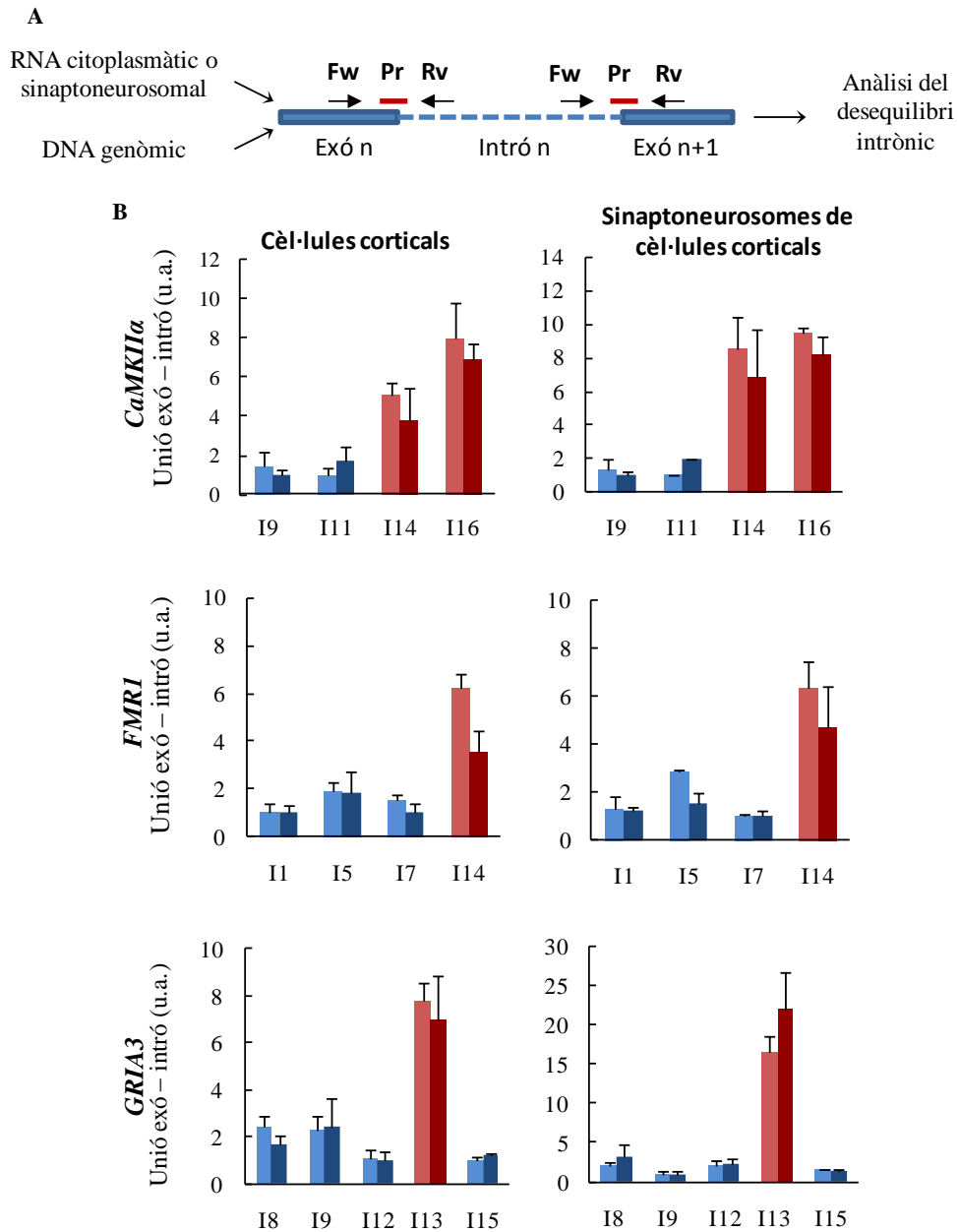


Figura 4. Els mRNAs analitzats presenten desequilibris intrònics

A. Esquema de l'anàlisi de la presència d'introns a l'mRNA per PCR quantitativa. **B.** Desequilibri intrònic a citoplasma de cèl·lules corticals (14 DIV) i sinaptoneurosomes obtinguts d'aquestes. Tots els resultats de PCR quantitativa es van fer relatius a DNA genòmic per corregir diferències a l'eficiència de les sondes i primers. Cada barra indica un experiment independent, les barres indiquen mitjana i interval de confiança ($\alpha=0.05$) per a triplicats tècnics. Cada experiment independent es va fer relatiu a la mitjana d'introns no retinguts.

2. Anàlisi del desequilibri intrònic de *CaMKII α*

Entre els tres gens que es van mesurar a l'anàlisi preliminar, es va triar la *CaMKII α* per al seu estudi en profunditat degut a la seva abundància i importància per a la plasticitat sinàptica^{55,126} i perquè altres estudis de seqüenciació massiva d'RNA han trobat també introns de *CaMKII α* retinguts a l'mRNA al citoplasma⁵⁶. A més, analitzant la seqüència dels diferents introns de *CaMKII α* , es va detectar la presència d'un element

ultra conservat (*UCE*, per les seves sigles en anglès *Ultra Conserved Element*) just al 5' de l'intró 16 (no així al 14), el que mostrava més retenció a l'estudi preliminar (figures 5A). La figura 5B mostra el percentatge d'identitat de tots els introns de *CaMKII α* , amb la línia taronja definint la identitat esperada en cas de no haver-hi cap tipus de conservació. Els *UCE* són seqüències de >100 bp que presenten un gran grau de conservació entre espècies ¹²⁷ que suggereix una importància crítica ¹²⁸, les funcions que s'associen a aquests elements són diverses, havent-hi evidències que algunes tenen com a funció regular el procés d'*splicing* ¹²⁹.

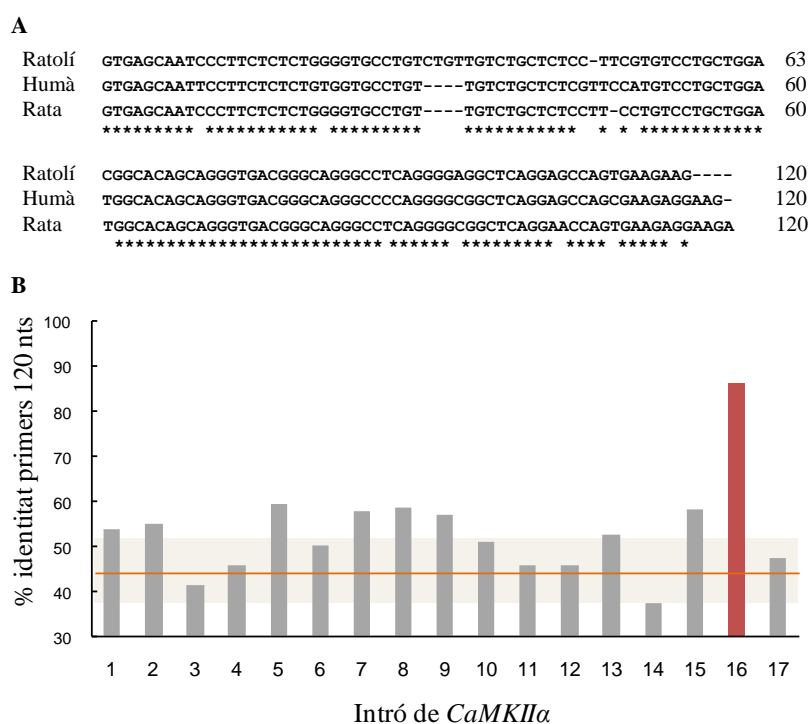


Figura 5. El 5' de l'intró 16 de *CaMKII α* conté un *UCE*
A. Alineament de la seqüència dels primers 120 nucleòtids de l'intró 16 de *CaMKII α* a ratolí, humà i rata.
B. Identitat dels primers 120 nucleòtids de cada intró de *CaMKII α* , en taronja, identitat esperada en cas de no haver-hi conservació.

Fent servir la mateixa estratègia que a l'anàlisi preliminar (figura 4A), es va analitzar el desequilibri intrònic per al gen de la *CaMKII α* a diferents mostres biològiques. Tant a extracte de cervell adult de ratolí, com fins i tot a la línia cel·lular de neuroblastoma de ratolí N2a s'observa un desequilibri, amb l'intró 16 enriquit aproximadament 10 vegades més que la mitjana de la resta d'introns (figures 6A i B respectivament). Totes les mostres van ser tractades per centrifugació diferencial abans d'extreure l'RNA per tal d'eliminar la fracció corresponent als nuclis (insert a la figura 6A). Tot i això, es va comprovar el desequilibri intrònic de *CaMKII α* a localitzacions especialitzades de les cèl·lules, obtenint les fraccions subcel·lulars corresponents a sinaptoneurosomes de cervell adult (figura 6C), i a sinaptoneurosomes de cèl·lules corticals *in vitro* (figura 6D). També es van purificar grànuls d'RNA de cervell adult de ratolí (figura 6E). La correcta purificació de la fracció desitjada es va comprovar per *western blot*, comparant marcadors postsinàptics (PSD-95, insert a figura 6D) al cas dels sinaptoneurosomes i marcadors de grànuls d'RNA (hnRNPA2/B1, insert a figura 6E).

Capítol 1

S'aprecia en totes les fraccions un enriquiment de l'intró 16 sobre la resta d'introns similar al que s'observa a l'extracte de cervells adults i cèl·lules corticals, demostrant que les formes d'mRNA que retenen l'intró no només surten del nucli, sinó que s'inclouen a grànuls d'RNA citoplasmàtics i arriben a les àrees cel·lulars on es duu a terme el contacte sinàptic, que nosaltres aïllem en forma de sinaptoneurosomes.

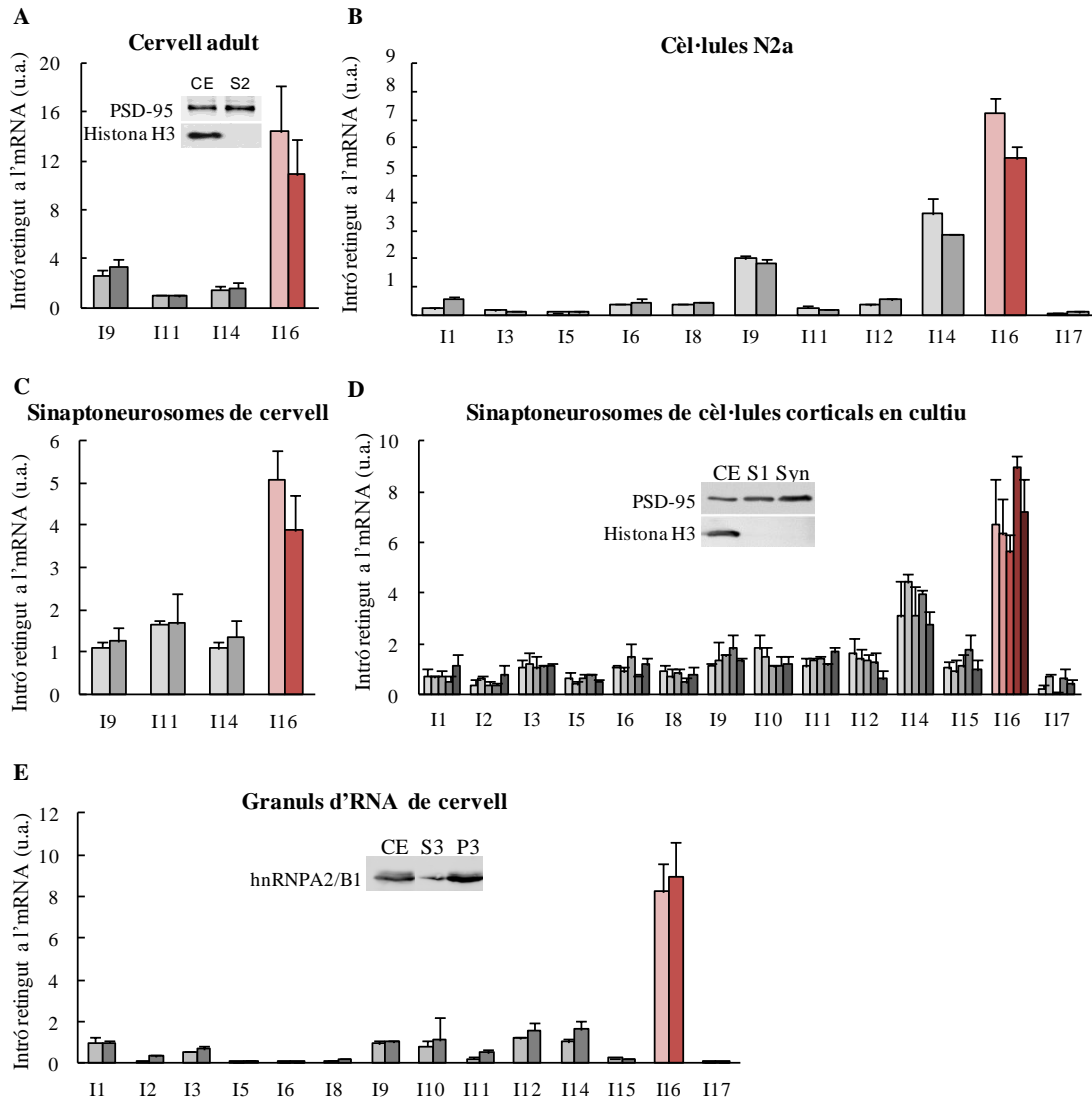


Figura 6. L'intró 16 de *CaMKII α* es reté diferencialment en diferents teixits neuronals

A-E. Anàlisi del desequilibri intrònic per al gen de *CaMKII α* en cervell adult, cèl·lules N2a, sinaptoneurosomes de cervell i de cèl·lules corticals in vitro i grànuls d'RNA de cervell, respectivament. A tots els casos l'RNA es va obtenir de mostres de les quals s'havien eliminat els nuclis per centrifugació (insert *western blot* a A). La purificació de sinaptoneurosomes es va comprovar per *western blot* contra marcadors de postsinapsis PSD-95 (insert a D). La purificació de grànuls d'RNA es va comprovar per *western blot* contra el marcador de grànuls hnRNPA2/B1 (insert a E). A tots els casos, els resultats de la qPCR quantitativa es van fer relatius a DNA genòmic per corregir per diferències en l'eficiència dels primers i sonda. Cada barra indica un experiment independent, les barres indiquen mitjana i interval de confiança ($\alpha=0.05$) per a triplicats tècnics. Cada experiment independent es va fer relatiu a la mitjana d'introns no retinguts.

3. Caracterització del transcrit de *CaMKII α* que reté l'intró 16

El fet que l'intró 16 de *CaMKII α* es trobi a tots els teixits i fraccions subcel·lulars aporta robustesa als resultats, i l'estratègia de PCR quantitativa utilitzada, amplificant la unió entre l'exó i l'intró contigus, informa inequívocament de què l'intró 16 està retingut, unit a l'exó immediatament anterior. Com que l'intró 14 només estava present en algunes de les mostres analitzades i no incloïa un *UCE* a la seva seqüència, es va triar l'intró 16 per al seu estudi en profunditat.

Es coneix que molts introns contenen seqüències que poden actuar com a promotors, activant la transcripció per generar, per exemple, ncRNAs⁴. Podria ser que l'intró previ al 16 tingués una d'aquestes seqüències, creant un transcrit que contindria l'intró 16 i el seu exó previ, essent detectat per la nostra estratègia de PCR quantitativa. Per descartar aquest cas, es va utilitzar una estratègia de PCR quantitativa canviant la localització d'un dels *primers* de la reacció, per tal que necessités la presència de l'exó previ a l'immediatament anterior a l'intró 16 (**figura 7A**). Es va comparar el resultat obtingut amb aquests *primers* amb l'obtingut amb l'estratègia usual per avaluar la retenció intrònica i amb un tercer joc de *primers*, que amplificarien l'hipotètic producte d'RNA resultant d'una transcripció que comencés a l'intró previ al 16 (I15-E16) (**figura 7B**). Per tal de poder comparar els resultats que dels diferents *primers*, la diferència en les seves eficiències es va corregir mitjançant DNA genòmic quan era possible o un transcrit equimolar. Els resultats obtinguts d'aquesta anàlisi confirmen que l'intró 16 de *CaMKII α* es reté en el context d'un mRNA madur. El fet que els *primers* utilitzats a la **figura 7A** donin la mateixa quantificació, molt més alta que la que resultaria en el cas d'una transcripció des de l'intró previ (I15-E16, **figura 7B**) corroboren que es tracta de retenció intrònica.

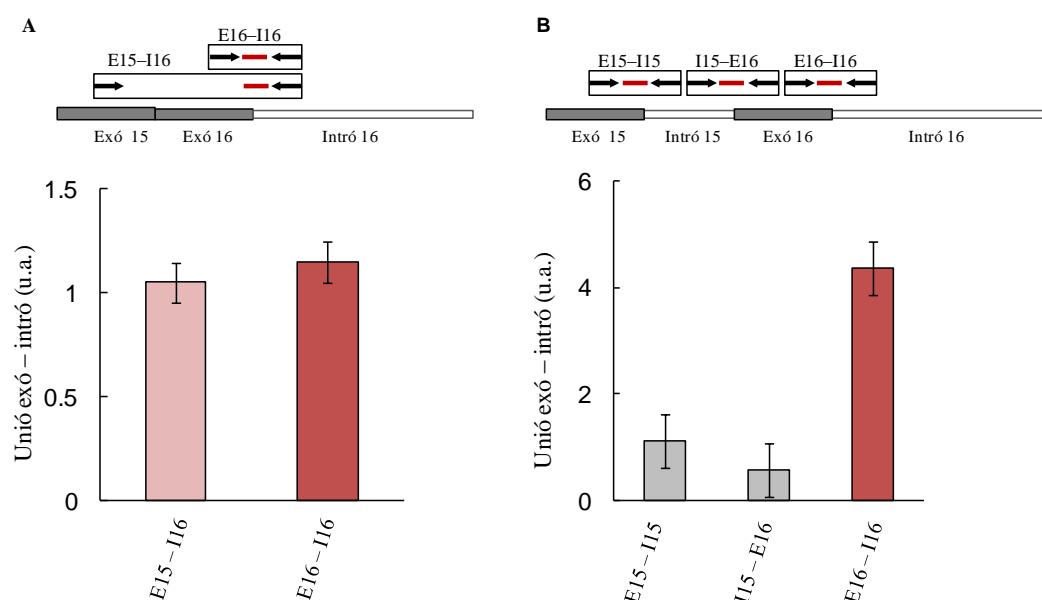


Figura 7. L'intró 16 es reté a un mRNA que també conte els exons 15 i 16

A. Anàlisi de la quantitat d'intró 16 retès a l'mRNA de la mateixa mostra que a la figura 6A, també per PCR quantitativa. Els resultats de les dues sondes es van fer relatius a la quantificació d'un transcrit equimolar per corregir diferències a l'eficiència. **B.** Com a A, però amb sondes contra les tres unions exó-intró. A tots els casos, cada barra mostra la mitjana de tres experiments independents i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

Capítol 1

L'estratègia de PCR quantitativa utilitzada fins ara només necessita unes poques bases de l'intró 16 per quantificar, de forma que l'intró 16 podria estar provocant una terminació prematura de la transcripció quan és retingut, i obtindríem els mateixos resultats que si es retingués sencer. Per confirmar que tot l'intró 16 està present en els transcrits analitzats fins ara, es va dur a terme una PCR semiquantitativa (la seqüència que formen la unió entre l'intró 16 i l'exó posterior és massa rica en guanines i citosines per a dur a terme una PCR quantitativa). Es van realitzar PCRs amb *primers* per a les unions exó 16-intró 16 i intró 16-exó 17 (**figura 8A**), corregint de nou les seves eficiències amplificant DNA genòmic. Els resultats ens permeten afirmar que les dues unions entre l'intró 16 i els exons contigus estan presents en la mateixa quantitat, és a dir, que el transcrit que conté l'intró 16 també conté l'exó 17, i presumiblement tots els elements posteriors que contindria un mRNA de *CaMKII α* en el que no s'ha retingut cap intró (**figura 8B**).

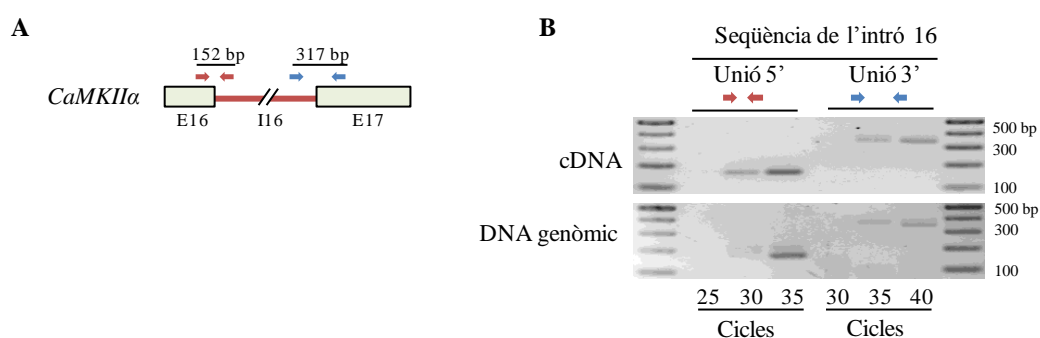


Figura 8. L'intró 16 es reté sencer

A. Esquema de l'exó₁₆-intró₁₆-exó₁₇ de *CaMKII α* i dels primers utilitzats per a la quantificació. **B.** Electroforesis en gel d'agarosa de l'amplificació per PCR semiquantitativa de les mateixes mostres que a la figura 6A i DNA genòmic per a controlar l'eficiència dels primers.

Per últim, existeixen diverses isoformes d'*splicing* de *CaMKII α* , tot i que la més estudiada és la que codifica per a la proteïna completa (utilitzada per a la nostra numeració dels introns, amb el codi d'Ensembl ENSMUST00000102888.9), existeixen altres isoformes molt menys abundants i estudiades. Una d'elles (codi d'Ensembl ENSMUST00000039904.6) consisteix en el domini d'associació de la proteïna, és a dir, la seva part 3', i podria contenir l'intró 16 (**figura 9A**). Per caracteritzar la presència de l'intró 16 a les dues isoformes d'*splicing* es va realitzar de nou una PCR semiquantitativa, ja que la seqüència a amplificar era massa llarga per a realitzar una PCR quantitativa. Les dues amplificacions tenien un primer en comú que anellava a l'intró, i un primer exclusiu per a la seva isoforma, aprofitant les diferències en la seqüència d'mRNA d'ambdues (**figura 9B**). L'eficiència d'amplificació dels primers es va comprovar amplificant un transcrit equimolar. El resultat de la PCR semiquantitativa demostra que l'intró 16 està retingut a la isoforma d'*splicing* que conté tots els exons de la *CaMKII α* , és a dir, la que vam fer servir per a numerar els introns i que codifica per a la proteïna sencera. El fet que hi hagi almenys 5 cicles de diferència entre el resultat de les dues PCRs ens diu que la isoforma amb l'intró 16 llarga és almenys 32 vegades més abundant que la curta, que està present en quantitats que podem ometre.

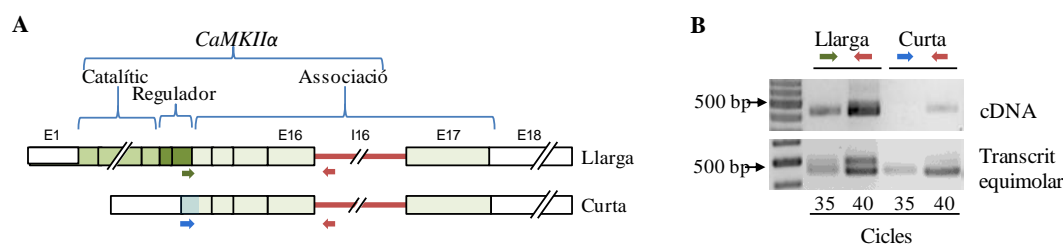


Figura 9. L'intró 16 es reté a la isoforma llarga de *CaMKIIα*

A. Diagrama de les isoformes llarga i curta de l'mRNA de *CaMKIIα* retenint l'intró 16 i els primers utilitzats per a la quantificació. **B.** Electroforesí en gel d'agarosa de l'amplificació per PCR semiquantitativa de les mateixes mostres que a la figura 6A i transcript equimolar per controlar l'eficiència dels primers.

Fins aquí, s'ha demostrat que l'intró 16 es reté complet a l'mRNA madur de *CaMKIIα*, isoforma ENSMUST00000102888.9. Combinant les dades del desequilibri intrònic i les presentades en aquest apartat també podem dir que quan es reté, està present en un context en el qual la resta d'introns han sigut eliminats per *splicing*. En resum, existeix una isoforma de *CaMKIIα* no descrita fins ara, que podríem afirmar és igual a la ENSMUST00000102888.9 però retenint l'intró 16.

4. Localització subcel·lular de la isoforma de *CaMKIIα* que reté l'intró 16

Tots els experiments realitzats fins ara partien de l'obtenció d'RNA de mostres de les quals s'havien eliminat els nuclis per centrifugació (demostrat al *western blot* de la figura 6A), tot i així, no es poden excloure petits nivells de contaminació. Les anàlisis bioquímiques no permeten diferenciar entre mRNAs citoplasmàtics i possibles contaminacions no eliminades de la fracció nuclear. Per tot això, es va dissenyar una estratègia ortogonal per demostrar la presència d'intró 16 de *CaMKIIα* al citoplasma i dendrites de les cèl·lules neuronals estudiades.

Es va realitzar una hibridació *in situ* fluorescent de molècula única (smFISH, per les seves sigles en anglès *single molecule Fluorescent In Situ Hybridization*), utilitzant el "ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit" (Affymetrix) (veure mètodes)¹³⁰. Estudis previs d'altres laboratoris l'han utilitzat per avaluar el transcriptoma neuronal amb una resolució de molècula d'mRNA única^{55,131,132}. La figura 10A mostra una imatge representativa del resultat de la smFISH a neurones hipocampals cultivades *in vitro* durant 14 dies. En vermell es pot veure el senyal obtingut amb les sondes contra l'intró 16, en verd la provinent de les sondes contra la part exònica de *CaMKIIα*, i en blau una immunofluorescència contra MAP2, una proteïna d'unió a microtúbuls utilitzada com a marcador de dendrites¹³³. Conseqüentment amb les dades obtingudes per PCR quantitativa, la figura mostra acumulació de l'intró al nucli de la cèl·lula (cercles amb línies discontinües), però també es detecta senyal provinent de les sondes contra l'intró fora dels nuclis, no només al soma cel·lular, sinó també a les zones distals de la cèl·lula, a les dendrites (detall a la figura 10B) Els resultats relatius al nombre de punts i distribució al soma i les dendrites de la sonda contra els exons de *CaMKIIα* concorden amb els obtinguts per altres grups mitjançant la mateixa aproximació⁵⁵.

A la imatge representativa s'observa manca de colocalització entre el senyal provinent de les sondes intròniques i les exòniques. Si l'intró 16 està retingut a l'mRNA de *CaMKIIα*, esperaríem tenir senyal exònica adjacent sempre que hi hagués un intró

detectat, però això només succeïa amb un 15% dels punts de smFISH intrònics (detall de la detecció a la **figura 10C**, quantificació a **figura 10D**, temps zero). El fet que al primer apartat trobéssim l'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16 a la fracció subcel·lular de grànuls d'RNA (**figura 6E**) ens va portar a pensar que la manca de colocalització podia ser deguda a problemes en la detecció de l'mRNA per les sondes de smFISH. Els grànuls d'RNA són estructures que contenen entre altres elements mRNAs, ribosomes i proteïnes, amb un grau de complexitat i compactació altes. A ¹³⁴ es demostra que els mRNAs que viatgen en aquests grànuls no són accessibles per a les sondes de FISH, i que després d'aquests grànuls via estímul o tractament amb proteases el nombre de partícules d'mRNA detectades per smFISH augmentava significativament.

Per comprovar si aquest era el nostre cas, es va realitzar una smFISH com a la **figura 10A**, però digerint amb pepsina després de fixar les cèl·lules i abans de realitzar la hibridació amb les sondes ¹³⁴, després així els grànuls d'RNA. La quantificació d'aquests experiments (**figura 10D**) mostra un increment significatiu de la colocalització intró-exó dependent del temps de tractament amb pepsina. Com s'ha comentat anteriorment, sense tractament aproximadament un 15% dels introns detectats tenen un exó adjacent, tractant 3 minuts amb pepsina aquest percentatge s'incrementa fins a un 35%. Tractar amb pepsina durant més temps comprometia la integritat de les cèl·lules en cultiu fins al punt de fer no interpretables els resultats de la smFISH. Tot i així, els resultats obtinguts i la dependència de la colocalització en el temps de digestió amb proteasa suggereixen que l'intró 16 i els exons de la *CaMKII α* estan adjacents dintre de la cèl·lula, i que la manca de colocalització és deguda a límits tècnics dels procediments utilitzats.

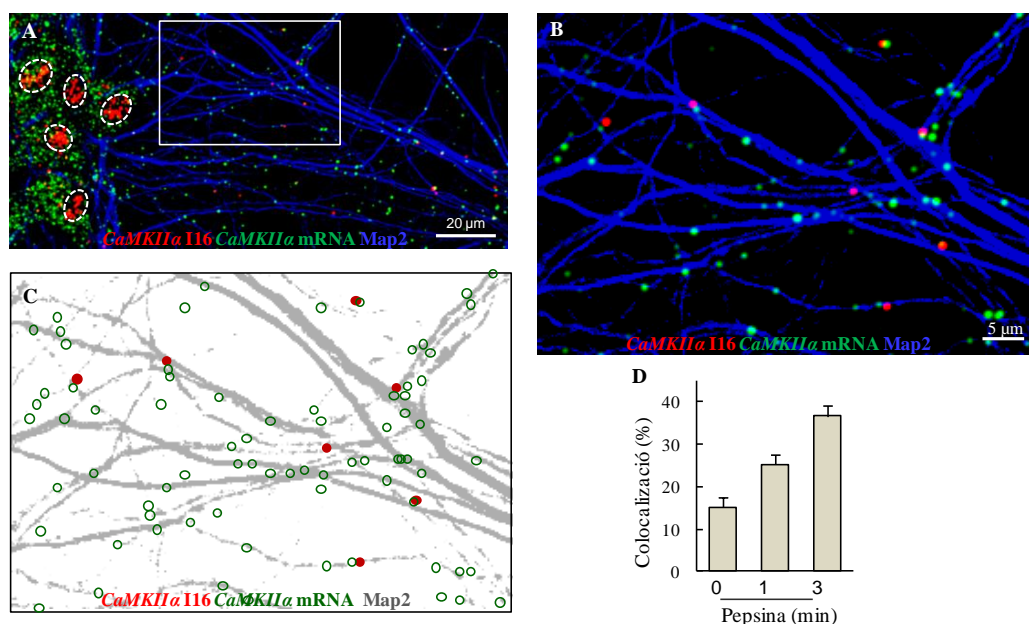


Figura 10. L'intró 16 de *CaMKII α* està present a dendrites neuronals i colocalitza amb l'mRNA totalment processat

A. Imatge representativa de la smFISH (intró 16 en vermell i exons de *CaMKII α*) i immunofluorescència (MAP2) realitzades a cèl·lules hipocampals cultivades *in vitro* a 14 DIV. **B.** Detall de la imatge a A, mostrant el senyal que prové de l'intró 16 a les dendrites. **C.** Detall de la detecció dels punts provenint de la smFISH amb el software ImageJ. **D.** Quantificació de la colocalització (distància inferior a 1 μm) del senyal provenint de l'intró 16 i l'mRNA de *CaMKII α* amb diferents temps de tractament amb pepsina. Cada barra representa dos experiments independents i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

Per caracteritzar la localització dintre de la neurona de l'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16, es van plantar neurones hipocampals a càmeres de PDMS "AXIS™ Axon Isolation Device, 900 μm " (AX90010, Millipore). En aquestes càmeres, les neurones es planten a uns canals rectangulars, dels quals emergeixen microcanals amb unes dimensions que permeten el pas de dendrites i axons, però no dels somes cel·lulars, aïllant així cossos i nuclis neuronals de les seves dendrites^{131,132}. Després de cultivar neurones hipocampals *in vitro* en aquestes càmeres durant 14 dies, es va realitzar una smFISH. La **figura 11A** mostra a l'esquerre una porció del canal que conté els somes cel·lulars, i a la dreta un microcanal, contenint diverses dendrites. S'observa que els introns arriben no només a les dendrites, sinó a les seves àrees més distals. El detall a la **figura 11B** mostra les zones més distals de les dendrites, amb la immunofluorescència més exposada per mostrar que tots els punts, tant intrònics com exònics, colocalitzen amb MAP2.

