



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Funció del factor d'elongació eEF1A2 en plasticitat sinàptica

Jorge Gómez Miragaya

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# Funció del factor d'elongació eEF1A2 en plasticitat sinàptica

Sara Gutiérrez Fernández

2018



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Doctorat en Biomedicina

# Funció del factor d'elongació eEF1A2 en plasticitat sinàptica

Memòria presentada per Sara Gutiérrez Fernández per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Carme Gallego González (Directora)

Sara Gutiérrez Fernández (Doctorand)

Artur Llobet Berenguer (Tutor)

Sara Gutiérrez Fernández

2018



## Resum

La plasticitat sinàptica és la capacitat que té el sistema nerviós de canviar la seva estructura i funcionament al llarg del desenvolupament. En processos d'aprenentatge, es formen noves espines dendrítiques que permetran fer noves sinapsis, aquest procés rep el nom de plasticitat estructural, també s'ha descrit que es produeix un augment en la síntesi local de proteïnes a les espines. Els mRNAs que es transcriuen en el nucli viatgen silenciats en grànuls de mRNAs fins a arribar a les espines on es produeix una traducció local a les sinapsis. Tot i que la majoria dels estudis sobre el control de la traducció analitzen el paper regulador dels factors d'inici, actualment, hi han estudis que indiquen que els factors d'elongació també poden ser importants en la regulació de la traducció en neurones.

El nostre treball s'ha centrat en el factor d'elongació eEF1A, aquest factor presenta dues isoformes que són pràcticament idèntiques i que tenen expressió diferent en funció del teixit. La isoforma eEF1A1 s'expressa en tots els teixits de l'organisme exceptuant el cervell, cor i múscul esquelètic, on és reemplaçada totalment per la isoforma eEF1A2. Aquest factor a part de ser un regulador de la traducció també presenta altres funcions, una de les més estudiades ha estat la capacitat d'interacció amb el citoesquelet d'actina.

Aquesta tesi ha tingut com a objectiu general estudiar la relació entre la plasticitat estructural, on l'actina és un factor clau, i la traducció local en el context de la sinapsis. Concretament, ens hem centrat en la determinació de la rellevància funcional de la fosforilació del factor eEF1A2 en plasticitat sinàptica.

## Resumen

La plasticidad sináptica es la capacidad que tiene el sistema nervioso de cambiar su estructura y funcionamiento a lo largo del desarrollo. En procesos de aprendizaje, se forman nuevas espinas dendríticas que permitirán hacer nuevas sinapsis, este proceso recibe el nombre de plasticidad estructural, también se ha descrito que se produce un aumento en la síntesis local de proteínas en las espinas. Los mRNAs que se transcriben en el núcleo viajan silenciados en gránulos de mRNA hasta llegar a las espinas donde se produce una traducción local en las sinapsis. A pesar de que la mayoría de los estudios sobre el control de la traducción local analizan el papel regulador de los factores de inicio, actualmente, hay estudios que indican que los factores de elongación también pueden ser importantes en la regulación de la traducción en neuronas.

Nuestro trabajo se ha centrado en el factor de elongación eEF1A, este factor presenta dos isoformas que son prácticamente idénticas y que tienen expresión diferente en función del tejido. La isoforma eEF1A1 se expresa en todos los tejidos del organismo a excepción del cerebro, corazón y músculo esquelético, donde es remplazada totalmente por la isoforma eEF1A2. Este factor aparte de ser un regulador de la traducción también presenta otras funciones, una de las más estudiadas ha sido la capacidad de interacción con el citoesqueleto de actina.

Esta tesis ha tenido como objetivo general estudiar la relación entre la plasticidad estructural, donde la actina es un factor clave, y la traducción local en el contexto de la sinapsis. Concretamente, nos hemos centrado en la determinación de la relevancia funcional de la fosforilación del factor eEF1A2 en plasticidad sináptica.

## Summary

Synaptic plasticity is the ability the nervous system has to modify its structure and behavior throughout development. In learning processes, it is formed new dendritic spines that let do new synapses, this process is called structural plasticity, it is also described that there is an increment in protein local synthesis in the spines. mRNAs transcribed at the nuclei travel being silent in mRNAs granules until they arrive at the dendritic spines where it is produced local translation of these mRNAs in the synapsis. Despite the main local translation control studies examining the role of the initiator factor, nowadays, there are studies that show that elongation factors can be also important in translational regulation in neurons.

Our work is focused on the elongation factor eEF1A, this factor has two isoforms that are virtually identical and that have tissue dependent expression. eEF1A1 isoform is expressed in all the tissues but the brain, heart and skeletal muscle, where it is replaced by isoform eEF1A2. This factor apart from being a translational regulator it has other functions as well, one of the most studied has been the ability to interact with the actin cytoskeleton.

The general objective of this thesis is to study the relationship between structural plasticity, where actin is a key factor, and local translation in the synaptic context. Specifically, we have focused on determining the functional relevance of EF1A2 phosphorylation in synaptic plasticity.





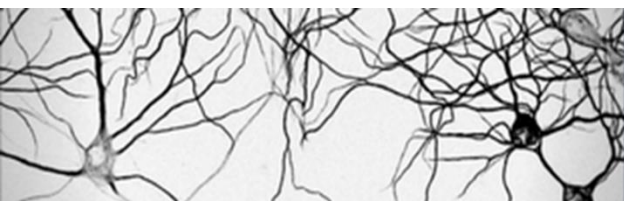
## CONTINGUTS

LLISTAT DE FIGURES I ABREVIATURES .....	13
Figures .....	15
Abreviatures .....	18
INTRODUCCIÓ .....	21
1. Plasticitat sinàptica .....	23
1.1 Plasticitat estructural .....	23
1.1.1 Procés de formació d'espines dendrítiques .....	24
1.1.2 Canvis estructurals a les espines dendrítiques en resposta a activitat sinàptica .....	25
1.1.3 Actina: principal component del citoesquelet de les espines dendrítiques .....	28
1.2 Traducció local de proteïnes en plasticitat sinàptica .....	29
1.2.1 Transport de grànuls de mRNAs a les dendrites .....	29
1.2.2 Mecanismes de traducció .....	31
1.2.3 Mecanismes de control traduccional .....	33
2. Funció del factor d'elongació eEF1A en plasticitat sinàptica .....	36
2.1 Estructura i isoformes del factor d'elongació eEF1A .....	36
2.2 Funció del factor d'elongació eEF1A en oncogènesis i malalties neurodegeneratives .....	39
2.3 El factor eEF1A i la plasticitat sinàptica .....	40
2.3.1 Evidències d'efectes del factor eEF1A sobre el citoesquelet d'actina .....	40
2.3.2 La fosforilació del factor eEF1A com a regulador de la traducció local .....	41
OBJECTIUS .....	43
RESULTATS .....	47
1. Determinació de les diferències en la seqüència d'aminoàcids de les isoformes eEF1A1 i eEF1A2 .....	49
2. Localització cel·lular dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 a la línia cel·lular HEK293T .....	50
3. Anàlisi de l'expressió i localització de la isoforma A2 en neurones .....	51
3.1 Determinació del patró d'expressió de la isoforma A2 <i>in vitro</i> .....	51
3.2 Anàlisi de la localització de la isoforma A2 en neurones d'hipocamp .....	51

4. Efecte dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 sobre el fenotip de la línia cel·lular HEK293T .....	53
5. Efecte dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 en el fenotip de cèl·lules d'hipocamp .....	54
5.1 Anàlisi de la formació i dinamisme dels fil·lopodis .....	54
5.2 Estudi del fenotip dels mutants de fosforilació del factor A2 en neurones madures .....	55
6. Anàlisi de la interacció amb actina dels mutants de fosforilació del factor A2 ....	57
7. Determinació de la formació de dímers dels mutants de fosforilació del factor A2 .....	58
8. Anàlisi de la capacitat de formar <i>bundles</i> d'actina pels mutants de fosforilació .	59
9. Determinació <i>in vivo</i> dels efectes de la fosforilació d'A2 sobre el citoesquelet d'actina .....	60
9.1 Anàlisi de la colocalització amb actina .....	60
9.2 Anàlisi del dinamisme de l'actina .....	63
10. Estudi dels efectes de la fosforilació d'A2 i la regulació de la traducció en diferents espècies .....	66
10.1 Traducció en llevat .....	66
10.1.1 Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids del factor d'elongació en llevat ..	66
10.1.2 Determinació del fenotip en llevat dels mutants de fosforilació .....	67
10.1.3 Anàlisi de la funció traduccional dels mutants de fosforilació .....	68
10.2 Traducció en cèl·lules de mamífer .....	69
10.2.1 Efectes de la fosforilació de la isoforma A2 sobre la interacció amb la proteïna de traducció EF1B .....	69
10.2.2 Anàlisi de la funció traduccional en HEK293T .....	70
10.2.3 Anàlisi de la funció traduccional reduint l'expressió de la proteïna endògena en cèl·lules N2A .....	71
11. Determinació de la fosforilació <i>in vivo</i> en neurones.....	72
12. Estudi dels efectes de la fosforilació d'A2 sobre la traducció en neurones .....	73
12.1 Determinació de la traducció dels mutants de fosforilació amb puromicina .....	73
12.2 Determinació de la traducció dels mutants de fosforilació amb AHA.....	74
DISCUSSIÓ .....	77
1. Importància de l'aparició de dues isoformes del factor eEF1A en l'evolució .....	79

2. La fosforilació del III domini de la isoforma A2 i la interacció amb el citoesquelet d'actina .....	80
3. Rellevància de la fosforilació del III domini de la isoforma A2 en el control traduccional .....	82
3. Model.....	85
CONCLUSIÓ .....	87
MATERIALS I MÈTODES .....	91
1. Cultius .....	93
1.1 Cultius primaris.....	93
1.2 Cultius de línies cel·lulars .....	95
2. Construcció de vectors .....	95
3. Transfeccions.....	98
3.1 Transfeccions de cèl·lules hipocampals .....	98
3.2 Transfecció de línies cel·lulars .....	98
4. Immunoprecipitació.....	98
5. Purificació de proteïnes .....	99
5.1 Purificació de proteïnes per plàsmids GST.....	99
5.2 Purificació de proteïnes per a plàsmids HIS .....	99
6. Obtenció de sinaptoneurosomes de cèl·lules corticals .....	100
7. Western Blot .....	100
8. Assajos d'interacció amb actina .....	102
8.1 Assajos d'unió (Binding) .....	102
8.2 Assajos de <i>bundling</i> .....	102
9. Phos-tag.....	103
10. Assajos d'anàlisi de proteïna de nova síntesis .....	104
10.1 Puromicina.....	104
10.2 AHA .....	104
10.3 Experiments d'incorporació de metionina en llevat .....	105
11. Microscopia .....	106
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>107</b>





## LLISTAT DE FIGURES I ABREVIATURES



## Figures

### Introducció

**Figura 1.** Resum dels diferents tipus de sinapsis

**Figura 2.** Diferents teories per explicar el procés de formació d'espines dendrítiques

**Figura 3.** Procés de formació d'espines dendrítiques segons el model fil·lopodial

**Figura 4.** Efecte de LTP i LTD sobre la plasticitat sinàptica

**Figura 5.** Dinamisme de les espines dendrítiques durant el desenvolupament neuronal

**Figura 6.** La plasticitat sinàptica en processos d'aprenentatge i memòria

**Figura 7.** L'actina és el principal component de les espines dendrítiques

**Figura 8.** Esquema de les diferents proteïnes d'unió a actina en espines

**Figura 9.** Traducció local de proteïnes a les espines dendrítiques

**Figura 10.** Representació del gradient de traducció de proteïna al llarg del desenvolupament

**Figura 11.** Formació del complex d'inici en eucariotes

**Figura 12.** Procés d'elongació de proteïnes en eucariotes

**Figura 13.** Vies de regulació de l'inici de la traducció

**Figura 14.** Efectes de la fosforilació d'eEF2 sobre la traducció local de proteïnes

**Figura 15.** Estructura del factor d'elongació eEF1A

**Figura 16.** Expressió diferencial de les dues isoformes del factor d'elongació eEF1A en diferents teixits

**Figura 17.** Comparació de la seqüència d'aminoàcids entre les dues isoformes humanes i el factor d'elongació en llevat

**Figura 18.** Hipòtesi d'interacció del factor d'elongació eEF1A amb el citoesquelet d'actina

### Resultats

**Figura 19.** Caracterització de les diferències d'aminoàcids fosforilables al III domini



- Figura 20.** Esquema dels principals cDNAs utilitzats durant la tesi
- Figura 21.** Determinació de la localització cel·lular dels mutants de fosforilació de la isoforma A2
- Figura 22.** Determinació de l'expressió de la isoforma A2 en el desenvolupament de neurones
- Figura 23.** Localització de la proteïna A2 en hipocamp
- Figura 24.** Identificació de la isoforma A2 en sinaptoneurosomes.
- Figura 25.** Anàlisi de la formació de fil·lopodis en la línia cel·lular HEK293T
- Figura 26.** Determinació de la formació de fil·lopodis en neurones d'hipocamp
- Figura 27.** Estudi dels efectes de la fosforilació de la isoforma A2 sobre el dinamisme de fil·lopodis
- Figura 28.** Estudi de la formació d'espines pels mutants de fosforilació en cèl·lules d'hipocamp
- Figura 29.** Anàlisi dels efectes dels mutants de fosforilació sobre la formació d'espines en cultius organotípics
- Figura 30.** Anàlisi de la interacció dels diferents mutants de fosforilació amb actina
- Figura 31.** Determinació de la formació de dímers dels mutants de fosforilació.
- Figura 32.** Anàlisi de la formació d'agregats per microscopia
- Figura 33.** Assaig de cosedimentació d'actina amb els mutants de fosforilació d'A2
- Figura 34.** Representació esquemàtica dels efectes de la fosforilació del factor A2 sobre la interacció amb actina
- Figura 35.** Colocalització dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 amb el citoesquelet d'actina
- Figura 36.** Anàlisi de la senyal de LifeAct a les dendrites
- Figura 37.** Colocalització del III domini dels mutants de fosforilació d'A2 amb la f-actina
- Figura 38.** Determinació del dinamisme d'actina per píxel
- Figura 39.** Determinació del dinamisme dels mutants de fosforilació per píxel

**Figura 40.** Anàlisi de l'aparició de noves serines a la isoforma A2 en diferents espècies

**Figura 41.** Estudi de l'efecte de les mutacions S356A i S356E en llevat

**Figura 42.** Efecte de les mutacions S356A i S356E sobre la traducció de proteïnes

**Figura 43.** Determinació de la interacció dels diferents mutants de fosforilació d'A2 amb la proteïna eEF1B

**Figura 44.** Quantificació de la incorporació de puromicina en els diferents mutants. de fosforilació

**Figura 45.** Quantificació de l'expressió de la isoforma A2 en la línia estable N2A shA2

**Figura 46.** Determinació de la incorporació de puromicina en la línia estable N2A shA2

**Figura 47.** Determinació de la fosforilació endògena del factor d'elongació A2 en cèl·lules corticals

**Figura 48.** Determinació de la incorporació de puromicina en neurones d'hipocamp

**Figura 49.** Estudi de la incorporació d'AHA en neurones d'hipocamp

#### Discussió

**Figura 50.** La regulació a l'inici o l'elongació determina la traducció de poblacions de mRNAs específics

**Figura 51.** Model: Efecte de les fosforilacions del factor A2 sobre la plasticitat sinàptica

#### Materials i mètodes

**Figura 52.** Descripció del procés de separació dels dos hemisferis del cervell

**Figura 53.** Descripció del procés de dissecció d'hipocamps

**Figura 54.** Resum del mecanisme d'incorporació d'AHA a les proteïnes.

## Abreviatures

**ABPs:** Proteïnes d'unió a actina (*Actin Binding protein*)

**AHA:** L-azidohomoalaina

**ALS:** Esclerosi lateral amiotròfia

**AMPA:** Receptor de l'àcid  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiònic

**BDNF:** Factor neurotròfic derivat del cervell (*Brain-derived neurotrophic factor*)

**CPE:** Elements de poliadenilació citoplasmàtic (*Cytoplasmic polyadenylation elements*)

**CPEB:** Proteïnes d'unió a elements de poliadenilació citoplasmàtic (*Cytoplasmic polyadenylation element binding protein*)

**CTA:** Aversió al gust condicionat (*conditioned taste aversion*)

**DHPG:** (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycina

**DIVs:** Dies in vitro (*Days in vitro*)

**F-actina:** Actina filamentosa

**G-actina:** Actina globular

**GEF:** Factor intercanviador de guanina (*Guanine nucleotide exchange factor*)

**IP:** Immunoprecipitació

**LTD:** Depressió a llarg termini (*Long term depression*)

**LTM:** Memòria a llarg termini (*Long term memory*)

**LTP:** Potenciació a llarg termini (*Long term potentiation*)

**NMDA:** Receptor de N-metil-D-aspartat

**NSPs:** Polipèptids sintetitzats de nou (*Newly synthesized polypeptides*)

**PABP:** Proteïna d'unió a poly(A) (*poly(A)-binding protein*)

**PFA:** Paraformaldehid

**RNP:** Ribonucleoproteïc

**STM:** Memòria a curt termini (*Short term memory*)

**SYN:** Sinaptoneurosomes

**TGF- $\beta$ :** Factor de creixement transformant beta (*Transforming growth factor beta*)

**T $\beta$ R-I i T $\beta$ R-II:** Receptors transmembrana TGF- $\beta$  tipus I i II

**TTX:** Tetradoxina

**WB:** Western Blot

**WT:** *Wild type*

#### Principals proteïnes mencionades a la tesi

##### **Actina**

**eEF1A1:** Elongation factor 1 alpha isoform 1

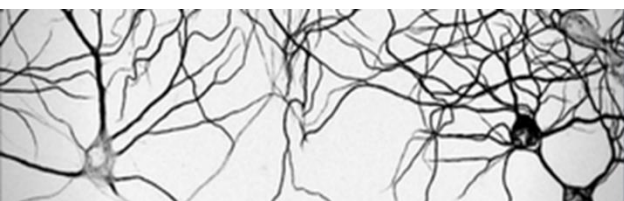
**eEF1A2:** Elongation factor 1A isoform 2

**eEF2:** Elongation factor 2

**eEF1B:** Elongation factor 1 beta

**TEF1:** Translation elongation factor 1 alpha-sub





## INTRODUCCIÓ



## 1. Plasticitat sinàptica

El cervell humà està format per milions de neurones interconnectades en circuits neuronals que donen lloc a tots els nostres pensaments, emocions, somnis i records. Una de les característiques més importants del cervell és la seva propietat plàstica que li permet modificar el nostre comportament en funció de canvis a l'ambient, ja que té la capacitat d'aprendre i recordar situacions viscudes.

Durant l'aprenentatge i en la formació de noves memòries es donen modificacions en les connexions entre neurones (sinapsis). Aquests canvis que es produeixen a les connexions neuronals es coneixen amb el nom de **plasticitat sinàptica**. Santiago Ramon i Cajal ja va utilitzar el terme de plasticitat, en observar que existien canvis no patològics a l'estructura del cervell adult [1]. La plasticitat sinàptica no solament genera canvis morfològics (**plasticitat estructural**) en determinades àrees del cervell, a causa d'alteracions a les connexions neuronals, sinó que també es donen canvis neuroquímics a la cèl·lula com els produïts per la **traducció local de proteïnes** a les espines [2].

### 1.1 Plasticitat estructural

La comunitat científica havia assumit durant molts anys que el sistema nerviós central dels mamífers es mantenia estable després del naixement. Descobriments com el de la neurogènesi en adult del 1960 havien estat pràcticament ignorats [3]. Tanmateix, a l'actualitat s'ha acceptat que es donen processos de neurogènesi [4] així com modificacions estructurals a les neurones adultes existents. La plasticitat estructural pot donar lloc a canvis que afecten a les connexions entre les neurones o **sinapsis**. Aquestes, es componen per un terminal presinàptic i un postsinàptic. El procés bàsic de comunicació entre neurones consisteix en l'arribada d'una senyal elèctrica (potencial d'acció) a l'element presinàptic la qual provoca l'exocitosi de vesícules a l'espai sinàptic. Aquestes vesícules contenen neurotransmissors que arribaran al terminal postsinàptic on seran reconegudes per receptors de membrana. Aquesta unió al receptor desencadenarà una cascada de senyalització en el terminal postsinàptic [5]. Cada neurona rep informació d'aproximadament 10.000 sinapsis i n'envia a més de 1000. Tot i que hi ha diferents tipus de sinapsis, la més habitual és l'axo-espínosa que es dona entre un axó (presinàptic) i una espina dendrítica (postsinàptic) (**figura 1**) [6].



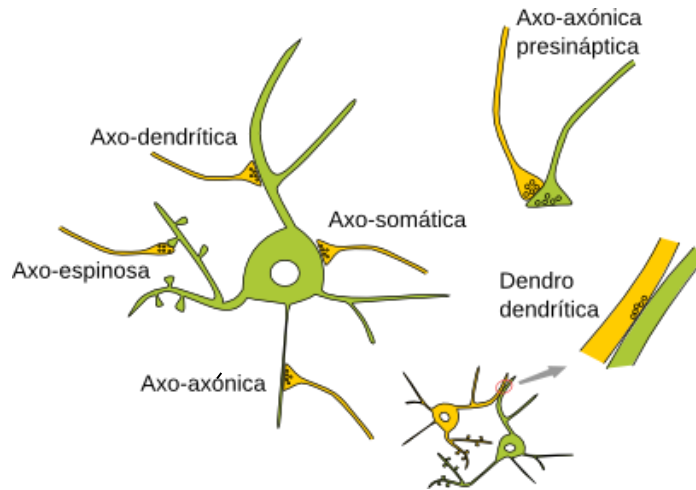


Figura 1. Resum dels diferents tipus de sinapsis [6].

### 1.1.1 Procés de formació d'espines dendrítiques

Les espines dendrítiques són petites protuberàncies que apareixen a la dendrita, se les considera responsables de les principals connexions neuronals. El seu nombre i forma es veuen afectats en processos d'aprenentatge i memòria [7]. Santiago Ramon i Cajal va ser el primer que va descriure les espines dendrítiques: *“En mi sentir, las espinas tienen por principal oficio aumentar las superficies de conexión de la arborización protoplásmica, saliendo al encuentro de las fibras nerviosas que, por hallarse a cierta distancia, no pueden establecer contacto directo con el contorno de las prolongaciones dendríticas”*[8].

En els estadis inicials del desenvolupament les neurones creixen sense espines ni sinapsis, és amb el temps quan comencen a aparèixer les primeres espines. Existeixen diferents teories de formació d'espines [9]. El model de Sotelo proposa que inicialment es formen unes espines immadures que al entrar en contacte amb un axó poden madurar i créixer [10]. El model de Miller i Peters considera que és primer l'axó el que ha d'entrar en contacte amb la dendrita i és a causa d'aquesta interacció que es produeix l'espino-genèsi [11]. Finalment, el model fil·lopodial afirma que inicialment es formen unes protuberàncies en forma de fil·lopodis i, aquests, en trobar-se amb un axó s'estabilitzen i formen noves espines (**figura 2**) [12].

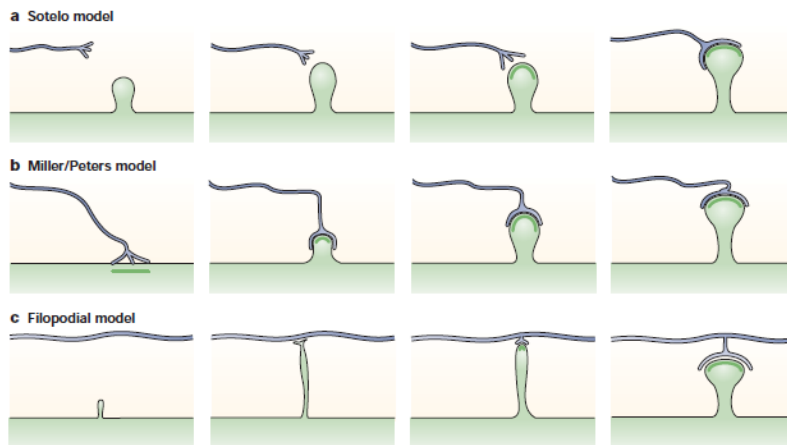


Figura 2. Diferents teories per explicar el procés de formació d'espines dendrítiques [9].

Aquesta última teoria (model fil-lopodial) és una de les més recolzades actualment (**figura 3**) [13]. Es proposa que el fil-lopodí, que és una estructura molt dinàmica, està en continu moviment fins que entra en contacte amb un axó. És en aquests moments que el fil-lopodí s'estabilitza i modificarà la seva estructura per donar lloc a una espina.

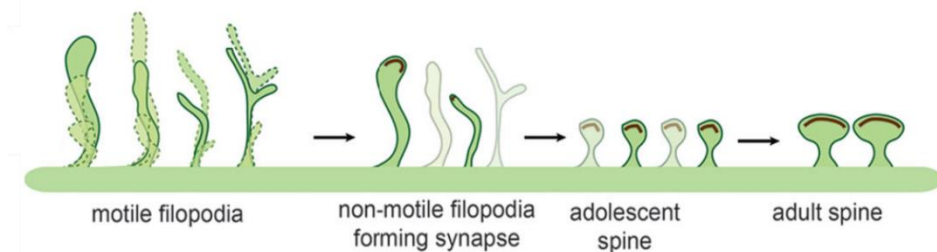


Figura 3. Procés de formació d'espines dendrítiques segons el model fil-lopodial (figura modificada [14]).

No obstant, l'espina dendrítica no és un element fixe atès que la seva estructura també pot canviar en resposta a activitat sinàptica [7].

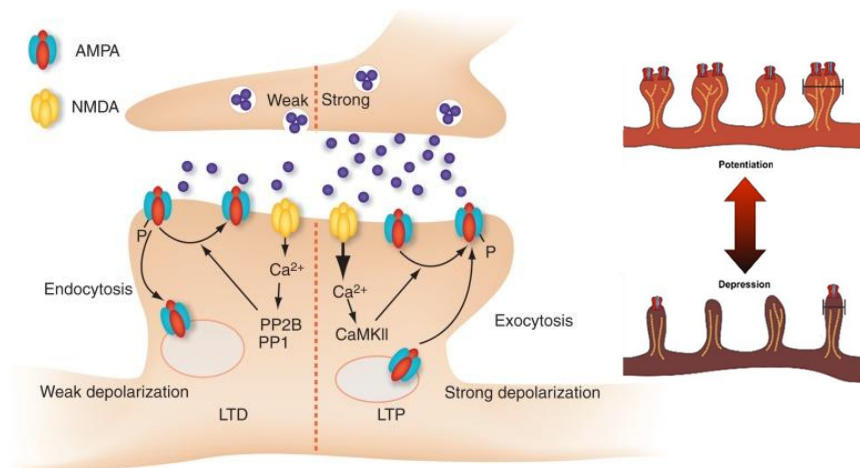
### 1.1.2 Canvis estructurals a les espines dendrítiques en resposta a activitat sinàptica

Les espines són les principals responsables de la comunicació entre neurones. L'activitat neuronal es troba constantment regulada per canvis en el voltatge de la

cèl·lula. Modificacions en el nombre de canals de calci i receptors localitzats a la membrana de les espines afectarà a la propagació i activitat neuronal [15].

Les transmissions intenses i persistents entre neurones enforteixen les connexions sinàptiques i reben el nom de potenciació a llarg termini (*Long term potentiation* LTP). Les estimulacions febles per contra debiliten les connexions, és el cas de la depressió a llarg termini (*Long term depression* LTD).

La potenciació a llarg termini és una forma de plasticitat que depèn d'activitat, es genera un augment persistent de la transmissió sinàptica que acaba promovent el creixement d'espines. El procés contrari de depressió a llarg termini (LTD) desencadena en l'eliminació de l'espina. Els dos són processos subjacents a l'aprenentatge i la memòria [16]. En ambdós fenòmens es produeix una redistribució dels receptors de glutamat tipus AMPA. Augmenten el nombre de receptors en LTP per contra, s'internalitzen en LTD per tal de debilitar la sinapsis (**figura 4**).



**Figura 4.** Efecte de LTP i LTD sobre la plasticitat sinàptica [17], [18]

L'activitat feble de la neurona (presinàptic) condueix a una despolarització modesta i a l'influx de calci a través dels receptors NMDA. Això activa preferentment fosfatases que desfosforilen els receptors AMPA, promovent així la seva internalització per endocitosis. Per contra, l'activitat forta està associada amb una major despolarització que desencadena LTP i es produeix una exocitosis de receptors. Tots dos processos requereixen de síntesi local de proteïnes.