La distribució soma-citoplasma dels punts de *CaMKII α* exònica concorda amb resultats publicats per altres grups⁵⁵ però la quantificació dels mRNAs de *CaMKII α* que contenen l'intró 16 mostra que es fan més abundants a mesura que avancem en la dendrita. El percentatge d'intró 16 fet relatiu a la *CaMKII α* total és significativament més elevat a la dendrita proximal (10%) que al citosol (3%), i encara més a zones més distals de les dendrites, arribant a constituir un 30% de les partícules de *CaMKII α* (**figura 11C**)

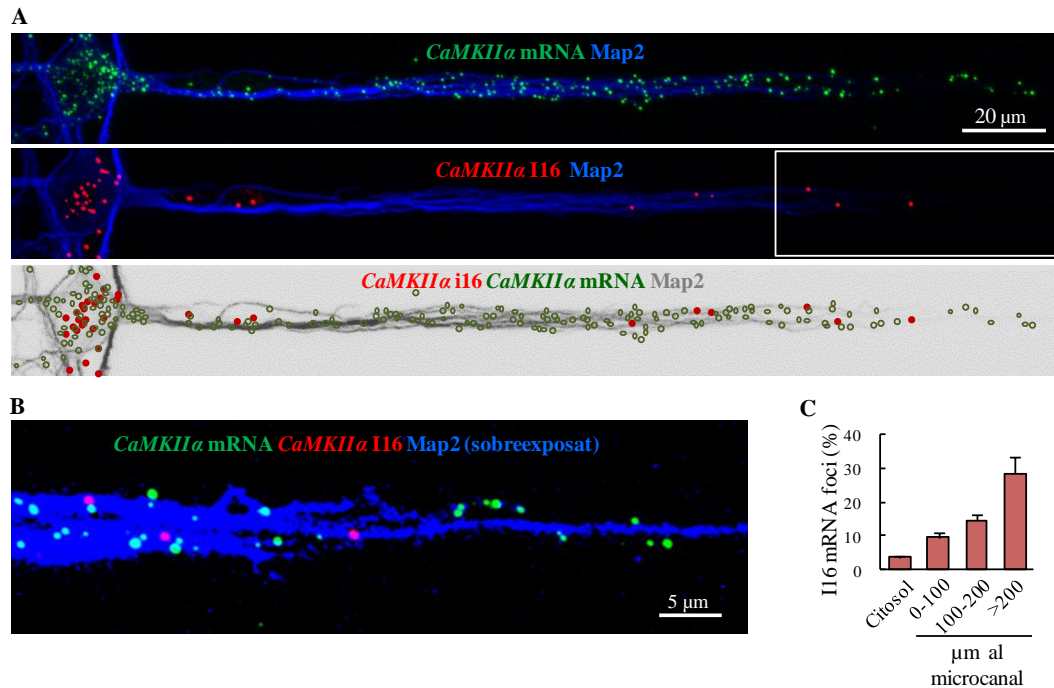


Figura 11. L'mRNA de *CaMKIIα* està particularment enriquit a zones distals de les dendrites

A. Imatge representativa d'un microcanal de les càmeres de cultiu de PDMS. Les neurones hipocàmpals van ser plantades en aquest dispositiu per separar dendrites de cossos cèl·lulars. Als 14 DIVs, es va realitzar la smFISH (en verd *CaMKIIα* mRNA, en vermell intró 16) i immunofluorescència (amb anticossos específics contra MAP2, en blau). La imatge inferior mostra la detecció amb FociJ del senyal de la smFISH. **B.** Detall de la zona més distal de les dendrites, amb el senyal de MAP2 incrementada digitalment, per tal de mostrar que tots els punts de la smFISH es localitzen a dendrites MAP2 positives. **C.** Quantificació de la smFISH a A. Percentatge de partícules intròniques (n=515) relatives a les exòniques (n=3997) a citosol i diferents distàncies al soma. Es mostra el ràtio i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

5. Interacció de l'intró 16 de *CaMKIIα* amb la proteïna d'unió a mRNA Staufen2

El transport d'mRNAs a dendrites és un dels mecanismes de regulació postranscripcional que utilitzen les neurones per poder respondre ràpidament i amb precisió a estímuls locals. Com que l'intró 16 es trobava a zones encara més distals que la *CaMKIIα* exònica, vam hipotetitzar que podia contenir a la seva seqüència elements d'unió a proteïnes de transport d'mRNAs, que li podien conferir capacitats de transport extremes o diferents de les descrites al 3' UTR de *CaMKIIα* (veure introducció).

Es coneixen moltes proteïnes que regulen el transport d'mRNAs i la seva traducció local, vam testar la unió a l'intró 16 de proteïnes que uneixen mRNAs i els transporten a dendrites. ZBP uneix el 3' UTR de β -actina, i és important per al seu transport i traducció a dendrites i axons⁹¹, CPEB1 uneix el 3' UTR de la *CaMKIIα*, entre altres mRNAs, inhibint la seva traducció^{59,83}. Staufen1 interacciona amb Kif5, responsable del transport de grànuls d'RNA on s'ha detectat *CaMKIIα*¹³⁵. Staufen2 és un marcador de grànuls d'RNA^{98,99} per al que s'ha demostrat la interacció específica amb l'mRNA de *CaMKIIα*¹⁰¹. Es va testar la capacitat d'aquestes quatre proteïnes d'unir específicament l'intró 16 de *CaMKIIα*. Per tal d'excloure les interaccions que hi pogués haver amb el 3' UTR endogen de la *CaMKIIα* es va fer servir un sistema completament heteròleg. Es van cotransfectar les proteïnes fusionades a FLAG i un gen reporter

(*ZsGreen*) fusionat a la seqüència de l'intró 16 a cèl·lules HEK293T, que no expressen *CaMKII α* endògena, i es va analitzar la interacció immunoprecipitant la proteïna marcada amb anticossos anti-FLAG, relativitzant els resultats a un gen endogen de les HEK293T que no està relacionat amb el transport a dendrites (*Tata-box binding protein, TBP*).

L'anàlisi per PCR quantitativa de l'enriquiment del gen reporter en la fracció immunoprecipitada (comprovació IP a **figura 12A**) contra l'extracte total mostra que *Staufen2* interacciona amb l'intró 16 de *CaMKII α* 4 vegades més que amb el gen control *TBP*, i aquest enriquiment és significativament major que el trobat per *Staufen1*, *CPEB1* o *ZBP* (**figura 12B**). *Staufen2* és una proteïna d'unió a RNA de doble cadena (dsRNA), per tant, es podria argumentar que la unió no és específica per a l'intró 16, sinó que aquest senzillament fa més estructures secundàries que el gen de les HEK293T utilitzat com a control, i aquestes estructures són reconegudes de forma no específica per *Staufen2*. Per demostrar l'especificitat de la interacció, vam repetir l'experiment només per *Staufen2* marcat amb FLAG, contranfectant també el gen reporter *ZsGreen* fusionat a la seqüència de l'intró 16 o bé l'intró 9 de *CaMKII α* com a control d'especificitat. De nou, es van fer relatius a *TBP* els enriquiments del gen reporter a la fracció immunoprecipitada contra l'extracte total. *Staufen2* interaccionava significativament més amb l'intró 16 que amb l'intró 9, demostrant l'especificitat de la interacció (**figura 12C**).

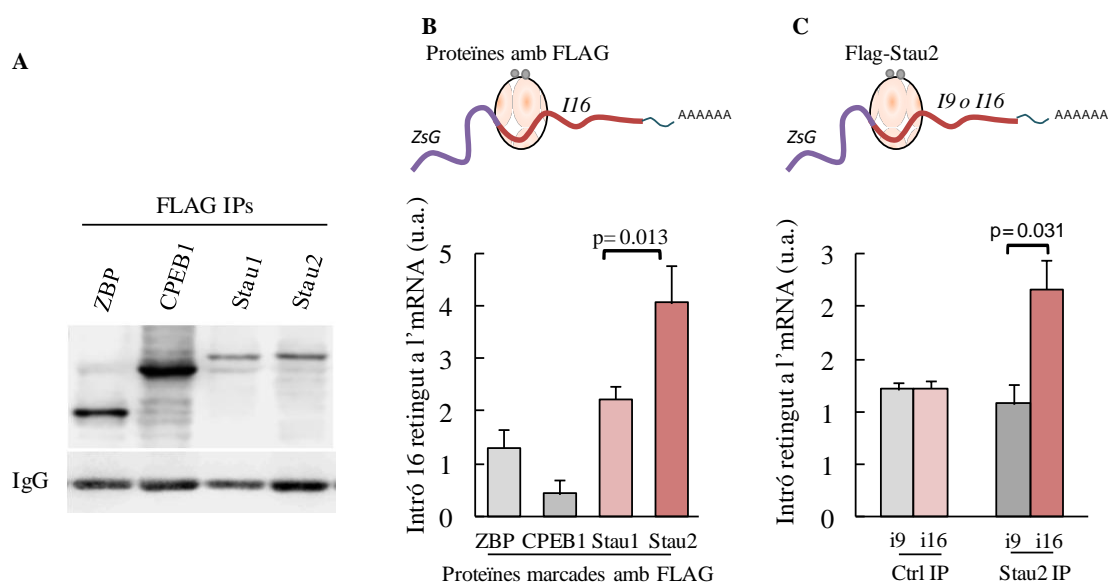


Figura 12. L'intró 16 de *CaMKII α* interacciona amb *Staufen2*

Cèl·lules HEK293T es van cotransfectar amb *ZsGreen-I16* i *ZBP* / *CPEB1* / *Stau1* / *Stau2* fusionades amb FLAG.

A. L'eficiència de la IP va ser comprovada per *western blot* amb anticossos contra FLAG. **B.** A cèl·lules transfectades com a A, es va analitzar per PCR quantitativa l'enriquiment de l'mRNA del gen reporter *ZsGreen* unit a l'intró 16 a la fracció immunoprecipitada comparant-la amb l'input. La unió no específica d'mRNA als anticossos va ser corregida mesurant els nivells de l'mRNA endogen de HEK293T *TBP*. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i l'error estàndard de la mitjana. **C.** Com a B, però cotransfectant FLAG-*Staufen2* o FLAG sol com a control amb *ZsGreen-I16* o *ZsGreen-I9* per testar l'especificitat de la unió.

Per acabar de demostrar que la interacció d'Staufen2 amb l'mRNA de l'intró 16 succeeix a nivells endògens i no és un artefacte de sobreexpressió, es van immunoprecipitar Staufen1 i Staufen2 amb anticossos específics, utilitzant com a input extracte de cervell adult de ratolí (del qual s'havien eliminat els nuclis per centrifugació). Es va comparar per PCR quantitativa l'enriquiment de l'intró 16 contra la resta d'introns de *CaMKII α* a l'input i a les fraccions d'immunoprecipitació d'Staufen1, d'Staufen2 i d'un anticòs control. A la IP d'Staufen2, l'enriquiment de l'intró 16 era 2,5 vegades més gran que a l'input, i significativament més gran que a les IPs anti-Staufen1 i control (**figures 13A i B**).

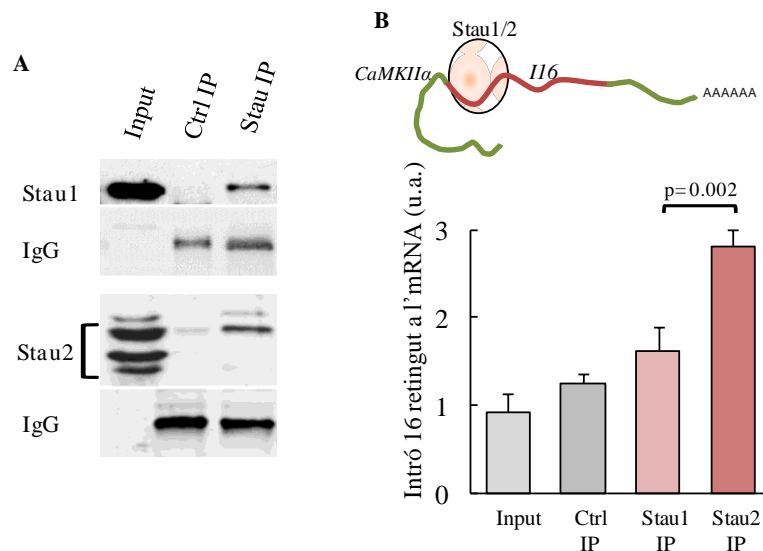


Figura 13. L'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16 interacciona a nivells endògens amb Staufen2

Extractes de cervell de ratolí adult, dels quals s'havien eliminat els nuclis per centrifugació, van ser utilitzats com a Input per una immunoprecipitació amb anticossos control, contra Staufen1 o contra Staufen2.

A. L'eficiència de la IP es va comprovar per *western blot* amb anticossos específics. **B.** Com a A, es van mesurar per PCR quantitativa els nivells d'intró 16 retés a *CaMKII α* a les fraccions Input i IPs, comparant-les amb els nivells d'altres introns no retenguts. Es mostra la mitjana de tres experiments independents i l'error estàndard de la mitjana.

Com s'ha comentat anteriorment, és conegut que Staufen2 uneix el 3'UTR de *CaMKII α* ¹⁰¹, i nosaltres hem demostrat que també uneix específicament la seqüència de l'intró 16. Aquests dos fets ens van portar a pensar ambdues formes de *CaMKII α* , la exònica i la que reté l'intró 16, podrien estar compartint compartiments cel·lulars i potser mecanisme o grànul de transport. Tot i que és un tema discutit, la majoria d'estudis apunten al fet que els mRNAs viatgen en grànuls que contenen una única molècula d'mRNA⁷¹, es coneix que les proteïnes de la família d'Staufen tenen un domini de dimerització¹³⁶. També es coneix que el mecanisme de creació i assemblatge de proteïnes i mRNAs als grànuls depèn de dominis intrínsecament desordenats, creant estructures molt complexes¹³⁷. Per tot això es va considerar provar si l'intró 16 de *CaMKII α* era capaç d'interaccionar amb l'mRNA exònic de *CaMKII α* . Per demostrar això es va transfectar l'intró 16 de *CaMKII α* fusionat al gen reporter habitual (*ZsGreen*) i a una seqüència d'mRNA anomenada *MBS* (de l'anglès, *MS2 Binding Protein*), aquesta seqüència uneix específicament la proteïna MCP (*MS2 Coat Protein*) (veure

mètodes). D'aquesta forma, marcant MCP amb FLAG, es podia immunoprecipitar la proteïna MCP, copurificant així el nostre gen reporter i l'intró 16 transfectats. Es va cotransfectar el constructe *ZsGreen-Intro16-MBS* juntament amb la proteïna FLAG-MCP (diagrama a **figura 14A**) a la línia cel·lular N2a (que a diferència de les HEK293T, expressa l'mRNA de *CaMKII α*). Es va analitzar la presència de *CaMKII α* endògena de les N2a a l'immunoprecipitat, comparant-lo amb una IP control que tenia el gen *ZsGreen* i la seqüència *MBS*, però no l'intró 16.

La **figura 14B** mostra el resultat de l'enriquiment del gen reporter *ZsGreen* (control o fusionat amb l'intró 16) contra el gen *TBP*, utilitzat de nou com a control. Es veu clarament que als tres experiments realitzats el sistema d'immunoprecipitació d'RNA basat en la interacció *MBS-MCP* funciona, ja que enriqueim entre 15 i 25 vegades més el nostre gen reporter *ZsGreen* fusionat a *MBS* que el gen control *TBP*. A més, es pot veure que l'enriquiment del gen no depèn de la presència o absència de la seqüència de l'intró 16. Per tal de mesurar si l'mRNA de *CaMKII α* endogen de les cèl·lules N2a interaccionava o no amb la seqüència de l'intró 16 transfectada, es va analitzar per PCR quantitativa la quantitat d'mRNA endogen de *CaMKII α* que copurificàvem en immunoprecipitar *ZsGreen-Intro16-MBS* o *ZsGreen-MBS* com a control. La **figura 14C** mostra que l'intró copurificava més del doble d'mRNA de *CaMKII α* endògena de les N2a que el constructe control, indicant una interacció, si més no indirecta, entre els dos mRNAs.

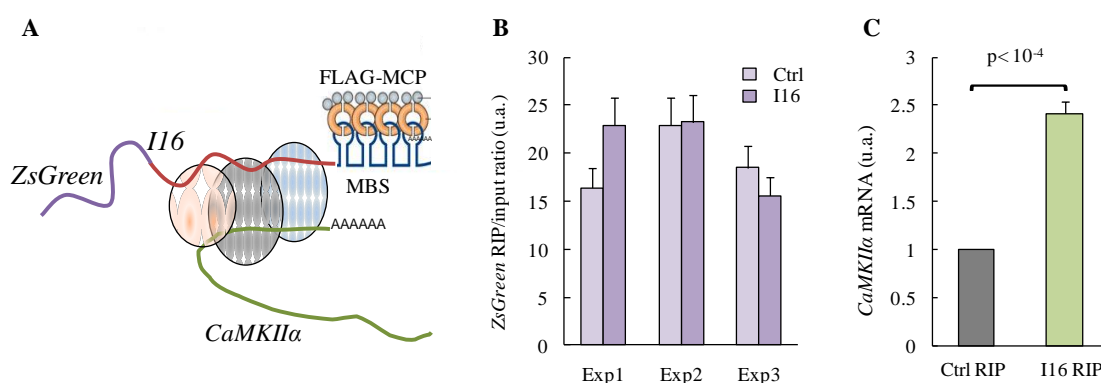


Figura 14. L'intró 16 de *CaMKII α* interacciona amb mRNAs de *CaMKII α* totalment processats

Es van cotransfectar a cèl·lules N2a (que expressen de forma endògena *CaMKII α*) constructes que expressen *ZsGreen-Intro16-MBS*, o *ZsGreen-MBS* com a control, amb MCP-FLAG (veure mètodes). **A**. Esquema del sistema utilitzat per mesurar la interacció mRNA-mRNA. **B**. A N2a transfectades amb els constructes explicats a A. Es va realitzar un *crosslink* amb formaldehid durant 10 minuts i es va immunoprecipitar FLAG-MCP. Es mostra l'anàlisi per PCR quantitativa de l'enriquiment de *ZsGreen* a la IP contra l'input, fent relatiu al gen endogen de N2a *TBP*. Les barres mostren la mitjana i interval de confiança ($\alpha=0.05$) de triplicats tècnics. **C**. Als mateixos experiments que a B es va analitzar per PCR quantitativa l'enriquiment de l'mRNA endogen de *CaMKII α* contra l'input, contra el gen endogen de N2a *TBP*.

6. Els nivells de mRNA de *CaMKII α* que contenen intró 16 responen a estímuls sinàptics

Hem demostrat fins ara que l'intró 16 de *CaMKII α* es reté en una fracció de l'mRNA madur, estant particularment enriquit en zones distals de les dendrites neuronals i que interacciona amb Staufen2, compartint compartiments cel·lulars l'mRNA *CaMKII α*

exònic. El fet que l'mRNA que conté l'intró 16 s'incorpori en grànuls d'RNA per si sol fa pensar que viatja en un estat traduccional reprimat ¹³⁸. A més, Staufen2 interacciona amb moltes proteïnes responsables i marcadors del silenciament de la traducció d'mRNAs, com CBP80 i PABPN1 ¹⁰¹. Amb totes aquestes dades, vam hipotetitzar que els nivells dendrítics de l'intró 16 contingut a *CaMKIIα* devien estar transportats en un estat de traducció reprimida, esperant un estímul per a ser alliberats del grànul d'RNA i possiblement traduïts.

Per demostrar si els nivells del nostre intró retingut responien a estímuls sinàptics, primer es van purificar sinaptoneurosomes funcionals de cervell de ratolí adult mitjançant gradients de Percoll (¹³⁹, veure mètodes), un cop purificats, es van estimular durant 30 minuts a 37°C amb 200 ng / mL BDNF, 50 µg / mL NMDA o amb vehicle per al cas control. Després de l'estimulació es va obtenir l'RNA i es va realitzar una PCR quantitativa per analitzar els nivells de *CaMKIIα* exònica i de la isoforma que conté l'intró 16. La **figura 15A** mostra que els nivells d'mRNA que conté l'intró 16 es redueixen un 50% després de l'estimulació tant amb BDNF o NMDA, utilitzant com a normalitzador el nivell d'mRNA de *CaMKIIα* exònica. Per donar robustesa es va realitzar una altra aproximació, repetint l'estimulació amb BDNF, però sobre neurones hipocampals cultivades durant 14 dies. L'anàlisi dels nivells d'mRNA a les dendrites per smFISH indica també una reducció en el nombre de partícules d'intró 16 comparant amb les partícules de *CaMKIIα* exòniques (**figura 15B**).

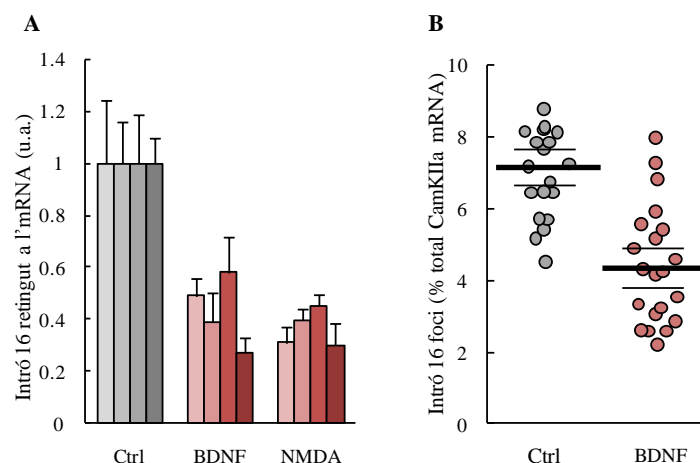


Figura 15. Els nivells d'intró 16 retés a *CaMKIIα* varien en resposta a estímul sinàptic

A. Sinaptoneurosomes funcionals es van obtenir de cortex de ratolí adult mitjançant gradients de Percoll. Es van estimular durant 30 min a 37°C amb 200 ng / mL BDNF, 50 µg / mL NMDA o vehicle. Posteriorment es van analitzar els nivells d'intró 16 retingut contra el total de mRNA de *CaMKIIα* per PCR quantitativa. Cada barra mostra un experiment independent, fet relatiu al cas control, i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$). **B.** Es van estimular neurones hipocampals en cultiu a 14 DIVs amb 200 ng / mL de BDNF o vehicle durant 30 min. Després es van fixar i es va realitzar una smFISH. Cada punt mostra el percentatge d'intró 16 relatiu a l'mRNA de *CaMKIIα* total quantificat a una imatge amb diverses neurones (n=20 imatges, els somes neuronals es van ometre a la quantificació). La barra horitzontal gruixuda mostra la mitjana i les primes l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

La retenció de l'intró 16 a l'mRNA madur de *CaMKIIα* fa que hi aparegui un codó STOP a la seqüència de l'intró, quedant una unió entre exons (*EJC*, de l'anglès *Exon Junction Complex*) *downstream* del codó STOP (diagrama a la **figura 16A**). Està demostrat que la presència d'*EJC* després del codó STOP de l'mRNA provoquen la

seva degradació per una via anomenada *NMD* (de l'anglès *Nonsense Mediated Decay*). Aquest mecanisme utilitza i necessita la primera ronda de traducció per detectar transcrits amb mutacions que provoquen un codó STOP prematur i degradar-los¹⁴⁰, però també és una forma més de regulació posttranscripcional de molts gens neuronals^{40,141}.

Per comprovar si la via *NMD* era la responsable del canvi en els nivells d'mRNA de *CaMKII α* amb l'intró 16 detectats, vam repetir les estimulacions amb BDNF com a la **figura 15A** amb o sense cicloheximida per aturar la traducció, necessària per desencadenar *NMD*. Els sinaptoneurosomes funcionals requereixen una preparació molt ràpida, i perden funcionalitat a mesura que passa el temps, de forma que per poder tractar amb cicloheximida i les estimulacions pertinents, així com per demostrar l'efecte dels estímuls en un altre sistema, es van estimular les neurones corticals en cultiu (18-20 DIVs) amb 200 ng / mL de BDNF, en presència o absència de cicloheximida, afegida 10 minuts abans de l'estimulació. Després dels 30 minuts d'estimulació, les cèl·lules es van recollir i es va aïllar la fracció sinaptoneurosomal per filtració (veure mètodes). Els nivells d'intró 16, *CaMKII α* , *Gapdh* com a control de càrrega i *Arc* com a control positiu d'*NMD* es van analitzar a aquesta fracció sinaptoneurosomal per PCR quantitativa. Als sinaptoneurosomes de les cèl·lules tractades amb BDNF els nivells de *CaMKII α* que conté l'intró 16 es reduïen significativament, aproximadament un 60%. La cicloheximida per si sola no tenia cap efecte, però era capaç de rescatar els nivells d'intró 16 quan s'aplicava juntament amb el BDNF (**figura 16B**). Com s'esperava, els nivells de *CaMKII α* exònica no es modificaven significativament ni amb BDNF ni amb cicloheximida, ja que *CaMKII α* , si no reté l'intró, no és un mRNA candidat per degradació via *NMD* (**figura 16C**). El control positiu per *NMD*, l'mRNA d'*Arc*, es modulava en resposta a BDNF i cicloheximida de la mateixa manera que l'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16 (**figura 16D**).

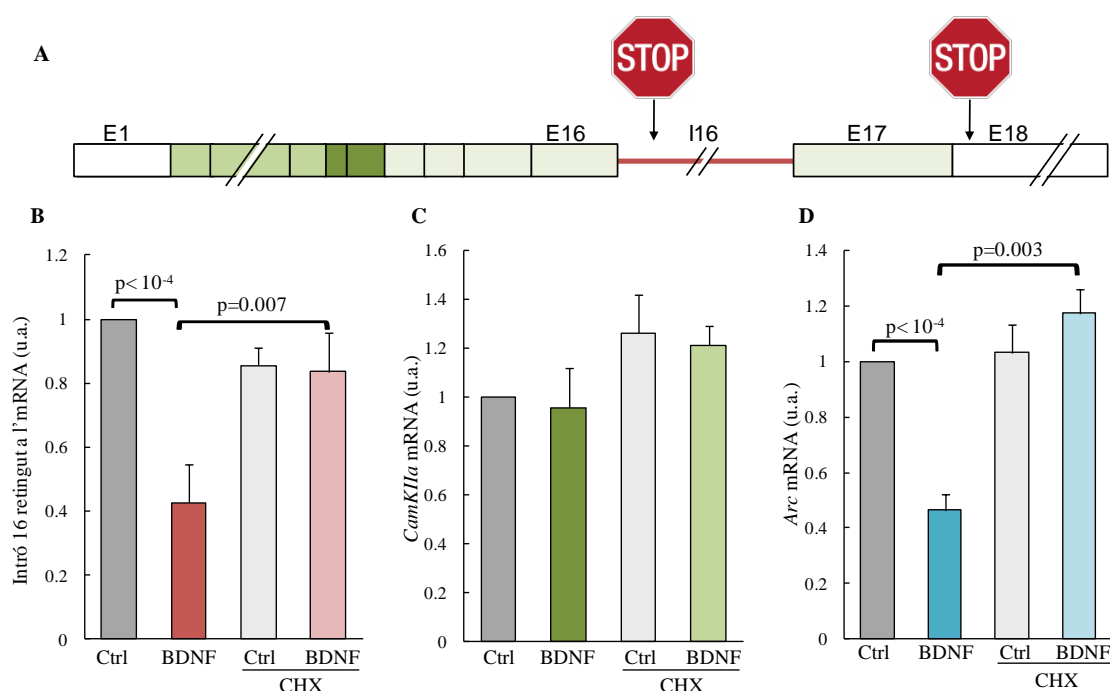


Figura 16. La disminució en els nivells d'mRNA que contenen l'intró 16 en resposta a estímul depèn de la seva pròpia traducció

Cultius corticals *in vitro* a 18-20 DIVs van ser tractats amb actinomicina D (10 µg / mL) durant una hora abans de l'estimulació amb 200 ng / mL BDNF o vehicle durant 30 min. Quan s'indica, 25 µg / mL de cicloheximida van ser afegits 5 min abans de l'estimulació. Després del temps indicat, la fracció sinaptoneurosomal va ser purificada per filtració (veure mètodes).

A. Esquema de l'mRNA de *CaMKIIα* retenint l'intró 16. Es mostra el codó STOP normal present al final de la ORF a l'exó 18 i el codó STOP introduït per l'intró 16, amb la unió entre l'exó17 i l'exó18 *downstream*. **B.** Els nivells d'intró 16 retesos a *CaMKIIα* van ser mesurats per PCR quantitativa, relativitzats contra l'mRNA de *Gapdh*. Les barres mostren la mitjana de tres experiments independents i l'error estàndard de la mitjana. **C.** Els mateixos experiments que a B. Es mostren els nivells de *CaMKIIα* totals relativitzats a *Gapdh*. **D.** Com a C, es mostren els nivells d'mRNA d'*Arc* relatiu a *Gapdh*.

7. Staufen2 regula els nivells de l'mRNA de *CaMKIIα* que conté l'intró 16 modulant la seva estabilitat

Fins ara hem demostrat la presència de l'intró 16 a les dendrites neuronals, la seva interacció amb Staufen2, i la resposta dels seus nivells a sinaptoneurosomes i dendrites a estímuls sinàptics, degradant-se en resposta a la seva pròpia traducció. Com s'ha dit anteriorment, altres estudis ja han demostrat la unió d'Staufen2 amb proteïnes encarregades de silenciar la traducció, per tant és probable que a nivell endogen, els nivells d'intró 16 estiguin estabilitzats per Staufen2, que protegeix l'intró 16 de la seva pròpia traducció fins que arriba l'estímul local adient.

Per demostrar la relació entre Staufen2 i l'intró 16 es van disminuir els nivells endògens d'Staufen2 mitjançant lentivirus que expressaven un shRNA que tenia com a diana l'mRNA endogen d'*Staufen2*, o bé un shRNA control que tenia com a diana el gen de la *Luciferasa* (un gen que no està present al genoma del ratolí). Es van infectar neurones corticals de ratolí a 3 DIV i es van cultivar fins a 14 DIV, la **figura 17A** mostra l'eficiència de l'shRNA. Es van recollir les cèl·lules i es van separar les fraccions citoplasmàtica i nuclear per centrifugació, analitzant per PCR quantitativa els nivells d'intró 16 retés a *CaMKIIα* i relativitzant-los a l'mRNA control *Gapdh*. Les cèl·lules amb

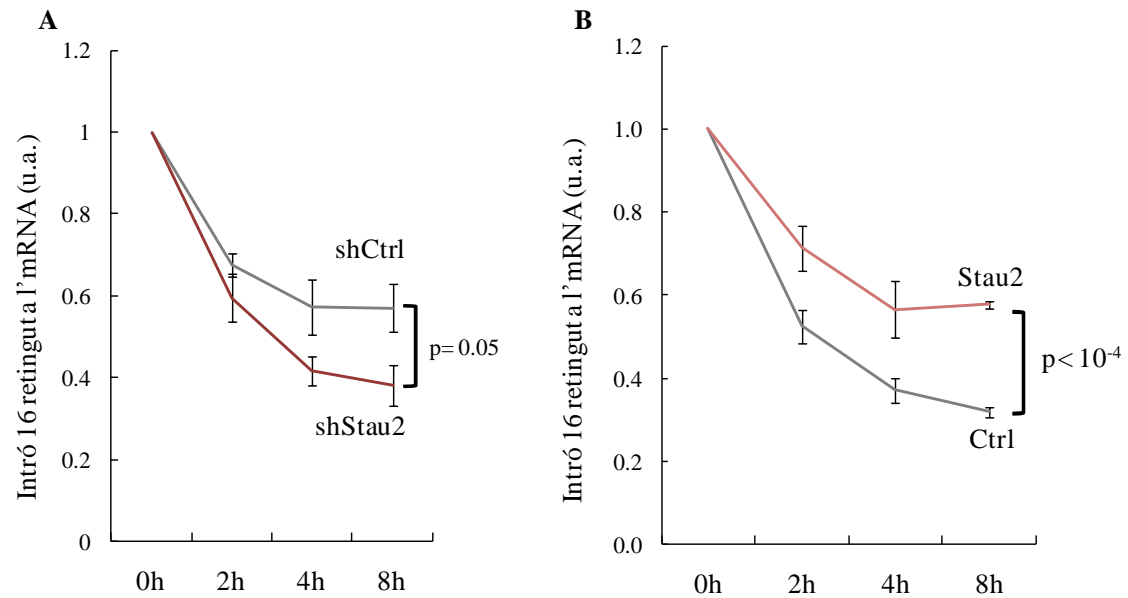


Figura 18. Staufen2 afecta els nivells d'intró 16 a l'mRNA de *CaMKIIα* modulant la seva estabilitat

A. Cèl·lules N2a es van transfectar amb plàsmids expressant shRNA control o contra Staufen2, 48 hores més tard es va aplicar actinomicina D (10 µg / mL) i es va purificar l'RNA després del temps indicat. Els nivells d'intró 16 es van analitzar per PCR quantitativa, fent els resultats relatius a l'mRNA control *eEF1A1*. Cada punt mostra la mitjana de tres experiments independents i l'error estàndard de la mitjana. **B.** Com a A, però transfectant les N2a amb plàsmids expressant Staufen2 o GFP com a control, i aplicant actinomicina D 24 hores després.

Per demostrar que l'efecte de la disminució en els nivells de Staufen2 sobre l'mRNA que conté l'intró 16 afectava també als seus nivells a dendrites, es van infectar cultius hipocampals amb l'shRNA contra Staufen2 a 3 DIV i a 14 DIV es van fixar i es va realitzar una smFISH. A la **figura 19A** es mostra la quantitat de punts intrònics relatius als punts exònics a cada dendrita individual. Es pot veure una reducció significativa d'un 50% en les dendrites amb nivells reduïts de Staufen2. En canvi, els valors absoluts de senyal provenint de la sonda contra els exons de la *CaMKIIα* no estan afectats per la disminució en els nivells d'Staufen2 (**figura 19B**).

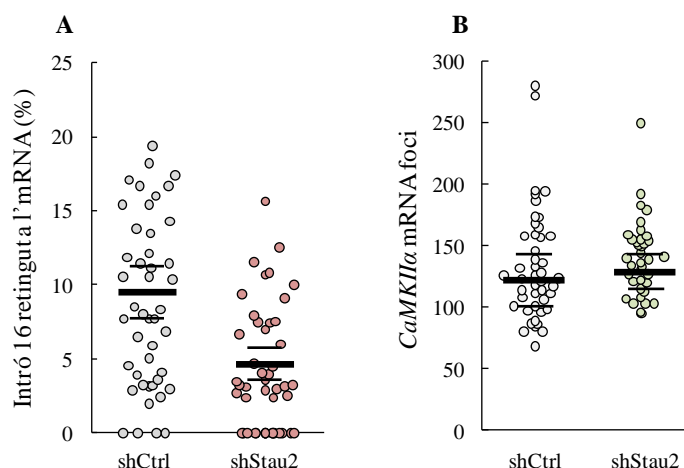


Figura 19. Staufen2 és necessari per la localització dendrítica de l'mRNA de *CaMKIIα* que conté l'intró 16

Es van infectar neurones hipocampals a 3 DIVs, i es van fixar i sotmetre a smFISH amb sondes contra l'intró 16 i contra l'mRNA de *CaMKIIα* a 14 DIV.

A. Cada punt mostra el percentatge d'introns relatiu a l'mRNA de *CaMKIIα* total a una dendrita individual ($n=46$ dendrites). Les línies horitzontals gruixudes mostren la mitjana, i les primes l'interval de confiança ($\alpha=0.05$). **B.** Com a A, però analitzant els nivells de totals d'mRNA de *CaMKIIα* per smFISH a les mateixes dendrites.

8. L'expressió exògena de l'intró 16 afecta la distribució i expressió de l'mRNA de *CaMKIIα*

Altres grups han demostrat prèviament la capacitat de seqüències contingudes als introns per afavorir el transport del seu mRNA. ³⁴ demostra que els elements ID continguts als introns que es retenen, quan s'expressen de forma exògena fusionats a un gen reporter modifiquen la seva distribució subcel·lular, competint amb els introns retinguts endògens. La sobreexpressió d'aquests *ID elements* a neurones fins i tot comprometia la distribució de la proteïna endògena, demostrant que les seqüències que formen part de l'intró i l'mRNA endogen del mateix gen comparteixen mecanismes de transport a dendrites.

Les dades obtingudes fins ara per nosaltres demostraven que els mRNAs de *CaMKIIα*, contenint o no l'intró 16, interaccionen entre ells i amb Staufen2, i són transportats en un estat de traducció reprimida a dendrites. Conseqüentment, l'intró 16 podia tenir algun efecte sobre la localització i expressió de *CaMKIIα*. Per testar aquesta possibilitat es van transfectar neurones a 10 DIV amb el gen reporter *ZsGreen* fusionat a la seqüència de l'intró 16 de *CaMKIIα*, o bé sol com a control negatiu. Es va deixar que el plasmidi exogen s'expressés durant 24 hores i es van fixar les cèl·lules, realitzant una smFISH per mesurar l'efecte de la sobreexpressió de l'intró sobre l'mRNA endogen de *CaMKIIα*. L'expressió de l'intró 16 augmentava significativament el nombre d'mRNAs completament processats de *CaMKIIα* a les dendrites neuronals, sense afectar el seu nombre al soma cel·lular (**figura 20A i B**).

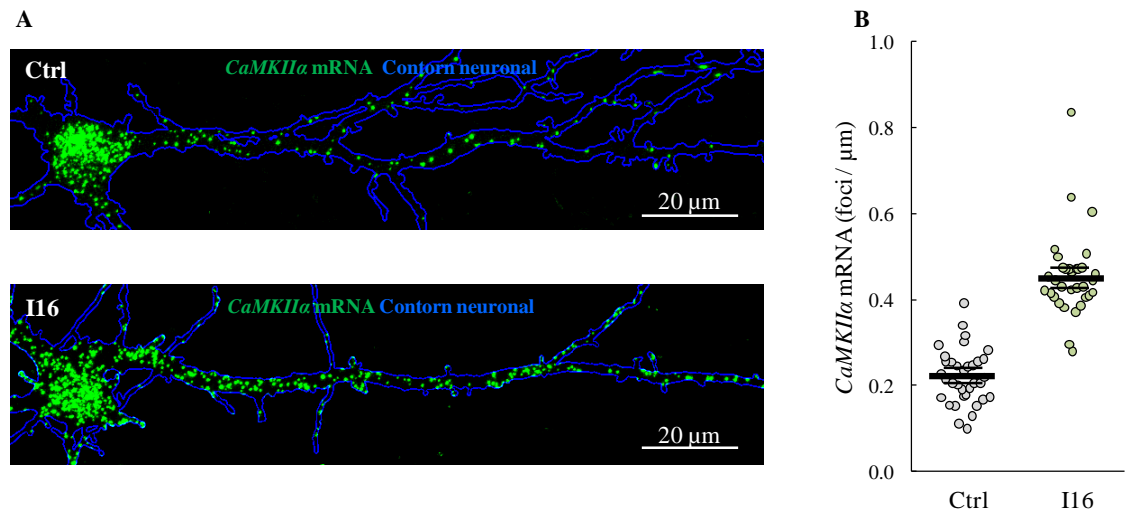


Figura 20. L'intró 16 de *CaMKIIα* modula el transport a dendrites de l'mRNA totalment processat de *CaMKIIα*

Es van transfectar neurones hipocampals a 10 DIVs amb *ZsGreen-I16* o *ZsGreen* com a control, i GFP per poder identificar les neurones transfectades. Es van fixar les cèl·lules 24 hores més tard i es van analitzar els nivells i distribució de *CaMKIIα* per smFISH, utilitzant aquesta vegada només la sonda contra els exons de *CaMKIIα*.

A. Es mostra una imatge representativa de cada condició. **B.** Quantificació del panell A, foci de mRNA de *CaMKIIα* per μm a 36 dendrites de 15 neurones transfectades amb *ZsGreen* i 33 dendrites de 14 neurones transfectades amb *ZsGreen-I16*. La línia gruixuda mostra la mitjana i les primes l'interval de confiança.

Discussió

1. La retenció de l'intró 16 de *CaMKII α* genera una nova isoforma d'*splicing* de *CaMKII α* que és exportada al citoplasma

L'anàlisi preliminar d'aquest treball mostra el desequilibri intrònic de tres gens importants per a la funció sinàptica, dels quals es coneix que són transportats a dendrites⁵⁵. El fet que es trobin introns enriquits a tots els gens analitzats concorda amb estudis recents que analitzen en massa mRNA citoplasmàtic, en general, aquests estudis basats en seqüenciació d'RNA troben que la retenció intrònica és un fenomen que afecta una proporció important d'mRNAs⁵⁶.

Aquesta tesi es centra en el desequilibri intrònic de l'mRNA de *CaMKII α* . A part de la retenció de l'intró 16, s'observa que l'intró 14 de *CaMKII α* també apareix retés en algunes mostres (**figures 4 i 6**), concretament en aquelles que provenen de teixit embrionari o de les cèl·lules de neuroblastoma de ratolí N2a. L'RNA obtingut de citoplasma o de grànuls d'RNA de cervell adult no retenen l'intró 14, però sí el 16. Com s'ha explicat a la introducció, estudis recents ja han estudiat la retenció intrònica en el context de desenvolupament neuronal, com a mecanisme de control posttranscripcional de gens que no seran necessaris fins a estadis del desenvolupament més avançats. Tot i que aquests estudis no analitzaven el gen de *CaMKII α* , seria un gen candidat a la repressió posttranscripcional que descriuen, ja que la seva expressió i funció se circumscriuen a les neurones totalment diferenciades. A més, la seqüència de l'intró 14 conté dianes d'unió a PTBP1 (seqüències riques en polipirimidines), de forma que la seva retenció succeeix probablement amb el mecanisme i funció que ja han estat descrits per altres estudis^{27,28}.

En canvi, el mecanisme responsable per la retenció de l'intró 16 semblava recaure en la seva unió amb l'exó previ, extremadament poc freqüent i no ajustada al consens de cap dels dos tipus d'*splicing* (U2 i U12)¹⁴². De nou, la seva retenció concorda amb estudis previs que relacionen els llocs d'*splicing* febles amb la retenció dels introns que segueixen¹⁴³. La presència d'un intró normalment provocaria la retenció nuclear de l'mRNA que el conté, però ja es coneixen determinats introns que contenen seqüències responsables per la seva exportació al citoplasma. El cas més estudiat per aquest mecanisme és l'intró 10 retés al gen de *Nxf1*, la seva seqüència conté un element anomenat *CTE*, que promou la seva exportació unint la mateixa proteïna Tap (codificada per *Nxf1*). Aquests elements *CTE* mostren un gran grau de conservació entre diferents espècies¹⁴⁴. Tot i que l'intró 16 de *CaMKII α* no conté elements *CTE*, el seu 5' també presenta una alta conservació (**figura 5**), fet que suggereix que duu a terme una funció important, possiblement és responsable de l'exportació de l'intró 16 contingut a l'mRNA de *CaMKII α* .

Per tot això, ens vam centrar en la retenció de l'intró 16 del gen de *CaMKII α* en el seu mRNA madur i la seva presència al citoplasma de les neurones. Primer, l'ús de dues aproximacions ortogonals (PCR quantitativa i smFISH) donen robustesa als resultats, aportant informació complementària sobre el procés de retenció intrònica. Per una banda, les sondes de qPCR utilitzades anellen a la unió exó-intró, de forma que només detecten l'intró diana si aquest està en un context d'mRNA, un intró transcrit sense l'exó previ o processat i escindit de l'mRNA no seria detectat. Per altra banda, aquesta

anàlisi bioquímica de la presència d'introns a diferents compartiments cel·lulars parteix d'un fraccionament previ per tal de separar els nuclis de la resta de components cel·lulars, separant posteriorment, si escau, compartiments més específics com grànuls d'RNA i sinaptoneurosomes. Tot i la comprovació realitzada per *western blot* dels diferents fraccionaments, no es pot descartar completament la contaminació de la resta de fraccions amb RNA provenint del nucli. Pel que fa a la smFISH, les sondes utilitzades anellen amb la seqüència de l'intró, de forma que no seria possible discernir entre un intró retés i un intró sol, fora del context de l'mRNA, que escapés del nucli i estigués present al citoplasma i dendrites neuronals, però ens permet assegurar la localització subcel·lular de les partícules d'RNA detectades.

La combinació de les dues tècniques ens permet afirmar que la detecció via PCR quantitativa de l'intró 16 de *CaMKII α* al citoplasma (extractes de cervell o de cèl·lules corticals cultivades *in vitro* als quals s'havien eliminat els nuclis per centrifugació) no és deguda a contaminacions nuclears, sinó a la presència fisiològica de la seqüència intrònica, com demostren les imatges de la smFISH, on seqüències intròniques són detectades fora del nucli de la neurona. A més, l'intró 16 de *CaMKII α* no només va ser detectat al citoplasma de les cèl·lules, sinó també a grànuls d'RNA de cervell i a sinaptoneurosomes obtinguts de cèl·lules corticals. De nou, aquesta anàlisi per qPCR de diferents fraccions cel·lulars es confirma per smFISH, ja que no només es veu senyal provenint de l'intró 16 fora del nucli, sinó que aquestes partícules són presents a les dendrites de les neurones, i la seva proporció respecte *CaMKII α* total va augmentant a mesura que ens allunyem del soma.

Per superar les limitacions intrínseques a les tècniques utilitzades, diferents aproximacions per PCR quantitativa o semiquantitativa (depenent de la seqüència a analitzar) van ser utilitzades per assegurar que l'intró 16 es reté en un context on la resta de l'mRNA de *CaMKII α* ha estat processat completament, és a dir, que estem davant un cas de retenció intrònica. Així, tot i que és impossible demostrar inequívocament la continuïtat de tota la seqüència de l'mRNA que conté l'intró 16, el fet que l'intró es retingui sencer i que els dos exons previs estiguin presents ens permet afirmar que l'intró es reté en un mRNA que per la resta està completament processat i conté tots els elements presents a l'mRNA totalment processat. Per últim, també per PCR semiquantitativa, es demostra que l'intró està retingut a la isoforma més abundant i estudiada de *CaMKII α* , la que codifica per la proteïna sencera.

2. L'intró 16 de *CaMKII α* confereix l'mRNA diferents interactors i localització subcel·lular

El cultiu de neurones a microcàmeres, aïllant neurites dels cossos cel·lulars, suggereix que l'intró 16 està conferint els mRNAs que el contenen propietats de localització addicionals a les dependents del seu 3'UTR. Els nostres resultats indiquen que la seqüència de l'intró està ajudant l'mRNA que el conté a ser transportat a punts més distals.

Resultats similars estan descrits en treballs previs. Al cas de *Robo3* i la seva forma amb intró retés, l'intró està controlant la traducció de l'mRNA que el conté, silenciant-la fins que un estímul molt determinat desencadena la seva traducció local⁴⁰. Com al nostre cas, l'mRNA que conté l'intró es beneficia de tots els determinants que conté

l'mRNA completament processat, i a més l'intró li confereix capacitats reguladores addicionals.

Els resultats de la localització a dendrites de l'intró 16 ens van portar a provar la seva interacció amb diferents proteïnes d'unió a RNA, les interaccions demostrades en un sistema heteròleg ens permeten afirmar que Staufen2 interacciona específicament amb l'intró 16 de *CaMKII α* , i la immunoprecipitació des de cervell de ratolí ens confirma que aquesta interacció succeeix *in vivo*. Com s'ha explicat a l'apartat d'introducció, es coneix l'interacció del 3'UTR de *CaMKII α* amb CPEB, Staufen1 i 2 i hnRNPA2 entre altres.

Tot i que és complicat d'afirmar-ho inequívocament, el fet que l'mRNA amb l'intró interaccioni amb més molècules d'Staufen2 que l'mRNA totalment processat concordaria amb la seva localització més distal. Staufen2 participa en molts processos relacionats amb el metabolisme d'mRNAs, algunes de les quals concorden amb els resultats observats en aquest treball. S'ha demostrat l'exportació al citoplasma de dues isoformes Staufen2 per dues vies, depenent d'Exportina1 o Exportina5^{102,145}. La disminució dels nivells d'Exportina5 (relacionada amb l'exportació al citoplasma de rRNA, tRNA i de proteïnes d'unió a dsRNA^{146,147}) resulta en l'acumulació al nucli d'Staufen2⁶², mentre que Staufen2⁵⁹ genera per *splicing* alternatiu un NES (*Nuclear Export Signal*) reconegut per Exportina1. A més, es coneix que Staufen2 entra i surt del nucli, interaccionant també proteïnes del porus nuclear i d'altres relacionades amb l'exportació d'mRNA del nucli al citoplasma, com Tap¹⁴⁸. Staufen2 podria estar funcionant com adaptador per l'exportació de determinats mRNAs al citoplasma, les nostres dades mostren que els nivells citoplasmàtics de l'intró 16 retingut a *CaMKII α* depenen d'Staufen2, però els nivells nuclears no. En cas d'una funció a l'exportació, esperaríem una acumulació nuclear del nostre intró en disminuir els nivells d'Staufen2. Tot i que és possible que Staufen2 estigui intervenint en l'exportació del nostre intró, afectant els seus nivells citoplasmàtics, però que els nivells nuclears romanguin estables a causa d'algun mecanisme de degradació, l'explicació que més encaixa hipotetitzo que Staufen2 podria entrar al nucli per marcar determinats mRNAs, començant així l'assemblatge d'un grànul d'mRNA que rebria la resta de components en sortir al citoplasma cel·lular¹⁴⁹. Aquesta hipòtesi explicaria la unió de l'intró 16 amb Staufen2 i el seu posterior transport a parts distals de la cèl·lula.

S'ha demostrat que Staufen2 és important per al transport de *MAP1b*, però no de *MAP2* ni de *CaMKII α* . En canvi, la disminució en els nivells d'Staufen1 per RNA d'interferència sí que afecten el transport a dendrites modulats pel 3'UTR de *CaMKII α* ^{123,150}. És molt interessant que Staufen2 no moduli el transport ni els nivells de la gran majoria d'mRNAs amb els que interacciona⁹⁶ i suggereix que pot tenir múltiples funcions, que poden variar depenent del propi mRNA al que s'uneixi. Les nostres dades relatives a la localització distal de l'mRNA que conté l'intró 16 es poden explicar tenint en compte que el seu 3'UTR conté també tots els elements necessaris per ser transportat per Staufen1, i a la vegada, l'intró 16 reclutaria molècules d'Staufen2 que conferirien l'mRNA capacitat de ser transportat a zones més distals.

Aquesta explicació es complementa amb descobriments recents d'altres laboratoris sobre la formació de grànuls d'RNA. La investigació de proteïnes que precipitaven en resposta a l'aplicació d'una molècula orgànica o a baixa temperatura va identificar un

enriquiment significatiu en proteïnes d'unió a RNA i DNA. Aquesta precipitació formava fibres amiloides, diferents dels agregats priònics en el seu dinamisme i capacitat de despolimerització. El tret comú entre elles i necessari per a la seva agregació eren seqüències de baixa complexitat ¹⁵¹. Staufen1 era una de les proteïnes que precipitaven, i l'anàlisi dels mRNAs que coprecipitaven amb aquests agregats amiloides solapava molt amb els mRNAs que s'uneixen a Staufen2 en cervell adult de ratolí, entre ells *CaMK2α* ¹³⁷. Aquests estudis demostren que els agregats formats per proteïnes amb dominis de baixa complexitat recluten selectivament altres proteïnes de les mateixes característiques, formant fibres homo o heterotípiques. Aquesta formació de fibres modulada per dominis de baixa complexitat depèn de la concentració d'aquestes proteïnes, així, els *UTRs* dels mRNAs poden estar servint per aglutinar diverses proteïnes d'unió a RNA que contenen dominis de baixa complexitat, generant una alta concentració local d'aquests dominis i afavorint l'agregació del grànul d'mRNA.

Es pot hipotetitzar que l'mRNA que continguí l'intró 16 de *CaMKIIα*, en interaccionar aquest amb Staufen2, tindrà una concentració local de proteïnes formadores de grànuls d'RNA més gran que l'mRNA de *CaMKIIα* sense intró. Així, l'intró 16 no només aporta a l'mRNA més molècules d'Staufen2, sinó que aquest augment farà que l'mRNA pugui reclutar indirectament més efectors, que li poden donar més capacitat de transport.

3. Els nivells d'mRNA de *CaMKIIα* que reté l'intró 16 responen a estímuls sinàptics

Es poden hipotetitzar moltes funcions per a l'mRNA de *CaMKIIα* que conté l'intró 16, tant a nivell d'RNA com codificant una proteïna truncada. De qualsevol forma, el fet que estigui present en cervell adult i que es transporti a regions encara més distals que *CaMKIIα* fa pensar que la seva funció, com la de *CaMKIIα* sense intró, ha de respondre a activitat sinàptica. L'intró 16 conté codons STOP a tots els seus marcs de lectura, de forma que, si es tradueix, hauria de degradar-se per *NMD*, ja que després de l'intró 16 hi ha una unió exó-exó entre els exons 17 i 18.

En principi es pensava que la funció de l'*NMD* era exclusivament degradar mRNAs que contenien mutacions que generaven *PTC*, per evitar la seva traducció en proteïnes potencialment deletèries, però es coneixen diversos casos en què un gen té un intró al 3'*UTR*, creant així una unió exó-exó *downstream* del codó STOP normal. L'expressió d'aquests gens es regula posttranscripcionalment per *NMD* ¹⁵². En el context sinàptic, l'mRNA del gen *Arc* és transportat a dendrites i traduït localment en resposta a estímul, essent posteriorment degradat per *NMD*. Aquest mecanisme permet a la cèl·lula controlar de forma molt precisa la quantitat de proteïna que es generarà a partir d'un mRNA.

Hi ha diverses hipòtesis per explicar perquè traduir un l'mRNA i degradar-lo immediatament, la primera i més òbvia és la producció d'una nova isoforma de *CaMKIIα*. Donada la localització de l'intró 16, aquesta proteïna contindria sencers el domini quinasa, el domini autoregulator i el domini d'unió a Calmodulina, però canviaria la meitat del domini de multimerització. La longitud de la proteïna no es veuria afectada, passant de 478 a 487 aminoàcids, però a partir de l'aminoàcid 401,

l'intró codificaria per a 86 aminoàcids diferents dels codificats pels exons 17 i 18 de *CaMKII α* (**figura 21B**). El fet que un intró modifiqués l'ORF d'una proteïna ja s'ha investigat per altres gens, com s'ha exposat a la introducció, els més coneguts són *Robo3* i *Nxf1*^{41,43}.

Les funcions d'aquesta nova isoforma de *CaMKII α* amb diferent domini d'associació són difícils d'hipotetitzar, ja que la seqüència d'aminoàcids codificada per l'intró 16 no és homologa a cap seqüència proteica coneguda. A priori, el fet que pogués ser una isoforma de *CaMKII α* que no multimeritzés sembla poc probable, estudis *in vitro* amb una versió de *CaMKII* sense el domini d'associació mostren que *CaMKII α* monomèrica necessita nivells més alts de Calmodulina per activar-se¹⁵³, ja que la seva multimerització facilita molt l'autofosforilació i per tant afavoreix l'adquisició d'independència a calci¹⁵⁴. Tot i així, no es pot excloure que els aminoàcids codificats per l'intró 16 modifiquessin l'activitat o la unió a substrats de la proteïna, generant una nova versió de *CaMKII α* lliure.

Una altra possibilitat seria una versió de *CaMKII α* capaç de multimeritzar amb les *CaMKII α* que provenen de l'mRNA sense intró retés, conferint al dodecamer alguna característica addicional. Com s'ha comentat, existeixen quatre gens de *CaMKII α* , que varien principalment en el *linker* entre el domini d'associació i el domini autoregulador. *CaMKII β* per exemple, conté un domini d'unió a actina i els heterododecamers que continguin la isoforma β adquiriran aquesta capacitat¹⁵⁵.

En aquest sentit és interessant que els dominis d'associació de *CaMKII α* contingui o no l'intró 16 serien idèntics fins després d'un domini molt conservat d'interacció entre el domini d'associació i el domini quinasa de la subunitat adjacent dintre del dodecamer, però no inclouria la "interfície clip β ", encarregada de dificultar la unió a Calmodulina¹⁰⁶. D'aquesta manera, una subunitat de *CaMKII α* codificada per l'mRNA que conté l'intró 16 podria incorporar-se en un dodecamer i modificar la seva resposta a nivells de calci (**figura 21A, B, C i D**).

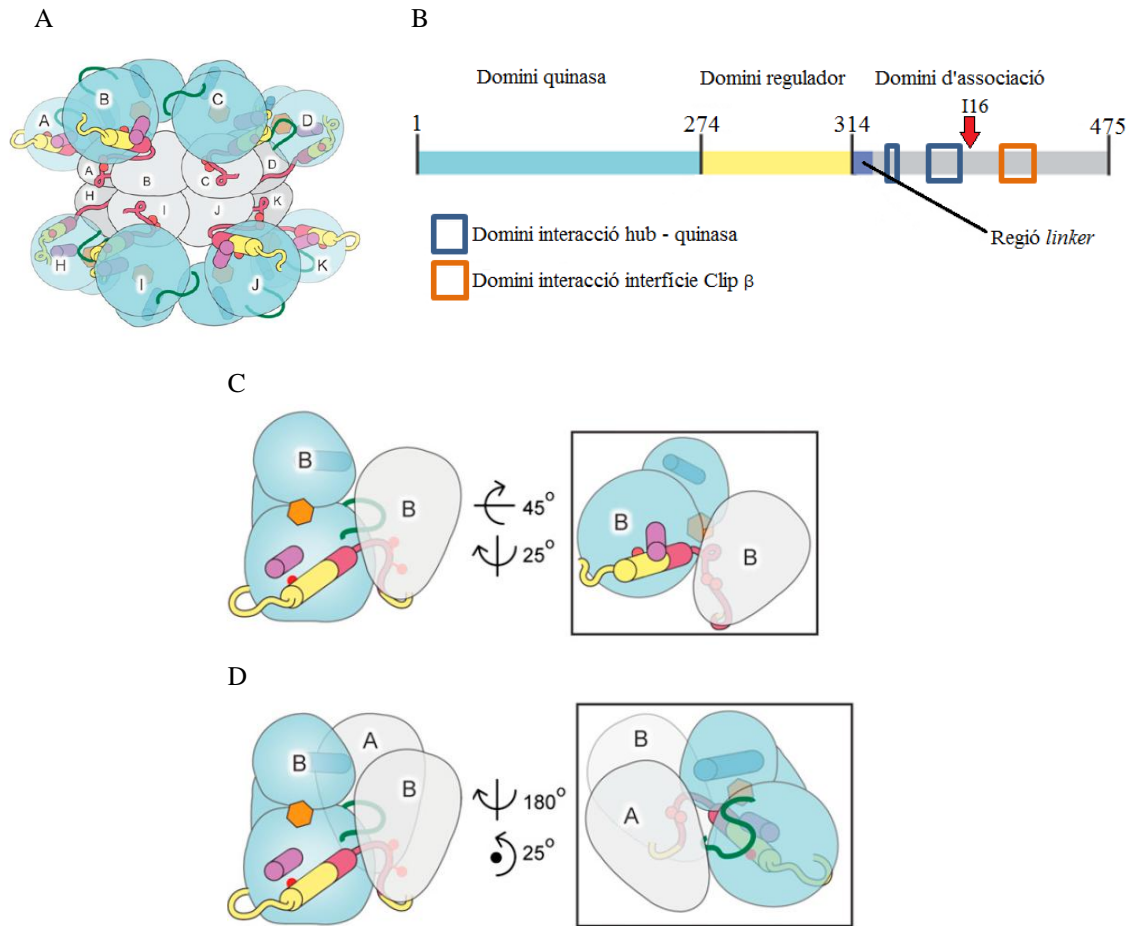


Figura 21. Estructura del dodecamer CaMKII α i possible afectació d'una subunitat codificada per CaMKII α retenint l'intró 16

A. Dodecamer de CaMKII α , es mostra en blau el domini quinasa de les diferents subunitats, i en gris els dominis d'associació, formant el "hub" central d'oligomerització. En verd els dominis d'associació, formant el "hub" central d'oligomerització. En verd, la seqüència d'activació. **B.** Estructura d'una subunitat de CaMKII α , mostrant els subdominis del domini final d'associació responsables de la interacció hub-domini quinasa (blau) i hub-domini d'unió a Calmodulina (taronja). La fletxa vermella marca el punt a partir del qual l'mRNA que reté l'intró 16 codifica per diferents aminoàcids. **C.** Es mostra en detall la disposició domini quinasa-domini d'associació provocada pel domini d'interacció interfície Clip β . Al detall enquadrat es mostra com el domini d'associació bloqueja l'accés al domini d'unió a Calmodulina. **D.** Es mostra en detall la disposició domini quinasa-domini d'associació provocada pel domini d'interacció hub-quinasa, pel qual el domini d'associació de la subunitat A interacciona amb el domini quinasa de la subunitat B.

Imatges extretes i adaptades de Chao LH., et al. 2011.

La regulació dels dodecamers de CaMKII α és molt complexa, l'activació via fosforilació de T286 necessita que dues subunitats adjacents estiguin unides a Calmodulina, motiu pel qual es creia que CaMKII α responia a la freqüència d'entrada de calci de forma estocàstica, activant-se només quan justament dues subunitats adjacents unien Calmodulina ¹⁵⁶. Avui dia es creu que les diferents subunitats dintre del dodecamer cooperen, i que la unió d'una a Calmodulina sensibilitza les subunitats adjacents per unir Calmodulina amb més afinitat ¹⁵⁷. CaMKII α es tradueix en resposta a activitat sinàptica ¹⁵⁸, i els resultats presentats demostren que la isoforma que conté l'intró també es tradueix al mateix context. D'aquesta manera, la isoforma intrònica estaria proporcionant, en resposta a estímul, una subpoblació de CaMKII més sensible a

l'activació per Calmodulina, facilitant el manteniment de la senyalització intracel·lular en resposta a entrades de calci.

Una altra possibilitat que explicaria la presència de l'intró 16 i la seva degradació després d'un estímul sinàptic seria en la seva habilitat per formar grànuls d'RNA. Hem demostrat que l'intró 16 de *CaMKIIα* interacciona, tot i que sigui indirectament, amb l'mRNA endogen, sense intró, de *CaMKIIα*. Si analitzem la seqüència de nucleòtids de l'intró 16 i la de *CaMKIIα* veiem que poden hibridar entre elles, formant un fragment de dsRNA (figura 22).

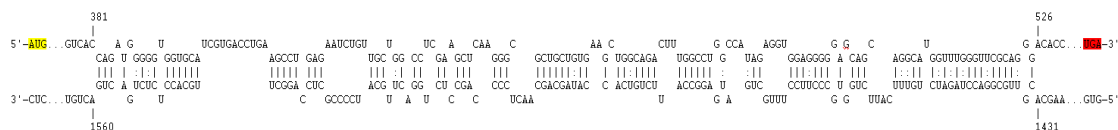


Figura 22. L'intró 16 i la ORF de *CaMKIIα* dimeritzen *in silico*

Interacció Watson i Crick entre la seqüència de l'intró 16 (abaix) i l'ORF de l'mRNA de *CaMKIIα* en groc codo Start, en vermell codo STOP). Predicció realitzada amb IntaRNA, Wright PR., et al. 2014.

De la mateixa manera que és possible que la presència de l'intró afavoreixi la inclusió de l'mRNA que el conté a un grànul d'RNA en augmentar la concentració local de proteïnes d'unió a RNA amb dominis de baixa complexitat, si l'mRNA que conté l'intró hibriditzés amb un mRNA sense introns, es forçaria la presència en un volum molt reduït de dos *UTRs* de *CaMKIIα* i un intró 16. L'intró estaria unint així una subpoblació d'mRNAs de *CaMKIIα*, incloent-les en un grànul d'RNA que podria contenir més proteïnes de transport que els mRNAs que només inclouen *CaMKIIα* sense intró. Potser, aquells mRNAs de *CaMKIIα* que han de viatjar fins a les regions més distals de les dendrites necessiten més proteïnes de regulació de la traducció i el transport, per impedir la seva traducció fins a arribar al seu destí. En rebre un estímul adient, el grànul d'RNA es desfà, alliberant els mRNAs que conté¹²³. Una forma de desfer aquest grànul seria eliminar l'RNA que conté l'intró, fet que desencadenaria la separació de gran part de les proteïnes d'unió a RNA presents. Aquesta hipòtesi concorda amb l'enriquiment en mRNAs amb intró 16 a les regions més distals de les dendrites i amb la seva degradació per *NMD*, també amb dades recents sobre el número d'mRNAs que s'inclouen als grànuls de transport. Es creu que la majoria de grànuls carreguen una molècula d'mRNA, amb algunes excepcions que poden carregar dos o tres¹²⁴. Cal considerar que les aproximacions utilitzades en aquests estudis utilitzen només sondes contra els exons dels mRNAs que detecten, de forma que un grànul que contingui un mRNA totalment processat i un altre amb l'intró donaria la mateixa senyal que un grànul amb dos mRNAs sense introns. Per altra banda, en aquests estudis el nombre de grànuls de transport que contenen dues molècules d'mRNA és molt baix, coherent amb el factor limitant que suposaria la retenció de l'intró 16, fet que succeeix en un total d'1-3% dels mRNAs.

Aquest mecanisme de transport dependent d'hibridació entre dues molècules d'mRNA seria nou a mamífers, però està descrit per a altres espècies. Per exemple, a *D. melanogaster*, la dimerització dels 3' *UTR* de l'mRNA d'*Oskar* és necessària per a la seva correcta localització a l'oòcit⁷². El mateix passa a l'mRNA de *Bicoid*, en aquest cas la dimerització recluta a Staufen i és necessària també per la formació del grànul

d'RNA¹⁵⁹. Pel que fa a mamífers, la dimerització intermolecular entre mRNAs i ncRNAs està descrita per a moltes funcions diferents¹⁶⁰.

4. Staufen2 estabilitza l'mRNA de *CaMKIIα* que conté l'intró 16

La interacció demostrada en aquest treball entre Staufen2 i l'intró 16 de *CaMKIIα* concorda amb el fet que localitza a punts distals de les dendrites, a més, els resultats presentats demostren que l'estabilitat de l'intró 16 contingut a *CaMKIIα* depèn dels nivells d'Staufen2. Això s'emmarca en la doble funció de moltes proteïnes de transport, entre elles Staufen2, amb el transport i control de la traducció dels mRNAs amb què interaccionen. L'mRNA de *CaMKIIα* està inclòs en grànuls d'RNA que contenen Staufen2, i mentre s'estan transportant la seva traducció està silenciada, en rebre un estímul, l'mRNA s'allibera del grànul i es tradueix¹²³. Les nostres dades demostren que el mateix està succeint amb l'mRNA que conté l'intró 16, però, degut l'estructura resultant de la retenció intrònica, aquest mRNA serà degradat per *NMD* en ser traduït.

El fet que Staufen2 sigui necessari per impedir la seva traducció fins que arribi l'estímul es justifica amb les dades disponibles sobre els grànuls d'RNA que contenen Staufen2. Altres laboratoris han descrit que aquests grànuls contenen CBP80¹⁰¹, que forma part del *cap-binding complex*¹⁶¹. Després de la primera ronda de traducció, CBP80 és reemplaçada pel factor d'inici eIF4E i la traducció continua, de forma que CBP80 i eIF4E són mútuament excloents a l'mRNA, i la presència de CBP80 al grànul demostra que els mRNAs que conté no s'estan traduït.¹⁶² CBP80 interacciona a més amb Upf1, proteïna important per al *NMD* i present també als grànuls d'Staufen2.

El mateix laboratori que demostra la unió d'Staufen2 amb CBP80 i Upf1 no troba interacció amb proteïnes que formen el complex *EJC* (eIF4AIII, Magoh i Y14), indispensables per a la degradació d'mRNAs per *NMD*. Això és sorprenent, ja que els *EJC* estan presents a tots els mRNAs que provenen de gens que contenen introns, que són la gran majoria dels gens de mamífer. Altres laboratoris sí que han trobat interacció entre Staufen2 i Y14 / Magoh¹⁴⁸. D'aquesta manera, l'mRNA de *CaMKIIα* que conté l'intró requereix ser marcat, possiblement al nucli, abans de la seva exportació al citoplasma¹⁴⁹, per incloure'l en un grànul d'RNA i evitar la seva traducció prematura, que promouria la seva degradació per *NMD*.

5. L'intró 16 de *CaMKIIα* afecta el transport de l'mRNA sense intró

Amb tota la informació sobre la regulació i transport de l'intró 16 de *CaMKIIα*, i la seva interacció amb els exons del mateix mRNA, es va cercar un possible efecte de l'intró, expressat de forma exògena, als nivells de *CaMKIIα* neuronals. Sobreexpressar l'intró a neurones hipocampals augmenta els nivells d'mRNA endògens de *CaMKIIα* a les dendrites, sense afectar significativament els seus nivells al soma cel·lular. Aquest resultat concorda amb el fet que l'intró 16 endogen viatja i està molt més enriquit en zones distals de les dendrites que al soma cel·lular. El mecanisme que pot estar darrere d'aquest fenotip no es coneix encara, però investigacions sobre la modulació de l'expressió dendrítica de diferents mRNAs ens permet formular diverses hipòtesis.