Estudis *in vivo* mostren que constantment es formen i s'eliminen espines [19]. Aquest dinamisme es dóna sobretot en neurones joves i va disminuint al llarg del temps (**figura 5**).

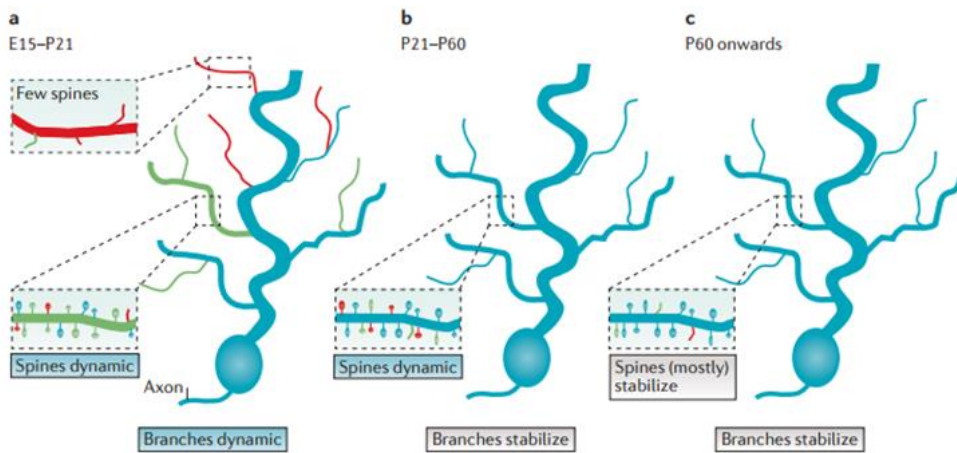


Figura 5. Dinamisme de les espines dendrítiques durant el desenvolupament neuronal [20].

**a.** En el desenvolupament temprà del ratolí embrionari a dia 15 (E15) a postnatal dia 21 (P21) es creen (en verd) i desapareixen dendrites (en vermell). Les dendrites que no formen contactes productius (en vermell) presenten menys espines i es retrauen. Contràriament, a les dendrites més estables (en verd) hi ha aparició i eliminació d'espines. **b.** Durant l'adolescència p21-p26 les dendrites s'estabilitzen i les espines dendrítiques continuen essent molt dinàmiques. **c.** Quan l'animal entra a l'edat adulta la majoria de les espines romanen estables i el dinamisme disminueix.

Aquest mecanisme de formació i eliminació d'espines es veu incrementat durant l'aprenentatge (**figura 6**) on aquelles sinapsis que són necessàries per mantenir una connexió funcional important s'estabilitzaran (cercle vermell), essent aquestes les que es creu que poden tenir un paper important en la memòria.

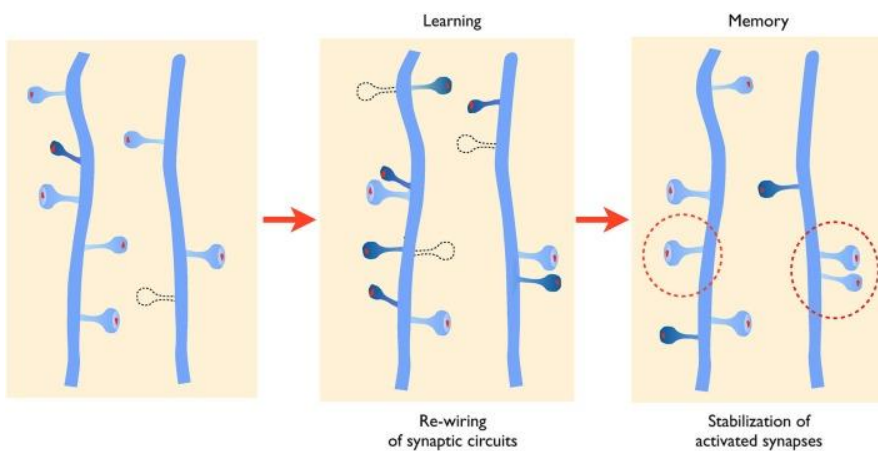


Figura 6. La plasticitat sinàptica en processos d'aprenentatge i memòria [19].

La plasticitat estructural implica una reorganització de les connexions neuronals en resposta a activitat. Els canvis estructurals que es donen a les espines són produïts principalment per remodelacions en el citoesquelet d'actina.

### 1.1.3 Actina: principal component del citoesquelet de les espines dendrítiques

L'actina és el principal component del citoesquelet de fil·lopodis i espines (figura 7). Estudis previs demostren que la reordenació de l'actina pot conduir a la formació o la pèrdua d'espines dendrítiques així com afectar a la seva plasticitat morfològica incloent la forma, el nombre i la mobilitat [21].

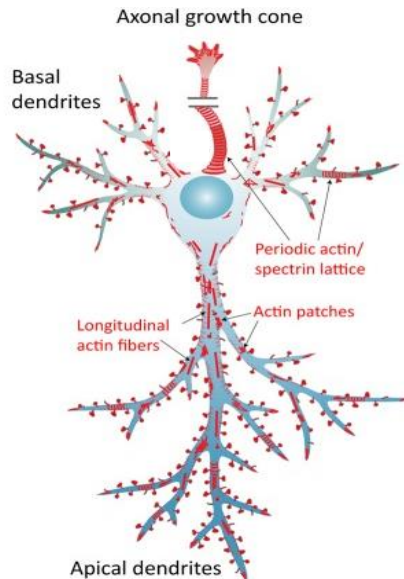


Figura 7. L'actina és el principal component de les espines dendrítiques [22].

Representació de l'acumulació de F-actina (actina filamentosa) en els diferents compartiments de la neurona.

L'actina existeix en dos estats a la neurona: com a globular o actina monomèrica (G-actina) i com a actina filamentosa (F-actina), que és el resultat de la polimerització de la G-actina. La nucleació és el procés pel qual es creen nous filaments d'actina i és un requisit previ per a la posterior polimerització del filament. Per tal de que es produeixi la nucleació s'han d'associar tres monòmers de G-actina per generar un nucli de filament amb extrems que poden allargar-se [23]. Els trímers d'actina són inestables en condicions fisiològiques no obstant, existeixen proteïnes d'unió a actina (ABPs) que les estableixen (figura 8). Algunes d'aquestes proteïnes participen en la nucleació de l'actina com és el cas de la Formina, polimerització com la Profilina o despolimerització com la Cofilina i Gelsolina. Altres grups de proteïnes d'unió a actina no afecten a la

polimerització d'aquesta directament, però poden per exemple establir els filaments d'actina unint-se als seus extrems i prevenint la pèrdua de G-actina en aquests punts. Finalment, existeixen altres proteïnes d'unió a actina, com la  $\alpha$ -Actinina, que uneixen diferents filaments d'actina i generen uns estructures de feixos de filaments (*bundles o crosslinking actin filaments*) [24].

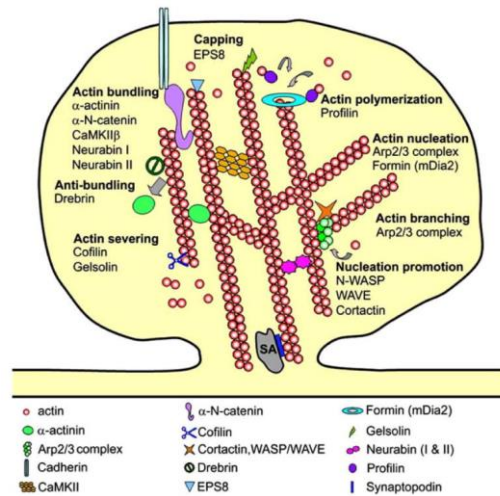


Figura 8. Esquema de les diferents proteïnes d'unió a actina en espines [24].

Així doncs, la **plasticitat estructural** implica una reorganització ràpida i persistent del citoesquelet d'actina a les espines. L'actina no solament dóna estructura a la sinapsi sinó que també és la responsable del correcte ancoratge dels receptors postsinàptics i la localització de la maquinaria de traducció [21].

## 1.2 Traducció local de proteïnes en plasticitat sinàptica

### 1.2.1 Transport de grànuls de mRNAs a les dendrites

La neurobiologia de l'aprenentatge postula que la **síntesis local de proteïnes** a la sinapsi determinarà si un aprenentatge serà transitori o quedarà permanentment emmagatzemat al cervell. La memòria a curt termini (*Short term memory STM*) que dura entre segons i minuts no requereix de nova síntesi de proteïna per contra, si que és necessària en la memòria a llarg termini (*Long term memory LTM*) que pot durar hores, dies, anys o tota una vida [25].

La identificació de poliribosomes en la base de les espines [26] va proporcionar la primera evidència de síntesi local de proteïnes en axons i dendrites. Estudis posteriors van demostrar que existien un subconjunt específic de mRNAs que es localitzaven a les

sinapsis [27] i vinculaven directament la plasticitat sinàptica amb la traducció local a les dendrites [28].

Aquest descobriment va ser molt important ja que el **dogma central de la biologia** s'havia descentralitzat demostrant que els mRNAs poden viatjar grans distàncies de forma silenciada en grànuls de mRNA i, en arribar a l'espina i en resposta a estimulacions, es tradueixen (**figura 9**) [29].

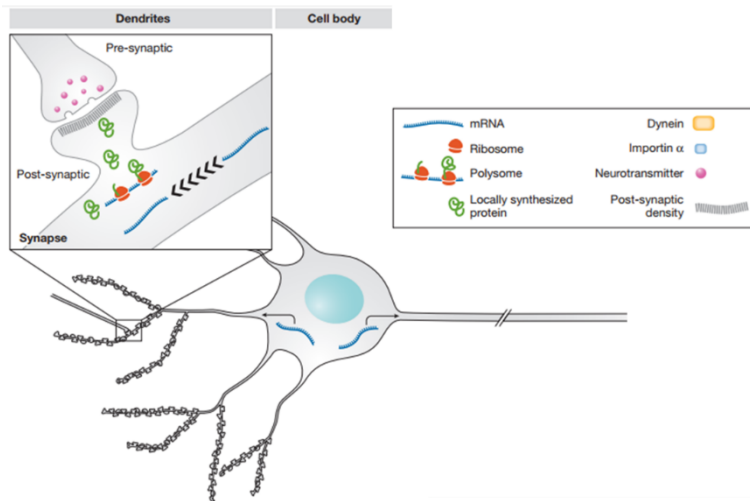


Figura 9. Traducció local de proteïnes a les espines dendrítiques (figura modificada [30]).

La traducció local de proteïnes permet donar una resposta de màxima precisió atès que la traducció es dona únicament en el lloc i en el moment que es necessita. Evitant, d'aquesta manera, el temps d'espera a que una proteïna traduïda al citosol sigui transportada a les sinapsis [31]. Això és realment important en cèl·lules tan polaritzades com les neurones on hi ha grans distàncies entre el soma i les espines dendrítiques.

A priori, pot semblar que la traducció local és insignificant respecte a la que es produeix en el soma, ja que es dona en compartiments molt petits com són les espines dendrítiques. Tanmateix, convé subratllar que hi han milers de sinapsis i, per tant, l'efecte que poden tenir sobre la traducció general pot arribar a ser més important que la pròpia traducció del soma (**figura 10**) [32].

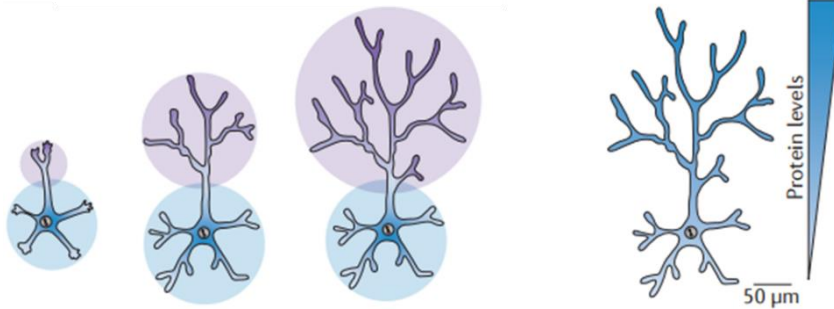


Figura 10. Representació del gradient de traducció de proteïna al llarg del desenvolupament [32].

Els cercles blaus simulen la traducció de proteïnes en el soma. Els cercles liles representen la síntesi local de proteïnes fora del soma.

### 1.2.2 Mecanismes de traducció

El procés de síntesis de proteïnes està dividit en tres fases: **inici**, **elongació** i **terminació**. En cada fase es requereix l'acció no solament del ribosoma, el mRNA i el tRNA sinó també d'una sèrie de proteïnes que facilitaran cada una de les etapes [33].

El procés d'inici de la traducció comença amb la formació del complex de preinici 43S, que consisteix en la subunitat petita del ribosoma 40S i el complex ternari; aquest, està format per Met-tRNA i el factor d'inici **eIF2** unit a GTP. Amb l'ajut del factor d'inici **eIF3**, la proteïna **PABP** (*poly(A)-binding protein*) i el factor d'inici **eIF4F** (format per eIF4G, eIF4A, eIF4E), el 43S preiniciat s'unirà a la posició 5' del mRNA formant la subunitat del complex de preinici 48S (**figura 11**).

Un cop unit, el complex preiniciador 48S escanejarà al llarg del mRNA fins trobar el codó d'inici AUG. En aquest moment es dissocien els factors d'inici i s'uneix la subunitat ribosomal 60S, formant el ribosoma competent per a la traducció 80S. Finalment, amb l'ajuda del factor **eIF5** comença l'elongació [34].



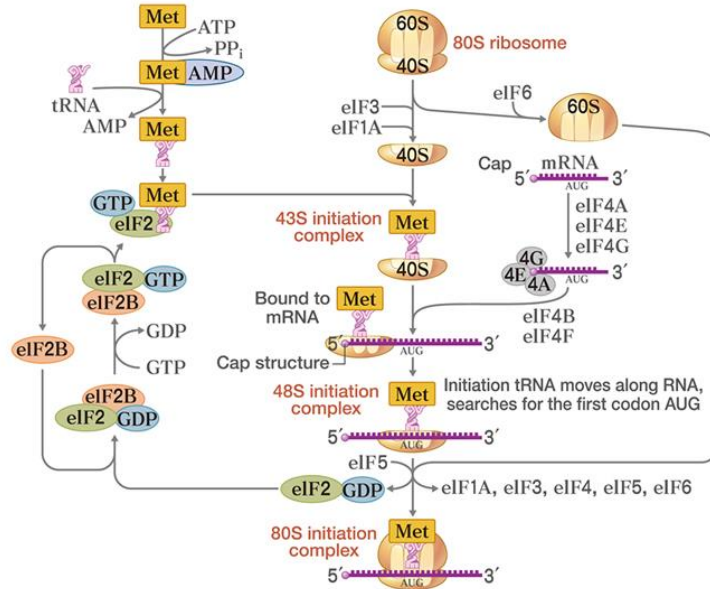


Figura 11. Formació del complex d'inici en eucariotes [35].

El mecanisme d'elongació en cèl·lules procariotes i eucariotes és molt similar. El ribosoma té tres llocs d'unió al tRNA denominats P (Peptidil), A (Aminoacil) i E (Alliberació). El metionil tRNA iniciador s'uneix al lloc P de manera que la primera etapa de l'elongació és la unió del següent aminoacil tRNA al lloc A. El aminoacil tRNA es transporta i guia cap al ribosoma pel factor d'elongació **eEF1A** unit a GTP. La inserció del tRNA correcte en el domini A produeix un canvi conformacional que indueix la hidròlisi del GTP unit al factor d'elongació i la seva alliberació del ribosoma, podent així interaccionar amb un altre tRNA i duent a terme el procés d'elongació de proteïnes. Es forma un enllaç peptídic entre els aminoàcids i es transloca el ribosoma. Per a la translocació és necessari el factor **eEF2**. En aquest procés el ribosoma torna a deixar lliure el lloc A. El procés d'elongació ha de continuar de manera que el factor eEF1A unit a GDP s'ha de convertir de nou en la forma activa unida a GTP. Aquesta conversió requereix de la participació d'un tercer factor d'elongació, la proteïna GEF **eEF1B** (*Guanine Nucleotide Exchange factor*) que promou la substitució de GDP a GTP permetent així que el factor eEF1A pugui interaccionar amb un altre tRNA per transportar-lo de nou al ribosoma (**figura 12**) [36],[37].

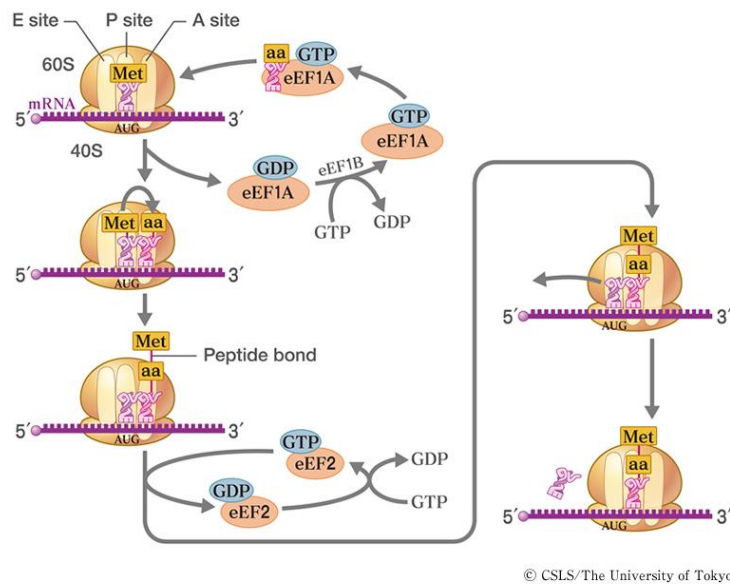


Figura 12. Procés d'elongació de proteïnes en eucariotes [23].

Finalment, durant la terminació, el factor **eRF1** reconeix el codó de *stop* i catalitza el final de la traducció unint-se al ribosoma en lloc del tRNA. Aquest fet juntament amb l'ajut del factor **eRF3** provoquen l'alliberació de la cadena peptídica [22].

### 1.2.3 Mecanismes de control traduccional

La regulació de la traducció pot ocórrer en qualsevol d'aquest tres passos esmentats anteriorment (inici, elongació, terminació) tanmateix, l'inici sol ser un pas limitant i sovint l'objectiu principal de regulació (**figura 13**).

#### -Regulació de l'inici

**-Regulació del factor d'inici eIF2 $\alpha$ :** El factor eIF2, com altres proteïnes d'unió a GTP, alterna el seu estat d'unit a GTP a unit a GDP. La hidròlisi del GTP es dona gràcies a la proteïna GEF del factor eIF2 (eIF2b), i es produeix quan l'iniciador AUG s'uneix al ribosoma. La fosforilació de la subunitat  $\alpha$  del factor d'inici eIF2 a la Serina 51 bloqueja l'activitat del factor eIF2b produint una disminució de la traducció global de proteïnes [39]. Estímuls com el BDNF redueixen la fosforilació d'aquest factor d'inici (**figura 13a**) [40].

**-Regulació de la traducció via mTORC1:** mTORC1 controla la traducció mitjançant la regulació de la fosforilació d'efectors que es troben *downstream* com per exemple, les proteïnes d'unió a eIF4E (4E-BP) i la quinasa S6K (**figura 13b**).

El procés més caracteritzat en el control de traducció per mTORC1 ha estat el control de la formació del complex eIF4F via fosforilació de 4E-BP. Les proteïnes 4E-BP (4E-BP 1,2 i 3) tenen un pes molecular petit i competeixen amb el factor d'inici eIF4G per la unió d'eIF4E. La fosforilació del factor 4E-BP via mTORC es dona primerament en la Treonina 37 i la 46 que donen lloc a la subseqüent fosforilació de la Serina 65 i la 70. Com a conseqüència, aquesta fosforilació del factor 4E-BP li impedeix la seva unió amb el factor eIF4E, permetent que aquest es pugui unir amb eIF4F i continuar amb el procés de traducció [34].

mTORC1 també pot regular la traducció a través de la fosforilació de la quinasa S6 (S6K). La S6K fosforila el factor d'inici eIF4B (un cofactor de eIF4A), la S6K també pot regular l'elongació ja que pot fosforilar a la quinasa EF2K i, aquesta al seu torn, fosforilarà el factor d'elongació eEF2 provocant una disminució de la traducció [41].

**-Regulació de traducció a través de CPEB:** La proteïna CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) regula la traducció de certs mRNAs que contenen elements CPE (*cytoplasmic polyadenylation elements*) en el seu extrem 3' UTR [42]. Els vertebrats tenen quatre tipus de CPEB: CPEB1–CPEB4. La proteïna CPEB1 es localitza a les dendrites de les neurones de mamífers on regula la traducció juntament amb altres proteïnes com són: *poly(A) polymerase*, la Gld2 i la proteïna deadenilasa PARN.

La fosforilació de CPEB permet l'alliberació de PARN del complex de RNP (ribonucleoproteïc). Com a conseqüència la cua *poly(A)* és elongada per la proteïna Gld2 permetent la unió de la proteïna PABP, aquesta ajudarà al reclutament del complex eIF4F al extrem 5' del mRNA promovent la traducció (**figura 13c**) [43].

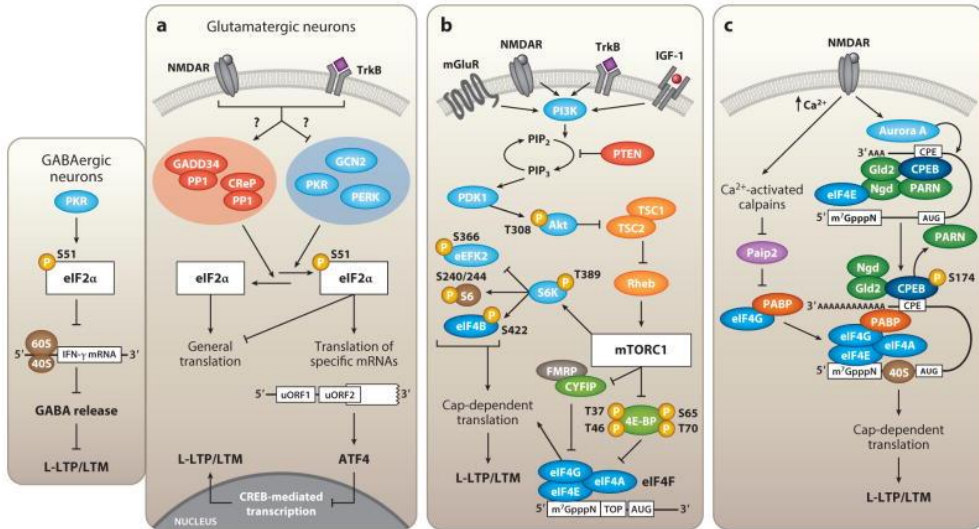


Figura 13. Vies de regulació de l'inici de la traducció [34].

A. Regulació de la traducció via fosforilació del factor d'inici eIF2. B. Regulació de la traducció per mTORC1. C. CPEB com a regulador traduccional.

### -Regulació de l'elongació

**-Regulació del factor d'elongació eEF2:** El factor eEF2, com s'ha detallat anteriorment, és el que s'encarrega de la translocació del ribosoma. Estudis previs han demostrat que la quinasa que el fosforila és la EF2K també anomenada CamKIII. Aquesta quinasa s'activa en dendrites per diferents estímuls entre ells el glutamat. S'ha vist que l'activitat de la quinasa eEF2K i la traducció dels mRNAs correlacionen negativament. És a dir, quan eEF2K és activada, aquesta fosforila al factor eEF2 a la Treonina 56 i això provoca una disminució de la traducció global de proteïnes [44].

Altres estudis sobre la fosforilació del factor eEF2 mostren el seu paper en LTD. En aquestes condicions, la quinasa EF2K és activa i fosforila a eEF2. Quan eEF2 està fosforilat atura la traducció general de proteïnes no obstant, alguns mRNAs específics si que es poden traduir; és el cas d'Arc que és una proteïna que s'encarrega de l'endocitosis de receptors postsinàptics AMPA. Això té un sentit perquè quan és necessari eliminar una sinapsis és important disminuir la traducció local de proteïnes però també augmentar la síntesis d'algunes proteïnes que ajudin a l'eliminació de la pròpia sinapsis (figura 14) [44].

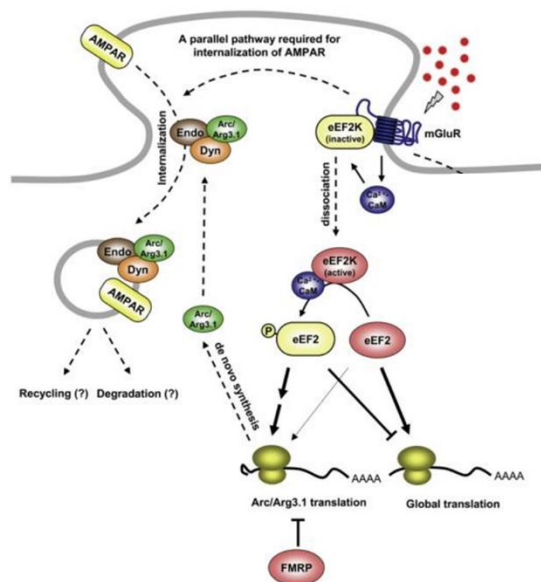


Figura 14. Efectes de la fosforilació d'eEF2 sobre la traducció local de proteïnes [44].

Quan el factor eEF2 és fosforilat es produeix una inhibició de la síntesi local de proteïnes en la sinapsis. Tanmateix, alguns mRNAs específics es continuaran traduïnt.

## 2. Funció del factor d'elongació eEF1A en plasticitat sinàptica

Tot i que, com s'ha comentat anteriorment, la fase que ha estat més estudiada en el control traduccional és l'inici, es comencen a tenir dades que mostren que en la sinapsis molts dels mRNAs que viatgen en grànuls a les dendrites estan silenciats i aturats a l'elongació [45]. D'entre tots els factors d'elongació el més estudiat en la regulació de la traducció local ha estat el factor eEF2. No obstant, convé destacar que el factor eEF1A és el més abundant a la cèl·lula, essent la segona proteïna més abundant després de l'actina [46] i no es tenen dades de la seva regulació.

### 2.1 Estructura i isoformes del factor d'elongació eEF1A

Una de les principals característiques d'aquest factor és que pot realitzar diferents funcions atès que està implicat en el procés d'elongació de proteïnes (funció canònica del factor) així com en moltes altres funcions (funcions no canòniques). Referent a les activitats no canòniques del factor es troben funcions de transport nuclear, apoptosi i la interacció amb el citoesquelet d'actina [47].

El factor eEF1A està format per tres dominis: el domini I i II estan relacionats amb la seva funció canònica pel fet que són els responsables de la interacció amb el GTP i amb el tRNA, respectivament [36],[48]. Per contra, el domini III se l'ha relacionat amb les funcions no canòniques, sobretot ha estat molt descrita la seva capacitat d'unió a actina (figura 15) [36].

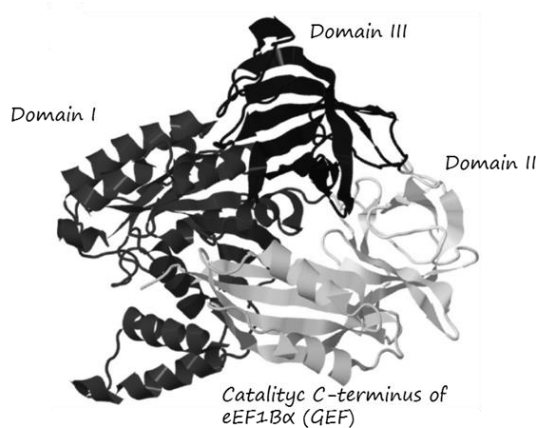


Figura 15. Estructura del factor d'elongació eEF1A.

És degut a aquestes implicacions tant en la traducció com en la interacció amb el citoesquelet d'actina que fa que aquest factor d'elongació pugui ser rellevant en la **plasticitat sinàptica**, considerant que podria participar tant en la plasticitat estructural com en la regulació local de la síntesi de proteïnes.

Una altra propietat particular d'aquesta proteïna és que tot i que els factors de traducció són molt conservats degut al seu rol fonamental, el factor d'elongació eEF1A presenta dues isoformes (eEF1A1 i eEF1A2). La isoforma eEF1A2 apareix en mamífers, essent el seu patró d'expressió diferent en funció del tipus de teixit [46]. El factor eEF1A1 s'expressa en tots els teixits de l'organisme, per contra el factor eEF1A2 es troba bàsicament en cervell, cor i múscul esquelètic [46],[49]. El més característic és que en aquests tres teixits en les primeres fases del desenvolupament (a nivell embrionari) s'expressa la isoforma eEF1A1 però a mesura que es va desenvolupant l'organisme (postnatal) acaba essent reemplaçada totalment per la isoforma eEF1A2 (figura 16). Aquest fet és molt significatiu considerant que ambdues són pràcticament idèntiques (92% similitud de seqüència) [49].