Es coneixen diversos ncRNAs que actuen com a esponja, reclutant miRNAs i així evitant que aquests reconguin la seva diana a l'mRNA i modulin la seva estabilitat o

traducció. Altres laboratoris han demostrat la regulació de la traducció local de *CaMKII α* per miRNAs ¹⁶³. El nostre intró 16 podria contenir dianes d'unió a miRNA, actuant com a esquer impedit que els miRNAs anellin amb el 3' *UTR* de *CaMKII α* , així, l'intró podria estar essent transportat a dendrites com un protector contra miRNAs, formant part de la regulació dels mRNAs. Sabem que el nostre intró 16 interacciona amb Staufen2, i està demostrada la interacció entre aquesta proteïna i diferents efectors del complex de degradació d'mRNAs depenent de miRNAs RISC ¹⁰¹.

Altres laboratoris han trobat molts exemples de ncRNAs que competeixen amb els mRNA per unió a miRNA, modulant així l'estabilitat i expressió de transcrits ^{164,165}. Els resultats de la smFISH en què es veu l'augment de *CaMKII α* exònica (**figura 17**) a les dendrites són difícils d'interpretar, a causa de les limitacions intrínseques a la hibridació de les sondes. Com s'ha comentat prèviament, els mRNAs que estan inclosos a ribonucleopartícules són menys accessibles a les sondes, quan aquestes partícules es desfan, a causa de tractaments amb proteasa o a què l'mRNA és alliberat per a la seva traducció, el transcrit es torna accessible i detectable per FISH ¹³⁴. Els miRNA poden promoure la degradació de l'mRNA o el silenciament de la seva traducció, depenent de l'anellament entre les dues molècules ¹⁶⁶. Donades les limitacions de la smFISH, no podem assegurar si el fet de veure més partícules d'mRNA de *CaMKII α* és a causa de que hi ha més transcrits, o aquests estan en traducció activa, i per tant més accessibles a les sondes. Qualsevol de les dues explicacions concordaria amb la protecció contra miRNAs per part de l'intró 16 de l'mRNA de *CaMKII α* endogen.

Una altra hipòtesi per explicar el fenotip de sobreexpressió exògena de l'intró 16 està relacionada amb el que s'ha comentat a l'apartat de la seva degradació per *NMD*. Si l'intró està hibridant amb l'mRNA de *CaMKII α* i actuant com a factor limitant per a la creació de grànuls d'RNA que viatjaran a zones distals de les dendrites, la seva sobreexpressió pot augmentar la quantitat de *CaMKII α* que trobarem transportada. A favor d'aquesta hipòtesi estan els mecanismes de transport dels mRNAs ja esmentats de *D. melanogaster*, *Oskar* i *Bicoid*, que requereixen dimerització per al seu correcte transport ^{72,159}. Altres laboratoris han demostrat que el 3' *UTR* de *CaMKII α* uneix tant Staufen1 com Staufen2 ^{101,123}, i les nostres dades demostren que l'intró 16 uneix Staufen2. Això sumat a la interacció demostrada entre les molècules de l'intró 16 i de *CaMKII α* , possiblement per hibridació, proporcionaria un microambient molt ric en proteïnes amb dominis de baixa complexitat, que ajudarien a generar un grànul d'RNA que transportaria el transcrit de *CaMKII α* fins a dendrites. Donada la baixíssima quantitat d'mRNAs endògens que retenen l'intró 16 comparats amb el total, i el fet que aquesta diferència va baixant a mesura que avancem a les dendrites fa pensar que poden ser el factor limitant per a la creació de grànuls destinats a les zones més distals de la cèl·lula. La sobreexpressió de l'intró 16 generaria llavors les condicions perquè més mRNAs endògens de *CaMKII α* es transportessin a dendrites.

Conclusions

- *CaMKII α* reté al seu mRNA madur l'intró 16, que es exportat al citoplasma.
- L'intró 16 confereix a l'mRNA que el conté la capacitat de ser transportat a zones distals de les dendrites.
- L'intró 16 de *CaMKII α* interacciona amb la proteïna d'unió a RNA Staufen2
- L'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16 és candidat per degradació via *NMD*.

| Capítol 1

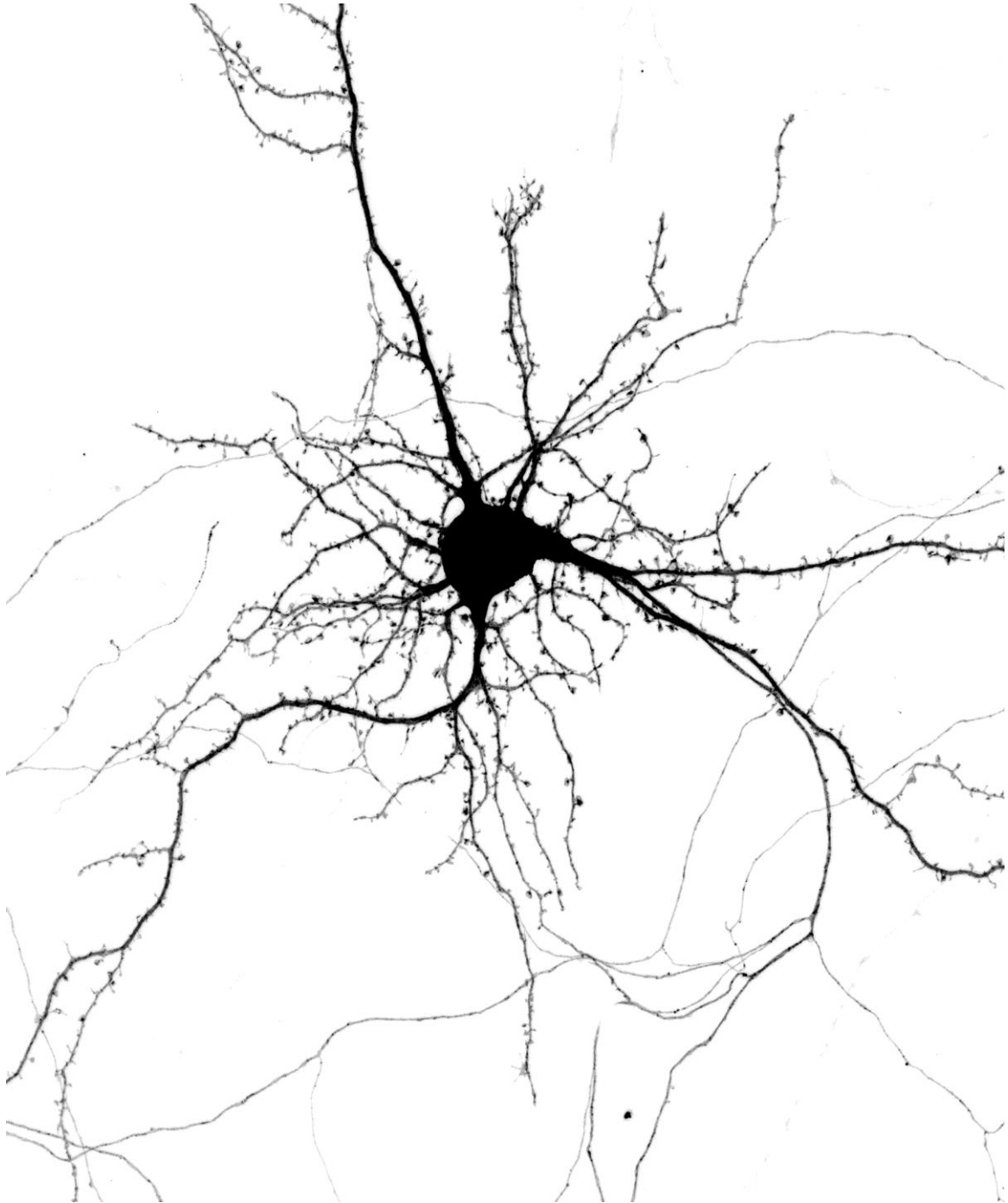
- Staufen2 estabilitza l'mRNA de *CaMKII α* que reté l'intró 16.
- L'expressió exògena de l'intró 16 afavoreix el transport de l'mRNA de *CamKIIa* totalment processat a dendrites.

El treball presentat a aquest primer capítol es va publicar a:

Ortiz, R.,* Georgieva, M.,* Gutierrez, S., Pedraza, N., Fernandez-Moya, S., Gallego, C.
Recruitment of Staufen2 enhances dendritic localization of an intron-containing
CaMKII α mRNA. *Cell Rep Jul 5;20(1):13-20.* (2017).

I es pot consultar a l'annex 1

Capítol 2



KIS afavoreix la traducció de receptors AMPA i estimula la remodelació d'espines dendrítiques

Introducció

1. Plasticitat sinàptica

Les neurones són capaces de modificar l'estructura i força de les seves sinapsis en resposta a activitat. És un tema de gran interès, ja que tot i que encara és motiu de debat, es creu que aquesta modificació estructural i funcional de la capacitat de transmetre informació entre neurones és la base de l'aprenentatge i la memòria ^{167,168}. En el cas de les sinapsis excitadores de l'hipocamp, aquesta plasticitat es manifesta en canvis a les espines dendrítiques, que són les estructures on la gran majoria de postsinapsis s'acumulen ^{169,170,171}, aquestes espines emergeixen de la dendrita de la neurona postsinàptica i contacten amb l'axó de la neurona presinàptica. La seva mida i la quantitat de proteïnes a la regió coneguda com a *PSD* (de l'anglès, *Post synaptic density*) correlacionen amb la força de la sinapsi que contenen ¹⁷². La neurona regula localment i amb una resolució d'espinas dendrítica individual aquests dos paràmetres, així, una estimulació amb intensitats i freqüències determinades desencadenarà una senyalització local que augmentarà la mida de l'espinas dendrítica i de la *PSD*, augmentant la quantitat de receptors sinàptics i proteïnes d'assemblatge, entre altres.

Les espines dendrítiques emergeixen de la dendrita com petites protrusions, que es poden estirar en forma de fil·lopodis buscant trobar terminals presinàptics. En contactar-hi, depenent de la intensitat i freqüència de l'estímul que la postsinapsi rep, es produeix un augment o disminució de la capacitat de resposta d'aquella mateixa sinapsi, processos anomenats *LTP* o *LTD* (de l'anglès, *Long Term Potentiation* o *Long Term Depression*) ^{171,173}. Pel que fa a la potenciació a llarg termini, les seves primeres fases funcionen de forma depenent de citoesquelet d'actina i translocació de proteïnes cap a l'interior de l'espinas dendrítica, fosforilacions i altres modificacions posttraduccionals de proteïnes preexistents ¹⁷⁴. Per exemple, l'entrada de calci activa la principal proteïna senyalitzadora postsinàptica, CaMKII, que fosforilarà subunitats de canals iònics per augmentar la seva permeabilitat, a més d'afavorir la translocació a membrana de més subunitats de receptors ¹²⁶. Aquests canvis, però, per mantenir-se en el temps necessiten traducció de proteïna *de novo*, part de la qual és dura a terme amb mRNAs transportats a la dendrita i regulats de manera local ¹⁷⁵.

La *PSD* conté les proteïnes directament responsables de la transmissió sinàptica. El seu proteoma és molt complex i inclou les adherines responsables del manteniment de la unió sinàptica, les proteïnes senyalitzadores que intervindran a la modificació de la sinapsi en resposta a estimulacions, i moltes altres. En el present treball ens centrarem en tres components, entre els més importants i estudiats de la postsinapsi, els receptors NMDA, els receptors AMPA i la proteïna d'assemblatge PSD-95.

Els receptors AMPA són els principals actors de la despolarització de membrana en resposta a l'alliberament de glutamat per part de l'axó presinàptic, són homo o heterotetràmers de les proteïnes GluR1 a GluR4, codificats per quatre gens diferents, i a la vegada diversificats per *splicing* alternatiu i edició d'RNA. D'aquesta manera, la varietat de receptors AMPA a la sinapsi és molt alta. Principalment són permeables a sodi i potassi, però la minoria de tetràmers que no tenen la subunitat GluR2 són també permeables a calci. La composició del tetràmer modifica així la selectivitat a cations, a més de la seva permeabilitat, temps d'inactivació i sensibilitat a glutamat ¹⁷⁶. Part de la

senyalització intracel·lular provocada per l'*LTP* desencadena modificacions posttraduccionals a la cua intracel·lular de les subunitats que formen els canals, regulant també la seva conductivitat. En resposta a unió de glutamat el canal AMPA s'obre, causant despolarització, que al seu torn activarà els canals d'NMDA, principals responsables de l'entrada de calci. Aquesta pujada en els nivells postsinàptics de calci és la principal senyalitzadora, via CaMKII, per a promoure *LTP*. CaMKII, al seu torn, fosforila subunitats d'AMPA i augmenta la seva permeabilitat a ions, a més d'afavorir el tràfic de nous receptors cap a la membrana sinàptica. Com s'ha explicat abans, aquestes primeres fases de l'*LTP* són independents de traducció, però per mantenir-se es necessita traducció *de novo*. Aquest augment en la quantitat de receptor AMPA a la membrana sinàptica és la principal responsable de l'augment de la força de la sinapsi, això és, de la despolarització de la membrana en resposta a l'alliberament de glutamat. Els nivells de receptors NMDA són més o menys estables entre diferents sinapsis, els de receptors AMPA varien més en resposta a activació, i per tant els que més diferencien una sinapsi forta d'una feble¹⁷⁷. En part, l'*LTP* es basa en un increment del número i excitabilitat dels receptors AMPA, que al seu torn, responen més fàcilment i amb més despolarització a estímuls facilitaran l'obertura dels canals de calci NMDA. Els mRNAs que codifiquen per les subunitats de receptor AMPA GluR1 i GluR2 són paradigmàtics del transport d'mRNAs i la seva traducció local regulada en el context d'*LTP*^{176,178,179}.

Un altre actor a la postsinapsi és PSD-95, membre de la família de proteïnes amb dominis PDZ, amb un paper fonamental a l'organització i l'agregació de diferents tipus de proteïnes a la sinapsi¹⁸⁰. És la proteïna més abundant del PSD i un marcador molt utilitzat per a la postsinapsi, a causa de la seva abundància a la sinapsi^{181,182}, correlació amb la força d'aquesta, i alta concentració sota la membrana sinàptica. PSD-95 és un regulador central de la maduració de la sinapsi i de l'*LTP*, participa a la creació de espines dendrítiques noves i al creixement de les existents^{183,184}. PSD-95 interacciona directament amb els receptors NMDA, i indirectament amb els AMPA¹⁸⁵, és molt més abundant que aquests dos canals iònics, però més petit i capaç de multimeritzar. D'aquesta manera PSD-95 forma una capa just sota la membrana sinàptica que manté concentrats els receptors^{172,186}. Tot i que el control de la traducció de PSD-95 no està tan estudiat com el dels receptors AMPA i NMDA, es coneix també el seu transport a dendrites i traducció en resposta a estímul sinàptic¹⁸⁷.

2. Citoesquelet en el context de les espines dendrítiques

Totes les formes de plasticitat sinàptica a espines dendrítiques depenen de polimerització i despolimerització del citoesquelet d'actina, és aquest el responsable de la morfologia i motilitat de les espines. És necessari per a la formació de la protrusió a partir de la dendrita, també per als remodelaments morfològics, i fins i tot per a mantenir l'estructuració dels elements de la postsinapsi¹⁸⁸. El citoesquelet d'actina és relativament poc abundant a la dendrita, però la seva concentració, tant de G-actina com d'F-actina a l'interior de l'espina és molt alta. Les espines dendrítiques també són molt riques en proteïnes reguladores de F-actina, que es desplacen dintre i fora de l'espina en resposta a estímuls per modular el grau de polimerització de l'actina a cada moment. Per exemple, Debrina, un estabilitzador dels filaments d'F-actina, surt de l'espina dendrítica per permetre la despolimerització que precedeix l'augment de mida de l'espina, tornant després per estabilitzar els nous filaments d'F-actina¹⁸⁹. La

subunitat β de CaMKII transporta aquesta proteïna al citoesquelet, on a part de funció senyalitzadora com a quinasa, té una funció estructural molt important protegint el citoesquelet de l'accés de proteïnes despolimeritzadores¹¹⁷. A banda de modular el seu grau de polimerització, la plasticitat sinàptica també necessita traducció local de l'mRNA de β -actina, per mantenir la seva concentració al llarg de la remodelació de l'espina⁹².

La tubulina està present a les espines dendrítiques en molt baixa concentració i de forma transitòria, per aquests motius el seu estudi és molt més recent i hi ha menys dades que per al citoesquelet d'actina. El citoesquelet de tubulina és molt abundant a les dendrites, i és el responsable del transport de grànuls d'RNA. Molts dels marcadors proteics utilitzats per localitzar microtúbuls consisteixen en proteïnes associades a tubulina polimeritzada, que moltes vegades tenen com a requisit que el filament de tubulina sigui estable. Recentment s'han trobat invasions del citoesquelet de tubulina a les espines, és interessant el fet que aquestes invasions són transitòries, formades per microtúbuls que polimeritzen cap a l'interior de l'espina i despolimeritzen a continuació. Tot i que encara hi ha poques dades, està demostrat que aquestes invasions són importants per a la plasticitat sinàptica de la espina dendrítica que les rep, transporten grànuls d'mRNA directament a l'interior de l'espina, i es creu que també poden tenir un rol important en la polimerització del citoesquelet d'actina^{190,191}. Mentre aquest últim tindria un rol estructural, les dades presents suggereixen que el citoesquelet de tubulina aportaria capacitats de transport de proteïnes i mRNAs entre la dendrita i l'interior de l'espina.

3. Control de la traducció local de proteïnes

Les neurones són cèl·lules molt polaritzades i especialitzades, com s'ha comentat, estímuls específics a una espina dendrítica determinada canviaran la seva estructura i composició proteica per translocació de proteïnes preexistents i canvis en el citoesquelet. Aquests canvis poden succeir amb una resolució d'espina individual, sense afectar altres sinapsis properes en l'espai, i per mantenir-se en el temps necessiten aportació de noves proteïnes sinàptiques i de citoesquelet.

Per aquests motius, les neurones no només transporten proteïnes traduïdes al soma fins a les sinapsis, sinó també mRNAs en estat de traducció silenciada. Aquesta nova capa de regulació posttranscripcional afegeix flexibilitat i capacitat de resposta ràpida a estímuls a les diferents sinapsis. Estudis recents mostren que aproximadament un terç dels mRNAs expressats a l'hipocamp són transportats a dendrites⁵⁵, entre ells els que hem exposat anteriorment, *PSD-95*, *GluR1* i *GluR2*, però també molts altres relacionats amb l'adhesió sinàptica (cadherines), la senyalització intracel·lular (*CaMKII α*), i els processos responsables per al manteniment de l'estructura dendrítica i les sinapsis, com els constituents o reguladors del citoesquelet d'actina i tubulina.

Aquest procés de transport d'mRNAs i traducció localitzada és un camp d'estudi actiu des de fa dècades, amb els primers ribosomes localitzats a dendrites detectats als anys 80⁴⁴. Tot i així, els mecanismes moleculars involucrats romanen desconeguts en molts casos. Aquest camp de la regulació i el control de l'expressió gènica local té implicacions en la funció cerebral, des del desenvolupament fins a la plasticitat

sinàptica a l'edat adulta, i moltes malalties o deficiències neuronals s'associen a la desregulació d'aquests processos de control de la traducció de proteïnes.

Es creu que els grànuls d'RNA destinats a transportar mRNAs fins a dendrites es comencen a generar al nucli i reben altres proteïnes reguladores al citoplasma ¹⁴⁹, després viatjaran amb l'ajuda de dineïnes i kinesines a través del citoesquelet de tubulina ¹²³. Part integrant del procés de transport d'mRNA i en la que més es centra el present estudi és la regulació de la seva traducció, com hem dit, els mRNAs viatgen per proporcionar a la cèl·lula un repositori que pot traduir de forma local en resposta a estímul, per tant, la traducció d'aquests mRNAs ha d'estar silenciada fins que arribin a la localització de destí i rebin l'estímul adient.

Multitud de processos, tant nuclears com citoplasmàtics, participen en la regulació de la traducció d'mRNAs. Una gran varietat de proteïnes uneixen RNA, i a la vegada aquestes proteïnes interaccionen amb multitud d'altres efectors que regularan la iniciació de la traducció d'mRNAs, la seva elongació i terminació, així com la seva estabilitat.

3.1. Poliadenilació citoplasmàtica i CPEBs

Un dels paràmetres dels mRNAs que afecta la seva traducció i és controlat als grànuls d'RNA és la poliadenilació citoplasmàtica. Al nucli, després de transcriure, als mRNAs se'ls hi afegeix una cua d'adenines llarga abans de ser exportats al citosol ^{192,193}, allà, la cua d'adenines recluta proteïnes que ajuden al procés d'inici de la traducció ¹⁹⁴. Els mRNAs que han de ser transportats a dendrites contenen determinants al seu 3'UTR que uniran proteïnes, bé ja al nucli o després de l'exportació al citoplasma, que evitaran la seva traducció reclutant altres efectors.

CPEB1 uneix els elements *CPEs* (*Citoplasmatic Poliadenilation Elements*) dels mRNAs, i recluta diverses proteïnes efectores que modularan la longitud de la cua de poliadenines i la iniciació de la traducció. La gran majoria de descobriments sobre el mecanisme molecular d'inhibició de CPEB1 s'han fet a l'organisme model *Xenopus laevis*, que és un bon model per estudiar el control de la traducció d'mRNAs, ja que acumula mRNAs silenciats durant la maduració meiòtica dels seus oòcits. A *X. laevis*, CPEB modula la traducció de l'mRNA al que s'uneix reclutant Maskina, que interacciona amb eIF4E bloquejant la unió del complex d'inici de la traducció. També recluta Gld2, una polimerasa de poliadenines, i PARN, una ribonucleasa que acurta la cua de poliadenines. L'equilibri entre aquests dos enzims al grànul d'RNA està desviat cap a l'activitat de PARN, el que provoca que la cua d'adenines romangui curta. Després de l'estímul, en aquest cas hormonal als oòcits de *X. laevis*, CPEB1 es fosforila, expulsant PARN del complex i permetent així la poliadenilació de l'mRNA per Gld2. La cua llarga de poliadenines unirà la proteïna d'unió ePAB, que desplaçarà Maskina i permetrà la formació del complex d'inici de la traducció (revisat a Richter, J. D. 2007 ¹⁹⁵). Tot i que no es coneix si el mecanisme de CPEB és el mateix a dendrites que a oòcits, tots els components que interaccionen amb CPEB estan també presents a neurones ^{196,197}, fet que fa pensar en una regulació semblant.

Per altra banda, a ratolí hi ha 4 gens que codifiquen per CPEB1, 2, 3 i 4. CPEB1 a *X. laevis* i ratolí són molt homòlogues, però no la resta de CPEBs. Els dominis d'unió a RNA de CPEB2, 3 i 4 són força similars entre si i diferents de CPEB1, fet que

concorda amb la diferent seqüència d'RNA necessària per a la seva unió ¹⁷⁹. Tot això fa pensar que poden estar regulant la traducció d'mRNAs que participen de forma diferent en la plasticitat sinàptica. Així, mentre CPEB1 regula entre altres la poliadenilació de l'mRNA de la subunitat de receptor NMDA GluN2A ⁸², CPEB3 regula la traducció local de la subunitat de receptor AMPA GluA22, amb grups argumentant que és un procés independent de poliadenilació ¹⁷⁹ i altres que, a l'igual que CPEB1, regula la cua de poliadenines dels mRNAs amb què interacciona ¹⁹⁸.

CPEB3 conté a més a la seva seqüència d'aminoàcids una regió rica en glutamines, s'ha demostrat en *Aplysia* que aquesta regió provoca l'agregació de proteïnes en forma de fibres amiloides en resposta a estimulació, i és un procés important per a la formació de memòries ^{199,200}. Més recentment, els mateixos processos d'agregació s'han demostrat a ratolí. La formació d'aquest tipus d'agregats resistents i estables en resposta a estimulació local es relacionen amb la capacitat de manteniment de memòries, ja que serien capaços de mantenir-se i reclutar altres components proteics durant molt temps ^{201,202}.

4. KIS

La proteïna KIS, codificada pel gen *UHMK1* (*U2AF homology motif kinase 1*), es va anomenar amb les sigles de *Kinase Interacting with Stathmin* perquè va ser descoberta en un assaig de doble híbrid que utilitzava Stathmin com esquer. La seva característica principal és un domini d'unió proteïna-proteïna al seu C terminal, que presenta un 42% d'homologia amb el del factor d'*splicing* U2AF, fet que fa pensar que pot estar relacionat amb la interacció amb proteïnes d'unió a RNA ²⁰³. La seva expressió es troba en tots els teixits, però està especialment enriquida al sistema nerviós ²⁰⁴, dintre del qual està especialment expressada al gir dentat i a les zones CA1, CA3 i CA4 de l'hipocamp, encara que també està present a les cèl·lules de Purkinje i a la capa granular del cerebel. Els seus nivells durant el desenvolupament van augmentant arribant als nivells màxims a l'adultesa. La proteïna es troba predominantment al nucli, tot i que també està present al citoplasma, i en neurones presenta un patró puntejat a dendrites ²⁰⁵.

Al nucli, s'ha demostrat que KIS té una distribució similar a la de complexos d'*splicing*. També s'ha demostrat la fosforilació per part de KIS del factor d'*splicing* SF1. Aquest paper nuclear de KIS es important per a l'assemblatge de la maquinària d'*splicing*, la seva eficiència, i per tant l'expressió gènica de gens específics de cervell ²⁰⁶. La absència de KIS provoca defectes cognitius i altera l'expressió gènica del cervell, desembocant en diferències en el condicionament d'animals *knock out* per a aquesta quinasa ²⁰⁴. Al citoplasma, s'ha demostrat la implicació de KIS en la fosforilació i degradació d'Stathmin ²⁰⁷, modulant l'estabilitat del citoesquelet de microtúbuls i la migració de cèl·lules musculars llises vasculares (VSMC) ²⁰⁸⁻²¹⁰.

Antecedents publicats pel nostre laboratori van demostrar que KIS es localitza a dendrites i interacciona amb KIF3A, quinesina important per al transport d'mRNAs a dendrites via citoesquelet de tubulina, també a dendrites KIS col·localitza amb aquesta kinesina i amb l'mRNA endogen de β -actina. L'absència de KIS a cèl·lules corticals en cultiu afecta el creixement de les neurites, presumiblement pel seu efecte a la traducció localitzada depenent de 3'UTR de β -actina. Un assaig de purificació de KIS a

Resultats

1. KIS afecta a la correcta formació de l'arbre dendrític i de les espines dendrítiques

Estudis previs d'aquest laboratori ²⁰⁵ van demostrar la importància de KIS per a la traducció local de β -actina, gen indispensable per a la correcta elongació i maduració de les neurites, així com de les espines dendrítiques. També es va demostrar l'efecte de la disminució de KIS sobre l'elongació de les dendrites de precursors neuronals. El patró d'expressió de KIS, que incrementa durant el procés de maduració cerebral ²⁰⁹ ens va fer hipotetitzar que també podria tenir un rol en el correcte desenvolupament de l'arbre dendrític i les espines dendrítiques que s'hi formen a neurones diferenciades.

Per comprovar-ho, es van transfectar a neurones hipocampals cultivades *in vitro* un plàsmid que coexpressava GFP i un shRNA contra KIS, o bé un shRNA contra Luciferasa com a control. La transfecció es va realitzar a 13 DIVs i es va deixar expressar shRNA durant 5 dies més, per tal d'assegurar la disminució als nivells de KIS i també per deixar temps perquè les espines dendrítiques desenvolupessin la seva morfologia madura.

Els cultius es van fixar a 18 DIVs i es van analitzar les neurones transfectades per microscopia confocal. Les neurones que expressaven l'shRNA contra KIS mostraven una complexitat dendrítica reduïda, així com unes espines dendrítiques menys desenvolupades (**figura 24A i B** i detall de dendrites ampliades a sota de cada neurona, respectivament). La quantificació de l'arbre dendrític es va dur a terme mitjançant anàlisi *Sholl*, que va mostrar una reducció significativa en la complexitat dendrítica de les neurones (**figura 24C**).

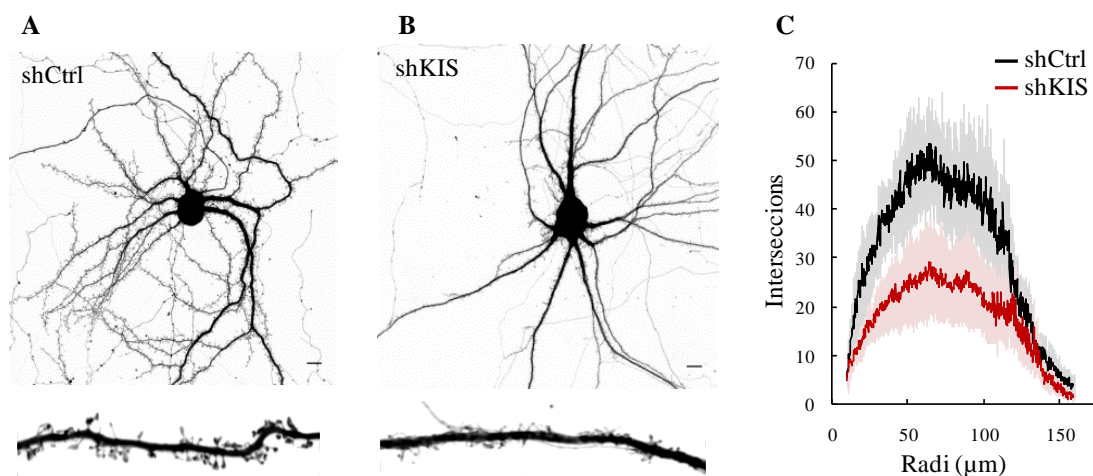


Figura 24. La disminució en els nivells de KIS afecta l'arbre dendrític neuronal

Neurones hipocampals van ser transfectades a 13 DIV amb plàsmids lentivirals expressant GFP i un shRNA control o contra KIS. Les neurones van ser fixades a 18 DIV.

A, B. Una neurona representativa de cada condició, imatges adquirides per microscopia confocal. Barra, 10 µm. Sota de cada neurona, detall de dendrita amb espines dendrítiques. **C.** Anàlisi *Sholl* de la complexitat dendrítica a 10 neurones per condició, es mostren el nombre d'interseccions de les dendrites amb cercles concèntrics en relació al seu radi. La línia mostra la mitjana i el color atenuat l'interval de confiança ($\alpha=0.01$).

Capítol 2

Per tal de quantificar les espines dendrítiques es va utilitzar un software escrit al mateix laboratori, SpineJ, que detectava les espines dendrítiques i analitzava els seus valors morfològics (veure materials i mètodes, detall de la detecció d'espines a **figura 25A**). L'anàlisi de les espines provinents de neurones expressant shRNA contra KIS mostra una reducció significativa de la seva àrea (**figura 25B**).

Un altre paràmetre morfològic interessant és la relació entre la longitud de les espines dendrítiques i la seva àrea. Per definició, aquest paràmetre serà més gran en espines poc madures, que presenten una morfologia estreta i estirada, que en espines madures amb coll estret i cap gran, en forma de xampinyó. La **figura 25C** mostra que les espines de neurones amb nivells reduïts de KIS tenen aquesta relació longitud / àrea significativament augmentada, demostrant la necessitat de KIS en el procés de maduració de les espines dendrítiques.

Les espines dendrítiques emergeixen en forma de fil-lopodis i l'estimulació de les sinapsis que contenen provoca la seva maduració i l'augment de la seva àrea ²¹¹, en un procés que requereix traducció local d'mRNAs sinàptics per mantenir-se en el temps ¹⁷⁴. La **figura 25D** mostra que el número total d'espines dendrítiques no varia en resposta a la depleció de KIS, suggerint que KIS està relacionat en el procés de regulació de la traducció local d'aquests mRNAs, i no en la creació de fil-lopodis *de novo*.

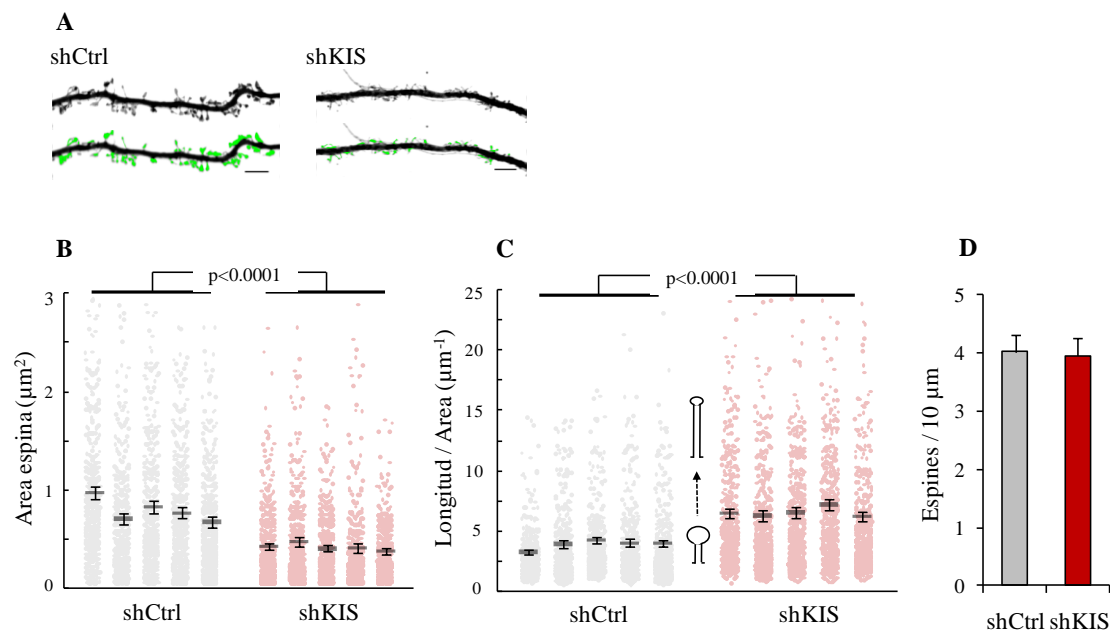


Figura 25. La disminució en els nivells de KIS afecta la morfologia de les espines dendrítiques

Neurones hipocàmpals van ser transfectedes a 13 DIV amb plàsmids lentivirals expressant GFP i un shRNA control o contra KIS. Les neurones van ser fixades a 18 DIV.