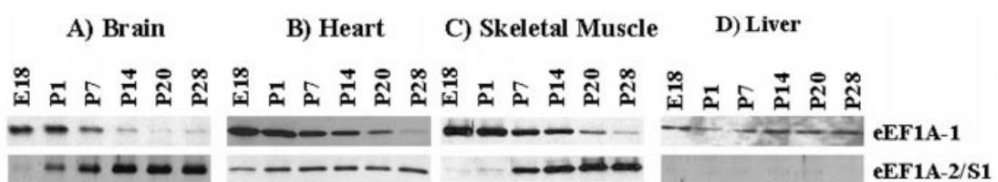


Figura 16. Expressió diferencial de les dues isoformes del factor d'elongació eEF1A en diferents teixits [49].

Expressió al llarg del temps de les dues isoformes del factor eEF1A des d'etapes embrionàries (E) a postnatal (P).

Al 1972 es van descriure uns ratolins que no expressaven la isoforma eEF1A2 [50] els quals es coneixen amb el nom de ratolins atrofiats (*Wasted mouse*). Presenten una deleció de 15.8 kb que anul·la l'expressió del gen que codifica pel factor d'elongació eEF1A2 [51]. Es caracteritzen per una pèrdua de pes, tremolors, anomalies en la marxa, atrofia a la melsa i al timus. Tots aquests efectes apareixen després del deslletament generalment als 21 dies i moren als 28 [52]. A nivell microscòpic, el principal canvi que s'observa és en la medul·la espinal, el fenotip és similar al de l'esclerosi lateral amiotròfia (ALS), presenten transmissions sinàptiques dèbils a nivell toràcic als 23 dies i lumbar als 25 dies [53]. Aquests ratolins han ajudat a descriure l'efecte que té la deleció de la isoforma eEF1A2 a nivell neuronal [51]. No obstant, fins el dia d'avui encara es desconeix el significat biològic de l'aparició en vertebrats de les dues isoformes. Si es comparen les seqüències d'aminoàcids, s'observen pocs canvis, entre ells, es donen 11 entre serines o treonines (aminoàcids que poden veure's afectats en processos de fosforilació) (**figura 17**).

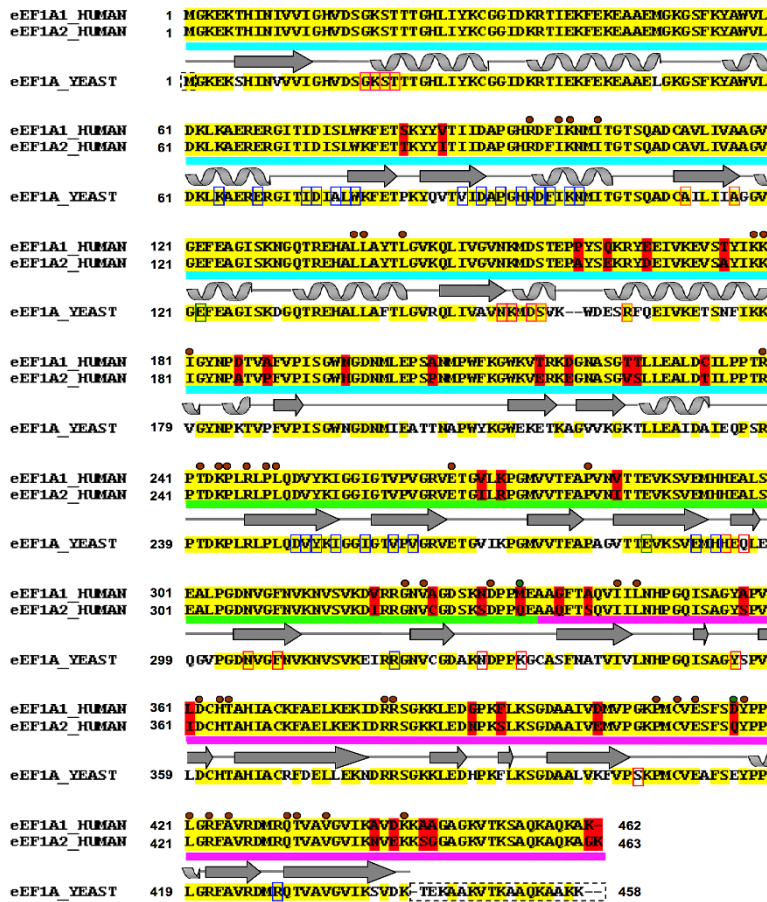


Figura 17. Comparació de la seqüència d'aminoàcids entre les dues isoformes humanes i el factor d'elongació en llevat [54].

En groc estan marcats els aminoàcids que són iguals entre isoformes, en vermell s'indiquen els canvis. Els dominis de la proteïna estan en: blau (domini I), verd (domini II) i rosa (domini III). Imatge ampliada a material suplementari (S1).

## 2.2 Funció del factor d'elongació eEF1A en oncogènesis i malalties neurodegeneratives

Ambdues isoformes es veuen sobreexpressades en certs tumors, tot i que la isoforma eEF1A2 és la que ha estat més estudiada. S'ha vist que la sobreexpressió del factor d'elongació eEF1A2 pot tenir múltiples efectes biològics dependent del tipus de tumor i de la seva base genètica. En alguns tumors està associat amb una pitjor prognòs i en altres amb una millor. En el cas del càncer de mama, la sobreexpressió de la isoforma eEF1A2 prediu un augment de la supervivència del pacient [55]. Contràriament, la



sobreexpressió de eEF1A2 es relaciona amb un pitjor pronòstic en càncer de pàncrees [56] o pròstata [57].

En alguns tumors s'han descrit els mecanismes moleculars de la isoforma eEF1A2, és el cas dels tumors de pàncrees on la seva sobreexpressió activa la proteïna AKT que, a la seva vegada, augmenta l'expressió de MMP9 que és una de les proteïnes responsables de la reorganització de la matriu extracel·lular en el context de la progressió tumoral [56]. Així mateix, altres estudis també corroboren l'activació d'AKT per eEF1A2 i això condueix a una remodelació en el citoesquelet d'actina que acaba donant lloc a un increment de fil·lopodis a les cèl·lules tumorals i, per tant, una major migració d'aquestes [58].

En referència al paper del factor EF1A2 en malalties neurodegeneratives, s'han identificat mutacions *de novo* en el gen que codifica per aquesta proteïna en pacients amb autisme i epilèpsia. S'han trobat tres mutacions *missense* en cinc pacients. Una és la Gly70Ser trobada en un pacient amb autisme i conducta agressiva [59]. Aquesta mateixa mutació es dona també en pacients amb epilèpsia [60]. Altres mutacions també han estat descrites en pacients epilèptics com són la Glu122Lys i Asp252His [61]. Encara no es coneix l'efecte que poden tenir aquestes mutacions sobre la funció de la proteïna, si poden donar lloc a una pèrdua o en una alteració de la seva activitat [62].

## 2.3 El factor eEF1A i la plasticitat sinàptica

### 2.3.1 Evidències d'efectes del factor eEF1A sobre el citoesquelet d'actina

D'entre totes les funcions no canòniques del factor d'elongació la que ha estat més àmpliament descrita és la seva capacitat d'unió al citoesquelet d'actina. Existeixen molts estudis, la majoria d'ells *in vitro*, que mostren la interacció del factor d'elongació eEF1A amb actina [63],[64],[65]. D'altra banda, estudis realitzats en llevat, han permès discernir que el principal domini d'interacció amb actina és el III domini de la proteïna [66].

Existeixen diverses hipòtesis de com es produeix aquesta unió entre el factor d'elongació i l'actina, però alguns treballs indiquen que per tal que es produeixi la unió és necessari que el factor eEF1A formi dímers. A més, aquesta formació de dímers podria dependre de  $Ca^{2+}$ . En la presència de  $Ca^{2+}$ /calmodulina aquest complex s'uniria al factor d'elongació prevenint que aquest es pugui unir a una altra molècula i això redueix la seva interacció amb actina (**figura 18**). Aquests són estudis fets *in vitro* en un model de *Dictyostelium* [63].

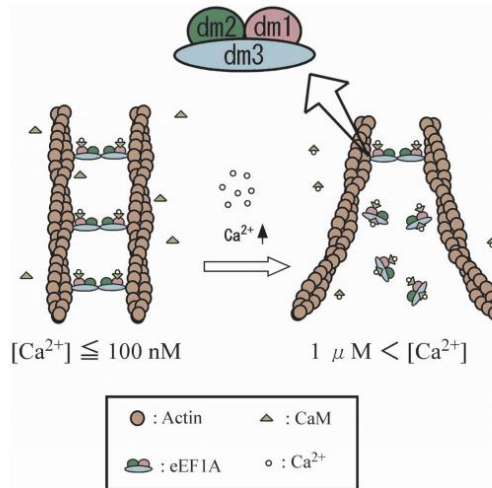


Figura 18. Hipòtesi d'interacció del factor d'elongació eEF1A amb el citoesquelet d'actina [63].

Els estudis *in vivo* mostren que el factor eEF1A colocalitza amb els filaments d'actina i suggereixen que també pot unir al propi mRNA d'actina amb una gran afinitat inclús quan està unit a la F-actina [67]. A més, s'ha demostrat que el factor eEF1A es concentra a les protrusions com són els fil·lopodis i altres regions que contenen filaments d'actina [67]. Estudis immunocitoquímics en neurones mostren que el factor també es troba enriquit a les espines dendrítiques [68] que, com hem explicat anteriorment, són compartiments que estan formats bàsicament de citoesquelet d'actina [69]. Utilitzant fusions dels diferents dominis del factor amb GFP demostren que el III domini és necessari i el principal responsable de la localització del factor eEF1A a l'espina sinàptica [70].

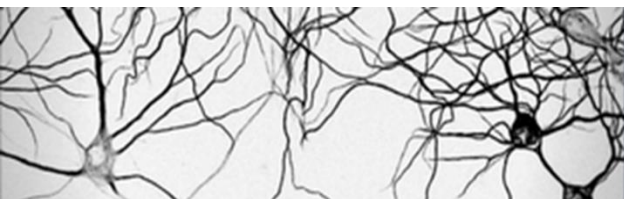
En l'únic estudi que relaciona la fosforilació del factor d'elongació amb la unió a actina, es postula que la quinasa Rho pot fosforilar al factor eEF1A *in vitro* i, consegüentment a aquesta fosforilació es disminueix la capacitat que té la proteïna d'unir diferents filaments d'actina (fer *bundles* d'actina) [71].

### 2.3.2 La fosforilació del factor eEF1A com a regulador de la traducció local

Com s'ha detallat anteriorment, el control de la traducció local per fosforilació més estudiat a nivell neuronal ha estat el del factor d'elongació eEF2. En canvi, hi ha poques dades referents a la proteïna eEF1A. Els pocs estudis sobre la fosforilació del factor eEF1A observen que la Serina 300 pot ser fosforilada en resposta al factor de creixement TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*), provocant una disminució de la síntesi general de proteïnes. El factor TGF- $\beta$  és un potent regulador del creixement

tumoral activant els receptors transmembrana TGF- $\beta$  tipus I i II (T $\beta$ R-I i T $\beta$ R-II) que formen un complex. Es va demostrar que sota aquesta activació es produïa un increment de la fosforilació del factor eEF1A [72] i, conseqüentment, una inhibició de la traducció de proteïnes. La Serina 300 es troba en el II domini que és el responsable de la correcta interacció del factor amb el tRNA. Convé destacar però, que la Serina 300 no canvia entre les dues isoformes (eEF1A1 i eEF1A2). Tanmateix, també hi ha estudis entre aminoàcids que són diferents entre isoformes [73]. Es va descriure que en situacions d'estrès induït, la quinasa JNK fosforila les Serines 205 (igual entre les dues isoformes) i 358 (serina que apareix de nou a la isoforma 2) del factor eEF1A2. Aquesta fosforilació el que provoca és una degradació de les proteïnes que s'han sintetitzat de nou (*newly synthesized polypeptides* NSPs). Aquesta ha estat la única observació que existeix actualment en cèl·lules neuronals que mostra una fosforilació en un aminoàcid no conservat entre les dues isoformes.

Tots aquests estudis exposats suggereixen que la fosforilació del factor d'elongació eEF1A2 podria ser un mecanisme regulador de la plasticitat sinàptica.



OBJECTIUS

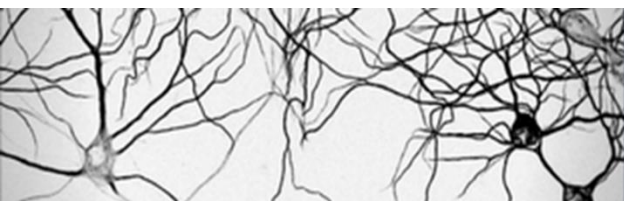


**Objectiu 1:** Anàlisi de les diferències de les dues isoformes del factor d'elongació eEF1A i caracterització de l'aparició i localització de la isoforma eEF1A2 en neurones.

**Objectiu 2:** Determinació del paper de la fosforilació de la isoforma eEF1A2 en la interacció amb el citoesquelet d'actina i el seu efecte sobre la plasticitat estructural.

**Objectiu 3:** Avaluació de les implicacions de la fosforilació de la isoforma eEF1A2 en la regulació de la traducció local de proteïnes.





## RESULTATS





*Objectiu 1: Anàlisi de les diferències de les dues isoformes del factor d'elongació eEF1A i caracterització de l'aparició i localització de la isoforma eEF1A2 en neurones.*

## 1. Determinació de les diferències en la seqüència d'aminoàcids de les isoformes eEF1A1 i eEF1A2

Per intentar respondre a la pregunta de perquè una proteïna amb una funció tan conservada com és el factor d'elongació **eEF1A1** canvia per una altra isoforma pràcticament idèntica (**eEF1A2**) en determinats teixits [46] es van analitzar les diferències a nivell de seqüència d'aminoàcids d'ambdues isoformes. Ens vam centrar en el III domini de la proteïna que és aquell que s'ha descrit que pot tenir altres funcions a part de la d'elongació de proteïnes [47]. Com es pot observar (**figura 19**) en aquest III domini es donen quatre canvis d'aminoàcids que no poden ser fosforilats a la isoforma eEF1A1 que donen lloc a serines a la isoforma eEF1A2.

Mm eEF1A1	MGKEKTHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAAEMGKGSFKYAWVL
Mm eEF1A2	MGKEKTHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAAEMGKGSFKYAWVL
	10 20 30 40 50 60
Mm eEF1A1	DKLKAERERGITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIVAAGV
Mm eEF1A2	DKLKAERERGITIDISLWKFETTKYVITIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIVAAGV
	70 80 90 100 110 120
Mm eEF1A1	GEFEAGISKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVGVNKMDSTEPYPYSQKRYEEIVKEVSTYIKK
Mm eEF1A2	GEFEAGISKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVGVNKMDSTEPAYSEKRYDEIVKEVSAYIKK
	130 140 150 160 170 180
Mm eEF1A1	IGYNPDTVAFVPISGWNGDNMLEPSANMPWFKGWKVKTRKDGSAAGTTLLEALDCILPPTTR
Mm eEF1A2	IGYNPATVFFVPISGWHGDNMLEPSNMPWFKGWKVERKEGNASGVSLLEALDTILPPTTR
	190 200 210 220 230 240
Mm eEF1A1	PTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPVNVITTEVKSVMEMHHEALS
Mm eEF1A2	PTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGILRPGMVVTFAPVNIITTEVKSVMEMHHEALS
	250 260 270 280 290 300
Mm eEF1A1	EALPGDNVGFNVKNVSVKDVRRGNVAGDSKNDPPEAAAGFTAQVILNHPGQISAGYAPV
Mm eEF1A2	EALPGDNVGFNVKNVSVKDIRRGNVCGDSKADPPQEAQFTSQVILNHPGQISAGYSPV
	310 320 330 340 350 360
Mm eEF1A1	LDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKKLEDGPKFLKSGDAAIVDMVPGKPMCVESFSQYPP
Mm eEF1A2	IDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKKLEDNPKSLKSGDAAIVEMVPGKPMCVESFSQYPP
	370 380 390 400 410 420
Mm eEF1A1	LGRFAVRDMRQTVAVGVIKAVDKKAGAGKVTKSAQKAQKA-K
Mm eEF1A2	LGRFAVRDMRQTVAVGVINKVEKSGGAGKVTKSAQKAQKAGK
	430 440 450 460

**Figura 19.** Caracterització de les diferències d'aminoàcids fosforilables al III domini.

Es comparen les dues seqüències d'aminoàcids de les isoformes eEF1A1 i eEF1A2. Els diferents dominis de la proteïna s'indiquen en colors: I domini (taronja), II domini (blau), III domini (vermell). En el III domini de la isoforma eEF1A2 apareixen quatre noves serines marcades de color groc (S342,S358,S393,S445).

Amb la intenció de poder estudiar quin efecte podria tenir una possible regulació per fosforilació d'aquesta nova isoforma (eEF1A2) en cervell, es van generar dues variants amb mutacions puntuals a les serines del III domini (S342,S358,S393,S445); mutades a alanina (eEF1A2 S/A) o a àcid glutàmic (eEF1A2 S/E). Es van nomenar de la següent manera: eEF1A1 (**A1**), eEF1A2 (**A2**), el mutant alanina (**A2 S/A**) i el mutant glutàmic (**A2 S/E**) (figura 20).

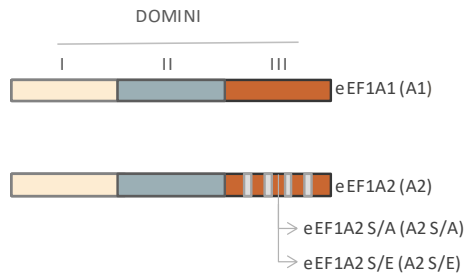


Figura 20. Esquema dels principals cDNAs utilitzats durant la tesi.

Es van generar 2 mutants amb les 4 serines que apareixen en el III domini de la isoforma eEF1A2 (S342,S358,S393,S445) mutades a alanina (A2 S/A) o a glutàmic (A2 S/E).

## 2. Localització cel·lular dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 a la línia cel·lular HEK293T

Es van transfectar les cèl·lules HEK293T amb la isoforma A2 *wild type* i els mutants A2 S/A i A2 S/E fusionats a GFP. Es va observar que la isoforma A2 i el mutant A2 S/A presentaven una localització citoplasmàtica. Aquesta localització coincideix amb la seva funció com a factor de traducció. Curiosament, una fracció del mutant A2 S/E es localitzava al nucli indicant que pot tenir altres funcions no relacionades amb la traducció (figura 21).

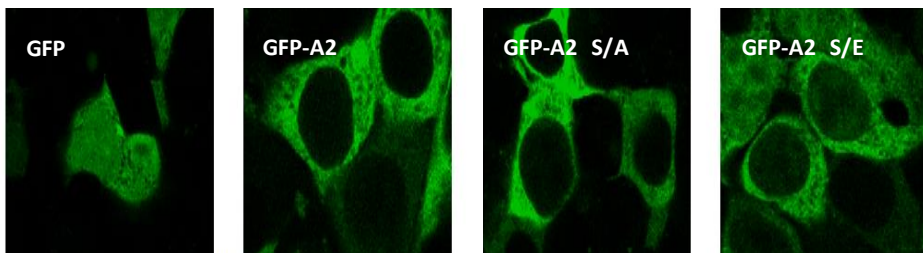


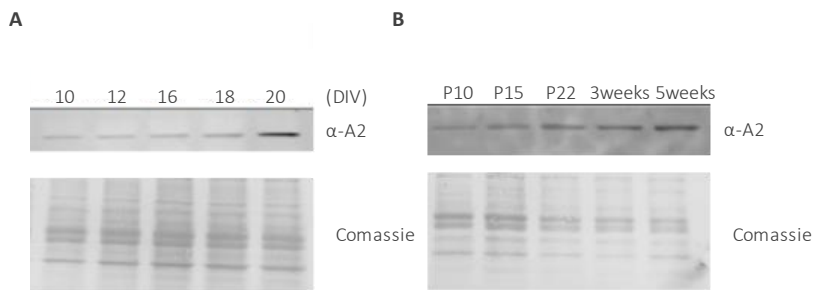
Figura 21. Determinació de la localització cel·lular dels mutants de fosforilació de la isoforma A2.

Les cèl·lules HEK293T es van transfectar amb GFP, GFP-A2, GFP-A2 S/A i GFP-A2 S/E. Es mostra una imatge representativa, adquirida amb microscopi confocal, de la localització cel·lular dels diferents mutants.

### 3. Anàlisi de l'expressió i localització de la isoforma A2 en neurones

#### 3.1 Determinació del patró d'expressió de la isoforma A2 *in vitro*

Altres grups havien mostrat que al llarg del desenvolupament del cervell de ratolí es produeix un bescanvi de la isoforma A1 per la isoforma A2 [24]. Es va voler comprovar si en neurones dissociades d'hipocamp d'embrions a E17 també es donava aquesta aparició de la isoforma A2. Els resultats obtinguts mostren que la isoforma A2 va apareixent al llarg del desenvolupament de la neurona *in vitro* (**figura 22A**) de la mateixa manera que ocorre *in vivo* en el cervell adult (**figura 22B**) [49].



**Figura 22.** Determinació de l'expressió de la isoforma A2 en el desenvolupament de neurones.

**A.** Western blot de cultius de neurones d'hipocamp de 10, 12, 16, 18 i 20 DIVs. L'expressió de la proteïna es va analitzar amb l'anticòs anti-A2. Es mostra la membrana tenyida amb comassie com a control de càrrega. **B.** Western blot de cervells de ratolí postnatal (P) de diferents dies: 10, 15, 22, cervell de ratolí de 3 i de 5 setmanes. L'expressió de la proteïna A2 es determina amb l'anticòs anti-A2. Es mostra la membrana tenyida amb comassie com a control de càrrega.

#### 3.2 Anàlisi de la localització de la isoforma A2 en neurones d'hipocamp

En col·laboració amb el doctor Miquel Bosch es van realitzar cultius organotípics d'hipocamp de rata postnatal a 6-7 dies. Els cultius es van transfectar 10 dies després de ser cultivats i es va sobreexpressar la proteïna A2 unida a GFP i la proteïna fluorescent dsRed com a marcador cel·lular. La proteïna A2 presentava exclusió nuclear i, com es pot observar, és present a la resta de la neurona incloent les espines (**figura 23**).

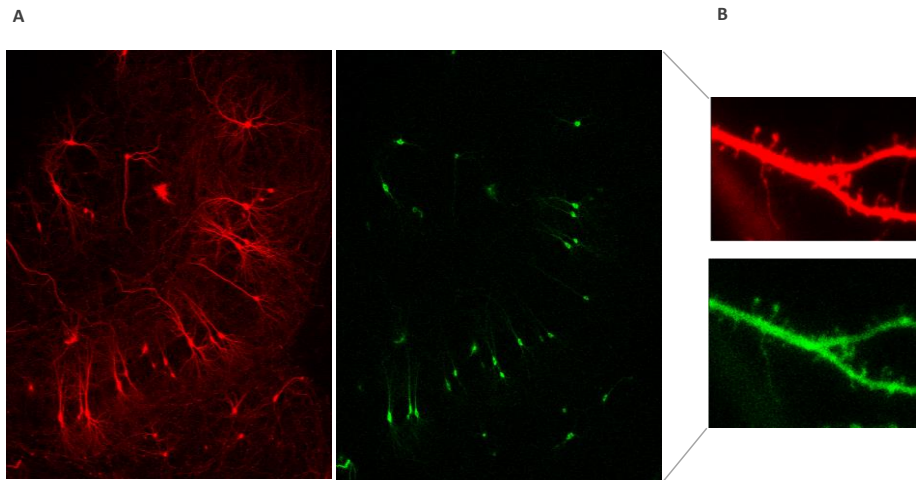


Figura 23. Localització de la proteïna A2 en hipocamp.

A. Cultius organotípics de rates d'entre 6 i 7 dies (postnatal) es transfecten als 10 dies amb dsRed (marcador cel·lular) i GFP fusionat a la proteïna A2. B. Ampliació de la figura A on es poden observar les espines dendrítiques.

Paral·lelament, es van fer servir cèl·lules corticals de 20 DIVS (suficientment madures com per tenir espines dendrítiques) i es van aïllar sinaptoneurosomes (figura 24A). Posteriorment es va analitzar l'expressió de la proteïna A2 endògena per western blot. Com es pot observar l'expressió de la proteïna A2 es veu enriquida a les espines dendrítiques (figura 24B).

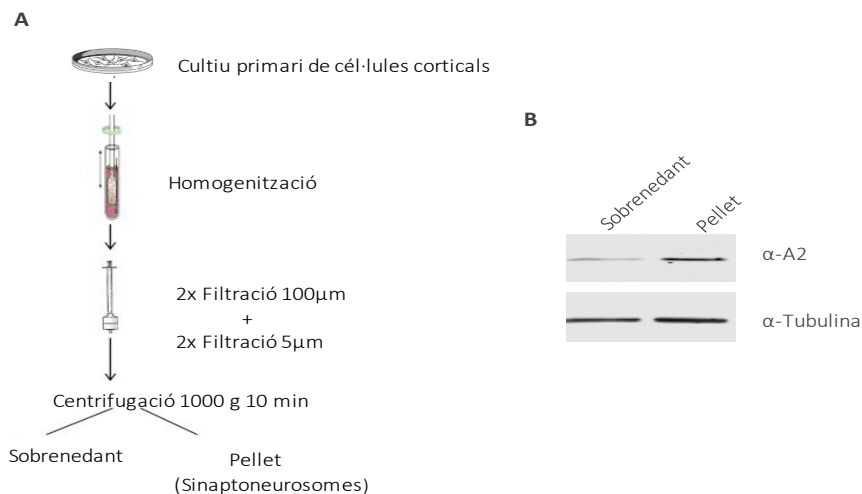


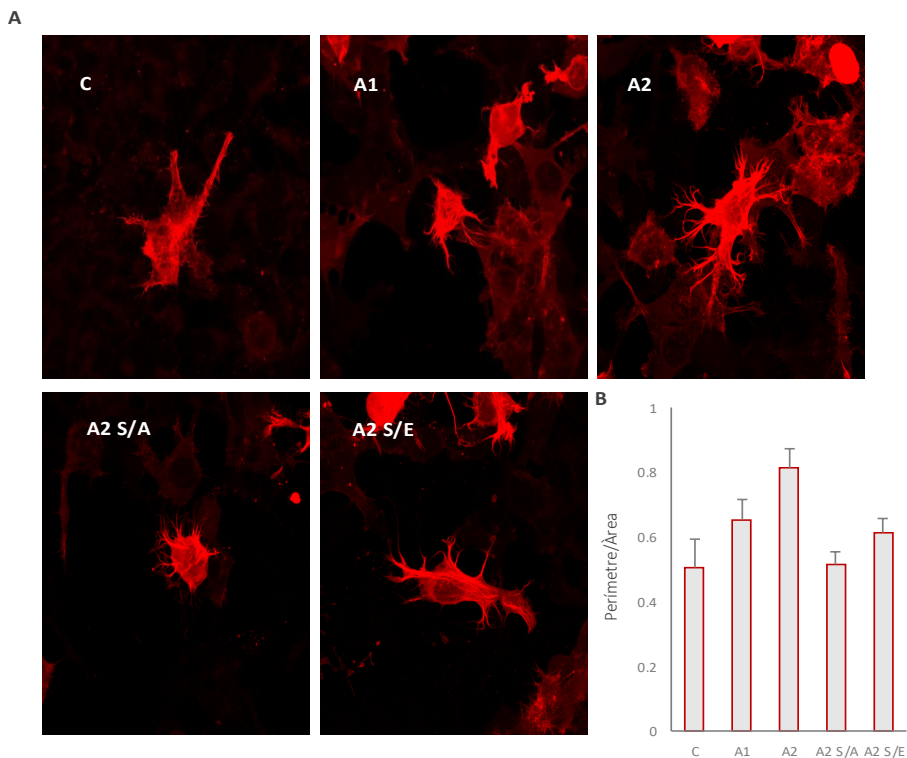
Figura 24. Identificació de la isoforma A2 en sinaptoneurosomes.

A. Preparació de sinaptoneurosomes pel mètode de filtració figura adaptada i traduïda [74]. B. Western blot de les mostres de sinaptoneurosomes. S'utilitza l'anticòs anti-A2 per determinar l'expressió de la proteïna i anti-tubulina com a control de càrrega.