A. Detall de dendrites representatives de cada condició. En verd es mostra la identificació d'espines dendrítiques amb el software SpineJ (veure mètodes). Barra, 10 µm. **B**. Àrea d'espines dendrítiques individuals ($n > 400$) de cinc neurones de cada condició, les barres horitzontals mostren la mitjana i les barres d'error l'interval de confiança. El valor p es va calcular per ANOVA, les dues condicions es van comparar utilitzant el mètode *post hoc* de Scheffe. **C**. Longitud de les espines dendrítiques relatiu a la seva àrea ($n > 400$). Per definició aquest ràtio és més baix en espines madures en forma de xampinyó que en fil-lopodis. Estadística com a B. **D**. Quantificació del nombre d'espines per 10 µm a dendrites (5 neurones, 8 fragments de 100 µm per neurona). Es mostra la mitjana i l'interval de confiança ($\alpha = 0.05$).

Tant l'estructura de les espines com la seva remodelació morfològica necessiten polimerització i despolimerització d'actina²¹². Tot i que els fil·lopodis també tenen un esquelet dependent d'actina polimeritzada, aquesta és molt més abundant a les espines madures, ja que tota l'arquitectura sinàptica es basa en polímers d'F-actina, que a la vegada interaccionen amb proteïnes importants per a la senyalització i participen activament en la modulació de la plasticitat sinàptica.

Tots aquests antecedents, sumats al fet que KIS participa en la traducció local de β -actina²⁰⁵, ens van portar a hipotetitzar que una de les diferències morfològiques analitzades en neurones amb nivells disminuïts de KIS podien estar relacionades amb la manca d'un citoesquelet d'actina completament desenvolupat. Per demostrar-ho, es van transfectar cultius primaris hipocampals com a la **figura 24**, però després de la fixació es va tnyir l'actina polimeritzada amb fal·loïdina unida a rodamina i es va analitzar per microscòpia confocal. De nou les neurones expressant l'shRNA contra KIS mostraven espines menys desenvolupades, però a més la intensitat de la tinció contra polímers d'actina era més baixa (**figura 26A i B**). Per a la quantificació es va modificar el software SpineJ perquè donés, a més dels valors morfològics, la intensitat al canal de la fal·loïdina-rodamina. Per descartar efectes deguts a la mida de l'espina, només es van analitzar aquelles amb una àrea de $0.5 \pm 0.25 \mu\text{m}^2$. La **figura 26C** mostra que la intensitat de tinció de fal·loïdina a les espines de cèl·lules amb nivells disminuïts de KIS és significativament més baixa que al control. Aquest resultat quadra amb la literatura publicada sobre la maduració de les espines dendrítiques i el seu creixement en volum, i també amb el resultat previ d'aquest laboratori sobre el paper de KIS en la traducció local d'mRNA de β -actina a les dendrites.

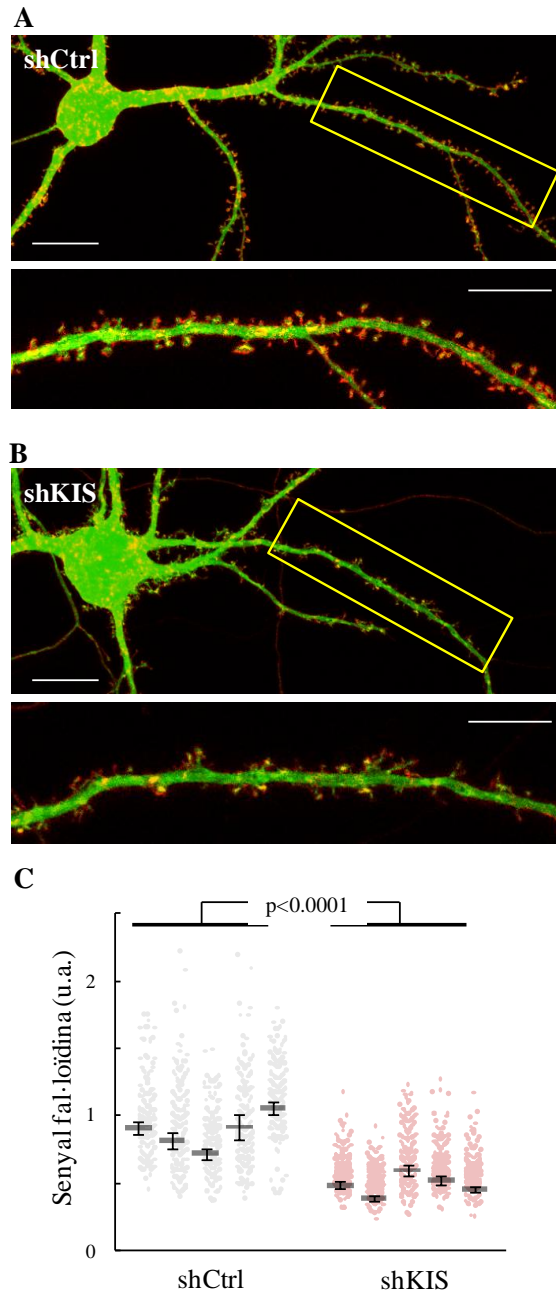


Figura 26. KIS és necessària per a la correcta polimerització d'actina a espines dendrítiques
 Les neurones es van transfectar i fixar com a les figures 24 i 25, després de la fixació, l'actina polimeritzada es va tenyir amb fal·loïdina.
A. Neurona i dendrita representativa de la transfecció amb el vector control, en vermell, senyal de fal·loïdina. **B.** Neurona i dendrita representativa de la transfecció amb el vector shKIS, en vermell, senyal de fal·loïdina. **C.** Quantificació de la intensitat del senyal de fal·loïdina mitjançant SpineJ (veure mètodes). Per evitar esbiaixes deguts a la diferent mida de les espines dendrítiques només es va quantificar el nivell d'actina polimeritzada a aquelles amb una àrea de $0.5 \pm 0.25 \mu\text{m}^2$. Es mostra la intensitat de cada espina individual ($n > 400$) a cinc cèl·lules per condició, les barres horitzontals mostren la mitjana i les barres d'error l'interval de confiança ($\alpha = 0.05$). Anàlisi estadístic de les dues condicions mitjançant ANOVA, test *post hoc* de Scheffe.

2. Els efectes de KIS sobre les espines dendrítiques afecten la funcionalitat de les seves sinapsis

L'activitat sinàptica modula canvis morfològics a les espines dendrítiques durant el desenvolupament neuronal i la plasticitat sinàptica. L'estimulació de les sinapsis contingudes en una espina determinada afecta de forma local la traducció d'mRNAs, la polimerització d'actina i la incorporació de canals iònics que canvien la força i capacitat de resposta de la sinapsi, modificant a la vegada la morfologia de l'espina. Així, la mida i la morfologia de les espines dendrítiques correlacionen amb la força de la sinapsi que hi contenen ²¹³.

Vist que KIS és necessari per a la correcta maduració de les espines dendrítiques, pel que respecta a la seva forma, mida i contingut en citoesquelet d'actina, la següent pregunta òbvia era si la manca de KIS afecta també la funcionalitat de les sinapsis. Per testar aquesta hipòtesi es van cultivar neurones hipocampals *in vitro*, es van infectar amb un lentivirus que expressava un shRNA control o contra KIS a 7 DIVs, i es van cultivar fins a 17-21 DIV, on es van mesurar les seves corrents excitadores postsinàptiques en miniatura (mEPSC, de l'anglès *miniature Excitatory PostSynaptic Current*). Aquest tipus de corrents postsinàptiques es deuen a l'alliberament d'una vesícula presinàptica de forma espontània, sense intervenir-hi un potencial d'acció. La freqüència d'aquests mEPSC correlaciona amb el nombre de sinapsis funcionals que tingui la neurona analitzada, en canvi, l'amplitud del corrent generat en resposta correlaciona amb la força de les sinapsis, amb la seva maduresa i per tant contingut en canals iònics ²¹⁴.

La inhibició de KIS provocava una baixada significativa, d'un 30%, en l'amplitud dels mEPSC, en canvi, el temps inter-esdeveniment, és a dir, la freqüència dels mEPSC, no es veia afectada (**figura 27A, B i C** traces representatives, quantificació de l'amplitud i de la freqüència d'esdeveniments respectivament). Aquest resultat és consistent amb literatura prèvia ²¹⁵, i concorda amb què KIS sembla necessari per a una correcta maduració de les espines dendrítiques, sense afectar la seva creació o nombre total.

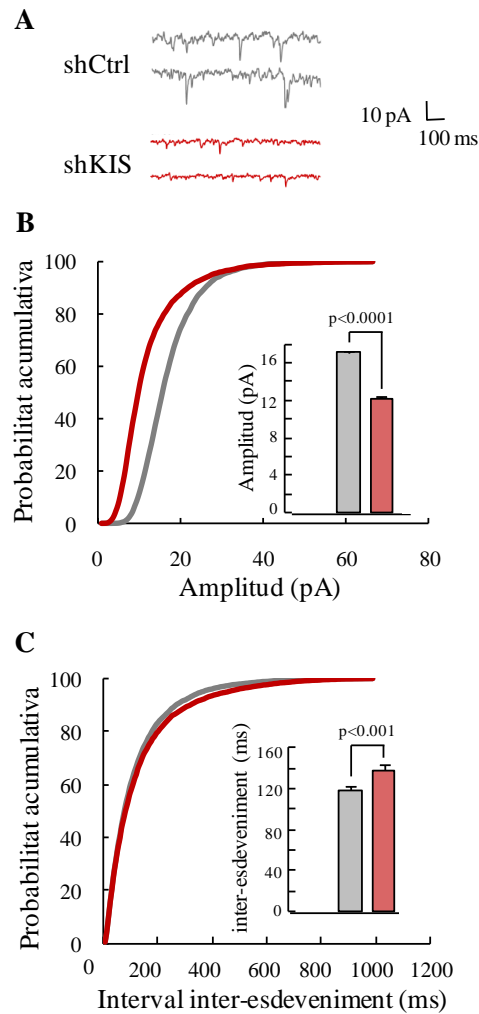


Figura 27. KIS és necessària per a la correcta transmissió sinàptica

Neurones hipocampals es van plantar a baixa densitat, infectar a 7 DIV amb vectors lentivirals expressant GFP i un shRNA control o contra KIS. Els experiments electrofisiològics es van realitzar a 17-21 DIVs.

A. Dues traces representatives de cada condició, shControl i shKIS. **B.** Histograma de probabilitat acumulativa de l'amplitud dels mEPSC obtingut de neurones infectades amb shControl (n>5700 esdeveniments) i shKIS (n>7300 esdeveniments). Les barres a l'insert mostren la mitjana de l'amplitud dels mEPSC i els intervals de confiança ($\alpha=0.05$). **C.** Histograma de probabilitat acumulativa de la freqüència o l'interval inter-esdeveniment entre mEPSC, com al panell B. Les barres a l'insert mostren la mitjana del temps inter-esdeveniment i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

3. La disminució en els nivells de KIS afecta el rati de traducció de PSD-95 i de receptors AMPA a neurones

Una de les causes que poden provocar canvis a la força de les connexions sinàptiques és una concentració alterada de receptors i altres proteïnes postsinàptiques^{27,183}. Vista la disminució que la inhibició de KIS provocava a la maduració de les espines dendrítiques i a la força de les sinapsis que contenien, la hipòtesi era que això podia ser causat per una reducció en els nivells de les proteïnes que formen part de les espines i sinapsis.

Uns dels receptors sinàptics responsables de les corrents generades en els mEPSC són els anomenats AMPA. Entre les diferents subunitats que els componen, es van

avaluar els nivells de GluR2 ²¹⁶, per ser la subunitat més abundant i present a la majoria dels receptors AMPA, i GluR1, per ser la subunitat més estudiada en el procés d'ampliació de la sinapsi en resposta a estímuls ²¹⁷. També es va avaluar l'efecte de KIS als nivells de PSD-95, per ser una proteïna estructural important per a la postsinapsi i un marcador acceptat d'espines dendrítiques i postsinapsis excitadores.

Com a la **figura 24**, es van transfectar a 13 DIVs neurones hipocampals amb plàsmids que expressaven GFP i un shRNA control o contra KIS. Als 18 DIVs les neurones van ser fixades i els nivells de les proteïnes d'interès es van analitzar per immunofluorescència i microscopia confocal, comparant els nivells a neurones transfectades contra les neurones veïnes de la mateixa imatge. Per tal d'assegurar que els efectes observats fossin deguts a la disminució dels nivells de KIS, i no a possibles efectes inespecífics de l'shRNA, també es va realitzar una cotransfecció amb l'shRNA contra KIS, afegint un cDNA de KIS resistent a l'acció de l'RNA d'interferència.

La **figura 28A** mostra que les neurones amb nivells reduïts de KIS tenen una clara disminució en els nivells de GluR1, GluR2 i PSD-95, tant al soma de les cèl·lules com a les seves dendrites (**figura 28B**). La quantificació a la **figura 28C** mostra una disminució significativa, d'un 50%, als nivells de les tres proteïnes analitzades. La cotransfecció del cDNA de KIS resistent a l'shRNA rescatava completament els nivells endògens de les proteïnes analitzades. Per assegurar que l'efecte sobre el nivell de les proteïnes analitzades no era degut a les funcions de KIS a l'*splicing* i la transcripció, es van infectar neurones amb els mateixos vectors lentivirals utilitzats per a la transfecció, als 18 DIVs es van recollir i es van mesurar els nivells d'mRNA de *GluR1*, *GluR2* i *PSD-95*. La **figura 28D** mostra que a nivell d'mRNA no hi ha diferències entre la infecció amb shControl o shKIS.

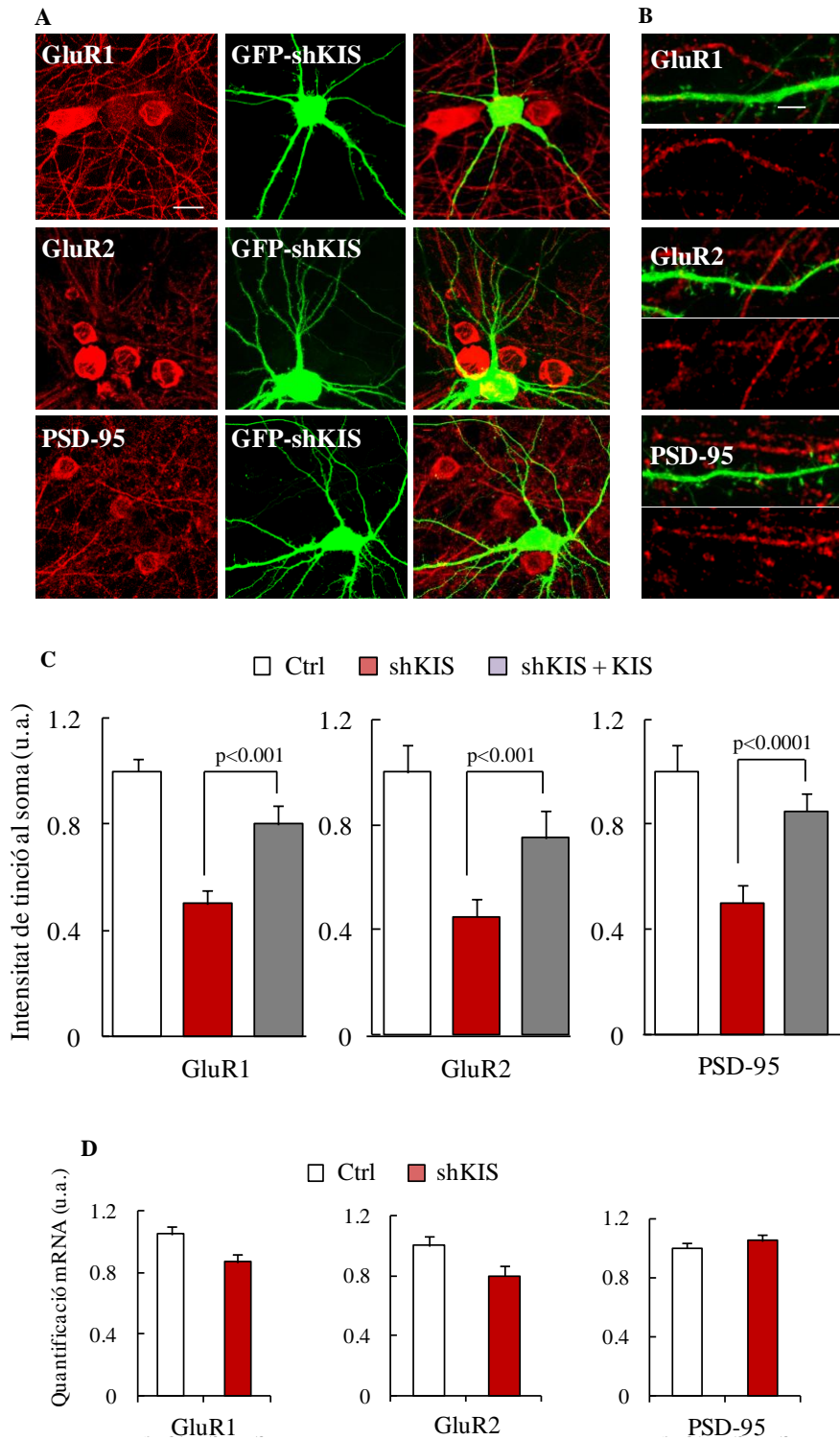


Figura 28. La disminució en els nivells de KIS afecta la quantitat de proteïna dels receptors AMPA GluR1, GluR2 i de PSD-95

Neurones hipocampals van ser transfectades a 13 DIV amb plàsmids lentivirals expressant GFP i un shRNA control o contra KIS. Les neurones van ser fixades a 18 DIV.

A. Imatges representatives de la quantificació de GluR1, GluR2 i PSD-95 (immunofluorescència en vermell) a cèl·lules transfectades (GFP en verd), amb cèl·lules no transfectades com a referència. Barra, 20 µm. **B.** Imatges representatives de la immunofluorescència contra GluR1, GluR2 i PSD-95 a neurites de cèl·lules transfectades amb GFP i shKIS. L'efecte quantificat al soma s'estén a les dendrites. Barra, 5 µm. **C.** Quantificació dels nivells de fluorescència al soma de cèl·lules transfectades (n=8) relativitzant-les

a les no transfectades del mateix camp (n=5 per camp) es mostra la transfecció de l'shKIS sol i amb un cDNA de KIS resistent a l'shRNA. Les barres mostren la mitjana i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$). D. Neurones hipocampals es van infectar amb els vectors lentivirals utilitzats en A, als 18 DIV es van recollir les cèl·lules i es van quantificar els nivells d'mRNA per *GluR1*, *GluR2* i *PSD-95*, relativitzant-los a l'mRNA endogen *Gapdh*.

Sabent que la disminució en els nivells de KIS afectava l'amplitud dels mEPSC, la causa més probable era que l'afectació dels nivells de subunitats de receptor AMPA *GluR1* i *GluR2* afectessin també als nivells d'aquests receptors iònics a la membrana plasmàtica. Per testar aquesta hipòtesi es va dur a terme un assaig de biotinitiació, bàsicament es biotinitilaven les proteïnes de membrana del cultiu de neurones hipocampals, es purificaven per afinitat amb streptavidina i s'analitzaven per *western blot* (veure materials i mètodes).

Aquest assaig es va realitzar en cultius de neurones infectades a 3 DIV amb el mateix lentivirus que a la **figura 27** expressant shRNA control o amb KIS com a diana. A dia 14 DIV, es va realitzar l'assaig de biotinitiació esmentat, i es van analitzar per *western blot* els nivells totals i en superfície (extracte total i fracció biotinitilada, respectivament) de *GluR1* i *GluR2*. La **figura 29** mostra el *western blot* i la quantificació per als nivells de les dues subunitats. Com s'esperava, es replica el resultat vist a la **figura 28A, B i C**, aquesta vegada amb una aproximació bioquímica. A més, la fracció de superfície presenta la mateixa disminució a la condició noquejada per KIS que l'extracte total, demostrant que l'efecte de KIS sobre els nivells de *GluR1* i *GluR2* es manifesta en una quantitat reduïda d'aquests a la membrana citoplasmàtica, provocant l'efecte fisiològic descrit a la **figura 27**.

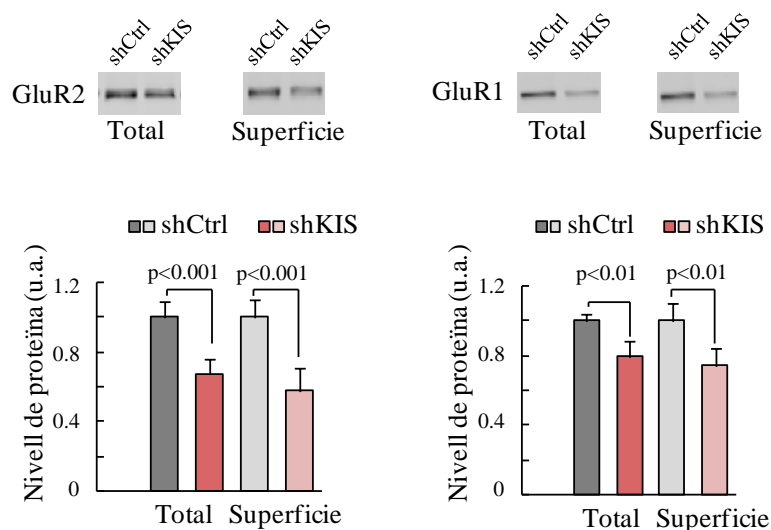


Figura 29. La disminució de *GluR1* i *GluR2* provocada per la inhibició de KIS afecta els nivells d'AMPA a membrana

Neurones hipocampals es van infectar amb vectors lentivirals expressant shRNA control o contra KIS a 3 DIV, a 14 DIV les proteïnes de membrana es van marcar amb biotina i l'extracte total (total) i la fracció unida a avidina (superfície) es van analitzar per *western blot* per quantificar els nivells de *GluR1* i *GluR2* totals i a membrana. Es mostra *western blot* i quantificació. Les barres mostren mitjana (n=3 experiments) i interval de confiança ($\alpha=0.05$).

Capítol 2

La següent pregunta era com afectava KIS als nivells totals de les proteïnes analitzades. A ²⁰⁵ es demostra el rol de KIS en la traducció de β -actina, la seva colocalització amb proteïnes relacionades amb el transport i traducció local d'mRNAs i la seva interacció amb els mRNAs de *GluR1*, *GluR2* i *PSD-95*, entre altres. Tots aquests antecedents ens van fer hipotetitzar que KIS podia estar modulant la traducció local d'aquests mRNAs sinàptics. Per tal de demostrar això, es van marcar les proteïnes de nova síntesi amb el mètode BONCAT (veure mètodes ²¹⁸) a cultius infectats expressant l'shRNA control o contra KIS, com a la **figura 29**.

Realitzant una immunodetecció de totes les proteïnes marcades amb el mètode BONCAT ens revelava que l'absència de KIS (demostrada a la **figura 30A**) no feia disminuir la traducció global (**figura 30B**), en canvi, quan es compara l'efecte de l'shRNA contra KIS a l'extracte total i a la fracció de proteïna de nova síntesi, s'observa que a aquesta última la disminució en GluR1, GluR2 i PSD95 és encara més acusada que a l'extracte total (**figura 30C**). Això indica que la reducció de KIS provoca una disminució de la traducció de les proteïnes analitzades. La proteïna mitocondrial utilitzada com a control, VDAC, no mostra canvis a cap fracció.

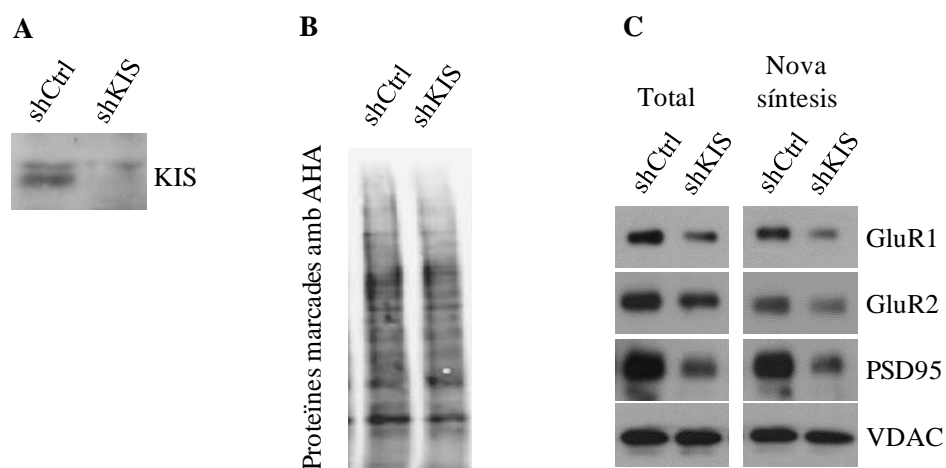


Figura 30. La disminució dels nivells de KIS afecta el procés de traducció de GluR1, GluR2 i PSD95.

Anàlisi BONCAT (veure mètodes).

A i B. Extractes totals analitzats per *western blot* amb anticossos contra KIS o amb estreptavidina per marcar el total de proteïnes marcades, respectivament. **C.** GluR1, GluR2 i PSD-95, a més de la proteïna control VDAC en extractes totals (total) i fracció marcada amb AHA (nova síntesi).

4. KIS modula la repressió traduccional provocada per CPEB3

Després de demostrar que KIS modula la traducció d'mRNAs de *GluR1* i *GluR2*, es va hipotetitzar que el mecanisme molecular sobre el qual KIS podia estar actuant podria incloure proteïnes de la família de CPEB. Són proteïnes conegudes per interaccionar amb mRNAs i modular la seva traducció a neurones, entre altres tipus cel·lulars. Primer es va testar la interacció entre FLAG-KIS i HA-CPEB1, 2, 3 i 4, expressant-les a la línia cel·lular HEK293T. La **figura 31** mostra la immunoprecipitació amb anticossos anti FLAG de la proteïna FLAG-KIS. A l'esquerra, veiem el *western blot* de l'extracte total, demostrant que KIS no afecta els nivells totals de cap de les proteïnes CPEB

expressades, a la dreta, veiem que CPEB1, 2 i 3, però no CPEB4, coimmunoprecipiten amb KIS.

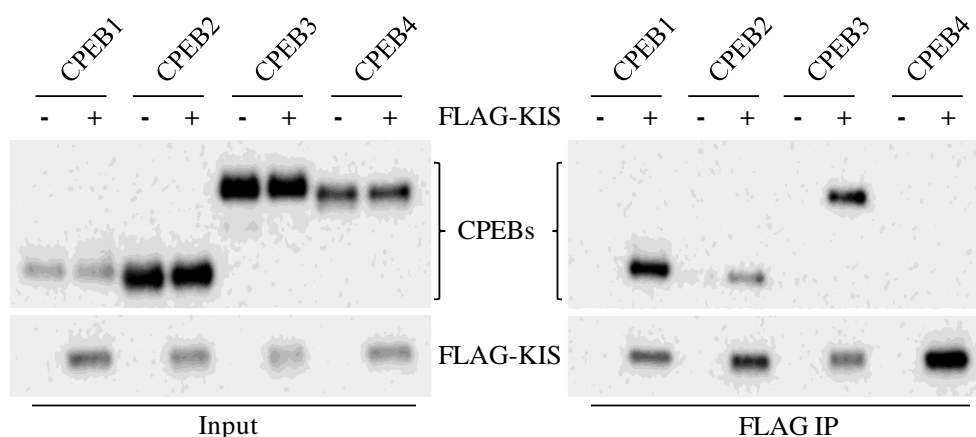


Figura 31. KIS interacciona amb CPEB1, CPEB2 i CPEB3.

FLAG-KIS va ser sobreexpressada en la línia cel·lular HEK293T amb CPEB1, 2, 3 o 4. 24 hores després es va immunoprecipitar KIS i es van analitzar per *western blot* els nivells de KIS i les proteïnes CPEB a l'input i la fracció immunoprecipitada.

De les 3 CPEBs que interaccionen amb KIS, CPEB3 controla la traducció a neurones de les subunitats de receptor AMPA modulades per KIS, GluR1 i GluR2^{179,198,219}. Per aquest motiu es va decidir testar si CPEB3 estava relacionada amb l'efecte de KIS en la traducció de GluR1 i GluR2. Es van infectar neurones hipocampals cultivades a 3 DIV amb lentivirus expressant shRNAs control, contra KIS i contra CPEB3, i els nivells de proteïna es van analitzar per *western blot* a 14 DIV. A la **figura 32A** (quantificada a **32B**) es veu que l'shRNA contra KIS provoca, com ja s'havia descrit, una baixada en els nivells de GluR1 i GluR2, sense afectar la proteïna control, Tubulina. L'shRNA contra CPEB3 per si sol no provoca canvis en cap de les proteïnes analitzades, però és capaç de rescatar els seus nivells si s'expressa amb l'shRNA contra KIS.

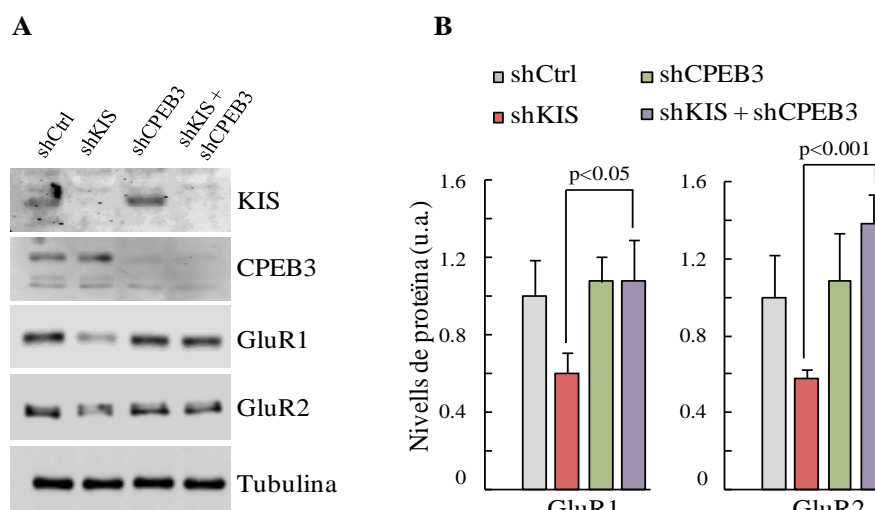


Figura 32. KIS modula la traducció de GluR1 i GluR2 a través de CPEB3

Neurones corticals van ser infectades amb vectors lentivirals expressant shControl, shKIS i/o shCPEB3 a 3 DIV i cultivades fins a 14 DIVs.

A. *Western blot* representatiu. **B.** Quantificació de tres *western blots*, les barres mostren mitjana i interval de confiança ($\alpha=0.05$).

S'ha demostrat que la sobreexpressió de CPEB3 en neurones hipocampals en cultiu és capaç de reprimir l'aparició de nous fil·lopodis neuronals ¹⁹⁸. Per demostrar que la modulació de KIS sobre la repressió de CPEB3 tenia conseqüències fisiològiques, es van transfectar cultius hipocampals a 10 DIVs (just abans que els fil·lopodis comencin a emergir) amb CPEB3, KIS, o CPEB3+KIS i es van quantificar el nombre de fil·lopodis a 11 DIVs (**figura 33A**, quantificació a **B**). CPEB3, com s'havia descrit a estudis anteriors, disminueix la quantitat de fil·lopodis a les dendrites. KIS no només provoca un petit augment en les protrusions, sinó que és capaç de rescatar la repressió provocada per CPEB3.

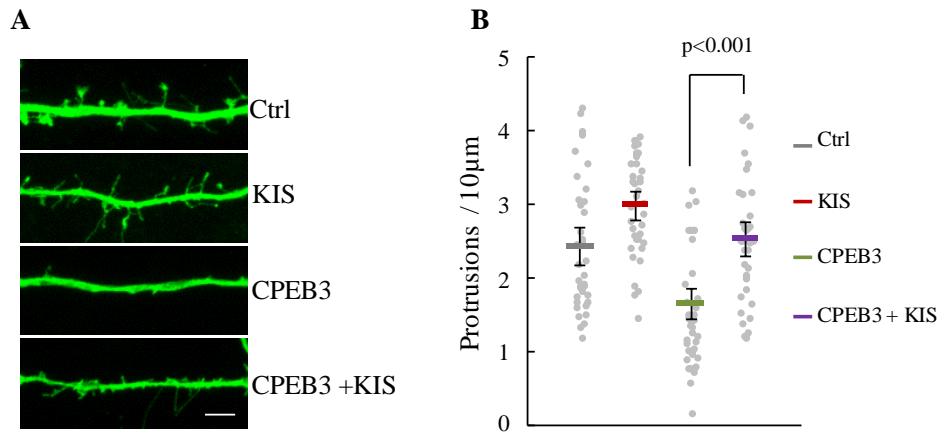


Figura 33. KIS reverteix l'efecte de CPEB3 sobre el nombre de protrusions a les dendrites de neurones hipocampals

Neurones hipocampals van ser transfectades a 10 DIVs amb plàsmids expressant GFP i la proteïna desitjada, o un plàsmid buit en el cas control. Es van fixar 24 hores després.

A. Dendrites representatives de cada condició. **B.** Quantificació de les protrusions per 10 μm. Es van quantificar 10 fragments de dendrita de 20 μm per neurona. n>15 neurones per condició.

5. KIS dissocia CPEB3 i el seu 3'UTR diana, afectant la repressió de la poliadenilació

El següent pas després de descriure l'efecte de KIS sobre la modulació que CPEB3 exercia sobre els mRNAs sinàptics era aprofundir en el mecanisme d'aquest efecte. Primer, es va comprovar si KIS era capaç *in vitro* de desreprimir la traducció del gen reporter *Luciferasa* unit al 3'UTR de *GluR2*, que com ja hem comentat és diana per a la repressió per CPEB3 ^{179,198}. La **figura 34A** mostra que CPEB3, com era esperat, fa disminuir la traducció de *Luciferasa* al voltant d'un 50%, mentre que KIS, per si sola, no té cap efecte. De nou, cotransfectar KIS amb CPEB3 rescata la traducció de *Luciferasa*, parcial però significativament.

Per conèixer el mecanisme d'aquesta modulació que KIS exercia sobre CPEB3, primer es va comprovar si la unió demostrada anteriorment entre aquestes dues proteïnes era directe o necessitava de la presència d'mRNA, al qual possiblement s'unien les dues proteïnes independentment. Per això es va repetir la immunoprecipitació realitzada a la **figura 31**, però només amb CPEB3 i en presència o absència de RNAsa. La **figura 34B** mostra que la degradació de l'RNA no té cap efecte en la interacció entre CPEB3 i KIS, demostrant que o bé interaccionen directament o bé formen part del mateix complex proteic. Això torna a suggerir que KIS està actuant directament sobre CPEB3,

descartant el cas d'una regulació alternativa sobre altres determinants presents a l'mRNA que pogués estar compensant l'efecte de CPEB3.

Està demostrat que CPEB3 uneix directament molècules d'mRNA, reclutant i modulant altres efectors proteics que regularan característiques de l'mRNA amb un efecte final en la seva traducció¹⁷⁹. Per tant, es va hipotetitzar que potser KIS estava alliberant l'mRNA de la repressió exercida per CPEB3 mitjançant una separació física, desplaçant l'mRNA del contacte amb CPEB3. Per demostrar això, de nou es van transfectar HEK293T amb *Luciferasa* fusionada amb el 3'UTR de *GluR2*, i es va cotransfectar CPEB3 o CPEB3+KIS. Immunoprecipinant CPEB3, purificàvem 6 vegades més gen reporter que en el cas de la IP control, confirmant la seva interacció amb CPEB3. La coexpressió de KIS, sense afectar l'eficiència de la IP de CPEB3, disminuïa la seva interacció amb el 3'UTR de *GluR2* fins al nivell de la IP control, demostrant que KIS dissocia CPEB3 i l'mRNA que regula (**figura 34C**).

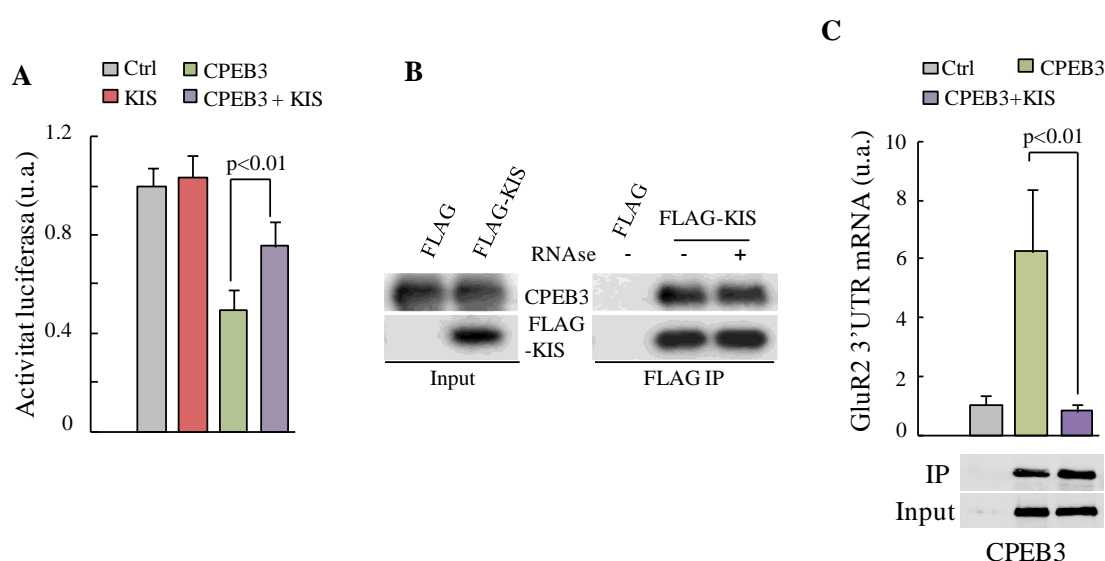


Figura 34. KIS promou la dissociació de CPEB3 del 3'UTR de *GluR2*

A. Anàlisi de l'activitat Luciferasa, fusionada al 3'UTR de *GluR2*. Es van transfectar HEK293T amb *Luciferasa-3'UTR GluR2* en combinació amb CPEB3, KIS, CPEB3+KIS, o un plàsmid control. Els valors d'activitat es van fer relatius als obtinguts en el cas control. Les barres mostren la mitjana i l'interval de confiança ($\alpha=0.05$). **B.** Efecte del tractament amb RNAasa sobre l'associació entre KIS i CPEB3. Immunoprecipitació com a la figura 31, però incubant amb RNAasa quan s'indica. **C.** Immunoprecipitació de CPEB3 i quantificació de l'mRNA copurificat per RT-qPCR. HEK293T van ser transfectades amb el gen reporter *Luciferasa* unit al 3'UTR de *GluR2*, a més de FLAG-CPEB3, FLAG-CPEB3 + FLAG-KIS, o un plàsmid control. Es va realitzar una immunoprecipitació 24 hores més tard amb anticossos anti-FLAG i es van analitzar els nivells de *Luciferasa* a l'eluat, relatius al gen control *Gapdh*.

És motiu de debat si CPEB3 regula directament la longitud de les cues de poliadenines, però està demostrat que CPEB3 modula la traducció d'mRNAs, afectant el seu estat de poliadenilació¹⁹⁸. Per tant, els efectes de KIS sobre la interacció entre CPEB3 i el 3'UTR de *GluR2* i sobre la seva repressió de la traducció haurien de reflectir-se en la longitud de la cua de poliadenines d'aquest UTR. Per demostrar-ho es va transfectar la línia cel·lular HEK293T, com a la **figura 34**, amb el gen reporter *Luciferasa* unit al 3'UTR de *GluR2*, i es van cotransfectar un plàsmid control, CPEB3, o bé CPEB3+KIS.

La **figura 35A** mostra que la coexpressió de KIS no tenia cap efecte sobre els nivells d'expressió de CPEB3, però sí sobre l'efecte d'aquest a poliadenilació del gen reporter. La **figura 35B** mostra la reducció de la longitud del poliadenines amb la sobreexpressió de CPEB3, corroborant les dades ja conegudes d'estudis d'altres laboratoris, la presència d'una sola banda reflexa que les molècules d'mRNA tenien una cua d'adenines curta, amb molt poca diversitat de longituds. Coexpressant KIS la banda es difumina cap a mides de DNA majors, reflectant diferents i més nivells de poliadenilació (**figura 35C i D**, representació gràfica i quantificació de la **figura 35B**).

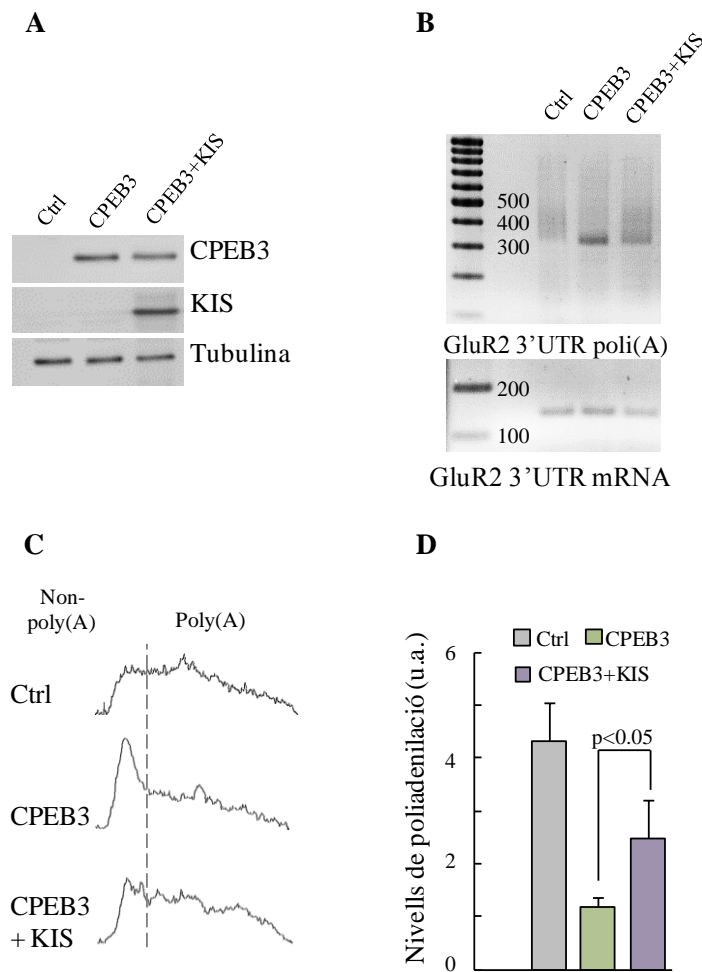


Figura 35. KIS modula l'efecte de CPEB3 en la poliadenilació del 3'UTR de *GluR2*

Anàlisi de poliadenilació, HEK293T van ser transfectades amb *Luciferasa-3'UTR GluR2*, 24 hores després, es va dur a terme una anàlisi de poliadenilació (veure mètodes).

A. *Western blot* dels extractes totals utilitzats per a l'anàlisi de la poliadenilació. **B.** Anàlisi de poliadenilació per PCR (veure mètodes), amplificant la cua de poliadenines (gel d'agarosa superior) o la part constant del 3'UTR de *GluR2* (gel d'agarosa inferior). **C.** Histograma del gel a B. **D.** Quantificació de l'histograma a C, zona poliadenilada relativa a la zona sense poliadenilar, es mostra la mitjana de tres experiments independents i els límits de confiança ($\alpha=0.05$).

Discussió

El procés de transport i control de la traducció d'mRNAs en neurones és important a tots els estadis del desenvolupament. Des de l'elongació de dendrites i axons, formant l'arbre neuronal, fins la creació de les espines dendrítiques i la seva remodelació, són tots processos dependents de traducció proteica regulada en resposta a estímuls. En concret les espines dendrítiques, estructures molt estudiades per la seva importància en la creació i emmagatzemament de memòries, són exemples paradigmàtics de compartiments cel·lulars on es dona traducció d'mRNAs concrets en moments determinats.

Estudis previs del nostre laboratori demostraven la presència de KIS a les dendrites neuronals colocalitzant amb l'mRNA de β -actina i interaccionant amb la quinesina KIF3A, important per al transport de grànuls d'RNA a dendrites. Es va demostrar també la interacció de KIS amb diversos mRNAs descrits per ser transportats i traduïts de forma regulada a dendrites²⁰⁵. Totes aquestes dades preliminars apunten a un paper de KIS en la regulació de la traducció d'mRNAs.

La demostració de l'efecte de KIS a l'arbre dendrític de les neurones hipocampals corrobora les dades obtingudes per l'estudi previ relacionades amb l'efecte de KIS a l'elongació de dendrites, possiblement degut al seu efecte en la traducció depenent del 3'UTR de β -actina. Es coneix que la remodelació i correcta morfologia de les espines dendrítiques depèn de traducció local de β -actina⁸⁸, més recentment també s'ha demostrat la funció del citoesquelet de tubulina a la morfologia de les espines dendrítiques, participant en la polimerització del citoesquelet d'actina i contribuint al transport de diferents components directament dintre de l'espina. KIS es va descobrir com a una quinasa que interactua amb Stathmin, proteïna crítica en el control del citoesquelet de tubulina. La funció coneguda de KIS en la traducció de β -actina i la seva interacció amb Stathmin són probablement part de la causa del fenotip observat a les espines dendrítiques de cèl·lules amb nivells reduïts de KIS. A més de demostrar l'efecte de la falta de KIS en la morfologia de les espines dendrítiques, també es demostra que hi ha diferències en els nivells d'actina polimeritzada dintre de les mateixes. Per a aquesta anàlisi es van mesurar únicament les espines amb una àrea entre 0.25 i 0.75 μm^2 descartant un possible biaix al ser les espines de les cèl·lules amb nivells reduïts de KIS més petites i menys desenvolupades, demostrant que el procés de polimerització d'actina es veu afectat pels nivells de KIS.

L'efecte de KIS sobre la traducció i manteniment dels nivells de GluR1, GluR2 i PSD-95 ofereix una altra explicació per al fenotip d'espines dendrítiques observat. En aquest treball es mostra que la reducció als nivells i traducció de GluR1 i GluR2 afecta els seus nivells a membrana. Aquestes dues proteïnes són les subunitats més abundants dels receptors AMPA, i el seu nombre a la postsinapsi augmenta molt quan l'espina dendrítica augmenta de mida, molt més que els receptors NMDA²²⁰. En augmentar la concentració d'AMPA, es produeix més despolimerització de la membrana en resposta a alliberament presinàptic de glutamat, facilitant així l'activació dels receptors NMDA i l'entrada de calci a l'espina dendrítica. El calci intracel·lular és el principal activador de la resposta postsinàptica, activant proteïnes necessàries per a l'LTP i per tant per a la remodelació morfològica de l'espina dendrítica. La reducció en els nivells de receptors AMPA dificulta la maduració de les espines, al reduir la seva

resposta a l'alliberament de glutamat des del terminal presinàptic. Això concorda amb els nostres experiments d'electrofisiologia on mostrem que els nivells reduïts de KIS no afecten la freqüència de les mEPSC però sí l'amplitud. PSD-95, principal proteïna d'assemblatge de la postsinapsi, també s'ha demostrat necessària per a la correcta resposta a estímuls sinàptics ²⁷.

D'aquesta manera KIS afecta dos processos necessaris per a la plasticitat sinàptica, la traducció de subunitats de receptor AMPA i de proteïna d'assemblatge PSD-95, i la polimerització de citoesquelet d'actina a l'interior de les espines dendrítiques. En aquest estudi només es mesura la quantitat d'actina polimeritzada a espines, i no s'analitza la via molecular responsable d'aquest canvi. Degut a la funció coneguda d'Stathmin en la polimerització del citoesquelet de tubulina, i el paper d'aquest tipus de citoesquelet en la polimerització d'actina i la morfologia de les espines ¹⁹⁰, es pot hipotetitzar que KIS té una funció directa sobre el procés de polimerització d'actina. Una altra possibilitat que explicaria el fenotip de la morfologia i contingut d'actina polimeritzada a espines dendrítiques causat per la manca de KIS és la seva funció, ja demostrada, a la traducció local de β -actina depenent del seu 3'UTR. Aquesta traducció s'ha demostrat crítica per la plasticitat sinàptica, proporcionant actina per a la polimerització necessària per a remodelar les espines dendrítiques en resposta a estímuls ⁸⁸.

Les dades presentades demostren la importància de KIS per a mantenir els nivells d'actina polimeritzada, sigui afectant els nivells d'actina o directament la polimerització, a més dels nivells de GluR1, GluR2 i PSD-95 a la cèl·lula i membrana. Tots aquests elements expliquen que les cèl·lules amb nivells disminuïts de KIS tinguin espines dendrítiques amb un nivell de maduració inferior. El més probable és que aquest fenotip sigui degut a la suma dels dos factors afectats per l'absència de KIS, els nivells reduïts de GluR1, GluR2 i PSD-95 provocaran que les espines dendrítiques siguin menys estimulades per activitat sinàptica, dificultant d'aquesta manera la seva maduració. Per altra banda, la disminució de la traducció i/o polimerització d'actina en resposta a estímuls sinàptics també afectarà la remodelació morfològica, dificultant el seu augment de mida i concordant amb el fenotip observat. El nombre total d'espines dendrítiques no està afectat per la disminució en els nivells de KIS, concordant amb que l'aparició de nous fil·lopodis no requereix traducció local de proteïnes, sinó polimerització d'actina preexistent. En canvi, la remodelació mantinguda en el temps de les espines sí que requereix polimerització d'actina i traducció de proteïna *de novo*.

És impossible descartar completament una contribució transcripcional al fenotip de les espines dendrítiques causat per la depleció de KIS en neurones hipocampals, ja que KIS té efectes estudiats a l'*splicing*, i per tant pot estar afectant els nivells de multitud d'mRNAs ²⁰⁴. Tot i així, els resultats relatius a la contribució de KIS als nivells de GluR1, GluR2 i PSD-95 demostren que la variació en aquestes proteïnes es deu a canvis en el seu rati de traducció, els nivells d'mRNA no es veien afectats en cap cas per la depleció de KIS. El treball preliminar on s'analitzava la contribució de KIS sobre el 3'UTR de β -actina també demostrava regulació al procés de traducció. La variació en els nivells de receptors AMPA, PSD-95 i polimerització d'actina expliquen per si sols la reducció en la maduració de les espines dendrítiques, sent el seu paper en la regulació de l'*splicing* independent del seu paper en la plasticitat sinàptica estudiat en aquesta tesi.

La interacció de KIS amb CPEB3 és interessant, ja que existeixen moltes evidències de la seva funció en la regulació de la traducció de GluR1, GluR2 i PSD-95 en ratolí.²¹⁹ La sobreexpressió de CPEB3 en neurones hipocampals en el moment de l'aparició de les primeres espines dendrítiques disminueix el seu nombre¹⁹⁸ i, a més, el ratolí *knock out* per CPEB3 té espines més grans²¹⁹. Igual que CPEB1, el factor CPEB3 es comporta com un inhibidor de la traducció d'mRNAs fins que rep un estímul, que el converteix en activador. En relació a les nostres dades, la depleció dels nivells de CPEB3 per si sola no afecta els nivells de GluR1 ni de GluR2 a neurones corticals, aquest resultat va en contra d'alguns prèviament publicats²¹⁹ i pot ser degut a les diferències en l'aproximació experimental utilitzada, ja que les nostres neurones estaven menys dies *in vitro* fins que eren recollides que les del citat estudi. Tot i el fet que els nivells de GluR1 i GluR2 eren independents de CPEB3, l'efecte demostrat de la disminució dels nivells de KIS sobre aquestes subunitats AMPA sí que depenia de CPEB3, en reduir via shRNA els nivells d'aquesta proteïna, la reducció paral·lela de KIS no tenia cap efecte. Això demostra que la via per la qual KIS afecta la traducció de GluR1 i GluR2 és compartida amb CPEB3. Si la manca de CPEB3 incrementés els nivells dels receptors AMPA podríem estar davant d'una compensació, però el fet que CPEB3 no sigui necessària per mantenir els nivells de GluR1 i GluR2 però sí perquè KIS moduli la seva traducció suggereix que tant KIS com CPEB3 modulen la traducció utilitzant la mateixa via molecular.

Com s'ha comentat, altres estudis han demostrat la capacitat de CPEB3 per reduir l'aparició de noves espines dendrítiques quan se sobreexpressa just al moment en què aquestes apareixen a les neurones hipocampals *in vitro* (10-11 DIVs). KIS és capaç de revertir aquesta disminució i promoure l'aparició de noves protrusions, concordant amb resultats publicats per altres moduladors de CPEB3¹⁹⁸. Aquestes dades contrasten amb les explicades a la **figura 1**, on es demostra que la disminució en els nivells de KIS no afecta el nombre total d'espines dendrítiques sinó la seva morfologia. El ratolí *knock out* per CPEB3 tampoc presenta diferències en el nombre total d'espines dendrítiques en neurones madures, però aquestes espines són més grans²¹⁹. En canvi, quan CPEB3 se sobreexpressa en neurones que encara estan en procés de maduració és capaç d'inhibir l'aparició de noves protrusions a les dendrites. KIS sembla comportar-se de forma similar però en la direcció oposada, cosa que suggereix que la funció de KIS com a regulador de la traducció es duu a terme via CPEB3. L'augment en el nombre d'espines dendrítiques quan només se sobreexpressa KIS probablement té a veure amb la seva actuació sobre la proteïna CPEB3 endògena de la neurona.

Concordant amb els nostres resultats, CPEB3 també uneix i regula la traducció via 3'UTR de PSD-95. El ratolí *knock out* per CPEB3 també mostra nivells augmentats de subunitats de receptor NMDA²¹⁹, però és més probable que aquesta regulació sigui indirecta, deguda a una major excitabilitat de les neurones com a conseqüència de l'augment en els nivells de PSD-95 i receptors AMPA directament promoguda per la falta del repressor CPEB3. Estudis sobre el mecanisme molecular de CPEB3 han hipotetitzat que podria no actuar en la poliadenilació dels mRNAs per regular la seva traducció, ja que no interacciona amb CSPF ni uneix CPEs, i no necessita l'element en C/S responsable de la poliadenilació dels mRNAs, la seqüència "AAUAAA"¹⁷⁹. Tot i que altres estudis han trobat efectes sobre els nivells de poliadenilació de l'mRNA de

GluR2 en resposta a sobreexpressió de CPEB3¹⁹⁸, no està clar si aquestes diferències en els nivells de poliadenilació són llavors causa o conseqüència de la modulació de la traducció per CPEB3. Per exemple, s'ha demostrat que el factor d'elongació eEF2 pot ser segrestat per CPEB2, disminuint la seva activitat GTPasa i afectant així negativament la traducció d'mRNAs interferint en el procés d'elongació²²¹.

KIS és capaç de contrarestar els efectes provocats per CPEB3 tant sobre la traducció i poliadenilació del 3'UTR de *GluR2* com sobre les protrusions emergents de dendrites de neurones en procés de maduració. Per simplificar les dades presentades només s'exposen els resultats obtinguts per la proteïna KIS normal, però la mutació *kinase dead* de la proteïna era igualment capaç de revertir els efectes de CPEB3 sobre els diferents reporters. Aquesta dada és sorprenent però concorda amb estudis previs que demostren que KIS pot afectar el repressor transcripcional CATS independentment de la seva activitat quinasa²²², via interaccions proteïna-proteïna. Al nostre cas, sembla que KIS està modulant l'acció de CPEB3 afectant d'alguna manera la seva capacitat d'unió a l'mRNA, en un sistema heteròleg, la sobreexpressió de KIS disminueix notable i significativament la quantitat de 3'UTR de *GluR2* que interaccionava amb CPEB3.

Ja hem esmentat que el ratolí *knock out* per CPEB3 té nivells més alts de GluR1, GluR2, PSD-95 i receptors NMDA²¹⁹, però estudis més recents que utilitzen ratolins *knock out* condicionals compliquen l'escenari. La deleció de CPEB3 a cèl·lules piramidals, abans o després de l'entrenament específic, bloquejava l'adquisició de memòria, demostrant que CPEB3 és important tant per a l'adquisició com per a l'estabilització de coneixement. Correlacionant amb això, el *knock out* de CPEB3 tenia nivells més alts de GluR1 i GluR2, però no era capaç d'augmentar els nivells d'aquestes subunitats de receptors AMPA en resposta a estímul²⁰¹. Aquesta dualitat en els rols de CPEB3, que sembla funcionar com a repressor i activador, concorda amb el que es coneix de la monoubiquitinació de CPEB3¹⁹⁸ i de la via molecular per la qual CPEB1 controla la poliadenilació de mRNAs.

Al mateix estudi i altres de paral·lels^{202,223} demostraven l'agregació de CPEB3 amb un comportament priònic. Després d'estimular neurones en cultiu CPEB3 formava agregats insolubles, correlacionant així la formació d'estructures priòniques amb la transformació de CPEB3 des de repressor de la traducció a activador.

No es coneix el mecanisme molecular de l'actuació de CPEB3, és possible que l'agregació de CPEB3 provoqui l'alliberament de l'mRNA amb què interacciona, resultant en la seva traducció. La sobreexpressió de CPEB3 monoubiquitinada funciona com a activador de la traducció de GluR2 i de la formació de protrusions a les dendrites neuronals. És possible que la monoubiquitinació de CPEB3 la faci més procliu a oligomeritzar, reclutant CPEB3 endògena i alliberant més mRNAs, també és possible que CPEB3 oligomeritzada pateixi algun canvi conformacional que promogui activament la traducció, creant així a l'estructura priònica un punt d'alta concentració d'mRNAs en traducció a la sinapsi. Les nostres dades concordarien més amb el primer model, ja que es demostra que la sobreexpressió de KIS disminueix la interacció entre CPEB3 i el 3'UTR de *GluR2*. KIS catalitzaria canvis a CPEB3 que promourien la seva oligomerització, alliberant els mRNAs reprimits, i creant a la vegada un agregat insoluble de CPEB3 que, comportant-se com un prió, reclutaria molècules de CPEB3

alliberant més mRNAs, creant així memòria molecular a les sinapsis activades. Aquestes dades concorden amb el que es coneix sobre altres proteïnes que afecten la funció de CPEB3¹⁹⁸.

Conclusions

- KIS promou el correcte desenvolupament de les espines dendrítiques.
- La polimerització d'actina a espines dendrítiques requereix de nivells normals de KIS.
- La disminució en els nivells de KIS afecta el rati de traducció de GluR1, GluR2 i PSD-95.
- KIS dissocia CPEB3 del seu mRNA diana, modulant l'efecte represor de CPEB3 sobre la traducció.

El treball presentat a aquest segon capítol es va publicar a:

Pedraza, N.,* Ortiz, R.,* Cornadó, A., Llobet, A., Aldea, M., Gallego, C. KIS, a kinase associated with microtubule regulators, enhances translation of AMPA receptors and stimulates dendritic spine remodeling. *J Neurosci.* Oct 15;34(42):13988-97 (2014).

I es pot consultar a l'annex 2

Mètodes

1. Cultius primaris, transfecció i fixació

En el present treball, es van utilitzar cultius primaris neuronals de cèl·lules corticals i hipocampals, obtinguts sempre d'embrions de ratolí amb 17 dies i mig de gestació (E17.5) amb un mètode modificat a partir del protocol clàssic²²⁴. El dia anterior a la dissecció dels embrions, es va cobrir la superfície on les neurones serien plantades amb una solució de poli-d-lisina (Sigma cat n°P7886) diluïda a 0.5 µg / mL en un tampó bòric-borat a pH 8.5 i es va incubar durant tota la nit en aquesta solució per preparar la superfície per a la correcta adhesió de les neurones. El mateix dia de la dissecció, es van netejar les plaques 5 vegades amb aigua *miliQ* per eliminar tota la poli-d-lisina no adherida a la placa, ja que pot ser tòxica per a les neurones.

Per a l'obtenció de les cèl·lules, es va realitzar eutanàsia sobre un ratolí femella prenyada de 17.5 dies, es van extreure els embrions i es van traslladar a una campana de cultius per treballar en condicions d'esterilitat. Es van disseccionar els còrtexs i els hipocamps amb fórceps i bisturí en medi de dissecció fred, treballant sempre en gel. Després de la dissecció, els còrtexs i els hipocamps es van netejar dues vegades amb el mateix medi de dissecció per eliminar teixit sobrant i es va afegir tripsina (Fisher cat n°15090046) a 0.25% i DNAasa (Sigma cat n°DN25) a 0.2 mg / mL. Es va incubar el teixit amb la tripsina i la DNAasa durant 15 minuts a 37°C.

Després de la digestió enzimàtica, es van rentar els trossos de teixit tres vegades amb medi de sembrat per eliminar la tripsina, deixant-los sedimentar en comptes de centrifugar per mantenir el màxim de viabilitat. Un cop nets es va disgregar mecànicament passant-los 10 vegades per una pipeta *pasteur* de 230 mm amb la punta estreta. Després es van comptar les cèl·lules amb una càmera de Burkert i es van plantar en medi de sembrat, a una densitat de 70000 cèl·lules per cm² per experiments bioquímics o transfeccions i 35000 cèl·lules per cm² per experiments d'imatge.

Un cop plantades les neurones, es van mantenir a l'incubador (37°C, 5% CO₂, ambient saturat d'humitat) durant 2 a 4 hores, després de les quals es va canviar el medi de sembrat per medi de manteniment neuronal. A partir d'aquest moment, es consideren *in vitro*, deixant-se els dies *in vitro* (DIVs) necessaris per a cada experiment.

Per als cultius hipocampals en càmeres microfluidiques de PDMS, es van utilitzar les càmeres amb microcanals de 500 µm *AXIS™ Axon Isolation Devices* (Millipore cat n°AX50010) es van seguir les instruccions del fabricant pel que fa a la neteja i preparació de les microcàmeres. Les cèl·lules es van plantar al canal en medi de sembrat i es va canviar el medi a les 2 hores per medi de manteniment neuronal, amb molta cura de no generar forces de cisalla.

Medis utilitzats:

Medi	Contingut
Medi de dissecció	HBSS 1x (VWR cat nºX0507), glucosa 0.8%, penicil·lina / estreptomicina (Fisher cat nº 15140122)
Medi de sembrat	MEM (VWR cat nº L0415), FBS 10% (Cultek cat nº 91S1810), glucosa 0.8% penicil·lina / estreptomicina
Medi de manteniment neuronal	Neurobasal (Fisher cat nº 21103049), B-27 2% (Fisher cat nº 17504044), Glutamax 1% (Fisher cat nº 35050), penicil·lina / estreptomicina Tant el B-27 com el glutamax es van guardar a -20°C i afegir al moment d'ús

Per transfectar els cultius neuronals, es va utilitzar el mètode del calci fosfat, amb el kit *CalPhos Mammalian Transfection Kit* (Clontech cat nº631312), com que les neurones són cèl·lules delicades i molt difícils de transfectar, en comptes de les instruccions del fabricant, el kit es va utilitzar amb el protocol adaptat per a l'aplicació en neurones (descriu a ²²⁵). Per fixar els cultius per experiments d'imatge, les neurones es van netejar dues vegades amb PBS fred, i després es van fixar amb 4% Paraformaldehid, 4% sucrosa en PBS, durant 30 minuts a 4°C.

2. Cultius de línies cel·lulars, transfecció, producció de virus i infecció

Una línia utilitzada va ser Neuro2A (o N2a), provinent de neuroblastoma de ratolí. Es van triar perquè tot i que no fan sinapsis expressen gens neuronals de forma endògena i tenen un origen neuronal. També es van utilitzar les cèl·lules HEK293T (*Human Epithelial Kidney 293 Transformed*), que provenen d'epiteli embrionari humà i són molt utilitzades per la seva facilitat de cultiu, manipulació i transfecció. Ambdues línies es van cultivar en DMEM (VWR cat nºL0104) complementat amb 10% *Fetal Bovine Serum* (Cultek cat nº91S1810) i penicil·lina / estreptomicina (Fisher cat nº15140122) per evitar contaminacions. Per al manteniment d'ambdues línies cel·lulars, es netejaven amb PBS preescalfat a 37°C per eliminar tot el medi, després s'incubaven amb tripsina (VWR cat nº L0931) a l'incubador durant 2 minuts, es resuspenien en medi de cultiu i es centrifugaven a 500g durant 5 minuts. Es resuspenien els pel·lets de cèl·lules i es plantava en una placa amb medi fresc una dilució 1:10.

Per transfectar les línies cel·lulars, es van plantar 24 hores abans de la transfecció, de tal manera que l'endemà estiguessin a un 70% de confluència, i es van transfectar amb *CalPhos Mammalian Transfection Kit*, seguint les instruccions del fabricant. Per a la producció de virus, es van transfectar cèl·lules HEK293T amb els plàsmids pHR82ΔR i pVSV.G, juntament amb el plàsmid lentiviral desitjat. 12 hores després de

la transfecció, es va canviar el medi de cultiu de les HEK293T per medi de manteniment neuronal. 48 hores més tard, es va col·lectar el medi contenint els virus i es va filtrar amb filtres de polietilensulfona de 0.45 μm , aquest medi filtrat que conté els virus es va utilitzar directament per infectar les neurones, substituint (i guardant) el seu medi de cultiu per medi d'infecció, compost per 50% medi amb virus i 50% medi de manteniment neuronal fresc. L'endemà al matí, el medi d'infecció es va substituir pel propi medi de les neurones retirat el dia anterior.

3. Experiments d'imatge, SpineJ i FociJ

Les imatges confocals de transfeccions amb GFP, immunofluorescències i smFISH es van obtenir amb un microscopi confocal Zeiss LSM780. Es va ajustar la potència del làser i del tub fotomultiplicador per a les necessitats de cada experiment, però mantenint en cada cas aquests paràmetres iguals entre problemes i controls. En tots els casos es va utilitzar l'objectiu de 63 augments. Es van agafar conjunts d'imatges amb una profunditat d'uns 15 μm aproximadament amb el *pinhole* ajustat a 1 airy. Les quantificacions d'immunofluorescències van ser realitzades amb mètodes estàndard del programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH).

Per detectar les espines dendrítiques i obtenir els seus valors morfològics quantitius i la intensitat de tincions amb marcadors fluorescents les imatges es van adquirir amb una resolució de 0.13 μm / píxel, adquirint una imatge a l'eix Z cada 0.37 μm . Es va escriure el *plug in* SpineJ, utilitzant llibreries i procediments inclosos a ImageJ. SpineJ necessita que la neurona a analitzar expressi alguna proteïna fluorescent a nivells alts, en un context de fons baix. El programa detecta el contorn de les dendrites basat en el contrast entre píxels brillants de la neurona i el fons. El funcionament es basa en la definició per part de l'usuari del recorregut de la dendrita, ajudat pel software, després SpineJ utilitza un algoritme per detectar protrusions des de la dendrita analitzant el canvi en el seu contorn. Un cop detectada la protrusió, s'obtenen les característiques morfològiques i la intensitat dels píxels a tots els canals.