*Objectiu 2. Determinació del paper de la fosforilació de la isoforma eEF1A2 en la interacció amb el citoesquelet d'actina i el seu efecte sobre la plasticitat estructural.*

#### 4. Efecte dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 sobre el fenotip de la línia cel·lular HEK293T

Com ja s'ha explicat a la revisió de la literatura científica, la proteïna A2 es troba sobreexpressada en alguns tumors tenint com a efecte un increment en el nombre de fil·lopodis [58]. Amb l'objectiu d'estudiar el paper que tenien els diferents mutants en la formació de fil·lopodis es va utilitzar la línia cel·lular HEK293T. Es van cotransfectar els diferents mutants juntament amb mCherry i es va determinar la formació de fil·lopodis. Per analitzar els resultats es va calcular el rati del perímetre de les cèl·lules entre l'àrea de les mateixes de tal manera que aquelles que formen més prolongacions tindran un rati perímetre/àrea superior (**figura 25**). Els resultats mostren que es dona un increment en la formació de fil·lopodis en les cèl·lules transfectades amb la isoforma A2 i el mutant A2 S/E.



**Figura 25.** Anàlisi de la formació de fil·lopodis en la línia cel·lular HEK293T.

Cèl·lules HEK293T es van cotransfectar amb mcherry i un control HA (C), la proteïna HA-A1, HA-A2 o els mutants HA-A2 S/A i HA-A2 S/E. **A.** Imatges obtingudes al microscopi confocal Zeiss. **B.** El gràfic mostra la mitjana dels ratis perímetre/àrea dels diferents mutants .

## 5. Efecte dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 en el fenotip de cèl·lules d'hipocamp

### 5.1 Anàlisi de la formació i dinamisme dels fil·lopodis

Per determinar els efectes sobre el fenotip neuronal es van utilitzar cèl·lules d'hipocamp d'embrions a E17 a 13 DIVS ja que en aquest període es troben en fase de maduració en la que ja hi ha fil·lopodis i comencen a aparèixer algunes espines. Es van cotransfectar GFP i els diferents mutants fusionats amb HA. Es van analitzar els canvis morfològics per microscòpia. El comptatge de les protrusions es va realitzar a mà amb un comptador. Com es pot observar la isoforma A2 i el mutant A2 S/E poden formar més fil·lopodis que la isoforma A1 i el mutant A2 S/A (figura 26). Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en la línia cel·lular HEK293T (figura 25).

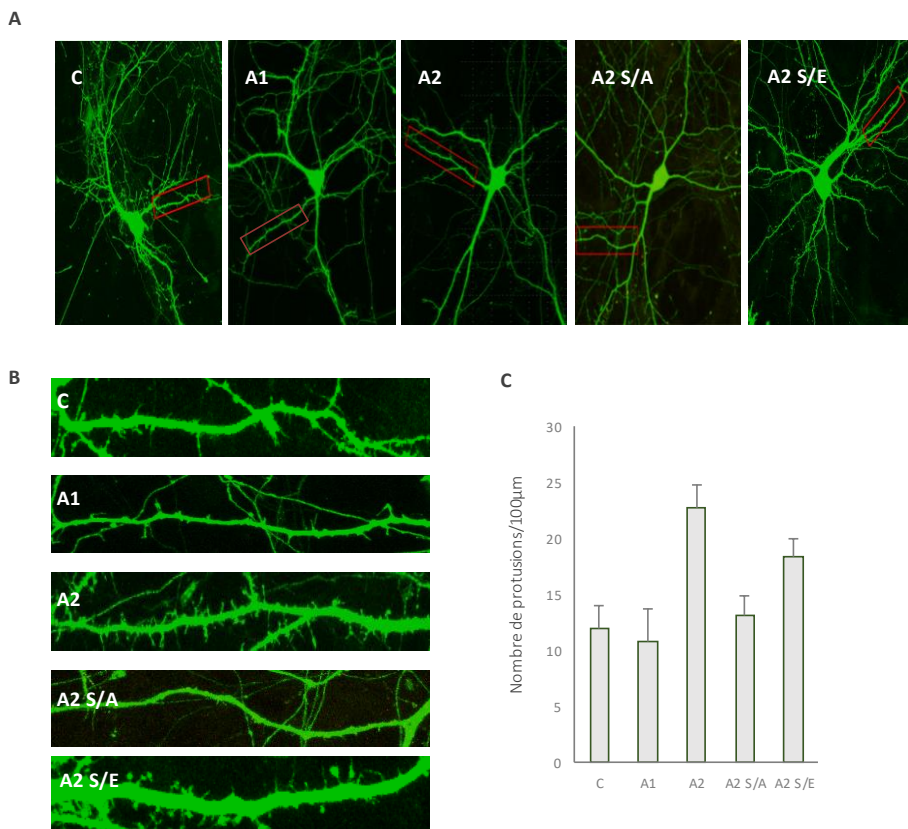
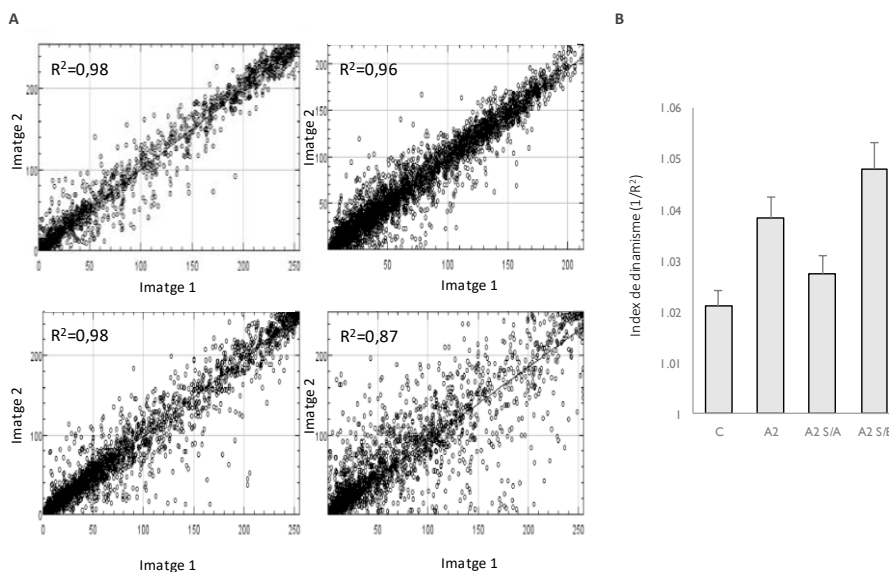


Figura 26. Determinació de la formació de fil·lopodis en neurones d'hipocamp.

Neurones a 13 DIVS van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E i es van analitzar a les 24h. **A.** Imatge representativa de les neurones transfectedes amb els diferents mutants. **B.** Ampliació de la dendrita marcada en vermell a l'apartat A. **C.** Mitjana del nombre de protrusions/100µm.

Com s'ha detallat anteriorment, els fil·lopodis bàsicament estan formats de citoesquelet d'actina, essent aquestes protrusions unes estructures molt dinàmiques [4]. Amb l'objectiu d'analitzar el dinamisme dels fil·lopodis es van transfectar cèl·lules d'hipocamp d'embrió E17 amb els diferents mutants de fosforilació. A les 24 hores es van realitzar vídeos de 10 minuts (**figura 27**). Per analitzar-ho es va utilitzar el programa *image J* amb el *plugin Correlation J*. Per la realització d'aquest tipus d'experiments era molt important que les cèl·lules estiguessin entre 8 i 9 DIVs que és quan hi ha més dinamisme de fil·lopodis; amb el temps aquests s'estabilitzaven [75] i això feia que no es poguessin veure diferències entre el mutants. Aquests experiments ens mostren que tant la isoforma A2 com el mutant a A2 S/E presenten fil·lopodis amb un dinamisme superior que el control i el mutant A2 S/A (**figura 27B**). Els vídeos i el gràfic de correlació complet es troben al material suplementari (S2).



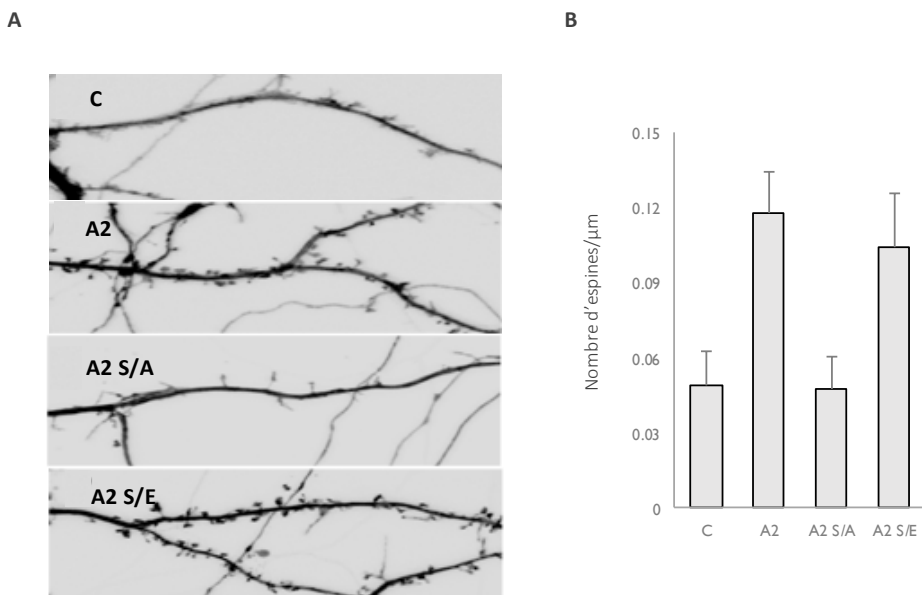
**Figura 27.** Estudi dels efectes de la fosforilació de la isoforma A2 sobre el dinamisme de fil·lopodis. Neurons a 8 DIVs van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E i es van analitzar a les 24 hores. **A.** Gràfic de correlació de la intensitat dels píxels al llarg del temps on es compara els canvis en la intensitat de cada un dels píxels d'una imatge del vídeo (imatge1) amb la següent (imatge 2) i així respectivament amb totes les imatges que formen el vídeo. **B.** Representació de les mitjanes de l'índex de dinamisme ( $1/R^2$ ) de la correlació obtinguda a la figura A.

## 5.2 Estudi del fenotip dels mutants de fosforilació del factor A2 en neurones madures

Segons el model fil·lopodial d'espino-genèsi les espines es formen a partir de fil·lopodis existents [9]. Basant-nos en aquest model, es va analitzar si les mutacions en



fosforilació del factor A2 podien afectar a la formació d'espines dendrítiques. Per realitzar aquests experiments es van utilitzar neurones d'hipocamp a 15 DIVs on ja comencen a haver-hi sinapsis i es van analitzar les diferències, en relació a la formació d'espines, entre els mutants. Les neurones es van cotransfectar amb GFP i els diferents mutants fusionats amb HA. L'anàlisi es va realitzar 48 hores després de la transfecció, es van adquirir imatges amb microscopia confocal i es van realitzar dos comptatges d'espines en paral·lel, tant a mà (amb l'ajut d'un comptador) com amb el programa *Image J* (amb el *pluggin Spine J*), que van coincidir en resultats (**figura 28**). S'observa que hi ha un increment en la formació d'espines quan es sobreexpressa el factor A2 i el mutant A2 S/E; coincideix que són les mateixes condicions on havíem vist que es formaven més fil·lopodis (**figura 26**).



**Figura 28.** Estudi de la formació d'espines pels mutants de fosforilació en cèl·lules d'hipocamp.

Les neurones a 15 DIVs es cotransfecten amb GFP i un control (HA), HA-A2, HA-SA o HA-SE. **A.** Imatge representativa d'una dendrita de cada un dels mutants, es mostra amb el filtre *invertir* de *Image J*. **B.** El gràfic representa la mitjana del nombre d'espines/ $\mu\text{m}$ .

Per completar l'estudi de fenotip d'espino-genèsi i amb la col·laboració del doctor Miquel Bosch es van utilitzar cultius organotípics en els que es van poder estudiar cèl·lules més madures (**figura 29**). Es va partir de cultius de rata a 6-7 dies postnatal i es van transfectar als 10 dies. Els resultats van ser analitzats per microscopia confocal quatre dies després de la transfecció. El comptatge es va realitzar paral·lelament a mà i amb el programa *Spine J*. Els resultats mostren que la isoforma A2 S/A forma menys espines que la resta. En aquests experiments no hi ha diferències entre el control, isoforma A2 i el mutant A2 S/E.

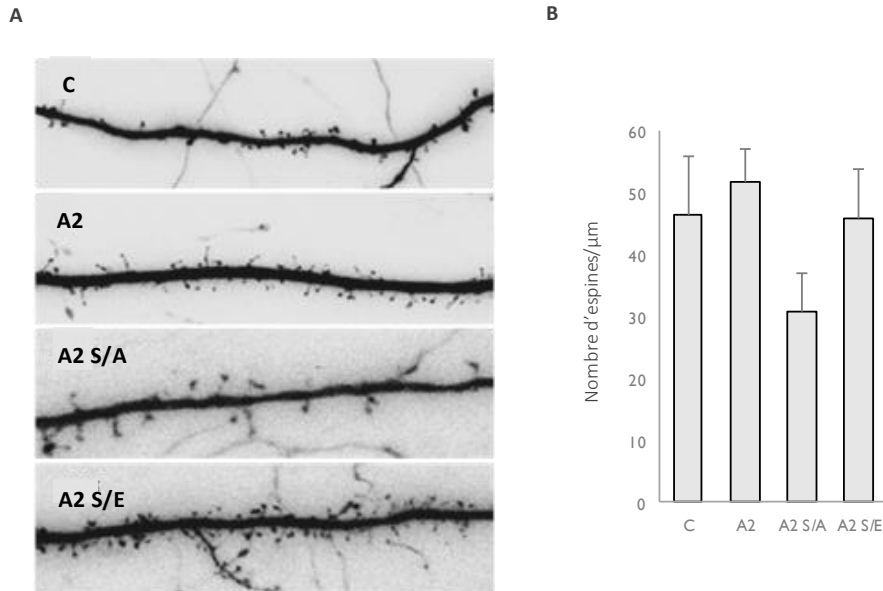


Figura 29. Anàlisi dels efectes dels mutants de fosforilació sobre la formació d'espines en cultius organotípics.

Els cultius organotípics d'hipocamp de rata postnatal de 6-7 dies es van transfectar als 10 dies i es van analitzar per microscopia als 4 dies. **A.** Imatge representativa d'una dendrita per cada un dels mutants. Es mostren amb el filtre *invertir* del programa *ImageJ*. **B.** El gràfic representa la mitjana del nombre d'espines per µm per cada un dels mutants.

## 6. Anàlisi de la interacció amb actina dels mutants de fosforilació del factor A2

Hi ha molts estudis que indiquen que el factor d'elongació A1 pot interaccionar amb el citoesquelet d'actina [65],[76],[77], alguns d'aquests postulen que les dues isoformes de la proteïna (A1 i A2) presenten la mateixa eficiència d'unió a actina [78]. En aquesta tesi s'ha volgut determinar les possibles diferències d'interacció entre els mutants de fosforilació del factor A2 i el citoesquelet d'actina (**figura 30**). Amb aquest propòsit es van transfectar HEK293T amb els diferents mutants fusionats a FLAG, les cèl·lules es van recollir a les 24 hores i es va afegir actina unida a biotina. Per purificar l'actina biotinilada i amb ella totes les proteïnes que interaccionen amb aquesta es va utilitzar estreptavidina. A continuació, es va realitzar un western blot amb l'anticòs anti-FLAG que ens va permetre determinar la unió dels diferents mutants amb l'actina. Com es pot observar el mutant A2 S/E uneix a actina amb una menor eficiència que el mutant A2 S/A i la proteïna A2.

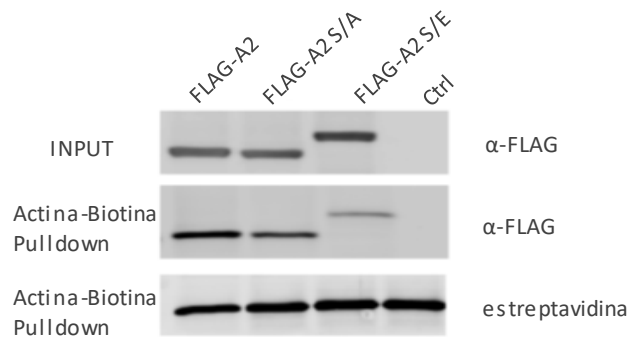


Figura 30. Anàlisi de la interacció dels diferents mutants de fosforilació amb actina

Cèl·lules HEK293T transfectades amb Flag-A2, Flag-A2 S/A i Flag-A2 S/E, es purifica l'actina biotilada. A la primera línia es pot observar l'input com a control de transfecció, la segona línia mostra amb anti-FLAG la interacció dels diferents mutants amb actina, finalment a la tercera línia es mostra la senyal d'estreptavidina com a control de càrrega.

## 7. Determinació de la formació de dímers dels mutants de fosforilació del factor A2

Tal i com ha estat anteriorment descrit, el factor A1 té la capacitat d'unir a actina i s'ha proposat que per aquesta unió sigui necessari que aquest formi dímers [79],[80]. Amb aquests antecedents es va determinar la possible dimerització de la isoforma A2 i dels mutants de fosforilació. Es van cotransfectar cèl·lules HEK293T amb els diferents factors fusionats amb HA i els mateixos però fusionats amb FLAG. A les 24 hores es va immunoprecipitar utilitzant *beads* de FLAG. Es va realitzar un western blot amb l'anticòs anti-HA per determinar la dimerització (figura 31).

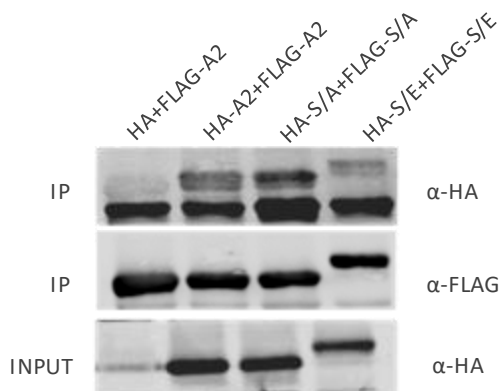


Figura 31. Determinació de la formació de dímers dels mutants de fosforilació.

Les cèl·lules HEK293T es van cotransfectar amb 1.HA + FLAG-A2, 2.HA-A2+FLAG-A2, 3.HA-A2 S/A+FLAG-A2 S/A i 4.HA-A2 S/E +FLAG-A2 S/E. A la primera línia es mostren els resultats de la IP, a la segona es mostra el control de la IP i a la tercera l'input com a control de transfecció..

Recentment, investigadors han descrit que el III domini de la isoforma A1 forma agregats en neurones [70]. Basant-nos en aquests resultats, es van transfectar cèl·lules d'hipocamp a 9 DIVs amb el III domini de la proteïna A2, A2S/A o A2S/E fusionat a GFP. Es van realitzar fotografies per microscopia confocal per determinar la formació d'agregats (**figura 32**). Com es pot observar el III domini del factor A2 i el del mutant A2 S/A formen més agregats que el mutant A2 S/E. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en experiments bioquímics de dimerització (**figura 31**). Es poden observar les imatges ampliades al material suplementari (**S3**).

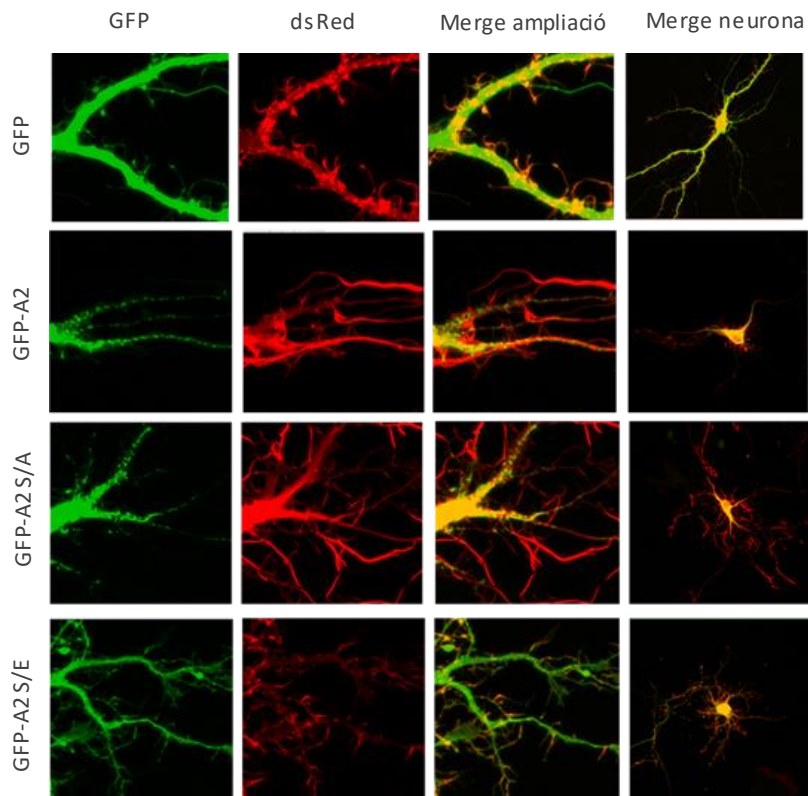


Figura 32. Anàlisi de la formació d'agregats per microscopia.

Les neurones a 9 DIVs es van transfectar amb III domini de les isoformes A2, A2 S/A i A2 S/E unides a GFP i la proteïna fluorescent dsRed. S'observa la senyal de GFP, dsRed, i ambdues (merge) de la neurona ampliada i la neurona completa.

## 8. Anàlisi de la capacitat de formar *bundles* d'actina pels mutants de fosforilació

Existeixen moltes evidències que proven que el factor A1 té la capacitat d'unir diferents filaments d'actina i formar feixos de filaments (*bundles*) [65],[76],[77]. Amb el propòsit de determinar quin era l'efecte dels diferents mutants de la isoforma A2 al respecte,

es van purificar els mutants fusionats amb histidines i es va realitzar un assaig de cosedimentació a baixes revolucions. Aquest experiment consisteix en centrifugar l'actina en presència d'una determinada proteïna. Si la proteïna ajuda a la formació de *bundles* d'actina, aquesta pesa més i precipita. Conseqüentment, si l'actina es troba al precipitat és senyal de que s'han format *bundles*, aquest és el cas de la isoforma A1 i el mutant A2 S/A (figura 33).

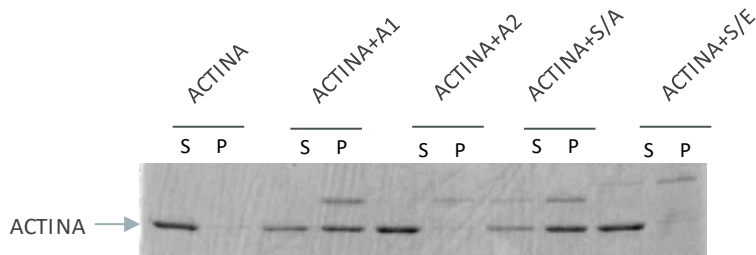


Figura 33. Assaig de cosedimentació d'actina amb els mutants de fosforilació d'A2

Les isoformes A1, A2 i els mutants A2 S/A i A2 S/E units a histidina es van centrifugar a baixes revolucions en presència d'actina. Les mostres es separen en un gel d'electroforesi, es mostra l'actina present al sobrenedant (S) i al *pellet* (P).

## 9. Determinació *in vivo* dels efectes de la fosforilació d'A2 sobre el citoesquelet d'actina

### 9.1 Anàlisi de la colocalització amb actina

Els resultats fins ara exposats mostren que quan la proteïna A2 no està fosforilada (A2 S/A) dimeritza i interacciona amb actina formant *bundles*. Mentre que quan la proteïna està fosforilada (A2 S/E) la proteïna no interacciona amb actina amb la mateixa facilitat, deixant els filaments més lliures i dinàmics (figura 34).

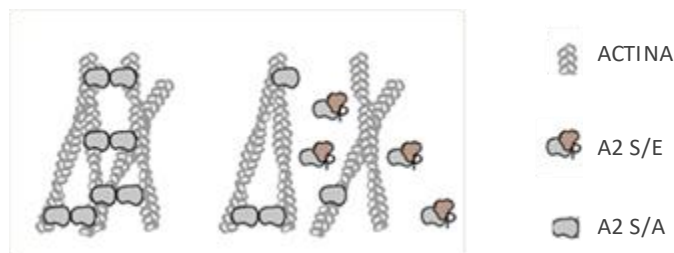


Figura 34. Representació esquemàtica dels efectes de la fosforilació del factor A2 sobre la interacció amb actina.

A continuació, es va voler confirmar aquests resultats en experiments *in vivo* en neurones. Primerament es va analitzar la colocalització entre l'actina, el factor A2 i els mutants A2 S/A i A2 S/E en cèl·lules d'hipocamp. Amb aquest objectiu, es van cotransfectar els diferents mutants en fusió amb GFP i el marcador de f-actina LifeAct. El LifeAct és un pèptid de 17 aa que correspon a un fragment de la proteïna d'unió a actina Abp140 de *Saccharomyces cerevisiae*. Es va demostrar que aquests primers 17 aa de Abp140 contenen el domini d'unió a actina i es podien utilitzar com a marcador de f-actina *in vivo* [81].

A les 24 hores posteriors a la transfecció es van realitzar vídeos per períodes de temps d'un minut i, a continuació, es va analitzar la colocalització d'ambdues senyals al llarg del temps (figura 35).

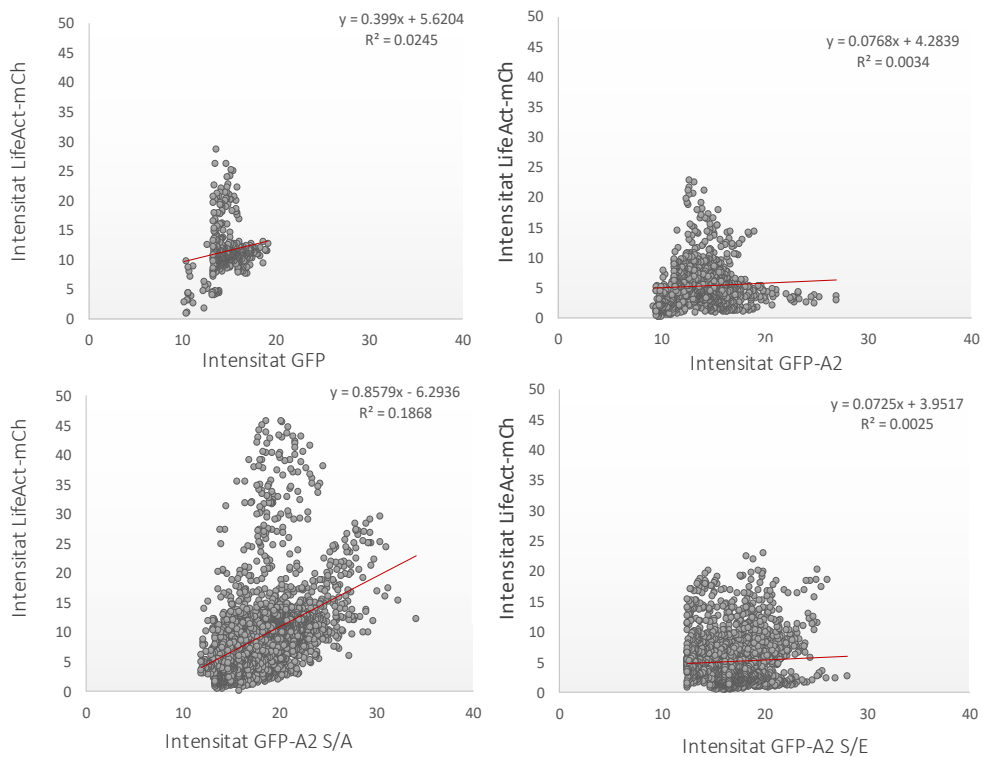
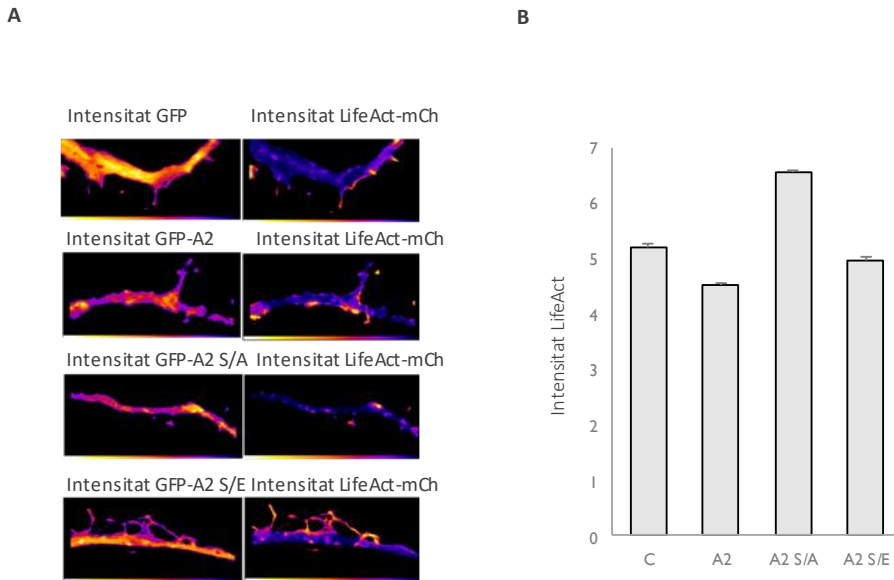


Figura 35. Colocalització dels mutants de fosforilació de la isoforma A2 amb el citoesquelet d'actina.