Per analitzar els resultats de la smFISH, les imatges es van adquirir amb una resolució de 0.13 μm / píxel, adquirint una imatge a l'eix Z cada 0.5 μm . Es va escriure al nostre laboratori el *plug in* FociJ utilitzant llibreries i procediments inclosos a ImageJ. FociJ detecta el senyal de la smFISH (consistent en punts brillants) basat en la detecció de grups de píxels marcadament més brillants que el fons. FociJ era capaç de detectar simultàniament tres canals, dos per a la smFISH (senyals intrònica i exònica) i un per a realitzar una immunofluorescència (sempre contra el marcador dendrític MAP2), el programa detectava les zones positives per MAP2 i establia una distància mínima a les neurones per evitar falsos positius. FociJ permetia excloure zones de l'anàlisi, normalment, els somes eren descartats per detectar a senyal de la smFISH només a les dendrites. Per a l'anàlisi de smFISH a cèl·lules transfectades amb GFP, es va escriure una variant de FociJ que ajudava a l'usuari a detectar les dendrites d'una neurona que expressés nivells alts de GFP. Després buscava senyal de smFISH al canal desitjat, únicament a l'interior de les dendrites detectades.

4. Electrofisiologia

Els mesuraments de mEPSC de cèl·lula completa es van dur a terme en neurones hipocampals a 17-21 DIVs, que havien sigut infectades amb els lentivirus necessaris a 7 DIVs. Les resistències mitjanes de les pipetes utilitzades per a les mesures eren 3-4 MΩ quan estaven plenes de solució interna (130 mM K-gluconat, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM Na₂ATP, 1 mM NaGTP, pH 7.2, 290 mOsm / kg). La solució externa contenia 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucosa, 1 μM tetrodotoxina i 10 μM picrotoxina, pH 7.4. L'osmolaritat de la solució externa era 290 mOsm / kg, tots els experiments es van realitzar a temperatura ambient. Es van mesurar en total 5 neurones infectades amb shControl i 7 infectades amb shKIS, obtenint un total de >5700 i >7300 mEPSC per a cada cas.

5. Producció de DNA, clonatges i vectors

Els plàsmids es van amplificar a *Escherichia coli* DH5α i obtenir mitjançant el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel cat n°740588) seguint les instruccions del fabricant. La integritat i qualitat del DNA es va mesurar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i espectrometria amb nanodrop. Les digestions de DNA amb endonucleases de restricció, electroforesis de DNA, lligacions i transformacions es van realitzar segons els protocols descrits a *Current Protocols in Molecular Biology*²²⁶. Les PCRs es van realitzar amb *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Fisher cat n°10024537) seguint les instruccions del fabricant, i el DNA es va purificar amb el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel cat n°740609).

Plàsmids utilitzats:

Plàsmid	Contingut	Font
pcDNA3	Vector d'expressió amb promotor CMV	Invitrogen
pEGFP-N1	Vector que expressa GFP sota el promotor CMV	Clontech
pcDNA3-FLAG	Expressa FLAG sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-KIS	Expressa KIS sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-CPEB3	Expressa CPEB3 sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-hKIS	Expressa KIS humana (resistent a l'shKIS) sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-KIS	Expressa FLAG-KIS sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pNBM470	Expressa HA sota CMV	Clonat al nostre laboratori

pNBM470-CPEB1	Expressa CPEB1 fusionada amb HA sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pNBM470-CPEB2	Expressa CPEB2 fusionada amb HA sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pNBM470-CPEB3	Expressa CPEB3 fusionada amb HA sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pNBM470-CPEB4	Expressa CPEB4 fusionada amb HA sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pGL3b-GaussiaLuciferasa	Expressa Luciferasa sota CMV	Regal Raúl Mendez
pGL3b-Cypridina	Expressa cypridina sota CMV	Regal Raúl Mendez
pGL3b-GaussiaLuciferasa-3' UTR <i>GluR2</i>	Expressa Luciferasa fusionada amb el 3' UTR de <i>GluR2</i>	Clonat al nostre laboratori
pHR82ΔR	Plàsmid necessari per a la producció de virus	Invitrogen
pVSV.G	Plàsmid necessari per a la producció de virus	Invitrogen
pLKO.3G-shControl	Vector lentiviral, expressa GFP i shRNA control	Sigma
pLKO.3G-shKIS	Vector lentiviral, expressa GFP i shRNA contra KIS	Sigma
pFUGW.GFP-shControl	Vector lentiviral, expressa GFP i shRNA control	Regal Michael Kiebler
pFUGW.GFP-shStaufen2	Vector lentiviral, expressa GFP i shRNA contra Staufen2	Regal Michael Kiebler
pZsGreen	Expressa ZsGreen sota CMV	Clonetech
pcDNA3-ZsGreen-I16	Expressa ZsGreen fusionat amb la seqüència de l'exó15-intró16-exó16	Clonat al nostre laboratori

pcDNA3-ZsGreen-I9	Expressa ZsGreen fusionat amb la seqüència de l'exó8-intró9-exó9	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-ZBP	Expressa ZBP fusionat a FLAG sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-CPEB1	Expressa CPEB1 fusionat a FLAG sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-Staufen1	Expressa Staufen1 fusionat a FLAG sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-Staufen2	Expressa Staufen2 fusionat a FLAG sota CMV	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-ZsGreen-MBS	Expressa ZsGreen fusionat amb la seqüència MBS	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-ZsGreen-I16-MBS	Expressa ZsGreen fusionat amb la seqüència de l'exó15-intró16-exó16 i la seqüència MBS	Clonat al nostre laboratori
pcDNA3-FLAG-MCP	Expressa la proteïna MCP fusionada amb FLAG	Clonat al nostre laboratori
pSUPER-shcontrol	Expressa GFP i un shRNA control	Regal Michael Kiebler
pSUPER-shStaufen2	Expressa GFP i un shRNA contra Staufen2	Regal Michael Kiebler

6. Extracció d'RNA, RT-PCR i qPCR

L'extracció d'RNA es va dur a terme amb *Total RNA purification kit* (VWR cat nºR6834) per cèl·lules a les plaques o eluats d'immunopurificació. Quan calia purificar RNA des de líquids o eluir en volums molt petits per a concentrar la mostra (obtenció de sinaptoneurosomes) l'RNA es va extreure amb *TRI reagent* (Sigma cat nºT9424). La integritat i puresa de l'RNA es mesurava amb electroforesi en gel d'agarosa i espectrofotometria al nanodrop. Per a la retrotranscripció, fins a 1 µg d'RNA es retrotranscriví a cDNA amb *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche cat nº4379012001) utilitzant com a oligonucleòtids hexàmers a l'atzar, per evitar l'esbiaix cap a 3' de la seqüència retrotranscrita provocat pels oligo-dTs.

Per a la quantificació per PCR quantitativa, 0.5-1 µL de la reacció de retrotranscripció es va afegir a la reacció de qPCR amb *JumpStart Taq ReadyMix for quantitative PCR* (Sigma cat nºD7440). En el cas en què no era possible realitzar PCR quantitativa, es va dur a terme PCR semiquantitativa amb *DreamTaq Green DNA Polymerase* (Fisher

cat n°EP0712). Per a les relativitzacions, es va utilitzar DNA genòmic de ratolí comercial (VWR cat n°69239) sempre que era possible, ajustant la quantitat de motlle per obtenir resultats similars als obtinguts des del cDNA de la RT-PCR, normalment entre 1 i 10 ng de gDNA per reacció. Quan no era possible utilitzar DNA genòmic com a relativitzador es van amplificar per PCR des de cDNA els transcrits desitjats i es van quantificar per electroforesi en gel d'agarosa.

La reacció de PCR quantitativa o semiquantitativa es va dur a terme als dos casos com segueix:

Termociclador	Cicle
94°C durant 10 minuts	Desnaturalització inicial
94°C durant 15 segons	45 cicles
55°C durant 20 segons	
72°C durant 30 segons	

7. Primers utilitzats per PCR quantitativa

La sonda estava marcada en tots els casos amb la combinació 6xFAM / *Black Hole Quencher 1*. Quan no s'indica el contrari, tots els primers i sondes van ser comprats a Sigma i tenen com a diana seqüències de ratolí.

Diana	Tipus	Seqüència 5'-3'
<i>CaMKIIα</i> exó 1-intró 1	Sentit	CCCGATTCACAGAAGAGTA
	Antisentit	CCATGCTCTCTAGGACTC
	Sonda	TTTGAGGAACTGGGAAAGTGAGTC
<i>CaMKIIα</i> exó 2-intró 2	Sentit	TGCCAAGATTATCAACAC
	Antisentit	AGGGTCTATTCTCTTCAC
	Sonda	CAGCCAGAGGTAGGTTACCGCAC
<i>CaMKIIα</i> intró 3-exó 4	Sentit	GTTGCTCCTGGAATTTAAC
	Antisentit	CGAAGATAAGGTAGTGGTG
	Sonda	ATGACAGCATCTCCGAGGAGG
<i>CaMKIIα</i> exó 5-intró 5	Sentit	GGAAGTGTGTTGAAGACATTG
	Antisentit	CTGGGAAGCTGACTGTAG
	Sonda	TGAGTACTGGCTGCAACCTGG
<i>CaMKIIα</i> exó 6-intró 6	Sentit	GACCTGAAGGTGAGTAAC
	Antisentit	GGTGGAGACATGAAAGAA
	Sonda	AAGCAGCTTTCCCAAGTCCC
<i>CaMKIIα</i> exó 8-intró 8	Sentit	CTGTGGTAAGTCCAATCC
	Antisentit	CAGGAGAGGAGAGATGAC
	Sonda	AGCCCTGTTCGTCTCCCAGC
<i>CaMKIIα</i> exó 9-intró 9	Sentit	GTACCAGCAGATCAAAGC
	Antisentit	AGACCCTAATCACTAGGC
	Sonda	CCTATGATGTGAGTGTTGCTCCC
<i>CaMKIIα</i> exó 10-intró 10	Sentit	TCGGTGAGCCTTTATCAG
	Antisentit	CAGTGAGCCAGAGATTCC

	Sonda	CGTGCTCCTCCAGGTCTTGT
<i>CaMKIIa</i> exó 11-intró 11	Sentit	GCCTGAAGAAGTTCAATG
	Antisentit	AACCGATGAAGAGAAGAG
	Sonda	AACTGAAGGTAACCTGTCCTTATTC
<i>CaMKIIa</i> exó 12-intró 12	Sentit	CCATCCTCACCACCTATGC
	Antisentit	GCTACCCAACAGTGTAATG
	Sonda	CCACCAGGAACCTTCTCCGGT
<i>CaMKIIa</i> intró 14-exó 15	Sentit	CTGTCGTTATTTGTGTCC
	Antisentit	GACTCAAAGTCTCCATTG
	Sonda	CTACCTTACAGTGCGCAAACAG
<i>CaMKIIa</i> exó 15-intró 15	Sentit	ACAGGAAATTATCAAAGTGA
	Antisentit	GAGTGAGTAGGTTTCAGAA
	Sonda	AGCTGATCGAAGCCATAAGCAAT
<i>CaMKIIa</i> exó 16-intró 16	Sentit	CCTGGACTTTCATCGATTC
	Antisentit	GAGAGCAGACAACAGACA
	Sonda	ATTTTGAAAACCGTGAGCAATCCCT
<i>CaMKIIa</i> exó 17-intró 17	Sentit	TCCACTTCCACAGATCTG
	Antisentit	CCTCTACTAAGGCAATACC
	Sonda	TCCTGCCGCAGTAAGGATTCT
<i>CaMKIIa</i>	Sentit	GACGAAGACACCAAAGTG
	Antisentit	GACTCAAAGTCTCCATTG
	Sonda	ACAGGAAATTATCAAAGTGACAGA
<i>eEF1A1</i>	Sentit	GAGCCAAGTGCTAATATG
	Antisentit	TGGTGGTAGGATACAATC
	Sonda	AAAGTCACCCGCAAAGATGGC
<i>Gapdh</i>	Sentit	GGTCTACATGTTCCAGTA
	Antisentit	CCCATTTGATGTTAGTGG
	Sonda	ATTC AACGGCACAGTCAAGGC
<i>Malat1</i>	Sentit	GTGCTGAAAATTAGATGTTC
	Antisentit	CCTTCTAAATACATACATTCTCTA
	Sonda	AATGTGCTCCAATGTA CTTGTGCTT
<i>ZsGreen</i>	Sentit	GTGGAGGAGAACTGCATG
	Antisentit	TGTCGGTCATCTTCTTCA
	Sonda	ACCACGAGTCCAAGTTCTACGG
<i>TBP</i>	Sentit	CACCAATGACTCCTATGA
	Antisentit	CCAAGATTCACGGTAGATA
	Sonda	CCTATCACTCCTGCCACACCA
TBP (Humà)	Sentit	CTGTGATGTGAAGTTTCC
	Antisentit	GGGTTTGATCATTCTGTAG
	Sonda	TGCTCACCCACCAACAATTTAGTA
<i>GluR1</i>	Applied Biosyste	Gria1 Mm00433753_m1
<i>GluR2</i>	Applied Biosyste	Gria2 Mm00442822_m1
<i>PSD95</i>	Applied Biosyste	Dlg4 Mm00492193_m1

8. Primers utilitzats per PCR semiquantitativa

	Tipus	Seqüència 5'-3'
CaMKII α isoforma llarga ENSMUST00000102888.9	Sentit	CCATCCTCACCACCTATGC
	Antisentit	CTGGATCTTCCTTCTTCAC
CaMKII α isoforma curta ENSMUST00000039904.6	Sentit	CTTGCCTGGTGTTGCTAA
	Antisentit	CTGGATCTTCCTTCTTCAC
Exó 16-Intró 16 junction	Sentit	CCTGGACTTTTCATCGATTC
	Antisentit	CTGGATCTTCCTTCTTCAC
Intró 16-Exó 17 junction	Sentit	TGTGGTATCCTGTTATCTAG
	Antisentit	CCATCAGGTGGATGTGAG

9. Immunofluorescència

Els cultius hipocampals es van fixar als DIVs desitjats amb paraformaldehid i sucrosa com s'ha explicat. Després de fixar i rentar el PFA, les neurones es van permeabilitzar amb tritó X-100 0.1% en PBS durant 5 minuts a 4°C, rentar tres vegades amb PBS i bloquejar amb *Normal Goat Serum* 5% en PBS durant 30'.

Els anticossos primaris es van incubar durant 2 hores a temperatura ambient, o tota la nit a la nevera, diluïts a solució de bloqueig, després de la incubació, es van rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS i es va incubar l'anticòs secundari en solució de bloqueig, durant 30 minuts a temperatura ambient. En el cas de la fal·loïdina, es va utilitzar com si es tractes d'un anticòs secundari. Després de la incubació amb l'anticòs secundari es van realitzar tres rentats més amb PBS abans del muntatge la mostra amb una solució de 50% de glicerol en 0.1x PBS.

Anticossos utilitzats:

Anticòs	Dilució	Font
PSD-95	1:400	Millipore cat nºMABN68
GluR1	1:400	Millipore cat nºAB1504
GluR2	1:400	Sigma cat nºSAB4300535
MAP2	1:1000	Sigma cat nºM1406
Anticossos secundaris		
Alexa-568 ase anti-conill	1:2000	LifeTechnologies cat nºA10042
Alexa-568 ase anti-ratolí	1:2000	LifeTechnologies cat nºA10037
Altres marcadors		
Fal·loïdina-Rodamina	2 U / mL	Sigma cat nºP1951

10. Western blot

Les cèl·lules es van rentar sempre amb PBS fred abans de recollir-les amb el volum desitjat de 1xSR. Un cop dissoltes a SR, es van sonicar per trencar les membranes i DNA genòmic. Després es va afegir el volum corresponent de 4xSS (20% sacarosa i 0,05% blau de bromofenol) i B-mercaptoetanol al 2%. Abans de carregar les proteïnes al gel d'acrilamida o congelar-les, es van bullir durant almenys 5 minuts a 95°C. L'electroforesi es va dur a terme en gels SDS-PAGE (SDS - *Poliacrilamide Gel Electrophoresis*), entre un 7.5% i un 15% d'acrilamida, depenent de la mida de la proteïna a detectar. Es va utilitzar sempre el sistema de Miniprotean (Biorad).

Després de l'electroforesi les proteïnes es van transferir a membranes de PVDF (Fisher cat nº 10452792). Després de la transferència, la membrana va ser bloquejada amb 5% de llet en pols en PBS-T (PBS + 0.1% Tween20) durant 1 hora, després de la qual va ser rentada tres vegades en PBS-T durant 15, 5 i 5 minuts en agitació. L'anticòs primari es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a la nevera, diluït en solució de bloqueig diluïda 1:20 en PBS-T. Després de la incubació amb l'anticòs primari, la membrana es va rentar tres vegades amb PBS-T durant 15, 5 i 5 minuts en agitació.

L'anticòs secundari es va incubar amb la membrana durant 40 minuts a temperatura ambient, en el mateix tampó que l'anticòs primari. Després es van realitzar sis rentats, un de 15 minuts i cinc de 5 minuts, amb PBS-T en agitació, abans de realitzar la detecció, que es va fer amb l'escàner Odyssey Fc o amb els reactius ECL (Bio-Rad cat nº1705060) depenent de l'anticòs secundari utilitzat

Anticossos per *western blot*:

Anticossos primaris		
GluR1	1:500	Millipore AB1504
GluR2	1:500	Sigma AB880
PSD-95	1:2000	Millipore MABN68
Tubulina	1:2000	Sigma B-5-1-2
VDAC	1:1000	Abcam Ab15895
KIS	1:100	Fet pel laboratori en col·laboració amb AbBCN
HA	1:1000	Sigma 12CA5
FLAG	1:2000	Sigma F3165
Histone H3	1:1000	Abcam Ab1791
hnRNPA2B1	1:1000	Novus Biologicals NB120-6102
CPEB3	1:500	Abcam Ab10883

Staufen1	1:500	Regal de Michael Kiebler
Staufen2	1:500	Regal de Michael Kiebler
Anticossos secundaris		
IRDye 680 RD	1:10000	LI-COR Biosciences Cat n°926-68070
IRDye 800 CW	1:10000	LI-COR Biosciences Cat n°926-32210
Proteïna A/G marcada amb HRP	1:10000	ThermoFisher cat n°32490
IRDye 800CW Streptavidina	1:1000	LI-COR Biosciences cat n° PN926-32230

11. Immunoprecipitació de proteïnes marcades amb FLAG

Per al cas de les cèl·lules en cultiu, siguin corticals o línies cel·lulars, les cèl·lules es van netejar amb PBS fred i es van recollir amb un rascador en el volum necessari de tampó d'immunoprecipitació (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% Tritó X-100, 10% glicerol, 0.5 mM DTT, 1x inhibidor de proteases [Roche cat n°05056489001] 1x inhibidor de fosfatases [Roche cat n°4906845001], si es pretenia analitzar RNA a l'eluat, l'aigua es tractava amb DEPC i s'afegien 40 U / ml inhibidors d'RNAses [LifeTechnologies cat n°10777019]). Un cop recollides, es van sonicar el temps necessari per reduir la viscositat de la solució, sempre en gel i amb pauses per evitar l'augment de temperatura. Després es centrifugaven durant 10 minuts a un mínim de 10000g a 4°C per eliminar el debris cel·lular, el sobrenedant es va recollir i incubar amb el volum desitjat de reïna de FLAG M2 agarosa (Sigma cat n° A2220), durant 2 hores a 4°C en rotació, s'afegia RNAsa durant la incubació si era necessari.

Després de la incubació la reïna es recuperava per centrifugació durant 1 minut a 50g a 4°C, i es rentava 3 vegades amb 0.5 mL de tampó RIP, en rotació durant 5 minuts. En cas que l'eluat de la immunoprecipitació es volgués analitzar per *western blot*, la reïna s'incubava en un volum de 2xSSR durant 5 minuts a 95°C. Si es tractava d'una immunoprecipitació d'RNA, la reïna s'incubava en tampó de lisi del kit d'extracció d'RNA (*EZNA Total RNA Purification KIT*), durant 15 minuts a 4°C en rotació. El *western blot* o protocol d'extracció RNA continuava normalment a partir d'aquest punt.

12. Immunoprecipitació de proteïnes endògenes de cervell

Per a les immunoprecipitacions d'Staufen1 i Staufen2 a partir de cervell adult de ratolí es van utilitzar tres cervells per condició. Es va disgregar el teixit en tampó d'immunoprecipitació amb ajuda d'un homogeneïtzador Douncer. Després es van eliminar els nuclis i el debris cel·lular amb dues centrifugacions seqüencials, a 1000g durant 10 minuts i a 10000g durant 10 minuts, sempre a 4°C, recuperant el sobrenedant amb cura de no resuspendre el pèl·let i sempre en gel. Es va recollir una mostra del segon sobrenedant, tant per RNA com per proteïna, i la resta va ser utilitzat com a input, netejant-lo primer amb proteïna A sefarosa (Fisher cat n°11514945) durant 2 hores a 4°C i en rotació. Després de la neteja, la sefarosa es va eliminar per

centrifugació, i el sobrenedant va ser incubat amb l'anticòs desitjat (5 µg d'anticòs específic contra Staufen1, Staufen2, o anticòs control). L'anticòs es va recuperar amb proteïna A sefarosa (125 µL de la dilució de reïna al 50%), incubant en rotació, a 4°C durant 2 hores, i la sefarosa es va rentar 5 vegades amb 1 mL de tampó d'immunoprecipitació, centrifugant entre rentats durant 1 minut a 50g a 4°C. A l'últim rentat, es va separar un terç de la sefarosa per l'anàlisi per *western blot* i es va incubar amb un volum de 2xSSR a 95°C durant 5 minuts. La resta, per a l'anàlisi d'RNA, es va incubar en tampó de lisi del kit d'extracció d'RNA durant 15 minuts a 4°C i en rotació. El *western blot* o protocol d'extracció RNA continuava normalment a partir d'aquest punt.

13. Crosslinking i immunoprecipitació amb el sistema MS2 (*MS2 Binding sequence-MS2 coat protein*)

Per a la immunoprecipitació de l'mRNA de *ZsGreen* unit a l'intró 16 de *CaMKIIα* (o *ZsGreen* com a control), es va realitzar una immunopurificació indirecta utilitzant el sistema MS2. Aquest consisteix en la unió de la seqüència MBS (*MS2 Binding Sequence*) a la de l'mRNA desitjat (resultant *ZsGreen-MBS* o *ZsGreen-I16-MBS*), la cotransfecció del plàsmids expressant aquests mRNAs amb la proteïna FLAG-MCP (*MS2 coat protein*, que uneix específicament i amb alta afinitat la seqüència d'mRNA MBS) permetia immunoprecipitar indirectament la molècula d'mRNA fusionada a la seqüència MBS.

Per realitzar aquesta immunoprecipitació, les cèl·lules N2a (a plaques de 100 mm) es van transfectar amb 8 µg pcDNA3-*ZsGreen*-Intro16-MBS o pcDNA3-*ZsGreen*-MBS com a control, als dos casos es va cotransfectar 2 µg de pcDNA3-FLAG-MCP. 24 hores més tard, es van recuperar les N2a de la placa de cultiu mitjançant tripsinització, durant 2 minuts a 37°C, immediatament després es va bloquejar la tripsina amb medi de cultiu cel·lular (que conté FBS) fred, i es van traspasar les mostres a gel. La tripsina i el medi de cultiu es van rentar dues vegades amb PBS fred, centrifugant entre rentats a 500g durant 5 minuts a 4°C. Les cèl·lules es van resuspendre en PBS deixant-les a 2 milions / mL i es va afegir formaldehid fins a 0.3%, incubant-lo en rotació a temperatura ambient durant 10 minuts, després dels quals es va afegir glicina (fins a 0.125 M) per bloquejar el formaldehid, i les cèl·lules van ser rentades dues vegades més amb PBS fred. Un cop netes es van resuspendre en tampó d'immunoprecipitació i es van sonicar per trencar les cèl·lules i eliminar la viscositat. Es va centrifugar la solució durant 10 minuts a 10000g a 4°C per eliminar els nuclis i el debris cel·lular. El sobrenedant va ser incubat amb reïna M2 FLAG agarosa durant 4 hores a 4°C en rotació, després de la incubació la reïna es va recuperar per centrifugació i es va rentar 5 cops amb tampó d'immunoprecipitació, sempre a 4°C i en gel. Després del rentat, la reïna es va incubar amb el tampó de lisi del kit d'extracció d'RNA durant 15 minuts a 4°C i en rotació, extraient l'RNA de forma normal.

14. Purificació de grànuls d'RNA de cervell

Per obtenir els grànuls d'RNA, els cervells de ratolí adult es disgregaven en tampó IMAC (20 mM HEPES pH 7.4, 140 mM d'acetat potàssic, 1 mM d'acetat de magnesi, 1 mM d'EGTA, 1x inhibidors de proteases i de fosfatases, 40 U / mL inhibidors de RNAses, en aigua tractada amb DEPC) amb l'ajuda d'un homogeneïtzador Douncer.

Un cop disgregat, es centrifugava a 1000g durant 10 minuts, resultant en P1 (que conté nuclis i debris) i S1, la fracció S1 es centrifugava de nou a 10000g durant 10 minuts, deixant al P2 reticle endoplàsmatic i estructures membranoses grans. L'S2 es centrifugava de nou a 100000g durant 60 minuts, resultant en un pèl·let P3 que contenia els grànuls d'RNA, que es resuspenien en 2xSSR o en tampó de lisi del kit d'extracció d'RNA, pipetejant i mesclant amb el vòrtex energèticament durant uns minuts, el *western blot* o l'obtenció d'RNA continuava de forma normal.

15. Obtenció de sinaptoneurosomes funcionals

Per a les estimulacions amb BDNF i NMDA es van obtenir sinaptoneurosomes funcionals des de cervell de ratolí adult, amb un protocol modificat a partir del creat per Nagy A. et al¹³⁹. El cervell adult s'homogeneïtzava en un tampó (0.32 M sucrosa, 1 mM EDTA, 1 mg / mL BSA, 5 mM HEPES pH 7.4, 1x inhibidor de proteases, 1x inhibidor de fosfatases, 40 U / ml inhibidors d'RNases en aigua tractada amb DEPC) a 650 rpm en un homogeneïtzador Douncer, sempre en gel. L'homogenat es va centrifugar a 3000g durant 10 minuts a 4°C per eliminar el debris, les cèl·lules sense trencar i els nuclis, el sobrenedant es va centrifugar a 14000g durant 12 minuts a 4°C. El pèl·let, que conté el sinaptoneurosomes, es va resuspendre a tampó HEPES-Krebs (150 mM HCl, 3 mM KCl, 10 mM glucosa, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7.4, 40 U / mL inhibidors de RNases, en aigua tractada amb DEPC) i es va afegir Percoll fins al 45% v/v, mesclant suaument invertint el tub. La solució es va centrifugar a 14000g durant 2 minuts a 4°C i els sinaptoneurosomes es van recuperar de la capa superior, es van rentar una vegada amb tampó HEPES-Krebs i es van centrifugar de nou a 14000g durant 30'. El pèl·let contenint els sinaptoneurosomes va ser resuspès en HEPES-Krebs fins a una concentració de proteïna d'1 µg / mL i es va incubar amb BDNF (100 µg / mL), NMDA (50 µg / mL) o vehicle durant 30 minuts a 37°C. L'RNA es va recuperar dels sinaptoneurosomes estimulats amb *TRI reagent*, seguint les instruccions del fabricant.

16. Obtenció de sinaptoneurosomes de cèl·lules corticals per filtració

A causa de la ràpida pèrdua de funcionalitat dels sinaptoneurosomes, les estimulacions amb cicloheximida es van dur a terme a cèl·lules corticals en cultiu, obtenint-se els sinaptoneurosomes després de l'estimulació. Les cèl·lules corticals en plaques de cultiu de 100 mm (2.5*10⁶ cèl·lules per placa) es van cultivar fins a 18-20 DIVs i es van tractar amb actinomicina D (10 µg / mL) durant una hora abans de les estimulacions per evitar efectes transcripcionals. Després es van estimular amb BDNF (200 ng / mL) o vehicle, amb o sense cicloheximida (afegida 10 minuts abans que el BDNF), durant 30 minuts a l'incubador. Després es van rentar dues vegades amb PBS-MC (PBS + 1mM MgCl₂ + 0.1mM CaCl₂) fred i es van recollir les cèl·lules amb un rascador, en 700 µL de tampó d'homogeneïtzació (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.53 mM KH₂PO₄, 212.7 mM glucosa, 1 mM DTT, pH 7.4, inhibidors de proteases i de fosfatases i 40 U / ml d'inhibidor d'RNases, en aigua tractada amb DEPC), sempre en gel. Les cèl·lules recollides van ser homogeneïtzades amb ajuda d'un Douncer, quatre passades suaus sempre en gel. L'homogenat va ser passat a través de dos filtres de 100 µm de nylon (Millipore cat n° NY1H02500) i dos més de 5 µm de PVDF (Millipore cat n° SVLP02500), i centrifugat a 1000g durant 10

minuts a 4°C. L'RNA va ser obtingut del pèl·let, que contenia els sinaptoneurosomes, amb *TRI reagent*, seguint les instruccions del fabricant.

17. smFISH

La hibridació fluorescent *in situ* de molècula única (smFISH) va ser realitzada amb *ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit* (ThermoFisher Scientific cat n°QVC0001). Es van utilitzar dues sondes, contra els exons 1-15 de *CaMKIIα* i contra la seqüència de l'intró 16, referides com a sondes exònica i intrònica. En ambdós casos les sondes van ser realitzades per la companyia, es va enviar la seqüència contra la qual es volia dirigir la sonda i ells, utilitzant un algoritme de la seva propietat, van dissenyar vint parells de sondes, que anellaven al llarg de la seqüència diana. Cada parell de sondes hibrida adjacent l'una a l'altre, creant a la vegada una seqüència diana per a les seqüències amplificadores de senyal contingudes al kit. El fet de necessitar dues sondes adjacents multiplica l'especificitat de la tècnica, i l'amplificació realitzada mitjançant seqüències de DNA resulta en suficient senyal per detectar molècules d'RNA individuals.

Al nostre cas en particular es van realitzar algunes modificacions al protocol proporcionat pel fabricant, principalment, la digestió amb proteasa es va ometre per mantenir la integritat cel·lular i poder realitzar immunofluorescències després de la smFISH. En els casos en què es digeriria amb pepsina per dissoldre els grànuls d'RNA es va utilitzar un mètode descrit anteriorment²²⁷. La pepsina (Sigma cat n°P7012) s'aplicava a una concentració de 0.1 mg / mL amb 10 mM HCl en aigua, pH 2.5, el temps de digestió era crític i una vegada completat el minut o els tres minuts, es va rentar el cultiu diverses vegades amb PBS + 0.1 M Glicina a pH 7.2 per bloquejar la pepsina i eliminar-la completament. Després de la digestió, la smFISH es va dur a terme normalment. En tots els casos, després de la smFISH es va realitzar una immunofluorescència contra MAP2, per poder detectar els somes i dendrites.

18. Assajos Luciferasa

Els assajos de Luciferasa es van dur a terme transfectant cèl·lules HEK293T, plantades a plaques de 24 pous, amb 100 ng de pGL3b-GaussiaLuciferasa-3'UTR*GluR2* o pGL3b-GaussiaLuciferasa com a control. Per relativitzar el senyal a l'eficiència de transfecció, es van transfectar 50 ng de pGL3b-Cypridina, també es van transfectar 0.1 µg de pcDNA3-CPEB3 i 0.9 µg pcDNA3-KIS. En els casos en què algun dels plàsmids no s'utilitzava es completava la transfecció amb pcDNA3 buit fins a 1150 ng de DNA total. 24 hores posttransfecció es va canviar el medi per medi fresc, i 2 hores després es va recollir el medi de cultiu per mesurar el ratí Luciferasa / Cypridina mitjançant *Pierce™ Gaussia Luciferase Flash Assay Kit* (ThermoScientific cat n°16158) i *Pierce™ Cypridina Luciferase Flash Assay Kit* (ThermoScientific cat n°16168). Als resultats obtinguts al luminòmetre s'hi van restar els valors obtinguts del control sense transfectar amb Luciferasa ni Cypridina.

19. Anàlisi BONCAT de traducció de novo

Es van plantar cèl·lules corticals a plaques de 100 mm (2.5*10⁶ cèl·lules per placa), es van infectar amb els lentivirus a 3 DIV i a 14 DIV es va procedir a marcar les proteïnes de nova síntesi amb la tècnica BONCAT (*Bioorthogonal noncanonical aminoacid tagging*), que consisteix bàsicament en la incorporació d'un aminoàcid

anàleg a la metionina, modificat amb un grup azida per poder ser marcat específicament amb alquí-biotina i detectat posteriorment amb estreptavidina. Aquest mètode a estat descrit en profunditat²²⁸, en el nostre cas es va utilitzar tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en comptes de bromur de coure per a generar el Cu(I) per a catalitzar la reacció de cicloadició dels grups azida-alquí.

Per marcar les proteïnes de nova traducció, es van cultivar les neurones amb medi sense metionina durant 30 minuts per a esgotar completament aquest aminoàcid. Després es van cultivar durant 4 hores amb medi sense metionina, però amb l'anàleg AHA (Azidohomoalanina) (Diffractia cat n°CLK-AA005-10). Un cop marcades, les neurones van ser recollides amb PBS pH 7.6 + 0.05% SDS i inhibidors de proteases i fosfatases. La reacció de cicloadició es va dur a terme com segueix: 200 µM ligand de triazol, 50 µM biotina-alquí, 400 µM TCEP i 200 µM sulfat de coure, tot incubat a 4°C durant tota la nit amb agitació. L'endemà al matí, la reacció va ser centrifugada a 2000g durant 5 minuts a 4°C i es va netejar amb columnes PD-10 (GE Healthcare cat n°17-0851-01) per eliminar l'excés de reactius, eluint en PBS pH 7.6 + 0.05% SDS. Aquest eluat conté totes les proteïnes, per purificar les que hagin incorporat AHA i per tant estaran marcades amb biotina es van precipitar amb reïna *NeutrAvidin* (Fisher cat n°11875835) durant tota una nit a 4°C. Després de la unió de les proteïnes biotilades amb *NeutrAvidin*, la reïna es va rentar tres vegades amb PBS pH 7.6 + 1% NP-40 i es va eluir amb 2xSSR. Les proteïnes purificades es van carregar al *western blot* de forma normal, i es van detectar amb anticossos específics o amb estreptavidina unida a un fluorocrom (IRDye 800CW Streptavidin, LI-COR Biosciences cat n°PN926-32230) per detectar la proteïna total.