Les cèl·lules a 10 DIVs es van cotransfectar amb LifeAct-mcherry i els diferents mutants de A2 en fusió amb GFP. Es van realitzar vídeos d'un minut de duració i es va analitzar la colocalització entre les senyals de GFP i lifeAct-mcherry.

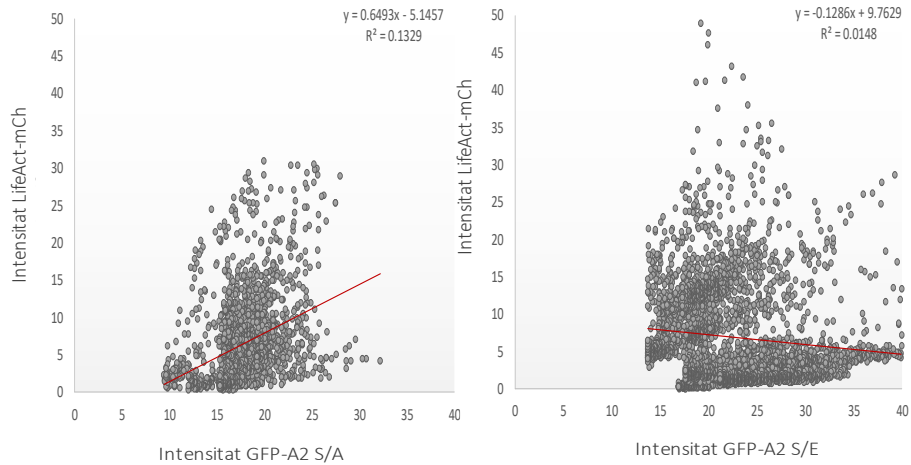
Els vídeos es poden observar al material suplementari (S4). La **figura 36A** mostra una imatge representativa de la intensitat de GFP i LifeAct de cada una de les condicions. Paral·lelament, es va quantificar la intensitat de LifeAct a les dendrites transfectades amb els diferents mutants. S'observa que la isoforma A2 S/A (que pot formar més dímers i té més unió amb actina) presenta també més senyal de LifeAct a les neurites (**figura 36B**), això indica que en aquestes condicions hi ha un increment d'actina filamentosa.



**Figura 36.** Anàlisi de la senyal de LifeAct a les dendrites.

Les cèl·lules a 10 DIVs es van cotransfectar amb LifeAct-mcherry i els diferents mutants de A2 en fusió amb GFP. **A**. Exemple d'una imatge per condició on es pot veure la intensitat de GFP i LifeAct. Les imatges es mostren amb el filtre *Fire* del *Image J*. Les regions on hi ha més fluorescència acumulada es veuen en groc i les de menys en blau (els punts entremitjos són una degradació en taronja). **B** El gràfic representa la mitjana d'intensitat de LifeAct de cada un dels mutants.

A continuació, es va determinar si la colocalització del factor d'elongació A2 amb actina era diferent al transfectar únicament el III domini de la proteïna. Per aquests experiments es va utilitzar únicament el III domini dels dos mutats (A2 S/A i A2 S/E en fusió amb GFP) i es va procedir a realitzar exactament el mateix experiment de colocalització amb actina. Com es pot observar (**figura 37**) el III domini del mutant A2 S/A colocalitza més amb actina que el mutant A2 S/E. No obstant, els efectes eren majors quan es va transfectar la proteïna sencera (**figura 35**).



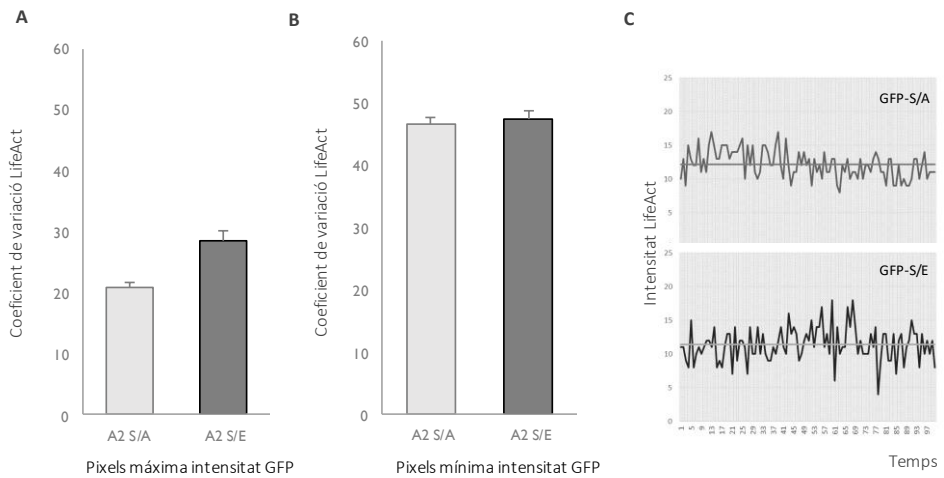
**Figura 37. Colocalització del III domini dels mutants de fosforilació d'A2 amb la f-actina**

Les neurones a 10 DIVS es van cotransfectar amb LifeAct-mcherry i el tercer domini dels mutants A2 S/A i del A2 S/E units a GFP. Es van realitzar vídeos d'un minut de duració i es va analitzar la colocalització entre les senyals de GFP i lifeAct-mcherry

## 9.2 Anàlisi del dinamisme de l'actina

Utilitzant el mateix abordatge de l'apartat anterior (8.1) es va analitzar l'efecte de les mutacions en fosforilació sobre el dinamisme de l'actina. En primer lloc, les dades d'intensitat es van ordenar i classificar per píxels, es van seleccionar aquells que presentaven més senyal de GFP (que corresponen on hi ha més acumulació de proteïna) i es van comparar amb aquells que tenen una menor senyal. A continuació, es va determinar la variabilitat de la intensitat d'actina en els píxels de major intensitat de GFP (**figura 38A**) i en els píxels amb menor intensitat (**figura 38B**). Es a dir, si ens fixem en un sol píxel i mirem com canvia la intensitat d'actina al llarg del temps ens dóna informació de si l'actina s'està movent. Si hi ha molt moviment vol dir que hi ha senyal de LifeAct-mCherry que apareix i desapareix del píxel provocant canvis bruscos en la intensitat. D'altra banda, si la intensitat roman més o menys constant es degut a que l'actina es troba més immòbil (**figura 38C**). Per quantificar aquesta variabilitat d'intensitat es va calcular el coeficient de variació de la intensitat d'actina. A la **figura 38C** es representa la variabilitat de la intensitat al llarg del temps. Es pot observar que als píxels on hi ha més acumulació de la isoforma A2 S/A la intensitat d'actina presenta menys variabilitat que als píxels on hi ha més el A2 S/E, indicant que és menys mòbil. Per contra, als píxels d'intensitat de GFP baixa, no hi ha diferències entre els mutants.

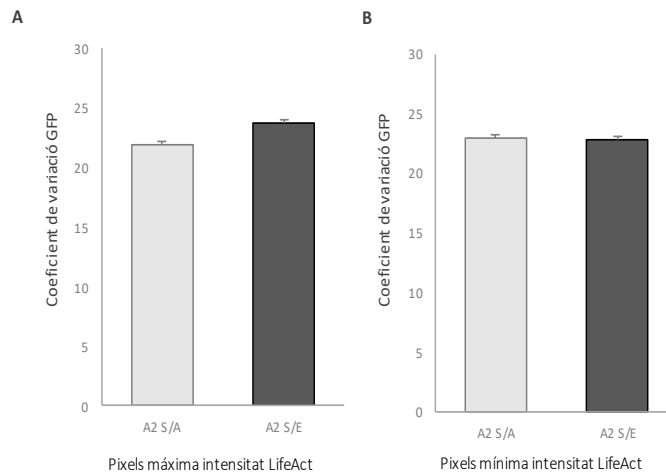




**Figura 38.** Determinació del dinamisme d'actina per píxel.

Les cèl·lules a 10 DIVs es van cotransfectar amb LifeAct-mcherry i els diferents mutants de A2 en fusió amb GFP. **A.** El gràfic mostra la mitjana del coeficient de variació de la senyal de LifeAct dels píxels amb intensitat més alta de GFP. **B.** El gràfic mostra la mitjana del coeficient de variació del LifeAct dels píxels amb intensitat de GFP baixa. **C.** Exemple de dos píxels amb intensitat de GFP alta, el gràfic mostra la variació de la intensitat de LifeAct al llarg del temps.

Amb el propòsit de determinar si és el factor d'elongació el que immobilitza l'actina, o si al contrari, es va realitzar un estudi a la inversa. En aquest, es van seleccionar aquells píxels més intensos i es van comparar amb aquells amb menys intensitat de LifeAct i es va analitzar com variava la intensitat de GFP al llarg del temps (**figura 39**).



**Figura 39. Determinació del dinamisme dels mutants de fosforilació per píxel.**

Les cèl·lules a 10 DIVs es van cotransfectar amb LifeAct-mcherry i els diferents mutants de A2 en fusió amb GFP. **A.** El gràfic mostra la mitjana del coeficient de variació del GFP-A2 S/A i el GFP-A2 S/E en píxels amb senyal de LifeAct més alta. **B.** El gràfic mostra la mitjana del coeficient de variació de GFP-A2 S/A i el GFP-A2 S/E analitzada als píxels que presenten una intensitat de LifeAct més baixa.

Aquests resultats indiquen que és el factor A2 S/A el que afecta al dinamisme de l'actina i no el contrari.

*Objectiu 3. Avaluació de les implicacions de la fosforilació de la isoforma eEF1A2 en la regulació de la traducció local de proteïnes.*

## **10. Estudi dels efectes de la fosforilació d'A2 i la regulació de la traducció en diferents espècies**

### **10.1 Traducció en llevat**

Per estudiar els efectes de la fosforilació del factor d'elongació sobre la traducció de proteïnes es va utilitzar primerament el llevat ja que ens permetia eliminar l'expressió de la proteïna endògena. Aquest fet era útil tenint en compte que el factor d'elongació EF1A és la segona proteïna més abundant de la cèl·lula després de l'actina. Cal destacar que el llevat solament presenta una isoforma del factor d'elongació que rep el nom de TEF1, aquesta proteïna està codificada per dos gens paràlegs TEF1 i TEF2.

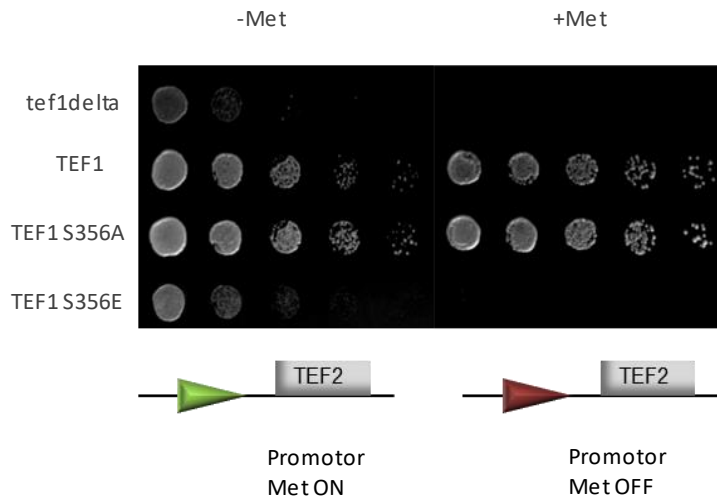
#### **10.1.1 Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids del factor d'elongació en llevat**

Es van alinear les seqüències d'aminoàcids del factor d'elongació de dues espècies que solament presenten una isoforma, com era el cas del llevat i de drosòfila. A continuació es van comparar amb les seqüències d'aminoàcids del factor d'elongació en espècies que presentaven dues isoformes. S'observa, com s'ha explicat anteriorment, que en el III domini hi ha quatre aminoàcids que no poden ser fosforilats a la isoforma A1 i si a la A2. En aquesta tesi s'han estudiat aquests quatre canvis que es donen en ratolí. No obstant, cal destacar que just abans del III domini apareix una nova serina a la isoforma A2 d'altres espècies, entre elles la humana (**figura 40**).

D'entre les serines que hem estudiat la més conservada és la S358. Aquest fet es pot afirmar per diferents evidències; en primer lloc, si es comparen les seqüències d'aminoàcids amb múltiples espècies s'observa que és la única invariable (**material suplementari S5**), la segona evidència, és que si analitzem aquells organismes que solament tenen una isoforma, com és el cas del llevat o la drosòfila, l'aminoàcid que es troba en posició corresponent a la S358 de ratolí és un aminoàcid també fosforilable (serina en el cas del llevat, treonina en el cas de la drosòfila) (**figura 40**) fet que no es dona en les altres tres serines.



comporta igual que aquell que no expressa el factor d'elongació TEF1 endogen (**figura 41 primera línia**).



**Figura 41.** Estudi de l'efecte de les mutacions S356A i S356E en llevat.

Es va sobreexpressar TEF1 *wild type*, TEF1 S356A o TEF1 S356E en una soca que no expressa el gen TEF1 i el gen TEF2 es troba sota un promotor regulable amb metionina. El panell de l'esquerra mostra les soques no tractades amb metionina, on hi ha expressió de la proteïna endògena i dels mutants sobreexpressats. El panell de la dreta mostra les soques tractades amb metionina on no hi ha expressió de proteïna endògena i el fenotip és degut a la sobreexpressió dels mutants.

### 10.1.3 Anàlisi de la funció traduccional dels mutants de fosforilació

Per estudiar pròpiament el paper de la fosforilació de la S356 en la traducció de llevat es va utilitzar la soca amb el gen TEF1 eliminat i l'expressió del gen TEF2 sota un promotor de metionina. Es van sobreexpressar els mutants de fosforilació, es va afegir metionina marcada amb un isòtop radioactiu i es van recollir mostres a les 0, 3 i 6 hores (**figura 42**). Com es pot observar, el mutant a glutàmic TEF1 S356E presenta menor incorporació de metionina indicant una menor eficiència de traducció comparat amb el *wild type* o el mutant a alanina.

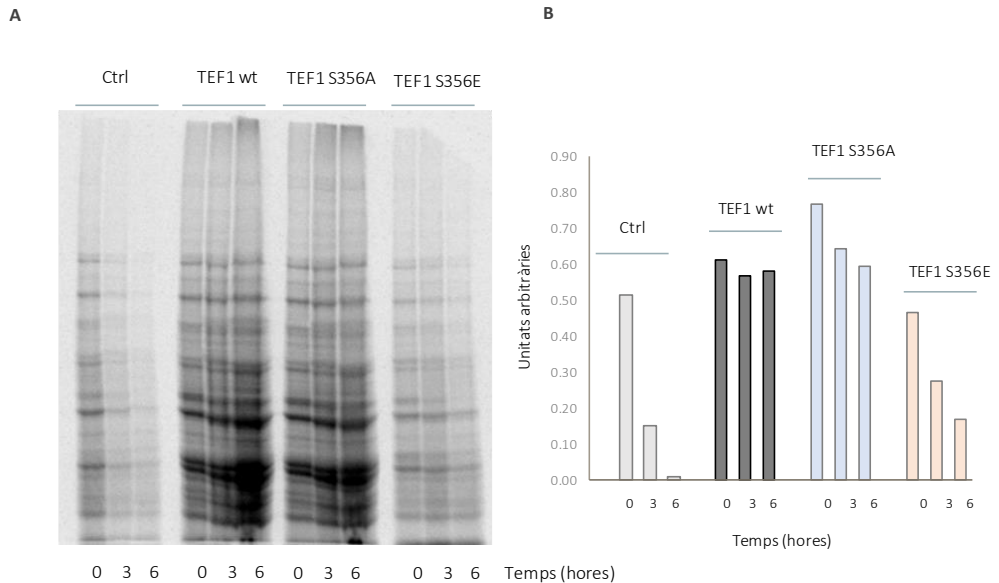


Figura 42. Efecte de les mutacions S356A i S356E sobre la traducció de proteïnes.

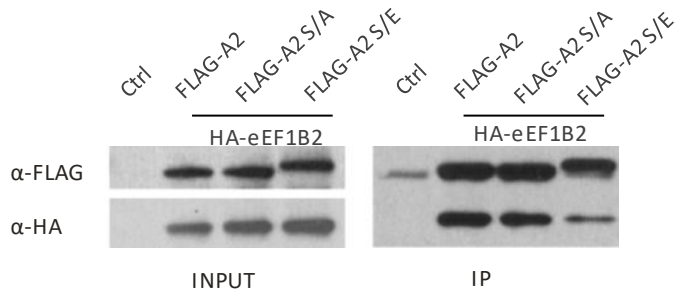
A. radiografia de la incorporació de metionina radioactiva. B. El gràfic representa la quantificació de les bandes de la imatge A realitzada amb el programa *ImageJ*.

## 10.2 Traducció en cèl·lules de mamífer

### 10.2.1 Efectes de la fosforilació de la isoforma A2 sobre la interacció amb la proteïna de traducció EF1B

Com s'ha explicat a la introducció, la proteïna GEF EF1B és la responsable de fer el bescanvi de GDP a GTP del factor d'elongació. Quan EF1B interacciona amb el factor d'elongació EF1A, el transforma en la seva forma activa permetent que pugui interaccionar amb un altre tRNA i continuar amb l'elongació. Alguns estudis mostren que una disminució entre la interacció d'aquestes proteïnes dóna lloc a una aturada en la fase d'elongació [29].

Per determinar si la fosforilació de la isoforma A2 podia afectar a la interacció amb la seva proteïna GEF EF1B, es van cotransfectar en HEK293T els diferents mutants fusionats amb FLAG i el factor EF1B amb HA. A les 24 hores es va realitzar una immunoprecipitació amb *beads* de FLAG i es van determinar les diferències d'interacció amb un western blot (**figura 43**). Com es pot observar, el mutant A2 S/E uneix amb una menor afinitat a EF1B, indicant una possible disminució en l'intercanvi GDP a GTP d'aquest mutant.



**Figura 43.** Determinació de la interacció dels diferents mutants de fosforilació d'A2 amb la proteïna eEF1B.

Les cèl·lules HEK293T es van cotransfectar amb HA-eEF1B2 i Flag (Ctrl), Flag-A2, Flag-A2 S/A o Flag-A2 S/E. Al panell de l'esquerra es mostren els inputs, analitzats amb el anticòs anti-FLAG i el anti-HA (com a control de transfecció). Al panell de la dreta es poden veure els resultats de la immunoprecipitació.

### 10.2.2 Anàlisi de la funció traduccional en HEK293T

Per determinar si la fosforilació de la isoforma A2 afectava a la traducció en cèl·lules de mamífer es va utilitzar la línia HEK293T. Es van transfectar els mutants de fosforilació i es van tractar les cèl·lules amb puromicina. La puromicina és un anàleg d'estructura química de l'extrem 3' de l'aminoacil-tRNA de manera que pot interaccionar amb el ribosoma i bloquejar la traducció de proteïnes. Pocs minuts de tractament amb puromicina són suficients perquè s'uneixi al ribosoma i no provoqui mort cel·lular, això permet utilitzar-la per marcar les proteïnes de nova síntesi.

Després del tractament de puromicina les cèl·lules es van fixar i es va realitzar una immunofluorescència amb un anticòs anti-puromicina, que posteriorment va ser analitzada per microscopia (**figura 44**). Els resultats mostren que el mutant A2 S/A té una eficiència de traducció major que el mutant A2 S/E. No obstant, les diferències de traducció entre els mutants eren menors que les obtingudes en llevat. Això podria ser explicat pel fet que en aquestes cèl·lules, a diferència del llevat, no es va reduir l'expressió de la proteïna endògena.

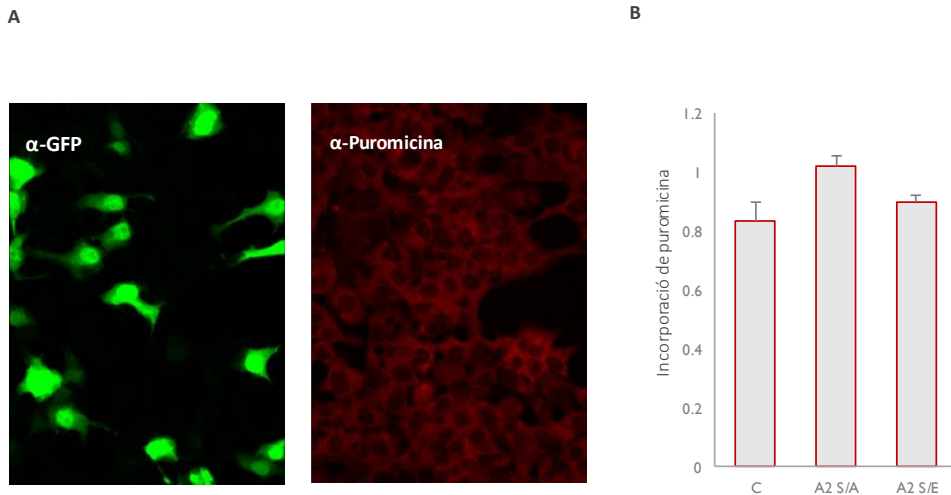


Figura 44. Quantificació de la incorporació de puromicina en els diferents mutants de fosforilació.

Les cèl·lules HEK293T van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E, es va afegir puromicina a les 24 hores. **A.** Imatge representativa de la senyal de GFP i de puromicina de cèl·lules HEK293T. **B.** El gràfic mostra la senyal de puromicina calculada fent un rati de la incorporació de puromicina en les cèl·lules transfectades entre la incorporació en les cèl·lules no transfectades de la mateixa fotografia.

### 10.2.3 Anàlisi de la funció traduccional reduint l'expressió de la proteïna endògena en cèl·lules N2A

Es va generar una línia de N2A estable utilitzant un shRNA contra el 3'UTR de la isoforma A2. Es va disminuir pràcticament del 50% de la proteïna A2 endògena (figura 45).

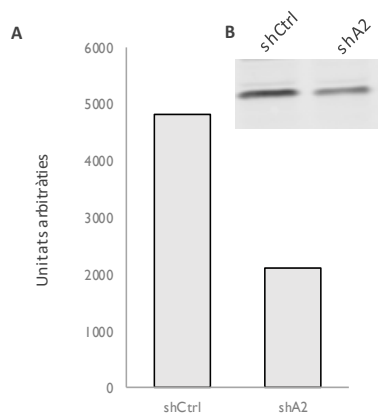
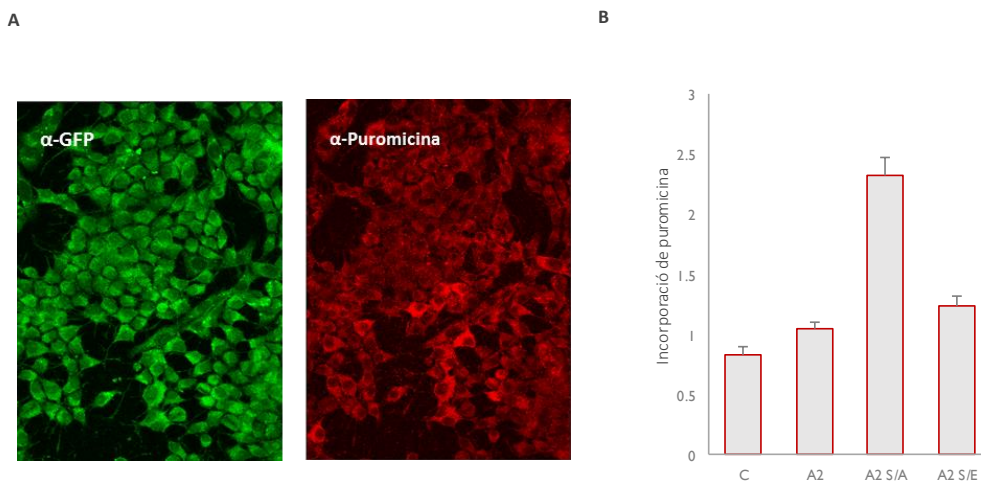


Figura 45. Quantificació de l'expressió de la isoforma A2 en la línia estable N2A shA2.

**A.** Quantificació de les bandes de western blot per *Image J*. La primera barra correspon a una cèl·lules N2A amb sh control, la segona són cèl·lules N2A seleccionades amb un shA2. **B.** Western blot de mostres N2A sh control i shA2 analitzades amb anticòs anti-A2.



En aquestes línies cel·lulars N2A shA2 es va realitzar el mateix experiment de determinació de la incorporació de puromicina (**figura 46**). Les cèl·lules N2A shA2 es van cotransfectar amb GFP i la isoforma A2 i els mutants de fosforilació fusionats amb HA. Al dia següent es van tractar amb puromicina i es va realitzar una immunofluorescència per determinar la incorporació d'aquesta. Els resultats van ser analitzats per microscopia amb el programa *Image J*. S'observa que al disminuir l'expressió de la proteïna A2 endògena les diferències són significativament més grans que en els experiments en HEK293T (**figura 44**).



**Figura 46.** Determinació de la incorporació de puromicina en la línia estable N2A shA2.

Les cèl·lules N2A van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E, es va afegir puromicina a les 24 hores. **A.** Imatge representativa de la senyal de GFP i de puromicina de cèl·lules N2A shA2. **B.** El gràfic mostra la mitjana dels ratios d'incorporació de puromicina de les cèl·lules transfectades entre la incorporació en cèl·lules no transfectades de la mateixa imatge.

## 11. Determinació de la fosforilació *in vivo* en neurones

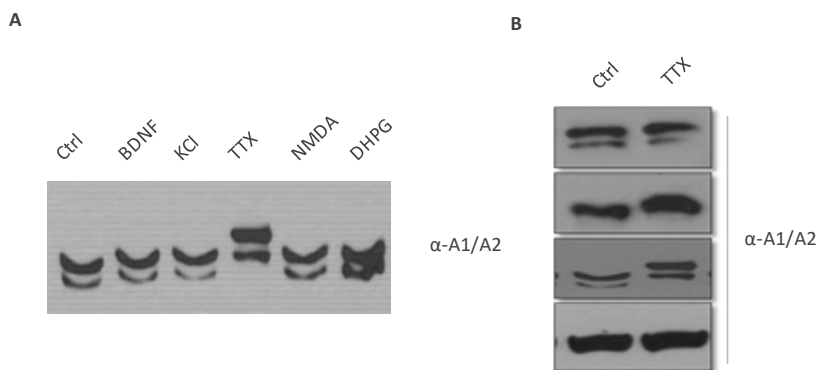
Els estímuls BDNF, KCl, TTX, NMDA i DHPG han estat descrits com a moduladors de la traducció de proteïnes via afectació de la fosforilació del factor d'elongació EF2 [82],[83],[84],[32]. Com s'ha explicat a l'apartat d'introducció, la fosforilació del factor eEF2 produeix una disminució de la traducció de proteïnes. Es van utilitzar aquests estímuls per estudiar la fosforilació *in vivo* en aquest cas de la isoforma A2.

Per realitzar aquests experiments es van utilitzar cèl·lules corticals d'embrions E17 que van ser tractades amb els diferents estímuls. Per determinar la fosforilació les mostres es van recollir i es va realitzar un western blot afegint phos-tag (**figura 47**). El phos-tag s'unirà als grups fosfats de la proteïna fent que aquesta corri amb un retard.

Es pot observar que les mostres tractades amb TTX corren amb un retardament (**figura 47A**), indicant una possible fosforilació del factor d'elongació en aquestes condicions. El TTX no solament ha estat descrit com a inhibidor de la traducció sinó que també afecta a la formació de fil·lopodis. Estudis previs mostren que tractaments amb TTX donen lloc a un increment en la llargada dels fil·lopodis [85]. Es considera per tant un bon candidat pel fet que presentava efectes tant en la traducció com en plasticitat estructural.

En els experiments de phos-tag es va utilitzar un anticòs que detecta les dues isoformes del factor d'elongació, per això es veuen dues bandes. La banda superior correspon a la isoforma A2 i la inferior a la A1 (l'efecte es veu en ambdues).

El procediment de determinació de fosforilació per phos-tag no era repetitiu, a continuació es mostra un recull de diferents repeticions de l'experiment amb les mateixes mostres (**figura 47B**).



**Figura 47.** Determinació de la fosforilació endògena del factor d'elongació A2 en cèl·lules corticals

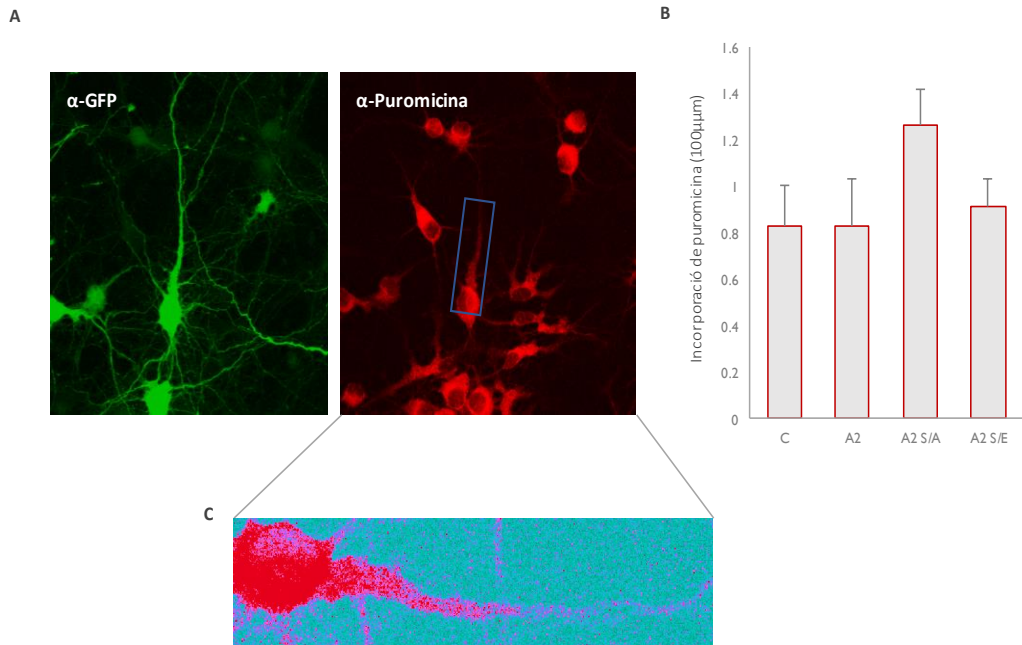
**A.** Les cèl·lules corticals de 20 DIVs es van tractar amb diferents estímuls: control, BDNF, KCl, TTX, NMDA i DHPG. Les mostres es corren en un WB amb phos-tag. **B.** En aquesta figura es mostren quatre western blots diferents en el que es van utilitzar les mateixes mostres: una mostra control (C) i una tractada amb TTX.

## 12. Estudi dels efectes de la fosforilació d'A2 sobre la traducció en neurones

### 12.1 Determinació de la traducció dels mutants de fosforilació amb puromicina

Atès que els resultats dels experiments de fosforilació de la proteïna endògena no eren concloents, es va decidir transfectar neurones d'hipocamp amb els mutants de fosforilació i es va realitzar un anàlisi de la incorporació de puromicina de la mateixa manera que es va fer en les cèl·lules N2A (**figura 46**). Per motius tècnics, a les cèl·lules

d'hipocamp no es va poder disminuir l'expressió de la proteïna endògena. Els resultats es poden observar a la **figura 48** on es determina la incorporació de puromicina en els primers 100µm de la dendrita ja que en 5 minuts de tractament la puromicina es troba únicament en el citosol i en els primers micròmetres de la neurita **figura 48C**.

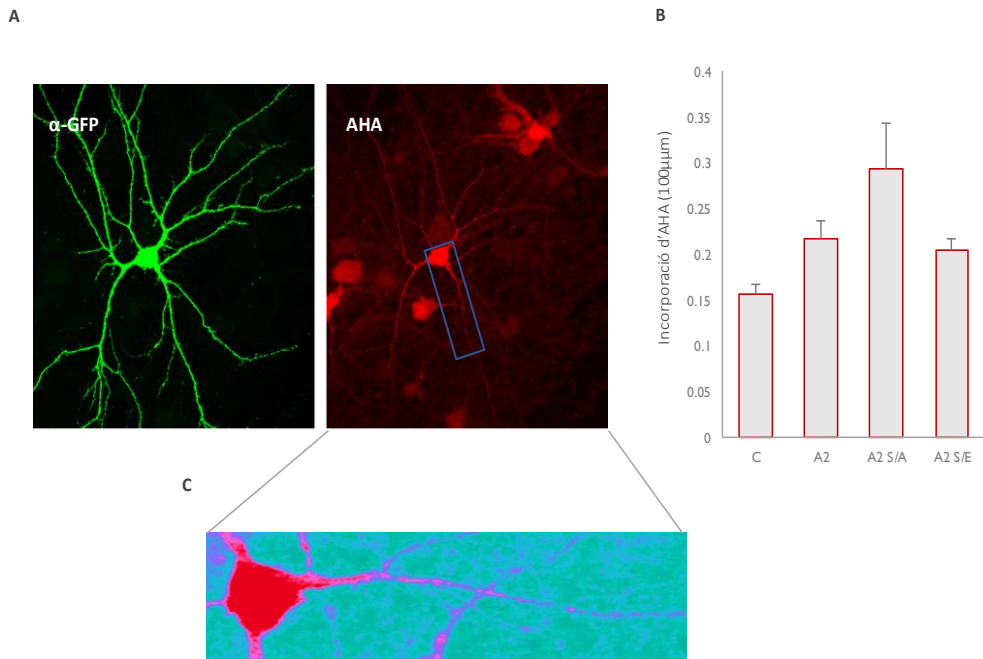


**Figura 48.** Determinació de la incorporació de puromicina en neurones d'hipocamp.

Les neurones d'hipocamp a 10 DIVs van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E, es va afegir puromicina a les 24 hores. **A.** Imatge representativa de la senyal de GFP i puromicina en una neurona transfectada amb A2. **B.** El gràfic representa la mitjana de la intensitat de puromicina fet relatiu a la intensitat de puromicina de cèl·lules no transfectades de la mateixa imatge. **C.** Ampliació d'una dendrita marcada en rectangle blau de l'apartat A. La imatge ha estat tractada amb el filtre *Ice* del programa *ImageJ*

## 12.2 Determinació de la traducció dels mutants de fosforilació amb AHA

Paral·lelament i amb la intenció de corroborar els experiments de puromicina es va realitzar un experiment d'incorporació de l'anàleg de metionina AHA (veure **materials i mètodes 8.2**). Per fer aquests tipus d'experiment es van transfectar les neurones d'hipocamp amb els diferents mutants i a les 24 hores es va afegir l'anàleg de metionina que s'incorporarà en totes aquelles proteïnes que s'estan sintetitzant de nou. Finalment amb una reacció que rep el nom de *reacció click-iT* s'uneix l'anàleg de metionina amb un fluoròfor que ens permetrà determinar la incorporació de metionina per microscopia (**figura 49**).

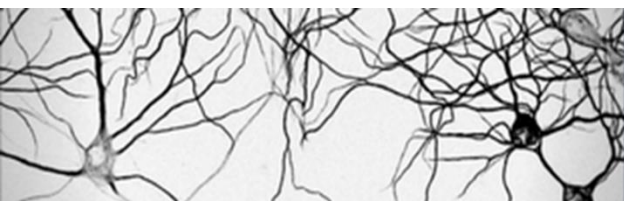


**Figura 49.** Estudi de la incorporació d'AHA en neurones d'hipocamp.

Les neurones d'hipocamp a 10 DIVs van ser cotransfectades amb GFP i un control (HA), HA-A1, HA-A2, HA-A2 S/A o HA-A2 S/E, es va afegir l'AHA a les 24 hores. **A.** Imatge representativa de la senyal de GFP i AHA en una neurona transfectada amb A2. **B.** El gràfic representa la mitjana de la intensitat d'AHA fet relatiu a la intensitat de puomicina de cèl·lules no transfectades de la mateixa imatge. **C.** Ampliació d'una dendrita marcada en rectangle blau de la figura A. La imatge ha estat tractada amb el filtre *Ice* del programa *ImageJ*

El material suplementari de la tesi es pot trobar a la carpeta suplementari.





## DISCUSSIÓ



## 1. Importància de l'aparició de dues isoformes del factor eEF1A en l'evolució

Una de les preguntes en ment de molts investigadors ha estat perquè una proteïna que té una funció tan conservada com és el factor d'elongació eEF1A, en algunes espècies (més desenvolupades) presenta dues isoformes pràcticament idèntiques a nivell d'estructura i de seqüència [46],[49]. La major part dels estudis sobre l'aparició de isoforma A2 són de tipus descriptiu, en els que es compara les dues isoformes i la seva expressió en els diferents teixits [46],[49],[86]. De moment no existeix cap estudi que doni una explicació funcional d'aquest bescanvi de isoformes en cervell.

En l'alineament entre les dues isoformes de ratolí observem canvis que impliquen substitucions de serines o treonines, apareixent quatre noves serines en el III domini de la isoforma A2 (S342, S358, S393 i S445). Aquests canvis suggereixen que la fosforilació pot tenir rellevància fisiològica. Si es comparen les seqüències d'aminoàcids de la isoforma A2 de diferents espècies, s'observa que de les quatre serines que apareixen en el III domini, la més conservada és la que correspon a la S358 de ratolí. **(material suplementari S5)**. A més, aquesta serina també està conservada en aquelles espècies que solament tenen una isoforma de la proteïna com és el cas del llevat i la drosòfila. Seria interessant fer un estudi per determinar si la fosforilació de cada una de les serines que apareixen en el III domini poden estar implicades en diferents funcions. El que està descrit fins ara és que el factor eEF1A està implicat en l'elongació de proteïnes però també està relacionat amb un conjunt de funcions no canòniques, entre les quals, les més estudiades han estat la unió al citoesquelet d'actina [87], l'apoptosi [88], el transport nuclear [89] i la degradació de proteïnes via proteosoma [90].

Una altra de les qüestions encara sense resoldre és perquè l'aparició de la isoforma A2 es dona solament en certs teixits com són el cervell, cor i múscul esquelètic. A priori, aquests teixits presenten una morfologia i una funció molt diferent, però és interessant observar quines característiques poden tenir en comú amb la intenció de poder esbrinar el perquè d'aquest bescanvi d'isoformes en aquests teixits.

Per una banda, una propietat comuna, és que tenen una proporció de cèl·lules (miòcits i neurones) totalment diferenciades que són incapaces d'entrar de nou en cicle [46]. Podria ser, per tant, que la isoforma A2 fos necessària en la diferenciació cel·lular atès que el seu patró d'expressió coincideix amb el patró de diferenciació neuronal (sinaptogènesi) en rata [51]. En referència a aquest possible efecte sobre la diferenciació cel·lular hi ha un estudi on observen que en cèl·lules musculars diferenciades quan es produeix dany muscular tornen a bescanviar la isoforma A2 per la A1. La reexpressió de la isoforma A1 reflecteix un retorn al patró embrionari de la cèl·lula [91]. A més, una altra evidència al respecte la trobem en el cervell on solament les cèl·lules terminalment diferenciades expressen la isoforma A2, mentre que les proliferants solament expressen la A1 [92].



D'altra banda, l'elevat nivell d'apoptosi que es produeix en el ratolí *Wasted mouse* és consistent amb la idea de que el factor A2 podria ser un inhibidor de l'apoptosi [93]. La seva expressió ectòpica en cèl·lules musculars les protegeix de l'apoptosi induïda per caspasa-3 [94]. Aquesta característica dóna suport també a la hipòtesis de que la seva expressió es dóna en cèl·lules totalment diferenciades i incapaces de tornar en cicle on pot ser que la inhibició de l'apoptosi pugui ser molt més necessària que en altres tipus cel·lulars.

Una altra característica que comparteixen aquests tres teixits, respecte les funcions no canòniques, és que són teixits amb cèl·lules on el citoesquelet d'actina es veu sotmès a canvis molt ràpids en resposta a l'ambient, ja sigui en l'aprenentatge (cervell) com en el moviment del cos (cor i múscul) [90],[95].

Existeixen molts estudis que mostren que la isoforma A1 pot interaccionar amb actina, la majoria d'ells han estat realitzats *in vitro* [63],[64],[65]. El nostre treball aporta noves dades sobre el factor A2 i la interacció amb actina. Hem demostrat el paper de les fosforilacions del III domini de la isoforma A2 en la interacció amb els filaments i en la formació de fil·lopodis i espines.

## **2. La fosforilació del III domini de la isoforma A2 i la interacció amb el citoesquelet d'actina**

En base als nostres resultats, la fosforilació del factor A2 a les serines S342, S358, S393 i S445 disminueix la capacitat d'unió al citoesquelet d'actina i, com a conseqüència, hi ha un increment en la formació de fil·lopodis. Aquest fet l'hem demostrat tant en cèl·lules HEK293T com en neurones d'hipocamp.

Els únics antecedents sobre la possible implicació del factor d'elongació en la formació de fil·lopodis han estat demostrats en cèl·lules tumorals [58],[96]. Tot i que no s'ha estudiat pròpiament el paper de la fosforilació del factor en càncer, els resultats que s'han publicat anteriorment encaixen amb els descrits en aquesta tesi.

Hi ha diferents estudis que relacionen la interacció del factor d'elongació amb el citoesquelet d'actina i el grau de metastasi. Tot i que no especifiquen la isoforma, el que s'ha identificat a nivell tumoral és que en cèl·lules cancerígenes la unió del factor d'elongació amb actina és menor [78]. En estudis comparatius del potencial metastàtic demostren que en cèl·lules de tumors més metastàtiques hi ha menys unió del factor amb actina respecte cèl·lules de tumors amb menys capacitat de fer metastasis [65]. En aquest mateix estudi postulen que quan el factor està unit a actina pot excloure la unió d'altres proteïnes amb aquesta [97] podent també afectar al dinamisme de l'actina (el grau de polimerització i despolimerització). La nostra hipòtesis és que en aquestes cèl·lules tumorals el factor A2 estaria fosforilat en les serines del III domini i, conseqüentment, uneix menys actina i forma més fil·lopodis. No obstant, per tal de corroborar els resultats aquí exposats, pot ser interessant analitzar el grau de

fosforilació a nivell tumoral per determinar el paper de les fosforilacions en oncogènesis.

Existeixen pocs estudis que expliquin la rellevància de la fosforilació del factor A2 sobre la interacció amb el citoesquelet d'actina. Alguns estudis mostren que la fosforilació del factor A1 per la quinasa Rho debilita la seva capacitat d'unió a actina essent la primera prova de que la fosforilació del factor pot provocar una disminució en la interacció amb aquesta [71]. D'altra banda, estudis en llevat demostren que la mutació puntual en Asn329Ser que corresponen a la Asn331 en A1 i al Ser331 en A2 redueix la desorganització del citoesquelet d'actina respecte al *wild type*, indicant una possible relació entre la fosforilació i l'actina [44]. No obstant, no existeix cap estudi en mamífers en relació a les quatre serines que apareixen en el III domini de la isoforma A2, i de si aquestes poden ser importants en la interacció amb el citoesquelet d'actina.

En aquesta tesi també s'ha analitzat l'efecte de les fosforilacions sobre la plasticitat estructural a les neurones. A l'inici del desenvolupament les neurones no fan sinapsis amb altres neurones, amb el temps es comencen a formar fil·lopodis que faran la funció de sensors a la recerca d'un axó pròxim. Hem demostrat que la fosforilació pot tenir una funció reguladora de la formació de nous fil·lopodis i sinapsis, essent per tant necessària en les primeres etapes del desenvolupament de les neurones. La fosforilació impedeix que el factor pugui formar xarxes de filament d'actina (*bundles*), facilitant per tant el seu dinamisme. Estudis previs confirmen que la formació de *bundles* d'actina per part del factor d'elongació produeix una disminució de la polimerització i del dinamisme d'aquesta [87],[98].

Diversos estudis mostren que és necessària una correcta estructura de l'actina per tal de que pugui haver-hi traducció [99]. Senyalen que l'addició de latrunculina A (molècula que desorganitza el citoesquelet d'actina) i ciclohexamida (inhibidor de la síntesis de proteïnes) tenen efectes equivalents en neurones. Demostrant que una correcta estructura del citoesquelet d'actina es necessària perquè és produeixi la síntesis de proteïnes [100]. Altres estudis correlacionen més directament la plasticitat estructural amb la traducció, utilitzen TTX (inhibidor del potencial d'acció) que està descrit que produeix una inhibició de la síntesis de proteïnes en neurones. Com a conseqüència del tractament amb TTX es produeix un increment en la formació de fil·lopodis. Això podria ser un mecanisme pel qual la cèl·lula, al inhibir la traducció de proteïnes a la sinapsis, afavoreix la formació de nous fil·lopodis amb l'objectiu de trobar altres axons amb els que connectar [85].

### 3. Rellevància de la fosforilació del III domini de la isoforma A2 en el control traduccional

La síntesis local de proteïnes a la sinapsis es un mecanisme que determinarà si un aprenentatge serà transitori o quedarà permanentment emmagatzemat al cervell. És per aquest motiu, que la traducció local ha estat molt estudiada [101],[102],[103].

La majoria d'estudis del control de la traducció es centren en la senyalització i la regulació dels factors d'inici. Tanmateix, cada vegada està adquirint una major importància el control de l'elongació perquè s'ha observat que molts dels mRNAs que viatgen silenciats a les espines en grànuls de mRNAs es troben aturats en aquest punt [45]. El factor més estudiat en la regulació de l'elongació ha estat el factor eEF2. La fosforilació d'eEF2 ha estat àmpliament descrita; aquesta, provoca una disminució de la traducció total de proteïnes [83],[104]. Diversos estudis han determinat el nivell de fosforilació d'aquest factor en processos d'aprenentatge i memòria [104],[105]. Particularment en el test d'aversion conegut amb el nom de CTA (*conditioned taste aversion*) analitzen l'estat de fosforilació de factors d'inici i el del factor d'elongació eEF2 en aprenentatge. Observen que quan el cervell es troba en condicions basals el procés limitant de la traducció és l'inici. No obstant, durant l'aprenentatge es produeix una inhibició temporal de l'elongació (observada amb un augment de la fosforilació del factor eEF2). Aquest fet té com a conseqüència una acumulació de factors d'inici fent que aquells mRNAs que tenen dificultats per ser iniciats (*poor initiators* mRNAs), amb estructures del 5'UTR complexes, es puguin traduir amb la mateixa facilitat que la resta. De manera que reduir l'eficiència d'elongació pot anar a favor de traduir una sèrie de mRNAs particulars [105] (**figura 50**). Per exemple, en sinaptoneurosomes l'estimulació de receptors de NMDA produeix una fosforilació del factor d'elongació eEF2 provocant una reducció d'un 50% de la síntesis de proteïnes però augmentant la de certs mRNA com la CAMKII [106].

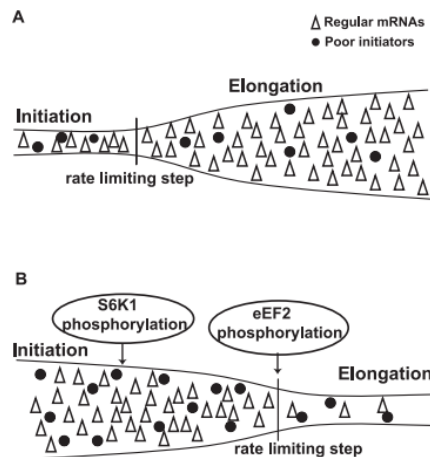


Figura 50. La regulació a l'inici o a l'elongació determina la traducció de poblacions de mRNAs específics [105].

Durant la consolidació de la memòria es dona un increment de l'inici i una disminució de l'elongació i això provoca una regulació de la traducció de diferents poblacions de mRNAs

Per tant, no hi ha una regulació exclusiva dels factors d'inici. El que es postula actualment és que es pot regular tant l'inici com l'elongació i depenent de la situació es permetrà la traducció d'un tipus o un altre de mRNAs. Possiblement, aquests bescanvi entre el control d'inici i elongació pot ser un mecanisme de control selectiu de la traducció local de proteïnes.

D'acord amb aquesta hipòtesi, hem observat que el mutant *fosfomimètic* d'A2 produeix una disminució de la traducció de proteïnes. Prèviament, investigadors van mostrar que la fosforilació en la Serina 300 del factor A1 també tenia aquest efecte. No obstant, aquesta serina és compartida entre ambdues isoformes. Les que hem descrit en aquest estudi solament hi són presents al III domini de la isoforma A2; podent per tant, ser necessàries en la regulació de la funció exclusivament del factor A2.

D'altra banda, podria ser que el nombre de serines que apareixen a la isoforma A2 sigui important per la seva regulació, considerant que els organismes més desenvolupats presenten més canvis de serines entre les dues isoformes. Sugerint que la complexitat de la funció de la isoforma A2 en aquests organismes requereix d'una regulació encara major.

Existeix algun estudi *in vitro* en *Dictyostelium discoideum* on proposen que el lloc d'unió al tRNA i el d'actina és el mateix, de manera que el factor no podria traduir i unir actina alhora [107]. Per contra, els experiments realitzats en el nostre laboratori semblen ser contraris a aquests últims, atès que quan generem les mutacions de les quatre serines

a alanina observem que es dona una major interacció amb actina així com un increment en la síntesis de proteïnes.

Altres estudis però sí que són coincidents amb els resultats aquí exposats. Per exemple, s'ha vist que en *Escherichia coli* es generen dímers del factor d'elongació durant la traducció de proteïnes. Aquest estudi mostra que són necessàries dues molècules del factor d'elongació per unir un tRNA i, en transferir el tRNA al ribosoma s'hidrolitzen dues molècules de GTP [108]. En aquesta tesi hem demostrat que la desfosforilació del factor A2 forma més dímers i té més capacitat de traducció

Estudis realitzats *in vivo*, mostren que el factor d'elongació pot unir a filament d'actina i al propi mRNA de la  $\beta$ -actina a la vegada amb una gran afinitat inclús quan està unit a la F-actina [67]. Indicant una possible dualitat de traducció i unió al citoesquelet [67], atès que posa en contacte el mRNA amb el citoesquelet que és un requisit per a que es doni la traducció. També s'ha vist que en LTP es produeix una redistribució del factor d'elongació a zones riques en actina filamentosa indicant que podria promoure la traducció d'aquells mRNAs que estiguin a prop del citoesquelet [109].

Altres estudis observen que hi ha diferències en la colocalització del factor d'elongació amb l'actina i els microtúbuls en funció dels requeriments traduccionals de les neurones. El model proposa que en neurones immadures el factor d'elongació podria tenir un paper més important en la traducció de proteïnes i en la regulació de la dinàmica de l'actina, és per això que hi ha una colocalització amb l'actina; per contra, en estadis tardans, el requeriment traduccional és menor i per això el factor es podria redistribuir als microtúbuls permetent una estabilització d'aquestes estructures [110].

No obstant, seria interessant discernir si totes quatre serines estan involucrades tant en la traducció com en la unió al citoesquelet d'actina. Estudis en llevat demostren que hi han mutacions del factor (en residus que no corresponen amb les serines aquí analitzades) que afecten a l'organització del citoesquelet d'actina però no a la traducció i viceversa [66]. En quant a aquesta idea en particular les mutacions N305S i N329S afecten al citoesquelet d'actina però no a la traducció, per contra mutacions en F308L i S405P afecten al citoesquelet d'actina i a la traducció de proteïnes [111]. Tenint en compte aquests resultats, si més no, pot ser necessari un anàlisi de les diferents serines aquí exposades, per determinar si totes poden regular tant el dinamisme de l'actina com la traducció.

### 3. Model

Basant-nos en els resultats exposats es proposa el següent model (**figura 51**): a l'inici de l'espino-gènesi, en el període de formació de fil·lopodis i les primeres espines dendrítiques predominaria la isoforma A2 fosforilada. En aquestes condicions la capacitat del factor d'interactuar amb actina seria menor i, això, li confereix a l'actina un major dinamisme permetent la formació de fil·lopodis. Segons la teoria fil·lopodial, el dinamisme del fil·lopodi és determinant per tal de que pugui trobar un axó d'una neurona veïna. El procés de formació d'espines madures es produirà quan es doni aquest contacte entre fil·lopodi i axó, és en aquest moment en el que la remodelació del citoesquelet d'actina esdevé necessari. La desfosforilació del factor A2 permetrà que aquest dimeritzi i, consegüentment, uneixi diferents filaments d'actina donant lloc a una estructura molt més estable. A més, la desfosforilació també permet la seva activació a nivell traduccional, consegüentment el factor A2 podrà traduir localment aquells mRNAs que hagin estat aturats en l'elongació a les espines dendrítiques.

Segurament durant aquest procés d'espino-gènesi hi haurà un balanç entre l'estat fosforilat i el no fosforilat de la isoforma A2 que podrà anar variant en funció dels requeriments. Per exemple, en processos de LTD on es produeix una inhibició de la síntesi de proteïnes i s'acaba donant lloc a la desaparició de l'espina, possiblement serà necessari que el factor d'elongació A2 desfosforilat torni al seu estat fosforilat; tal i com es produeix en el factor d'elongació EF2 [44]. Per poder confirmar la rellevància de la fosforilació en processos de LTD s'hauria d'analitzar el grau de fosforilació de la proteïna *in vivo*.

D'altra banda, també seria interessant analitzar si la fosforilació del III domini de la isoforma A2 permet interaccions amb altres proteïnes que li confereixin noves funcions. En aquest sentit, hi ha un estudi que mostra que en situació d'estres la quinasa JNK fosforila al factor A2 a les serines 205 i 358 (aquesta última és una de les que s'han analitzat durant la tesi) [73]. La fosforilació del factor A2 per JNK ajuda a la degradació d'aquelles proteïnes que han estat sintetitzada *de novo*. Aquesta degradació de les proteïnes en estrès és necessària ja que en aquestes circumstàncies tenen més probabilitat de plegar-se de manera incorrecta, essent, per tant la fosforilació del factor A2 un mecanisme de prevenció d'errors. Altres estudis també demostren que el factor d'elongació en resposta a estrès cel·lular té la capacitat d'entrar al nucli i exportar el factor de transcripció Snail [112]. En aquesta tesi hem demostrat que existeixen diferències en la localització dels mutants de la isoforma A2; observant que el *fosfomimètic* presenta marcatge nuclear. Es per això, que considerem que la fosforilació del factor podria tenir un paper actiu en l'aturada de la transcripció. El fet de que el factor d'elongació pot entrar el nucli i aturar la transcripció podria ser un bon mecanisme d'inhibició de síntesi de proteïna perquè actua per dues vies; per una banda transportant el factor d'elongació al nucli (evitant l'elongació de proteïnes) i per una altra, ajudant a exportar fora del nucli factors com Snail (per inhibir la

transcripció). Seria interessant per tant, investigar la possibilitat de que aquesta fosforilació pugui també afectar a la transcripció.