20. Biotinilació de proteïnes de superfície

Es van plantar neurones corticals a plaques de 100 mm (2.5×10^6 cèl·lules per placa), es van infectar a 3 DIV amb lentivirus i a 14 DIVs es van marcar i purificar les proteïnes de superfície. Els cultius neuronals es van rentar una vegada amb PBS-MC fred i es van incubar amb 1 mg / mL de sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce cat n°11811205) diluïda en PBS-MC durant 15 minuts, aquesta biotina té la particularitat de no ser permeable a la membrana plasmàtica. Després de la incubació, es va rentar i bloquejar la biotina lliure rentant dues vegades amb TBS fred. Les cèl·lules van ser recollides amb tampó RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5 mM EDTA i inhibidors de proteases i fosfatases), abans de continuar, es va guardar una part d'aquest extret total (que contenia l'extracte proteic total).

Es va mesurar la concentració de proteïna als extrems i es van incubar 1 mg durant tota una nit amb 20 µL de *NeutrAvidin* (Pierce) a 4°C, en un volum total de 500 µL, sempre en rotació. El matí següent la reïna va ser rentada tres vegades amb tampó RIPA fred i es va eluir la proteïna amb 2xSSR, procedint amb el *western blot* de les fraccions total i marcada amb biotina (que correspon a les proteïnes de superfície).

21. Assaig de longitud de les cues de poliadenines

Es van transfectar cèl·lules HEK293T (a plaques de 100 mm) amb 1 µg de pGL3b-Luciferasa-3' *UTRGluR2*, + 3 µg de pcDNA3-CPEB3 i 6 µg de pcDNA3-KIS. Als casos en què algun dels plàsmids no s'utilitzava, es completava amb pcDNA3 buit fins a un

total de 10 µg de DNA. 24 hores després de la transfecció es van recollir les cèl·lules i l'RNA es va extreure amb el mètode descrit, realitzant-se una RT-PCR per obtenir cDNA que seria utilitzat per l'anàlisi de la longitud de la seva cua de poliadenines.

Per mesurar la longitud del poliA al gen reporter *Luciferasa-3'UTR GluR2* es va utilitzar el *Poly(A) tail-length assay kit* (USB-affymetrix), seguint sempre les instruccions del fabricant. Es va utilitzar un primer específic per al 3' UTR del gen *GluR2* de ratolí, que anellava a la seqüència anterior al senyal de poliadenilació, l'altre primer utilitzat va ser subministrat al kit i anellava al final de la cua de poliadenines. Per a controlar l'eficiència de la retrotranscripció i PCR, es va amplificar una seqüència anterior al senyal de poliadenilació. Els primers utilitzats van ser:

Sentit: 5' - GGAAAGACCAAATAATTATGAACT - 3'*

Antisentit: 5' - GTTTGTTCCTTGGAGTATGACAC - 3'

*El primer sentit és comú per a les reaccions de PCR per amplificar la cua de poliadenines i la seqüència control.

Entre les diferents opcions descrites al protocol del kit utilitzat, es va escollir una PCR d'un pas únic, amb una temperatura d'anellament i extensió de 64°C. Els productes de PCR es van analitzar amb una electroforesi en gel d'agarosa del 2.5%.

22. Separació Nucli-citoplasma

Per obtenir les fraccions nuclear i citoplasmàtica dels cultius neuronals corticals, es van netejar primer en PBS fred i a continuació es van recollir amb tampó RIP (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% Tritó X-100, 10% glicerol, 0.5 mM DTT, 1x inhibidor de proteases, 1x inhibidor de fosfatases, 40 U / mL d'inhibidors d'RNAses en aigua DEPC) i es van disgregar suaument amb la pipeta, passant-les unes 10 vegades. La solució es va centrifugar a 1000g durant 3 minuts a 4°C. El pel·let conté la fracció nuclear i el sobrenedant la citoplasmàtica. L'RNA es va obtenir de cada fracció amb *TRI reagent*. La correcta separació de fraccions es confirmava analitzant els mRNAs Gapdh i Malat1 (Citoplasmàtic i nuclear, respectivament).

Referències

1. Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R. & Roberts, R. J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1–8 (1977).
2. Berk, A. J. & Sharp, P. A. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12**, 721–732 (1977).
3. Singh, R. K. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol. Med.* **18**, 472–482 (2012).
4. Ferrigno, O. *et al.* Transposable B2 SINE elements can provide mobile RNA polymerase II promoters. *Nat. Genet.* **28**, 77–81 (2001).
5. Yan, M.-D. *et al.* Identification and characterization of a novel gene Saf transcribed from the opposite strand of Fas. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1465–1474 (2005).
6. Bevilacqua, A., Ceriani, M. C., Capaccioli, S. & Nicolini, A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J. Cell. Physiol.* **195**, 356–372 (2003).
7. Zucchelli, S. *et al.* SINEUPs are modular antisense long non-coding RNAs that increase synthesis of target proteins in cells. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 174 (2015).
8. Westholm, J. O. & Lai, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897–1904 (2011).
9. Nilsen, T. W. & Graveley, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463**, 457–463 (2010).
10. Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413–1415 (2008).
11. Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 345–355 (2010).
12. Roberts, A. G., Redding, S. J. & Llewellyn, D. H. An alternatively-spliced exon in the 5'-UTR of human ALAS1 mRNA inhibits translation and renders it resistant to haem-mediated decay. *FEBS Lett.* **579**, 1061–1066 (2005).
13. Kramer, M. *et al.* Alternative 5' Untranslated Regions Are Involved in Expression Regulation of Human Heme Oxygenase-1. *PLoS One* **8**, e77224 (2013).
14. Raj, B. *et al.* Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. *Neuron* **87**, 14–27 (2015).
15. Gilbert, W. Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501–501 (1978).
16. Dvinge, H. & Bradley, R. K. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med.* **7**, 45 (2015).
17. Braunschweig, U. *et al.* Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. *Genome Res.* **24**, 1774–86 (2014).
18. Wong, J. J.-L., Au, A. Y. M., Ritchie, W. & Rasko, J. E. J. Intron retention in mRNA: No longer nonsense. *BioEssays* **38**, 41–49 (2016).
19. Buckley, P. T., Khaladkar, M., Kim, J. & Eberwine, J. Cytoplasmic intron retention, function, splicing, and the sentinel RNA hypothesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5**, 223–230 (2014).
20. Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379–91 (2005).
21. Glanzer, J. *et al.* RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16859–64 (2005).

22. König, H., Matter, N., Bader, R., Thiele, W. & Müller, F. Splicing segregation: the minor spliceosome acts outside the nucleus and controls cell proliferation. *Cell* **131**, 718–29 (2007).
23. Pessa, H. K. J. *et al.* Minor spliceosome components are predominantly localized in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8655–60 (2008).
24. König, H. & Müller, F. Minor splicing: nuclear dogma still in question. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, E37 (2008).
25. Steitz, J. A. *et al.* Where in the cell is the minor spliceosome? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8485–6 (2008).
26. Singh, J. & Padgett, R. A. Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128–1133 (2009).
27. Zheng, S. *et al.* PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2. *Nat. Neurosci.* **15**, 381–388 (2012).
28. Yap, K., Lim, Z. Q., Khandelia, P., Friedman, B. & Makeyev, E. V. Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. *Genes Dev.* **26**, 1209–1223 (2012).
29. Cohen, S. & Greenberg, M. E. Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 183–209 (2008).
30. Davis, G. W. HOMEOSTATIC CONTROL OF NEURAL ACTIVITY: From Phenomenology to Molecular Design. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 307–323 (2006).
31. Mauger, O., Lemoine, F. & Scheiffele, P. Targeted Intron Retention and Excision for Rapid Gene Regulation in Response to Neuronal Activity. *Neuron* **92**, 1266–1278 (2016).
32. Bell, T. J. *et al.* Intron retention facilitates splice variant diversity in calcium-activated big potassium channel populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21152–7 (2010).
33. Bell, T. J. *et al.* Cytoplasmic BK(Ca) channel intron-containing mRNAs contribute to the intrinsic excitability of hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1901–6 (2008).
34. Buckley, P. T. *et al.* Cytoplasmic Intron Sequence-Retaining Transcripts Can Be Dendritically Targeted via ID Element Retrotransposons. *Neuron* **69**, 877–884 (2011).
35. Kim, J., Martignetti, J. A., Shen, M. R., Brosius, J. & Deininger, P. Rodent BC1 RNA gene as a master gene for ID element amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3607–11 (1994).
36. McGlincy, N. J. & Smith, C. W. J. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem. Sci.* **33**, 385–393 (2008).
37. Hug, N., Longman, D. & Cáceres, J. F. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1483–1495 (2016).
38. Steward, O., Farris, S., Pirbhoy, P. S., Darnell, J. & Driesche, S. J. Van. Localization and local translation of Arc/Arg3.1 mRNA at synapses: some observations and paradoxes. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 101 (2015).
39. Wong, J. J.-L. *et al.* Orchestrated Intron Retention Regulates Normal Granulocyte Differentiation. *Cell* **154**, 583–595 (2013).
40. Colak, D., Ji, S.-J., Porse, B. T. & Jaffrey, S. R. Regulation of axon guidance by compartmentalized nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **153**, 1252–65 (2013).
41. Chen, Z., Gore, B. B., Long, H., Ma, L. & Tessier-Lavigne, M. Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* **58**, 325–32 (2008).
42. Li, Y. *et al.* An intron with a constitutive transport element is retained in a Tap messenger RNA. *Nature* **443**, 234–237 (2006).
43. Li, Y. *et al.* An NXF1 mRNA with a retained intron is expressed in hippocampal and neocortical neurons and is translated into a protein that functions as an Nxf1 cofactor. *Mol. Biol. Cell* **27**,

- 3903–3912 (2016).
44. Steward, O. & Levy, W. B. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**, 284–91 (1982).
 45. Davis, L., Banker, G. A. & Steward, O. Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* **330**, 477–479 (1987).
 46. Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. & Lipshitz, H. D. RNA LOCALIZATION IN DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335–394 (1998).
 47. Martin, K. C. Local protein synthesis during axon guidance and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 305–310 (2004).
 48. Steward, O. & Schuman, E. M. Protein Synthesis at Synaptic Sites on Dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 299–325 (2001).
 49. Welch, J. M., Wang, D. & Feng, G. Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *J. Comp. Neurol.* **472**, 24–39 (2004).
 50. Garner, C. C., Tucker, R. P. & Matus, A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**, 674–677 (1988).
 51. Böckers, T. M. *et al.* Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 182–190 (2004).
 52. Burgin, K. E. *et al.* In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 1788–98 (1990).
 53. Herb, A. *et al.* Prominent Dendritic Localization in Forebrain Neurons of a Novel mRNA and Its Product, Dendrin. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 367–374 (1997).
 54. Kindler, S., Mohr, E., Rehbein, M. & Richter, D. in 83–104 (Springer Berlin Heidelberg, 2001). doi:10.1007/978-3-540-40025-7_6
 55. Cajigas, I. J. *et al.* The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* **74**, 453–66 (2012).
 56. Khaladkar, M. *et al.* Subcellular RNA Sequencing Reveals Broad Presence of Cytoplasmic Intron-Sequence Retaining Transcripts in Mouse and Rat Neurons. *PLoS One* **8**, e76194 (2013).
 57. Blichenberg, A. *et al.* Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1881–8 (2001).
 58. Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M. K. & Carson, J. H. Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2311–27 (2008).
 59. Huang, Y.-S., Carson, J. H., Barbarese, E. & Richter, J. D. Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev.* **17**, 638–653 (2003).
 60. Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T. & Tohyama, M. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* **3**, 1079–1084 (2000).
 61. Khateb, S., Weisman-Shomer, P., Hershco, I., Loeb, L. A. & Fry, M. Destabilization of tetraplex structures of the fragile X repeat sequence (CGG)_n is mediated by homolog-conserved domains in three members of the hnRNP family. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4145–4154 (2004).
 62. Farina, K. L. & Singer, R. H. The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol.* **12**, 466–72 (2002).
 63. Moore, M. J. From Birth to Death: The Complex Lives of Eukaryotic mRNAs. *Science (80-.)*. **309**, 1514–1518 (2005).

64. Hachet, O. & Ephrussi, A. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959–963 (2004).
65. Wang, H. *et al.* Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J. Cell Biol.* **171**, 811–21 (2005).
66. Khanam, T. *et al.* Can ID Repetitive Elements Serve as Cis-acting Dendritic Targeting Elements? An In Vivo Study. *PLoS One* **2**, e961 (2007).
67. Hoek, K. S., Kidd, G. J., Carson, J. H. & Smith, R. hnRNP A2 Selectively Binds the Cytoplasmic Transport Sequence of Myelin Basic Protein mRNA^T. *Biochemistry* **37**, 7021–7029 (1998).
68. Munro, T. P. *et al.* Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J. Biol. Chem.* **274**, 34389–95 (1999).
69. Subramanian, M. *et al.* G–quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep.* **12**, 697–704 (2011).
70. Fernández Moya, S. M. & Kiebler, M. A. CLIPing Staufen to secondary RNA structures: Size and location matter! *BioEssays* **37**, 1062–1066 (2015).
71. Batish, M., van den Bogaard, P., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4645–50 (2012).
72. Jambor, H., Brunel, C. & Ephrussi, A. Dimerization of oskar 3' UTRs promotes hitchhiking for RNA localization in the *Drosophila* oocyte. *RNA* **17**, 2049–2057 (2011).
73. Wagner, C. *et al.* Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J. Mol. Biol.* **313**, 511–524 (2001).
74. Chekulaeva, M., Hentze, M. W. & Ephrussi, A. Bruno Acts as a Dual Repressor of oskar Translation, Promoting mRNA Oligomerization and Formation of Silencing Particles. *Cell* **124**, 521–533 (2006).
75. Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683–96 (2001).
76. Dahm, R. & Kiebler, M. Cell biology: Silenced RNA on the move. *Nature* **438**, 432–435 (2005).
77. Meignin, C. & Davis, I. Transmitting the message: intracellular mRNA localization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 112–119 (2010).
78. Lunde, B. M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 479–490 (2007).
79. Kim, J. H. & Richter, J. D. Opposing Polymerase-Deadenylation Activities Regulate Cytoplasmic Polyadenylation. *Mol. Cell* **24**, 173–183 (2006).
80. Huang, Y.-S., Jung, M.-Y., Sarkissian, M. & Richter, J. D. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J.* **21**, 2139–48 (2002).
81. Richter, J. D. Think globally, translate locally: what mitotic spindles and neuronal synapses have in common. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7069–71 (2001).
82. Udagawa, T. *et al.* Bidirectional Control of mRNA Translation and Synaptic Plasticity by the Cytoplasmic Polyadenylation Complex. *Mol. Cell* **47**, 253–266 (2012).
83. Wu, L. *et al.* CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* **21**, 1129–39 (1998).
84. Huang, Y.-S., Jung, M.-Y., Sarkissian, M. & Richter, J. D. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alphaCaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J.* **21**, 2139–2148 (2002).
85. Berger-Sweeney, J., Zearfoss, N. R. & Richter, J. D. Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn. Mem.* **13**, 4–7 (2006).

86. Zearfoss, N. R., Alarcon, J. M., Trifilieff, P., Kandel, E. & Richter, J. D. A Molecular Circuit Composed of CPEB-1 and c-Jun Controls Growth Hormone-Mediated Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 8502–8509 (2008).
87. Kim, H. H., Lee, S. J., Gardiner, A. S., Perrone-Bizzozero, N. I. & Yoo, S. Different motif requirements for the localization zipcode element of β -actin mRNA binding by HuD and ZBP1. *Nucleic Acids Res.* **43**, 7432–46 (2015).
88. Perycz, M., Urbanska, A. S., Krawczyk, P. S., Parobczak, K. & Jaworski, J. Zipcode Binding Protein 1 Regulates the Development of Dendritic Arbors in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **31**, 5271–5285 (2011).
89. Lin, A. C. & Holt, C. E. Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.* **26**, 3729–36 (2007).
90. Tiruchinapalli, D. M. *et al.* Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **23**, 3251–61 (2003).
91. Eom, T., Antar, L. N., Singer, R. H. & Bassell, G. J. Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J. Neurosci.* **23**, 10433–44 (2003).
92. Hüttelmaier, S. *et al.* Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512–515 (2005).
93. Micklem, D. R., Adams, J., Grünert, S. & St Johnston, D. Distinct roles of two conserved Staufens domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* **19**, 1366–1377 (2000).
94. Ryter, J. M. & Schultz, S. C. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* **17**, 7505–13 (1998).
95. Laver, J. D. *et al.* Genome-wide analysis of Staufens-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9438–9460 (2013).
96. Heraud-Farlow, J. E. *et al.* Staufens2 Regulates Neuronal Target RNAs. *Cell Rep.* **5**, 1511–1518 (2013).
97. Duchaine, T. F. *et al.* Staufens2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell Sci.* **115**, 3285–95 (2002).
98. Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. & Schuman, E. A role for a rat homolog of staufens in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463–75 (2001).
99. Köhrmann, M. *et al.* Microtubule-dependent recruitment of Staufens-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2945–53 (1999).
100. Goetze, B. *et al.* The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufens2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* **172**, 221–231 (2006).
101. Fritzsche, R. *et al.* Interactome of Two Diverse RNA Granules Links mRNA Localization to Translational Repression in Neurons. *Cell Rep.* **5**, 1749–1762 (2013).
102. Macchi, P. *et al.* The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufens2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J. Biol. Chem.* **279**, 31440–4 (2004).
103. Miki, T. & Yoneda, Y. Alternative Splicing of Staufens2 Creates the Nuclear Export Signal for CRM1 (Exportin 1). *J. Biol. Chem.* **279**, 47473–47479 (2004).
104. Kuret, J. & Schulman, H. Mechanism of autophosphorylation of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**, 6427–33 (1985).
105. Wayman, G. A. *et al.* Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron* **59**, 914–931 (2008).
106. Chao, L. H. *et al.* A Mechanism for Tunable Autoinhibition in the Structure of a Human

- Ca²⁺/Calmodulin- Dependent Kinase II Holoenzyme. *Cell* **146**, 732–745 (2011).
107. Sakagami, H. & Kondo, H. Differential expression of mRNAs encoding γ and δ subunits of CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaM kinase II) in the mature and postnatally developing rat brain. *Mol. Brain Res.* **20**, 51–63 (1993).
 108. Brocke, L., Chiang, L. W., Wagner, P. D. & Schulman, H. Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. *J. Biol. Chem.* **274**, 22713–22 (1999).
 109. Miller, S. G., Patton, B. L. & Kennedy, M. B. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺-independent activity. *Neuron* **1**, 593–604 (1988).
 110. Coultrap, S. J. & Bayer, K. U. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* **35**, 607–18 (2012).
 111. Lisman, J., Yasuda, R. & Raghavachari, S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 169–82 (2012).
 112. Bayer, K.-U., De Koninck, P., Leonard, A. S., Hell, J. W. & Schulman, H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* **411**, 801–805 (2001).
 113. Steiner, P. *et al.* Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron* **60**, 788–802 (2008).
 114. Gardoni, F., Polli, F., Cattabeni, F. & Di Luca, M. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 2694–2704 (2006).
 115. Krapivinsky, G., Medina, I., Krapivinsky, L., Gapon, S. & Clapham, D. E. SynGAP-MUPP1-CaMKII Synaptic Complexes Regulate p38 MAP Kinase Activity and NMDA Receptor- Dependent Synaptic AMPA Receptor Potentiation. *Neuron* **43**, 563–574 (2004).
 116. Okamoto, K.-I., Narayanan, R., Lee, S. H., Murata, K. & Hayashi, Y. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 6418–6423 (2007).
 117. Kim, K. *et al.* A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron* **87**, 813–826 (2015).
 118. Miller, S. *et al.* Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* **36**, 507–19 (2002).
 119. Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K. & Kandel, E. R. The 3'-untranslated region of CaMKII α is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13250–5 (1996).
 120. Zhang, Y., Gaetano, C. M., Williams, K. R., Bassell, G. J. & Mihalescu, M. R. FMRP interacts with G-quadruplex structures in the 3'-UTR of its dendritic target Shank1 mRNA. *RNA Biol.* **11**, 1364–1374 (2014).
 121. Stefanovic, S. *et al.* Fragile X mental retardation protein interactions with a G quadruplex structure in the 3'-untranslated region of NR2B mRNA. *Mol. Biosyst.* **11**, 3222–30 (2015).
 122. Dichtenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. & Bassell, G. J. A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic mRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X Syndrome. *Dev. Cell* **14**, 926–939 (2008).
 123. Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. Kinesin Transports RNA. *Neuron* **43**, 513–525 (2004).
 124. Mikl, M., Vendra, G. & Kiebler, M. A. Independent localization of MAP2, CaMKII α and β -actin RNAs in low copy numbers. *EMBO Rep.* **12**, 1077–84 (2011).
 125. Heraud-Farlow, J. E. *et al.* Staufen2 Regulates Neuronal Target RNAs. *Cell Rep.* **5**, 1511–1518 (2013).
 126. Hell, J. W. CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron* **81**, 249–65 (2014).

127. Bejerano, G. *et al.* Ultraconserved Elements in the Human Genome. *Science (80-.)*. **304**, 1321–1325 (2004).
128. Katzman, S. *et al.* Human Genome Ultraconserved Elements Are Ultraselected. *Science (80-.)*. **317**, (2007).
129. Lareau, L. F., Inada, M., Green, R. E., Wengrod, J. C. & Brenner, S. E. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**, 926–929 (2007).
130. Battich, N., Stoeger, T. & Pelkmans, L. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nat. Methods* **10**, 1127–1133 (2013).
131. Taylor, A. M. *et al.* Axonal mRNA in Uninjured and Regenerating Cortical Mammalian Axons. *J. Neurosci.* **29**, 4697–4707 (2009).
132. Taylor, A. M., Dieterich, D. C., Ito, H. T., Kim, S. A. & Schuman, E. M. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron* **66**, 57–68 (2010).
133. Harada, A., Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K. & Hirokawa, N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J. Cell Biol.* **158**, 541–549 (2002).
134. Buxbaum, A. R., Wu, B. & Singer, R. H. Single β -actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* **343**, 419–22 (2014).
135. Ohashi, S. *et al.* Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J. Biol. Chem.* **277**, 37804–10 (2002).
136. Park, E. & Maquat, L. E. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 423–435 (2013).
137. Han, T. W. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Bound RNAs Identify Features and Components of Cellular Assemblies. *Cell* **149**, 768–779 (2012).
138. St Johnston, D. Developmental Cell Biology: Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 363–375 (2005).
139. Nagy, A. & Delgado-Escueta, A. V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* **43**, 1114–23 (1984).
140. Chang, Y.-F., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F. The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 51–74 (2007).
141. Giorgi, C. *et al.* The EJC Factor eIF4AIII Modulates Synaptic Strength and Neuronal Protein Expression. *Cell* **130**, 179–191 (2007).
142. Turunen, J. J., Niemelä, E. H., Verma, B. & Frilander, M. J. The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 61–76
143. Sakabe, N. & de Souza, S. Sequence features responsible for intron retention in human. *BMC Genomics* **8**, 59 (2007).
144. Wang, B., Rekosh, D. & Hammarskjöld, M.-L. Evolutionary conservation of a molecular machinery for export and expression of mRNAs with retained introns. *RNA* **21**, 426–37 (2015).
145. Miki, T. & Yoneda, Y. Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J. Biol. Chem.* **279**, 47473–9 (2004).
146. Brownawell, A. M. & Macara, I. G. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* **156**, 53–64 (2002).
147. Kim, V. N. & al., et. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* **14**, 156–9 (2004).
148. Monshausen, M., Gehring, N. H. & Kosik, K. S. The Mammalian RNA-Binding Protein Staufen2 Links Nuclear and Cytoplasmic RNA Processing Pathways in Neurons. *NeuroMolecular Med.* **6**,

- 127–144 (2004).
149. Kiebler, M. A., Jansen, R.-P., Dahm, R. & Macchi, P. A putative nuclear function for mammalian Staufen. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 228–231 (2005).
 150. Lebeau, G. *et al.* Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn. Mem.* **18**, 314–326 (2011).
 151. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
 152. Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 700–712 (2012).
 153. Hanson, P. I., Meyer, T., Stryer, L. & Schulman, H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron* **12**, 943–56 (1994).
 154. Lisman, J. E. & Goldring, M. A. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5320–4 (1988).
 155. Shen, K., Teruel, M. N., Subramanian, K. & Meyer, T. CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* **21**, 593–606 (1998).
 156. Hudmon, A. & Schulman, H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* **364**, 593–611 (2002).
 157. Chao, L. H. *et al.* Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 264–272 (2010).
 158. Aakalu, G., Smith, W. B., Nguyen, N., Jiang, C. & Schuman, E. M. Dynamic Visualization of Local Protein Synthesis in Hippocampal Neurons. *Neuron* **30**, 489–502 (2001).
 159. Wagner, C. *et al.* Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J. Mol. Biol.* **313**, 511–524 (2001).
 160. Smalheiser, N. R. The RNA-centred view of the synapse: non-coding RNAs and synaptic plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130504–20130504 (2014).
 161. di Penta, A. *et al.* Dendritic LSM1/CBP80-mRNPs mark the early steps of transport commitment and translational control. *J. Cell Biol.* **184**, (2009).
 162. Kim, K. M. *et al.* A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes Dev.* **23**, 2033–2045 (2009).
 163. Banerjee, S., Neveu, P. & Kosik, K. S. A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation. *Neuron* **64**, 871–884 (2009).
 164. Hansen, T. B. *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384–388 (2013).
 165. Tay, Y. *et al.* Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs. *Cell* **147**, 344–357 (2011).
 166. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
 167. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science (80-.)*. **313**, 1093–1097 (2006).
 168. Takeuchi, T., Duzkiewicz, A. J. & Morris, R. G. M. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130288–20130288 (2013).
 169. Bourne, J. N. & Harris, K. M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 47–67 (2008).

170. Kessels, H. W. & Malinow, R. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* **61**, 340–350 (2009).
171. Caroni, P., Donato, F. & Muller, D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 478–490 (2012).
172. Ehrlich, I. & Malinow, R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **24**, 916–27 (2004).
173. De Roo, M., Klauser, P., Muller, D., Muller, D. & Murphy, T. LTP Promotes a Selective Long-Term Stabilization and Clustering of Dendritic Spines. *PLoS Biol.* **6**, e219 (2008).
174. Bosch, M. *et al.* Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* **82**, 444–59 (2014).
175. Tanaka, J. -i. *et al.* Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science (80-.)*. **319**, 1683–1687 (2008).
176. Huganir, R. L. & Nicoll, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* **80**, (2013).
177. Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. Spine-Neck Geometry Determines NMDA Receptor-Dependent Ca²⁺ Signaling in Dendrites. *Neuron* **46**, 609–622 (2005).
178. Ehrlich, I. & Malinow, R. Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **24**, 916–927 (2004).
179. Huang, Y.-S., Kan, M.-C., Lin, C.-L. & Richter, J. D. CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *EMBO J.* **25**, 4865–4876 (2006).
180. Kim, E. & Sheng, M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 771–781 (2004).
181. Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K. & Okabe, S. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat. Methods* **2**, 677–684 (2005).
182. Cheng, D. *et al.* Relative and Absolute Quantification of Postsynaptic Density Proteome Isolated from Rat Forebrain and Cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1158–1170 (2006).
183. El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* **290**, 1364–8 (2000).
184. Stein, V., House, D. R. C., Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J. Neurosci.* **23**, 5503–6 (2003).
185. Schnell, E. *et al.* Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13902–13907 (2002).
186. Sheng, M. & Hoogenraad, C. C. The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 823–847 (2007).
187. Ifrim, M. F., Williams, K. R. & Bassell, G. J. Single-Molecule Imaging of PSD-95 mRNA Translation in Dendrites and Its Dysregulation in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *J. Neurosci.* **35**, 7116–7130 (2015).
188. Zhang, W. & Benson, D. L. Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J. Neurosci.* **21**, 5169–81 (2001).
189. Koganezawa, N., Hanamura, K., Sekino, Y. & Shirao, T. The role of drebrin in dendritic spines. *Mol. Cell. Neurosci.* (2017). doi:10.1016/j.mcn.2017.01.004
190. Gu, J., Firestein, B. L. & Zheng, J. Q. Microtubules in dendritic spine development. *J. Neurosci.* **28**, 12120–4 (2008).
191. Kapitein, L. C., Yau, K. W. & Hoogenraad, C. C. in *Methods in cell biology* **97**, 111–132 (2010).

192. Huarte, J. *et al.* Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell* **69**, 1021–30 (1992).
193. Sachs, A. & Wahle, E. Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J. Biol. Chem.* **268**, 22955–8 (1993).
194. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480 (2005).
195. Richter, J. D. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 279–285 (2007).
196. Huang, Y.-S., Jung, M.-Y., Sarkissian, M. & Richter, J. D. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alphaCaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J.* **21**, 2139–2148 (2002).
197. Richter, J. D. Think globally, translate locally: What mitotic spindles and neuronal synapses have in common. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7069–7071 (2001).
198. Pavlopoulos, E. *et al.* Neuralized1 activates CPEB3: a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage. *Cell* **147**, 1369–83 (2011).
199. Heinrich, S. U. & Lindquist, S. Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal Aplysia cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2999–3004 (2011).
200. Raveendra, B. L. *et al.* Characterization of prion-like conformational changes of the neuronal isoform of Aplysia CPEB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 495–501 (2013).
201. Fioriti, L. *et al.* The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. *Neuron* **86**, 1433–1448 (2015).
202. Drisaldi, B. *et al.* SUMOylation Is an Inhibitory Constraint that Regulates the Prion-like Aggregation and Activity of CPEB3. *Cell Rep.* **11**, 1694–1702 (2015).
203. Kielkopf, C. L., Lücke, S. & Green, M. R. U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev.* **18**, 1513–1526 (2004).
204. Manceau, V., Kremmer, E., Nabel, E. G., Maucuer, A. & Selby, P. The Protein Kinase KIS Impacts Gene Expression during Development and Fear Conditioning in Adult Mice. *PLoS One* **7**, e43946 (2012).
205. Cambray, S. *et al.* Protein Kinase KIS Localizes to RNA Granules and Enhances Local Translation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 726–735 (2009).
206. Manceau, V. *et al.* Major phosphorylation of SF1 on adjacent Ser-Pro motifs enhances interaction with U2AF65. *FEBS J.* **273**, 577–587 (2006).
207. Manceau, V., Gavet, O., Curmi, P. & Sobel, A. Stathmin interaction with HSC70 family proteins. *Electrophoresis* **20**, 409–417 (1999).
208. Langenickel, T. H. *et al.* KIS protects against adverse vascular remodeling by opposing stathmin-mediated VSMC migration in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3848–3859 (2008).
209. Maucuer, A. *et al.* KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif. *J. Biol. Chem.* **272**, 23151–6 (1997).
210. Maucuer, A., Le Caer, J. P., Manceau, V. & Sobel, A. Specific Ser-Pro phosphorylation by the RNA-recognition motif containing kinase KIS. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4456–64 (2000).
211. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761–766 (2004).
212. Hlushchenko, I., Koskinen, M. & Hotulainen, P. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton* **73**, 435–441 (2016).
213. Bosch, M. & Hayashi, Y. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 383–8 (2012).

214. Han, E. B. & Stevens, C. F. Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10817–22 (2009).
215. Zhang, J., Yang, Y., Li, H., Cao, J. & Xu, L. Amplitude/frequency of spontaneous mEPSC correlates to the degree of long-term depression in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res.* **1050**, 110–117 (2005).
216. Lu, W. *et al.* Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* **62**, 254–68 (2009).
217. Hayashi, Y. *et al.* Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **287**, 2262–7 (2000).
218. Dieterich, D. C. *et al.* Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat. Protoc.* **2**, 532–540 (2007).
219. Chao, H.-W. *et al.* Deletion of CPEB3 enhances hippocampus-dependent memory via increasing expressions of PSD95 and NMDA receptors. *J. Neurosci.* **33**, 17008–22 (2013).
220. Lu, W.-Y. *et al.* Activation of Synaptic NMDA Receptors Induces Membrane Insertion of New AMPA Receptors and LTP in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* **29**, 243–254 (2001).
221. Chen, P.-J. & Huang, Y.-S. CPEB2-eEF2 interaction impedes HIF-1 α RNA translation. *EMBO J.* **31**, 959–971 (2012).
222. Archangelo, L. F. *et al.* The CATS (FAM64A) protein is a substrate of the Kinase Interacting Stathmin (KIS). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 1269–1279 (2013).
223. Stephan, J. S. *et al.* The CPEB3 Protein Is a Functional Prion that Interacts with the Actin Cytoskeleton. *Cell Rep.* **11**, 1772–1785 (2015).
224. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–15 (2006).
225. Jiang, M. & Chen, G. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat. Protoc.* **1**, 695–700 (2006).
226. *Current Protocols in Molecular Biology.* (John Wiley & Sons, Inc., 2001). doi:10.1002/0471142727
227. Buxbaum, A. R., Wu, B. & Singer, R. H. Single β -actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* **343**, 419–22 (2014).
228. Landgraf, P., Antileo, E. R., Schuman, E. M. & Dieterich, D. C. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1266**, 199–215 (2015).

Annexos

Annex 1:

Ortiz, R.,* Georgieva, M.,* Gutierrez, S., Pedraza, N., Fernandez-Moya, S., Gallego, C. Recruitment of Stauf2 enhances dendritic localization of an intron-containing CaMKII α mRNA. *Cell Rep.* (In press).

Annex 2:

Pedraza, N.,* Ortiz, R.,* Cornadó, A., Llobet, A., Aldea, M., Gallego, C. KIS, a kinase associated with microtubule regulators, enhances translation of AMPA receptors and stimulates dendritic spine remodeling. *J Neurosci.* Oct 15;34(42):13988-97 (2014).