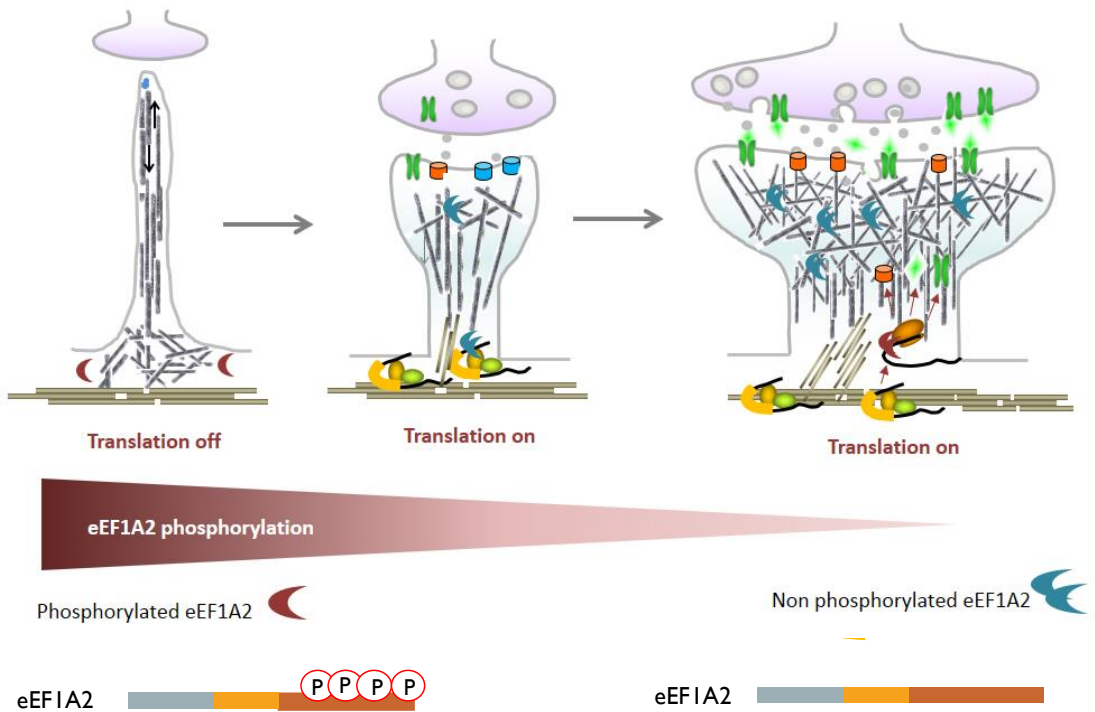
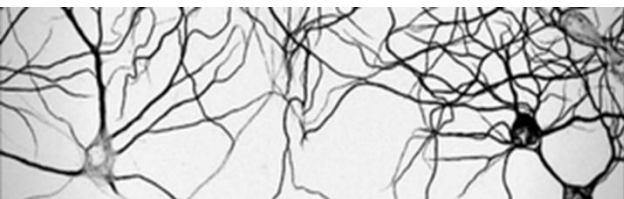


Figura 51. Model: Efecte de les fosforilacions del factor A2 sobre la plasticitat sinàptica.



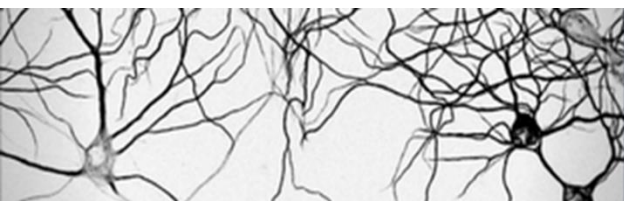
## CONCLUSIÓ





- 1- La fosforilació del III domini del factor d'elongació eEF1A2 està implicada en la plasticitat estructural ajudant a la formació i dinamisme de fil·lopodis i a l'espino-genèsi.
- 2- La dimerització del factor d'elongació eEF1A2 ajuda a la interacció amb el citoesquelet i a la formació de *bundles* d'actina. L'estat desfosforilat de la proteïna incrementa la formació de dímers.
- 3- La fosforilació del III domini del factor d'elongació eEF1A2 actua com a mecanisme de control traduccional.
- 4- El factor eEF1A2 fosforilat presenta menys afinitat amb la proteïna GEF eEF1B i redueix la síntesi de proteïnes.





## MATERIALS I MÈTODES



## 1. Cultius

### 1.1 Cultius primaris

En aquesta tesi es van utilitzar cultius primaris de cèl·lules corticals i hipocampals d'embrions de ratolí de 17 dies i mig de gestació. Les plaques i cubreobjectes van ser tractats amb poli-d-lisina (sigma P7886) diluïda a 0.5µg/mL en una solució de boricborat a pH 8.5 que es mantenien a 37°C tota la nit, aquest tractament permet preparar la superfície per una correcta adhesió de les neurones. Al dia següent les plaques es rentaven 5 vegades amb aigua miliQ per eliminar tota la poli-d-lisina que no havia quedat adherida a les plaques ja que aquesta poli-d-lisina sobrant és letal per a les neurones. Un cop rentades les plaques se li afegia **medi de plaqueig** (MEM (Fisher 31095029, FBS 10% (Cultek 91S1810), glucosa 0.6%, penicil·lina/estreptomicina). Les plaques es mantenien a l'incubador durant tot el temps de la realització del cultiu (que és aproximadament d'una hora).

Un cop preparades les plaques es procedia a realitzar el cultiu. S'ha de tenir en compte que el temps des de que l'animal ha estat sacrificat fins que les cèl·lules es planten ha de ser el menor possible per tal de mantenir les cèl·lules en unes condicions òptimes. Per a l'obtenció de cèl·lules corticals primer s'han d'aïllar els cervells dels embrions. La dissecció es realitzava utilitzant fòrceps i bisturí en **medi de dissecció** fred (HBSS (VWR X0507), glucosa 0.6%, penicil·lina/estreptomicina (Fisher 15140122)). Un cop obtinguts els cervells se separaven els dos còrtexs del tronc encefàlic i finalment s'extirpaven les meninges tal i com es mostra a la següent imatge.

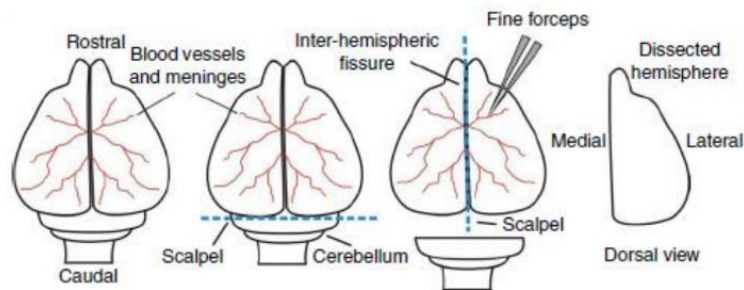


Figura 52. Descripció del procés de separació dels dos hemisferis del cervell.

Als cultius de neurones hipocampals s'agafaven els còrtex i sota una lupa es separaven els hipocamps.

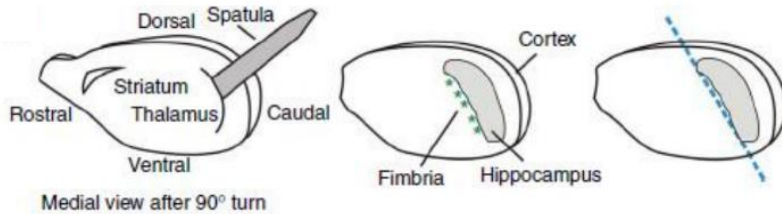


Figura 53. Descripció del procés de dissecció d'hipocamps.

Les cèl·lules es dissociaven primerament amb el que denominem disgregació química que consisteix en afegir tripsina (Fisher 15090046) a 0.25% i DNAsa (sigma DN25) a 0.2mg/ML durant 15 minuts a 37°C. Passats els 15 minuts es feien tres rentats amb el medi de plaqueig. A continuació es realitzava una disgregació mecànica amb una pipeta Pasteur polida amb un diàmetre més petit per dissociar les cèl·lules. Per evitar danyar-les al màxim es passaven les cèl·lules uns 10 cops evitant fer escuma. Finalment es contaven les cèl·lules i es plantaven a les plaques que s'havien preparat prèviament.

A la següent taula es mostren les diferents concentracions en les que es plantaven les neurones en funció de l'experiment a realitzar.

Plaques	Utilització	Volum del medi	Cèl·lules plantades
<b>4 pouets</b> (Fisher 10507591)	Microscopia	500µL	50.000
<b>IBIDIS</b> (Inycom 81156)	Microscopia (vídeos)	2mL	100.000
<b>12 pouets</b> (Fisher 11889684)	Comprovació de virus	1mL	250.000
<b>100mm</b> (Fisher 10075371)	Bioquímica	10mL	2·10 <sup>6</sup>

Un cop plantades les neurones es deixaven a l'incubador durant dues hores, passat aquest temps s'aspirava el medi i s'afegia un **medi de manteniment** (Neurobasal (Fisher 21103049), 2% B27 (Fisher 17504044) i 1% glutamax (Fisher35050) penicil·lina/estreptomicina). En el moment que es plantaven corresponen a 0 dies in vitro (DIVs). A partir d'aquí es començava a contar els dies que havien de romandre a l'incubador. S'ha de tenir en compte que depenent de l'experiment que es realitzava les neurones havien d'estar en un determinat punt de maduració i per tant s'havia d'esperar a que arribessin a un determinat numero de DIVS.

## 1.2 Cultius de línies cel·lulars

Es van utilitzar dos tipus de línies cel·lulars: les **Neuro2A** (N2A), que són cèl·lules que provenen de neuroblastoma de ratolí, i les **HEK293T** (*Human Epithelial Kidney 293 Transformed*). Les N2A es van triar perquè tot i que no fan sinapsis expressen gens neuronals i permeten tenir unes condicions similars a les presents a les neurones. Les HEK293T es van triar ja que degut a la seva fàcil transfecció són idònies per experiments de tipus bioquímic on era necessari un gran nombre de cèl·lules transfectades.

Per ambdues línies es va utilitzar el medi DMEM (VWR L01014) complementat amb 10% de *Fetal bovine serum* (cultek 91S1810) i penicil·lina/estreptomicina (Fisher 15140122). Les cèl·lules es dividien dos cops per setmana: es netejava amb PBS prèviament escalfat a 37°C, a continuació s'afegia 1mL de tripsina (VWR L0931) per desenganxar les cèl·lules de la placa. Un cop desenganxades es recollien en medi DMEM, es centrifugaven a 200g durant 5 minuts, es descartava el sobrenedant i el *pellet* es resuspensia en DMEM diluint el cultiu 10 o 20 cops. Per a les transfeccions es plantàvem a una densitat de  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules per plaques de 100mm.

## 2. Construcció de vectors

Els plàsmids es van amplificar a partir de *Escherichia coli* DH5α que creixien a 37°C durant tota la nit i s'obtenia el DNA a través del Kit Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel 740588). Les PCRs es van realitzar amb la polimerasa *Phusion High Fidelity DNA polymerase* (Fisher 10024537) seguint el protocol del fabricant. Les restriccions, lligacions i transformacions es van realitzar segons els protocols descrits en *Current Protocols in Molecular Biology* [113].

### Vectors utilitzats:

Tal i com s'explica a l'**apartat 1 de resultats**, apareixen 4 serines a la isoforma A2 que no hi son en la A1. Són aquestes 4 serines les que es van mutar a glutàmic (S342, S358, S394 i S445).

Plàsmids	Contingut	Obtenció
pcDNA3	Vector d'expressió amb promotor CMV	Invitrogen
pNBM470	Expressa HA sota el promotor CMV	Clonat al laboratori
pNBM470-Ef1a1 WT	Expressa HA-A1 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
pNBM470-Ef1a2 WT	Expressa HA-A2 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori



<b>pNBM470-Ef1a2 S/A</b>	Expressa HA-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1a2 S/E</b>	Expressa HA-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1a1 WT</b>	Expressa HA-A1 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1a2 WT</b>	Expressa HA-A2 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1a2 S/A</b>	Expressa HA-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1a2 S/E</b>	Expressa HA-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pNBM470-Ef1b2</b>	Expressa HA-Ef1b2	Clonat al laboratori
<b>pcDNA3-Flag</b>	Expressa FLAG sota CMV	Clonat al laboratori
<b>pcDNA3-eEF1A1 WT</b>	Expressa FLAG-A1 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pcDNA3-eEF1A2 WT</b>	Expressa FLAG-A2 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pcDNA3- eEF1A2 S/A</b>	Expressa FLAG-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pcDNA3- eEF1A2 S/E</b>	Expressa FLAG-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pGEX-KG</b>	Vector d'expressió GST sota el promotor Tac	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A1 WT</b>	Expressa GST-A1 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 WT</b>	Expressa GST-A2 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 S/A</b>	Expressa GST-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 S/E</b>	Expressa GST-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (proteïna sencera)	Clonat al laboratori

<b>pGEX- eEF1A1 WT</b>	Expressa GST-A1 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 WT</b>	Expressa GST-A2 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 S/A</b>	Expressa GST-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pGEX- eEF1A2 S/E</b>	Expressa GST-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP-C3</b>	Expressa GFP sota promotor...	Cedit per un altre laboratori
<b>pEGFP- eEF1A1 WT</b>	Expressa GFP-A1 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 WT</b>	Expressa GFP-A2 <i>wild type</i> (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 S/A</b>	Expressa GFP-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 S/E</b>	Expressa GFP-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (proteïna sencera)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A1 WT</b>	Expressa GFP-A1 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 WT</b>	Expressa GFP-A2 <i>wild type</i> (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 S/A</b>	Expressa GFP-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pEGFP- eEF1A2 S/E</b>	Expressa GFP-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic (III domini)	Clonat al laboratori
<b>pET28a</b>	Expressa His tag sota el promotor T7	Cedit per un altre laboratori
<b>pET28a- eEF1A1 WT</b>	Expressa His-A1 <i>wild type</i>	Clonat al laboratori
<b>pET28a- eEF1A2 WT</b>	Expressa His-A2 <i>wild type</i>	Clonat al laboratori
<b>pET28a- eEF1A2 S/A</b>	Expressa His-A2 amb les 4 serines mutades a Alanina	Clonat al laboratori

<b>pET28a- eEF1A2 S/E</b>	Expressa His-A2 amb les 4 serines mutades a Glutàmic	Clonat al laboratori
<b>pFUGW+GFPsh eEF1A2</b>	Vector lentiviral que expressa shEf1a2 TRCN0000193188	Col·lecció del parc científic
<b>TEF1 en YEp195</b>	TEF1 expressat en YEp195	Clonat al laboratori
<b>TEF1 S356A en YEp195</b>	TEF1 expressat en YEp195 amb la S356 mutada a Alanina	Clonat al laboratori
<b>TEF1 S356E en YEp195</b>	TEF1 expressat en YEp195 amb la S356 mutada a Glutàmic	Clonat al laboratori

### 3. Transfeccions

#### 3.1 Transfeccions de cèl·lules hipocampals

Per a la transfecció de cèl·lules hipocampals es va utilitzar el kit *CalPhosMammalian Transfection Kit* (condalab 631312). Es van seguir amb algunes modificacions el protocol publicat a *Nature* [114].

#### 3.2 Transfecció de línies cel·lulars

Per a la transfecció de HEK293T i N2A es va fer servir Lipotransfectina (Attendbio LTF-1ml) seguint estrictament les instruccions del fabricant.

### 4. Immunoprecipitació

Les immunoprecipitacions realitzades en aquesta tesi han estat fetes a partir de línies cel·lulars de HEK293T i N2A transfectades. Un cop les cèl·lules havien estat transfectades s'esperava 24 hores i es recollien amb un **tampó de lisis** (aigua mQ, 20mM HEPES-KOH (pH 7.5), 125mM NaCl, 0.1% NP40, 1mMEDTA, complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001)). Es sonicaven 10 segons fent tres repeticions amb una amplitud de 10% (sempre a 4°C). Posteriorment es centrifugava 10 minuts 16000g a 4°C. El sobrenadat es separava i s'afegien les *beads* de FLAG (sigma A2220), que prèviament havien estat rentades en el mateix tampó de lisis 3 cops, per tal de condicionar-les al mateix medi al qual estaven les mostres. S'afegien les *beads* (50µl de *beads* per mostra) i es deixaven rodant a 4°C durant 2h. Passades les dues hores es feien tres rentats amb el mateix tampó de lisis. A l'últim rentat s'afegia 2xSSR a les mostres i es congelaven per el seu posterior anàlisi per western blot.

## 5. Purificació de proteïnes

La purificació de proteïnes es va realitzar a partir de bacteri (soca BL21). Per aquest motiu era necessari retransformar els plàsmids que es necessitaven a BL21. Un cop retransformat es picaven tres colònies i es deixaven créixer en medi LB amb l'antibiòtic corresponent (20ml durant tota la nit a 37°C en agitació).

Al dia següent es diluïa el cultiu 50 cops i s'afegia 10% de glicerol i es deixava a 30°C de 2 a 3 hores en agitació fins a una  $OD_{600}=0.2-0.3$ . Arribada a aquesta OD s'induïa amb IPTG (sigma I6758) a 0.4mM i es deixaven créixer entre 6 i 8 hores (depenent de l'experiment) a 25°C. Es centrifugaven les mostres a 10.000g 15 minuts i es congelaven els *pellets* a -80°C. Al dia següent es procedia a l'extracció de proteïna que era diferent en funció del plàsmid.

### 5.1 Purificació de proteïnes per plàsmids GST

Es descongelaven els *pellets* i es resuspenien amb el **tampó GSB** (25mM potassium Hepes pH 7.5, 0.3M KCl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 10%glicerol, 1mM DTT, complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001). Es sonicava 4 vegades 1 minut amb una amplitud del 10%. Es centrifugava 10 minuts 4°C 16000g i, al sobrenedant s'afegien les *beads* de glutatió (Fisher 11594935) que prèviament havien estat rentades amb el mateix tampó GSB. Es deixaven rodant 2h, i passades les dues hores es rentaven 3 cops amb el tampó de lisis. Finalment s'afegia 5% de glicerol i es congelaven. En el cas que es volguessin eluir s'utilitzava el següent **tampó d'elució** (40mM GSH (G4251), 20mM NaCl, 0.5mM DTT, 65mM Tris pH 8 i 0.1% NP-40 (sigma NP40S).

### 5.2 Purificació de proteïnes per a plàsmids HIS

Es descongelaven els *pellets* i es resuspenien amb el següent **tampó de lisis** (50mM TRIS-HCL pH 7.5, 500mM NaCl, 1% Triton-X100 (sigma T8787), 10mM 2-mercaptoetanol (Fisher 10265220), 20mM Imidazol (sigma I5513), complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001)). Es sonicava 4 vegades d'1 minut amb una amplitud del 10%. Es centrifugava 10 minuts 4°C 16000g i, al sobrenedant s'afegia les *beads* d'histidina NI-NTA (sigma P6611) que prèviament havien estat rentades i equilibrades en el mateix tampó de lisi. Es deixen rodant 2 hores a 4°C, a continuació es feien dos rentats amb el **tampó de rentat 1**, dos rentats més amb el **tampó de rentat 2**, després dos rentats amb el **tampó de rentat 3**. Finalment es realitzava un quart rentat amb el **tampó de rentat 4**. Si es volia eluir era necessari fer dues elucions amb **tampó d'elució**.

Tampó	Contingut
<b>Tampó de rentat 1</b>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5, 50mM NaCl, 20mM Imidazol, 5mM 2-mercaptoetanol, 2% tritó i 5% glicerol
<b>Tampó de rentat 2</b>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5, 20mM Imidazol, 5mM 2-mercaptoetanol, 1M NaCl i 5% glicerol.
<b>Tampó de rentat 3</b>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5, 50mM NaCl, 20mM Imidazol, 5mM 2-mercaptoetanol i 5% glicerol.
<b>Tampó de rentat 4</b>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5, 50mM NaCl, 50mM Imidazol, 5mM 2-mercaptoetanol i 5% glicerol
<b>Tampó d'elució</b>	50mM TRIS-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 1% Trito-X100, 10mM 2-mercaptoetanol, complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001), 250mM Imidazol, 5% glicerol.

Per els experiments de *bundling* era necessari que la proteïna estigués en unes condicions molt pures de manera que després de la producció de proteïna es dialitzaven (Fisher 10250054) durant tota la nit en el següent **tampó de diàlisi**: 20mM TrisHCl pH 7.6, 150mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT, 25% glicerol, 1mM ATP (sigma A3377), 1mM PMSF (A3377).

## 6. Obtenció de sinaptoneurosomes de cèl·lules corticals

Les cèl·lules corticals es van rentar dos cops amb PBS-MC (1mM MgCl, 0.1mM CaCl) i es va recollir en un **tampó d'homogenització** (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl, 1.53mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 212.7mM glucosa, 1mM DTT pH 7,4, inhibidors complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001)). Les cèl·lules recollides van ser homogeneïtzades amb l'ajuda d'un *Douncer*. Es van fer quatre passades suaus en gel i es va filtrar l'homogenat. Primer es va filtrar a través de dos filtres de 100µm de nylon (Millipore ref NY1H02500) i dos més de 5µm de PVDF (Millipore SVLP02500). Es va centrifugar 1000g 10 minuts a 4°C. Els sinaptoneurosomes quedaven al *pellet* i per obtenir-los s'havia de resuspendre amb el tampó d'homogenització. Finalment s'afegia 2XSSR i es congelaven pel seu anàlisi per WB.

## 7. Western Blot

Les proteïnes es separaven per mides en un gel d'electroforesis, un cop havien estat separades es transferien a una membrana de PVDF (Fisher 10452792) durant 1 hora.

Després de ser transferides les proteïnes havien estat transferides es bloquejava la membrana durant una hora en llet diluïda al 5% en **PBS-T**. Posteriorment, es rentava la membrana tres cops amb PBS-T i s'afegia l'anticòs primari diluït en el **tampó I**. Depenent de l'anticòs es va fer servir en una dilució determinada durant 1h.

Anticossos primaris	Casa comercial	Dilució
$\alpha$ HA	Roche 11583916001	1/1000
$\alpha$ FLAG	Sigma F3165	1/1000
$\alpha$ A1/A2 (detecta les dues isoformes)	Millipore 05-235	1/200
$\alpha$ A2 (detecta solament la isoforma A2)	Abyntec LS-C102299	1/200
estreptavidina	Life Technologies S32351	1/1000
$\alpha$ Tubulina	T5168	1/1000

Un cop havia passat el temps corresponent amb l'anticòs primari es feien 3 rentats de 15,10 i 5 minuts corresponentment amb PBS-T. Després del rentat s'afegia l'anticòs secundari en una dilució 1:10.000 en el **tampó I**.

Anticossos secundaris	Casa comercial	Dilució
IRDye 680 RD	LI-COR Bioscience (926-68070)	1:10.000
IRDye 800 CW	LI-COR Bioscience (926-32210)	1:10.000
Proteïna A/G marcada amb HRP	ThermoFisher (32490)	1:10.000
IRDye 800CW Streptavidina	LI-COR Bioscience (PN926-32230)	1:10.000

Finalment es tornen a fer tres rentats amb PBS-T de 15,10 i 5 minuts.

Tampó	Contingut
PBS-T	PBS 20Mm, 0.1% Tween (Fisher 10113103)
Tampó I	Llet 0.25% en PBS-T

## 8. Assajos d'interacció amb actina

En aquesta tesi s'han realitzat dos tipus d'assajos d'interacció a actina. Assajos d'unió a actina (*binding*) i assajos de *bundling* (on s'analitza la capacitat que té la proteïna d'arreglar filaments d'actina formant feixos).

### 8.1 Assajos d'unió (Binding)

#### Assaig d'unió a actina en HEK293T

Primerament les cèl·lules es van transfectar amb els mutants que es volien analitzar. Al dia següent es van recollir en el següent **tampó de recollida** (20mM Tris-HCl pH 7, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 1% tritó, 0.2mM DTT, 2mM EGTA i complete EDTA free (Roche 05056489001) i una pastilla de PhosSTOP (Roche 04906837001)). Les mostres es van sonicar 3 cops amb un amplitud del 10% i es van centrifugar a 4°C 10 minuts 16.000g. Es va afegir al sobrenedant actina unida a biotina (labnet CY-AB07-A-5) que prèviament havíem preparat seguint les instruccions de la casa comercial. Es va barrejar bé i es va deixar rodant tota la nit. Al dia següent es van afegir les *beads* d'estreptavidina (Fisher 11875835) prèviament equilibrades i rentades en el mateix **tampó de recollida**. Les mostres es van deixar en rotació 2 hores a 4°C. Finalment es van realitzar 5 rentats amb PBS i en l'últim es va afegir a les *beads* directament 2xSSR i es va fer l'anàlisi per WB.

### 8.2 Assajos de *bundling*

Per aquest experiment les proteïnes es van purificar unides a histidines ja que vam comprovar que si les proteïnes estaven fusionades amb GST l'experiment no funcionava.

Es va utilitzar 250µg d'actina (Labnet CY-AKL95) i es va resuspendre en 1µg/µL en el **tampó general d'actina** (5mM Tris pH 8, 0.2mM CaCl<sub>2</sub>). Es va incubar durant 30min a 4°C. Passat aquest temps, es va afegir 25µL de **tampó de polimerització** (500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ATP, 100mM Tris pH 7) i es va incubar a temperatura ambient durant 1 hora. En aquestes condicions s'obté actina filamentosa i està a 23µM.

Un cop es tenia preparada l'actina i les proteïnes que s'havien d'analitzar es feia una centrifugació prèvia per a que pogués precipitar tot el que no fos soluble (16.000g 10 min).

Es preparaven els tubs amb actina 1µM i es va afegir 0.25µM de proteïna. Es va incubar 30 minuts a temperatura ambient i les mostres es van centrifugar a 4.000g 5 min. Finalment, es van separar els sobrenedant dels *pellets*. El *pellet* es va resuspendre en 30µL d'aigua i es va afegir 2xSSR i als 30µL de sobrenedant es va afegir també els 30µL de 2XSSR. De manera que ambdues mostres poguessin ser comparables. Finalment les mostres es separaven per electroforesi i es va quantificar la quantitat que havia en el *pellet* i en el sobrenedant.

## 9. Phos-tag

El Phos-tag és una molècula que s'uneix específicament als ions fosforilats i s'utilitza per determinar la fosforilació de proteïnes.

Per fer aquest experiment es van utilitzar cèl·lules corticals de 20DIVS. Dos dies abans de l'experiment es van deprivar els medis per tal de reduir els estímuls que es donen entre les neurones; 48 hores abans de l'experiment es va canviar la meitat del seu medi per Neurobasal i el suplement B27 (però sense glutamax), a les 24hores es va canviar el 90% del medi per Neurobasal sense suplementar el B27.

Estímul	Concentració	Temps (minuts)	Funció
<b>BDNF</b>	200ng/ml	20	Activa els receptors TrK
<b>KCl</b>	25mM	5	Despolaritza la membrana
<b>TTX</b>	2µM	12hores	Inhibeix la propagació dels potencials d'acció, a través del bloqueig dels canals de sodi depenent de voltatge
<b>NMDA</b>	30µM	5	Activa els receptors de glutamat NMDA
<b>DHPG</b>	50µM	5	Agonista dels receptors metabotrópics del grup I

Les mostres es van recollir amb 1XSR i es van analitzar per western blot. A diferència d'un western normal, per els experiments de phos-tag va ser necessari realitzar un gel especial amb la següent composició:

<i>Running</i>	<i>Stacking</i>
H2O 1.64mL	H2O 1.725mL
Tris 1M pH 8, 1.87mL	Tris 1M pH 6.8, 3.12µL
SDS 10% 50µL	SDS 10% 25µL
Acrilamida 1.17mL	Acrilamida 425µL
Phos-tag 20µL (Rafter 300-93523)	PA 10% 25µL
MnCl <sub>2</sub> 10mM 50 µL	TEMED 2.5µL
PA 10% 70µL	
TEMED 14µL	



Després de l'electroforesi era necessari passar la membrana per un **tampó de transferència** amb 10mM EDTA per eliminar el MnCl<sub>2</sub> després es va fer un rentat sense EDTA i es va transferir. A partir d'aquí es va bloquejar amb llet i es va continuar amb el protocol normal de western blot.

## 10. Assajos d'anàlisi de proteïna de nova síntesis

### 10.1 Puomicina

La puomicina és un antibiòtic d'ampli espectre, la seva importància en l'estudi de la síntesis de proteïna radica en que és un anàleg d'estructura química de l'extrem 3' del aminoacil-tRNA i per això es capaç de interaccionar amb el ribosoma.

Després de transfectar les cèl·lules era necessari esperar 24 hores per poder realitzar els experiments de puomicina. Per l'assaig es va afegir 1µM de puomicina (Sigma P8833) i 1µM d'emetina (sigma P8833) que s'incubaven a 37°C durant 5 minuts i es feien dos rentats de PBS.

Les cèl·lules es van fixar en PFA (paraformaldehid) 4% i sucrosa 4% durant 20 minuts a temperatura ambient. A continuació es feien 3 rentats amb PBS, en l'últim s'afegia tritó 0.1% per permeabilitzar la membrana. Es van realitzar dos rentats més amb PBS i es va bloquejar amb normal goat serum 5% (Fisher PCN5000) en PBS durant 30 min. A continuació s'afegia l'anticòs primari αPuomicina (Millipore MABE343) diluït 1/1000 i s'incubava durant 2h.

Es feien 3 rentats més amb PBS i s'afegia l'anticòs secundari 1:2000. Finalment, 3 rentats més amb PBS i es preparaven els cubreobjectes amb una solució de muntatge de 50% glicerol en 0.1x PBS.

### 10.2 AHA

L'AHA (L-azidohomoalaine) (invitrogen C10102) és un anàleg de la metionina que conté un grup azida. Aquesta molècula s'afegeix als cultius i es incorporada a les proteïnes que s'estan sintetitzant de nou. Un cop passades les 24 hores de la transfecció de les cèl·lules, se'ls hi canviava el medi per un medi DMEM sense metionina (LifeTechnologies 21013024) durant 30 minuts. A continuació s'afegia la molècula AHA (4mM durant 4 hores). Passades les 4 hores es feien 3 rentats amb PBS i es fixaven amb PFA.

Les cèl·lules es bloquejaven amb una **solució de bloqueig** (10% *normal horse serum*, 5% sucrosa, 2% *bovine serum albumin* (BSA), en PBS 7.4) durant 1.5h. Es van fer tres rentats de 10 minuts amb PBS a un pH 7.8.

A continuació es realitzava una reacció que rep el nom de click-iT. Aquesta reacció es dona entre un grup azida i un grup alquí. El grup Azida el conté la molècula d'AHA i el

alquí estarà unit a un fluoròfor . Quan es produeix aquesta reacció aquests dos grups queden units i això ens permetrà detectar la metionina que s'ha incorporat a la mostra.

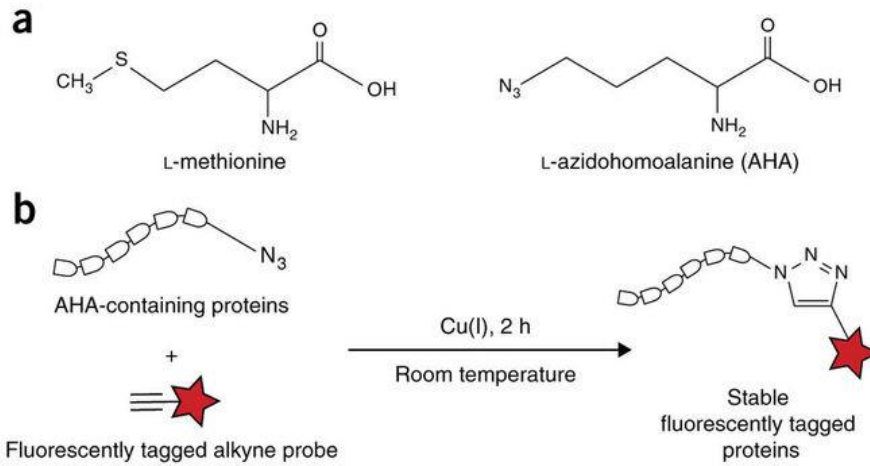


Figura 54. Resum del mecanisme d'incorporació d'AHA a les proteïnes [115] .

a. AHA és una anàleg de la metionina que conté un grup azida. b. En la reacció click-IT el grup azida de la molècula AHA i el grup alquí del fluoròfor quedaran units permetent marcar les proteïnes de nova síntesi.

Per fer aquesta reacció es necessari que les mostres estiguessin protegides de la llum. Per preparar-ho s'utilitzaven falcons de 15 ml on s'afegia 5ml de medi PBS pH 7,8, 5 $\mu$ L de 200mM Tris((1-Benzyl-1H-1,2,3-Triazol-4-yl)Met (TBTA) (sigma 678937), 5 $\mu$ L de 500mM Tris(2-Carboxyethyl) Phosphine hydrochloride (TCEP) (C4706), 0,5 $\mu$ L de 2mM fluoròfor alquí i 5 $\mu$ L de 200mM CuSO<sub>4</sub>. Era molt important seguir aquest ordre i vortexar després d'haver afegit cada una de les solucions.

Els cubreobjectes es van incubar cap per avall tocant aquest solució. Per fer-ho era necessari afegir uns puntets de parafina de manera que els cubreobjectes quedessin a una distància del plàstic sense arribar a tocar-lo. La reacció es deixava durant tota la nit. Al dia següent es feien 3 rentats amb PBS pH 7.4. Finalment les mostres eren analitzades per microscopia.

### 10.3 Experiments d'incorporació de metionina en llevat

A les soques de llevat amb el *knock out* del gen TEF1 i el gen TEF2 sota un promotor de metionina es van sobreexpressar els mutants TEF1 wt, TEF1 S356A i TEF1 S356E. Aquestes soques van créixer durant tota la nit en un medi sense metionina.

Al dia següent s'inoculen a un medi de 100ml amb metionina a una OD inicial de 0.2. Això correspon a temps 0. S'agafaven 5 OD es centrifugaven i es resuspensia el *pellet* en

1ml de medi sense metionina. S'afegia metionina marcada amb  $S^{33}$  5 minuts a 30°C. A continuació, es van centrifugar les mostres i es van fer dos rentats amb aigua freda. El pellet es va resuspendre amb **lisis buffer** (100µL d'aigua destil·lada i 100µL 0.2M NaOH) durant 5 minuts i es van tornar a centrifugar però aquest cop es van resuspendre en 50µL 2XSSR. Finalment, es van bullir les mostres a 95°C 5 minuts i es van córrer en un gel de poliacrilamida. Es va repetir el mateix procés a les 3 i a les 6 hores.

## 11. Microscopia

Les cèl·lules transfectades i les immunofluorescències van ser analitzades amb un microscopi confocal Zeiss LSM780. Es va ajustar la potència del làser i del tub fotomultiplicador per a les necessitats de cada experiment. S'han utilitzat els objectius de 40X i 63X depenent de l'experiment.

-Anàlisi del perímetre/àrea de les cèl·lules HEK293T: Les imatges de les cèl·lules transfectades es van analitzar amb el programa *Image J* fent un *Threshold* que permet seleccionar solament la cèl·lula transfectada. Es va analitzar el perímetre i l'àrea de la cèl·lula amb l'opció *Analyze particles-Show Outlines*.

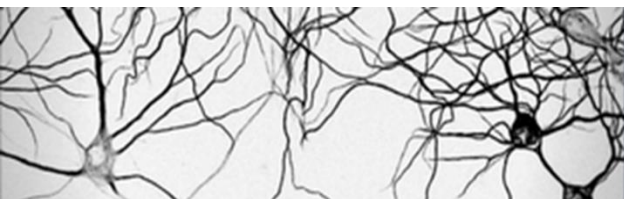
-Experiments de determinació de fil·lopodis o espines dendrítiques, immufluorescències (puromicina) i AHA:

Per els comptatges de les espines es va utilitzar el *plugging* del *ImageJ: SpineJ*. Aquest programa és capaç de detectar les protrusions que sobresurten de la dendrita. Alguns dels comptatges també es van realitzar a mà.

-Dinàmica de fil·lopodis: Per els experiments d'anàlisi de fil·lopodis es van realitzar vídeos amb Zeiss LSM780 que es van gravar cada minut i al llarg de 10 minuts. Per analitzar els vídeos utilitzàvem el programa *ImageJ*. Primer estabilitzàvem la imatge amb *Image stabilizer* per eliminar els moviments deguts a l'objectiu del microscopi i no als propis de la mostra, ja que aquest podien afectar als nostres resultats. Finalment utilitzàvem el *pluggin Image Correlation J*, que compara els píxels de cada una de les imatges del vídeo amb la següent imatge. Aquest anàlisi proporciona un gràfic de correlació amb un  $R^2$ . Es considerava l'índex de dinamisme com  $1/R^2$ .

-Colocalització i anàlisi per píxel: Pels experiments de colocalització es va utilitzar el microscopi Zeiss LSM780 amb l'opció *photon-counting*, l'objectiu de 63x, velocitat de 6 i amb un zoom de 10. El *pixel dwell time* era de 13,05µs. La mida de la imatge era 248 x 100 píxels i es recollien en un temps d'aproximadament 1 min.

Per analitzar com variava la intensitat del píxel al llarg del temps es van seleccionar els píxels amb el programa *Image J* fent anar l'eina *Measure Stack* que ens donava la informació dels valors d'intensitat d'aquest píxel al llarg del temps.



## BIBLIOGRAFIA



- [1] F. W. Stahnisch and R. Nitsch, "Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: The ambiguity lives on," *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 11, pp. 589–591, 2002.
- [2] E. Fuchs and G. Flügge, "Adult neuroplasticity: More than 40 years of research," *Neural Plast.*, 2014.
- [3] B. Leuner and E. Gould, "Structural Plasticity and Hippocampal Function," *Annu. Rev. Psychol.*, vol. 61, no. Shors 2008, pp. 111–140, 2010.
- [4] T. J. Shors, "From Stem Cells to Grandmother Cells: How Neurogenesis Relates to Learning and Memory," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 253–258, 2008.
- [5] S. Cohen and M. E. Greenberg, "Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 183–209, 2008.
- [6] P. M. Megías Manuel, Molist Pilar, "Tipos celulares," *Univ. Vigo*, pp. 4–11, 2015.
- [7] C.-C. Chen, J. Lu, and Y. Zuo, "Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain," *Front. Neuroanat.*, vol. 8, no. May, pp. 1–7, 2014.
- [8] V. Garci, M. Freire, and P. Garci, "The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience," vol. 83, pp. 110–130, 2007.
- [9] R. Yuste and T. Bonhoeffer, "Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 1, pp. 24–34, 2004.
- [10] A. Hirano and H. M. Dembitzerc, "Cerebellar alterations in the weaver mouse," *J. Cell Biol.*, vol. 56, no. 2, pp. 478–486, 1973.
- [11] M. Miller and A. Peters, "Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons," *J. Comp. Neurol.*, vol. 203, no. 4, pp. 555–573, 1981.
- [12] J. E. Vaughn, "Review: Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system," *Synapse*, vol. 3, no. 3, pp. 255–285, 1989.
- [13] M. Phillips and L. Pozzo-Miller, "Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders," *Neurosci. Lett.*, vol. 601, no. January, pp. 30–40, 2014.
- [14] A. Sudarov, F. Gooden, D. Tseng, W. B. Gan, and M. E. Ross, "Lis1 controls dynamics of neuronal filopodia and spines to impact synaptogenesis and social behaviour," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 591–607, 2013.
- [15] D. Debanne, "Long-Term Plasticity of Intrinsic Excitability : Learning Rules and Mechanisms Long-Term Plasticity of Intrinsic Excitability : Learning Rules and Mechanisms," pp. 456–465, 2003.
- [16] T. V. P. Bliss and S. F. Cooke, "Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective.," *Clin. (São Paulo, Brazil)*, vol. 66 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 3–17, 2011.

- [17] C. Luscher and R. C. Malenka, "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, no. 6, pp. 1–15, 2012.
- [18] M. D. Scofield *et al.*, "The Nucleus Accumbens : Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis," vol. 7288, no. July, pp. 816–871, 2016.
- [19] Y. Bernardinelli, I. Nikonenko, and D. Muller, "Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders," *Front. Neuroanat.*, vol. 8, no. November, pp. 1–9, 2014.
- [20] A. J. Koleske, "Molecular mechanisms of dendrite stability," *Nat. Publ. Gr.*, no. July, 2013.
- [21] P. Hotulainen and C. C. Hoogenraad, "Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function," *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 4, pp. 619–629, 2010.
- [22] A. Konietzny, J. Bär, and M. Mikhaylova, "Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. May, pp. 1–10, 2017.
- [23] M. Krause and A. Gautreau, "Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 577–590, 2014.
- [24] Lin and Webb, "Actin and Actin-Binding Proteins: Masters of Dendritic Spine Formation, Morphology, and Function," *Open Neurosci J.*, pp. 54–66, 2010.
- [25] E. R. Kandel, "The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses," *Science (80- )*, vol. 294, no. 5544, pp. 1030–1038, 2001.
- [26] O. Steward and W. B. Levy, "Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus," *J Neurosci*, vol. 2, no. 3, pp. 284–291, 1982.
- [27] O. Steward, C. S. Wallace, G. L. Lyford, and P. F. Worley, "Synaptic activation causes the mRNA for the leg Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites," *Neuron*, vol. 21, no. 4, pp. 741–751, 1998.
- [28] G. Aakalu, W. B. Smith, N. Nguyen, C. Jiang, and E. M. Schuman, "Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons," *Neuron*, vol. 30, no. 2, pp. 489–502, 2001.
- [29] C. E. Holt and E. M. Schuman, "The central dogma decentralized: New perspectives on RNA function and local translation in neurons," *Neuron*, vol. 80, no. 3, pp. 648–657, 2013.
- [30] G. J. Bassell and J. L. Twiss, "RNA exodus to Israel:RNA controlling function in the far reaches of the neuron," 2006.
- [31] H. Jung, C. G. Gkogkas, N. Sonenberg, and C. E. Holt, "Remote control of gene function by local translation," *Cell*, vol. 157, no. 1, pp. 26–40, 2014.
- [32] C. Hanus and E. M. Schuman, "Proteostasis in complex dendrites," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 9, pp. 638–648, 2013.

- [33] D. H. Lackner and J. Bähler, "Chapter 5 Translational Control of Gene Expression. From Transcripts to Transcriptomes," *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 271, no. C, pp. 199–251, 2008.
- [34] A. L. Kau and P. E. Korenblat, "Translational Control in Synaptic Plasticity and Cognitive Dysfunction," vol. 14, no. 6, pp. 570–575, 2015.
- [35] U. of Tokio, "Introduction to Life Science," 2017. [Online]. Available: [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/09\\_04.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/09_04.html).
- [36] A. N. Sasikumar, W. B. Perez, and T. G. Kinzy, "The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex," *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 3, no. 4, pp. 543–555, 2012.
- [37] L. Competition, D. Affects, and I. In, "RNA Transport and Local Control of Translation," vol. 86, no. 12, pp. 3279–3288, 2008.
- [38] L. F. Lareau, D. H. Hite, G. J. Hogan, and P. O. Brown, "Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments," *Elife*, vol. 2014, no. 3, pp. 1–16, 2014.
- [39] M. Costa-Mattioli and N. Sonenberg, *Chapter 5 Translational control of gene expression: A molecular switch for memory storage*, vol. 169. Elsevier, 2008.
- [40] M. Costa-Mattioli *et al.*, "eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Bidirectionally Regulates the Switch from Short- to Long-Term Synaptic Plasticity and Memory," *Cell*, vol. 129, no. 1, pp. 195–206, 2007.
- [41] X. M. Ma and J. Blenis, "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 307–318, 2009.
- [42] J. D. Richter and E. Klann, "translational regulation Making synaptic plasticity and memory last : mechanisms of translational regulation," *Genes Dev.*, pp. 1–11, 2009.
- [43] M. Ivshina, P. Lasko, and J. D. Richter, "Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Proteins in Development, Health, and Disease," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 393–415, 2014.
- [44] S. Park *et al.*, "Elongation Factor 2 and Fragile X Mental Retardation Protein Control the Dynamic Translation of Arc/Arg3.1 Essential for mGluR-LTD," *Neuron*, vol. 59, no. 1, pp. 70–83, 2008.
- [45] T. E. Graber *et al.*, "Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 40, pp. 16205–16210, 2013.
- [46] S. Lee, a M. Francoeur, S. Liu, and E. Wang, "Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 33, pp. 24064–24068, 1992.
- [47] A. N. Sasikumar, W. B. Perez, and T. G. Kinzy, "The Many Roles of the Eukaryotic Elongation Factor 1 Complex," *Wiley Interdiscip Rev RNA*, vol. 3, no. 4, pp. 543–555, 2013.



- [48] G. R. Andersen *et al.*, "Structural Basis for Nucleotide Exchange and Competition with tRNA in the Yeast Elongation Factor Complex eEF1A:eEF1B $\alpha$ ," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 1261–1266, 2000.
- [49] A. Khalyfa *et al.*, "Characterization of Elongation Factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 Protein Expression in Normal and wasted Mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 22915–22922, 2001.
- [50] L. D. Shultz, H. O. Sweet, M. T. Davisson, and D. R. Coman, "'Wasted', a new mutant of the mouse with abnormalities characteristic of ataxia telangiectasia," *Nature*, vol. 297, no. 5865, pp. 402–404, 1982.
- [51] D. M. Chambers, J. Peters, and C. M. Abbott, "The lethal mutation of the mouse wasted (*wst*) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1, encoded by the *Eef1a2* gene," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 8, pp. 4463–4468, 1998.
- [52] H. J. Newbery *et al.*, "Progressive loss of motor neuron function in wasted mice: effects of a spontaneous null mutation in the gene for the eEF1A2 translation factor.," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 64, no. 4, pp. 295–303, 2005.
- [53] C. M. Abbott, H. J. Newbery, C. E. Squires, D. Brownstein, L. A. Griffiths, and D. C. Soares, "eEF1A2 and neuronal degeneration," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 37, no. 6, pp. 1293–1297, 2009.
- [54] D. C. Soares, P. N. Barlow, H. J. Newbery, D. J. Porteous, and C. M. Abbott, "Structural models of human eEF1A1 and eEF1A2 reveal two distinct surface clusters of sequence variation and potential differences in phosphorylation," *PLoS One*, vol. 4, no. 7, 2009.
- [55] G. Kulkarni *et al.*, "Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 102, no. 1, pp. 31–41, 2007.
- [56] C. Xu, D. Hu, and Q. Zhu, "eEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 30, no. 7, pp. 933–944, 2013.
- [57] T. S. Worst *et al.*, "The eEF1A2 gene expression as risk predictor in localized prostate cancer," *BMC Urol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [58] A. Amiri, F. Noei, S. Jeganathan, G. Kulkarni, D. E. Pinke, and J. M. Lee, "eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration," *Oncogene*, vol. 26, no. 21, pp. 3027–3040, 2007.
- [59] J. de Ligt *et al.*, "Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 20, pp. 1921–1929, 2012.
- [60] J. Xu *et al.*, "Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability," vol. 1, no. 1, pp. 1–14, 2015.
- [61] J. Nakajima *et al.*, "De novo eEF1A2 mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability, autistic behaviors and epilepsy," *Clin. Genet.*, vol. 87, no. 4, pp. 356–361, 2015.

- [62] W. W. K. Lam *et al.*, “Novel de novo EEF1A2 missense mutations causing epilepsy and intellectual disability.,” *Mol. Genet. genomic Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 465–74, 2016.
- [63] K. Morita, F. Bunai, and O. Numata, “Roles of three domains of Tetrahymena eEF1A in bundling F-actin.,” *Zoolog. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 22–29, 2008.
- [64] R. Munshi, K. A. Kandl, A. Carr-Schmid, J. L. Whitacre, A. E. M. Adams, and T. G. Kinzy, “Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast,” *Genetics*, vol. 157, no. 4, pp. 1425–1436, 2001.
- [65] B. T. Edmonds *et al.*, “Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma.,” *J. Cell Sci.*, vol. 109 ( Pt 1, pp. 2705–2714, 1996.
- [66] S. R. Gross and T. G. Kinzy, “Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no. 9, pp. 772–778, 2005.
- [67] M. G. Poirier, S. Eroglu, and J. F. Marko, “Interactions of Elongation Factor 1 with F-Actin and beta -Actin mRNA: Implications for Anchoring mRNA in Cell Protrusions,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 2170–2179, 2002.
- [68] S. J. Cho, J. S. Jung, B. H. Ko, I. Jin, and I. S. Moon, “Presence of translation elongation factor-1A (eEF1A) in the excitatory postsynaptic density of rat cerebral cortex,” *Neurosci. Lett.*, vol. 366, no. 1, pp. 29–33, 2004.
- [69] S. M. Dudek *et al.*, “Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 22, pp. 4042–4056, 2010.
- [70] S. J. Cho, H. S. Lee, S. Dutta, D. H. Seog, and I. S. Moon, “Translation elongation factor-1A1 (eEF1A1) localizes to the spine by domain III,” *BMB Rep.*, vol. 45, no. 4, pp. 227–232, 2012.
- [71] T. Izawa, Y. Fukata, T. Kimura, A. Iwamatsu, K. Dohi, and K. Kaibuchi, “Elongation Factor-1 $\alpha$  Is a Novel Substrate of Rho-Associated Kinase,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 278, no. 1, pp. 72–78, 2000.
- [72] K. W. Lin, I. Yakymovych, M. Jia, M. Yakymovych, and S. Souchelnytskyi, “Phosphorylation of eEF1A1 at Ser300 by T $\beta$ R-I results in inhibition of mRNA translation,” *Curr. Biol.*, vol. 20, no. 18, pp. 1615–1625, 2010.
- [73] V. Gandin *et al.*, “Degradation of Newly Synthesized Polypeptides by Ribosome-Associated RACK1/c-Jun N-Terminal Kinase/Eukaryotic Elongation Factor 1A2 Complex,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 13, pp. 2510–2526, 2013.
- [74] L. E. Villasana, E. Klann, and M. V. Tejada-Simon, “Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 158, no. 1, pp. 30–36, 2006.
- [75] N. E. Ziv and S. J. Smith, “Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation,” *Neuron*, vol. 17, no. 1, pp. 91–102, 1996.

- [76] J. A. Lopez-Valenzuela, B. C. Gibbon, P. A. Hughes, T. W. Dreher, and B. A. Larkins, "eEF1A isoforms change in abundance and actin-binding activity during maize endosperm development," *Plant Physiol*, vol. 133, no. 3, pp. 1285–1295, 2003.
- [77] M. G. Poirier, S. Eroglu, and J. F. Marko, "The bending rigidity of mitotic chromosomes," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 2170–2179, 2002.
- [78] J. Kim *et al.*, "The role of translation elongation factor eEF1A in intracellular alkalinization-induced tumor cell growth," *Lab. Investig.*, vol. 89, no. 8, pp. 867–874, 2009.
- [79] D. O. Vlasenko, O. V. Novosylina, B. S. Negrutskii, and A. V. El'skaya, "Truncation of the A,A\*,A' helices segment impairs the actin bundling activity of mammalian eEF1A1," *FEBS Lett.*, vol. 589, no. 11, pp. 1187–1193, 2015.
- [80] F. Bunai, K. Ando, H. Ueno, and O. Numata, "Tetrahymena eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) bundles filamentous actin through dimer formation," *J. Biochem.*, vol. 140, no. 3, pp. 393–399, 2006.
- [81] J. Riedl *et al.*, "NIH Public Access," vol. 5, no. 7, pp. 1–8, 2010.
- [82] G. Lenz and J. Avruch, "Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 46, pp. 38121–38124, 2005.
- [83] M. A. Sutton, A. M. Taylor, H. T. Ito, A. Pham, and E. M. Schuman, "Postsynaptic Decoding of Neural Activity: eEF2 as a Biochemical Sensor Coupling Miniature Synaptic Transmission to Local Protein Synthesis," *Neuron*, vol. 55, no. 4, pp. 648–661, 2007.
- [84] C. Heise, F. Gardoni, L. Culotta, M. di Luca, C. Verpelli, and C. Sala, "Elongation factor-2 phosphorylation in dendrites and the regulation of dendritic mRNA translation in neurons," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, no. February, pp. 1–8, 2014.
- [85] C. Portera-Cailliau, D. T. Pan, and R. Yuste, "Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, no. 18, pp. 7129–7142, 2003.
- [86] S. M. KNUDSEN, J. FRYDENBERG, B. F. C. CLARK, and H. LEFFERS, "Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 $\alpha$  isoforms: Isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 $\alpha$ ," *Eur. J. Biochem.*, vol. 215, no. 3, pp. 549–554, 1993.
- [87] J. W. Murray, B. T. Edmonds, G. Liu, and J. Condeelis, "Bundling of actin filaments by elongation factor 1  $\alpha$  inhibits polymerization at filament ends," *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 5, pp. 1309–1321, 1996.
- [88] a Duttaroy, D. Bourbeau, X. L. Wang, and E. Wang, "Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha.," *Exp. Cell Res.*, vol. 238, no. 1, pp. 168–176, 1998.
- [89] A. Utani, "Laminin ??3 chain-derived peptide promotes keratinocyte

- migration and wound closure: Clustering of syndecan-4 and integrin  $\beta 1$ ,” *Seikagaku*, vol. 82, no. 4, pp. 327–331, 2010.
- [90] S.-M. Chuang, L. Chen, D. Lambertson, M. Anand, T. G. Kinzy, and K. Madura, “Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 403–13, 2005.
- [91] A. Khalyfa, B. M. Carlson, J. A. Carlson, and E. Wang, “Toxin injury-dependent switched expression between EF-1 $\alpha$  and its sister, S1, in rat skeletal muscle,” *Dev. Dyn.*, vol. 216, no. 3, pp. 267–273, 1999.
- [92] S. Kahns *et al.*, “The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: Cloning of the cDNA and characterization of the protein,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 8, pp. 1884–1890, 1998.
- [93] M. Potter, A. Bernstein, and J. M. Lee, “The *ef1a* Gene Regulates Multiple Forms of Thymocyte Apoptosis,” *Cell. Immunol.*, vol. 188, no. 2, pp. 111–117, 1998.
- [94] S. Talapatra, J. D. O. Wagner, and C. B. Thompson, “Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis,” *Cell Death Differ.*, vol. 9, no. 8, pp. 856–861, 2002.
- [95] D. C. Soares and C. M. Abbott, “Highly homologous eEF1A1 and eEF1A2 exhibit differential post-translational modification with significant enrichment around localised sites of sequence variation,” *Biol. Direct*, vol. 8, no. 1, p. 29, 2013.
- [96] S. Jeganathan, A. Morrow, A. Amiri, and J. M. Lee, “Eukaryotic elongation factor 1A2 cooperates with phosphatidylinositol-4 kinase III beta to stimulate production of filopodia through increased phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate generation,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 14, pp. 4549–61, 2008.
- [97] C. H. Owen, D. J. Derosier, and J. Condeelis, “Actin crosslinking protein EF-1 a of *Dictyostelium discoideum* has a unique bonding rule that allows square-packed bundles,” *J. Struct. Biol.*, vol. 109, no. 3, pp. 248–254, 1992.
- [98] T. P. Schrank, “Assembly Kinetics Determine the Architecture of  $\alpha$ -actinin Crosslinked F-actin Networks,” pp. 95–121, 2016.
- [99] R. Stapulionis, S. Kolli, and M. P. Deutscher, “Efficient mammalian protein synthesis requires an intact F-actin system,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 40, pp. 24980–24986, 1997.
- [100] Y. Fukazawa, Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno, and K. Inokuchi, “Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo,” *Neuron*, vol. 38, no. 3, pp. 447–460, 2003.
- [101] V. Rangaraju, S. tom Dieck, and E. M. Schuman, “Local translation in neuronal compartments: how local is local?,” *EMBO Rep.*, vol. 18, no. 5, pp. 693–711, 2017.
- [102] M. A. Kiebler and L. Desgroseillers, “Molecular Insights into mRNA Review Transport and Local Translation in the Mammalian Nervous System,” *Neuron*,

- vol. 25, pp. 19–28, 2000.
- [103] M. Costa-Mattioli, W. S. Sossin, E. Klann, and N. Sonenberg, “Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory,” *Neuron*, vol. 61, no. 1, pp. 10–26, 2009.
- [104] E. Taha, I. Gildish, S. Gal-Ben-Ari, and K. Rosenblum, “The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity,” *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 105, pp. 100–106, 2013.
- [105] K. Belevovskiy, A. Elkobi, H. Kaphzan, A. C. Nairn, and K. Rosenblum, “A molecular switch for translational control in taste memory consolidation,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 22, no. 10, pp. 2560–2568, 2005.
- [106] a J. Scheetz, a C. Nairn, and M. Constantine-Paton, “NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses,” *Nat. Neurosci.*, vol. 3, no. 3, pp. 211–216, 2000.
- [107] G. Liu, J. Tang, B. T. Edmonds, J. Murray, S. Levin, and J. Condeelis, “F-actin sequesters elongation factor 1 $\alpha$  from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction,” *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 4, pp. 953–963, 1996.
- [108] M. Ehrenberg, A. M. Rojas, J. Weiser, and C. G. Kurland, “How many EF-Tu molecules participate in aminoacyl-tRNA binding and peptide bond formation in *Escherichia coli* translation?,” *J. Mol. Biol.*, vol. 211, no. 4, pp. 739–749, 1990.
- [109] M. D. Antion, “A TOP at the Synapse,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 43, pp. 9823–4, 2005.
- [110] R. Bluem *et al.*, “Components of the translational machinery are associated with juvenile glycine receptors and are redistributed to the cytoskeleton upon aging and synaptic activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 52, pp. 37783–37793, 2007.
- [111] W. B. Perez and T. G. Kinzy, “Translation elongation factor 1A mutants with altered actin bundling activity show reduced aminoacyl-tRNA binding and alter initiation via eIF2 $\alpha$  phosphorylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 30, pp. 20928–20938, 2014.
- [112] M. Vera *et al.*, “The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response,” *Elife*, vol. 3, p. e03164, 2014.
- [113] F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. 2003.
- [114] M. Jiang and G. Chen, “High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 695–700, 2006.
- [115] J. Wang *et al.*, “Nonradioactive quantification of autophagic protein degradation with l-azidohomoalanine labeling,” vol. 12, no. 2, pp. 279–288, 2017.