

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioqímica i  
Biologia Molecular.  
Unitat de Medicina



**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS *BRAIN-SPECIFIC KINASES* 1 Y  
2 (BRISK1 Y BRISK2, TAMBIÉN LLAMADAS SAD QUINASAS) EN  
LA DIFERENCIACIÓN Y SINAPSIS NEURONALES.**

**Arantzazu Rodríguez Asiain**

**TESIS DOCTORAL**

**Bellaterra, 2012**

# **RESULTADOS**



## **RESULTADOS-CAPÍTULO 1:**

### **R.1 Obtención y optimización de reactivos para el estudio de las BRSKs.**



## R.1 Obtención y optimización de reactivos para el estudio de las BRSKs.

Al inicio de este trabajo, el escaso conocimiento que se disponía sobre las BRSKs conllevaba una falta de reactivos y protocolos estandarizados de trabajo que tuvieron que ser generados y puestos a punto en el laboratorio. El desarrollo de este material ha permitido disponer de herramientas básicas para estudiar la función y regulación de las BRSKs, los resultados de los cuales se recogen en los siguientes capítulos formando el grueso de esta Memoria. En el presente Capítulo 1 se describe cómo se obtuvieron y optimizaron estas herramientas, además de corroborar los estudios pioneros sobre la activación y localización de las BRSKs.

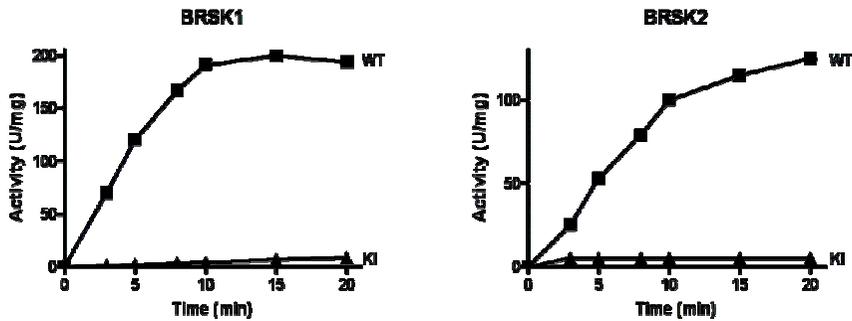
### R.1.1 Activación de BRSK1 y BRSK2 por el complejo LKB1.

Los experimentos iniciales de caracterización bioquímica de las BRSKs se centraron en reproducir la activación de estas proteínas por la quinasa *upstream* LKB1. Como se menciona en la Introducción, el complejo LKB1 (LKB1/STRAD/MO25) activa las BRSKs mediante la fosforilación del residuo Thr189 (BRSK1) o Thr174 (BRSK2) del *activation loop* (también denominado T-loop) del dominio quinasa (Lizcano et al, 2004).

#### El complejo LKB1/STRAD/MO25 fosforila y activa a BRSK1 y BRSK2 *in vitro*.

Para confirmar que LKB1 fosforila y activa las BRSKs *in vitro* se incubó BRSK1 o BRSK2 purificadas de células *E. coli* con el complejo activo o inactivo de LKB1/STRAD/MO25 (purificado a partir de lisados de células humanas HEK-293 que co-expresan cada una de las tres proteínas). En una primera fase de la reacción se incubó cada BRSK con el complejo LKB1 a los tiempos indicados en presencia de ATP frío y magnesio y, en una segunda fase se determinó la actividad de cada isoforma de BRSK utilizando <sup>32</sup>P-ATP, magnesio y el péptido AMARA como sustrato. Como muestra la **figura R.1** ambas isoformas de BRSK se activan en presencia del complejo activo LKB1/STRAD/MO25, mientras que permanecen inactivas cuando se incuban con el complejo LKB1 inactivo.

A continuación, se estudió si la activación de las BRSKs por LKB1 estaba mediada por la fosforilación del residuo de treonina conservado en el T-loop de estas quinasas (T189 y T174 de BRSK1 y BRSK2, respectivamente). Como se menciona en la Introducción (**figura I.4A**), esta treonina se encuentra conservada en todos los miembros que forman la subfamilia de las AMPK-related kinases, y LKB1 actúa de hecho como una proteína quinasa máster que activa a las AMPK-related kinases a través de la fosforilación de este residuo. Para comprobar este extremo se generaron los correspondientes mutantes en los que la treonina del T-loop fue mutada a alanina (mutante T/A, incapaz de ser fosforilado por LKB1) y mutada a glutámico (mutante T/E,

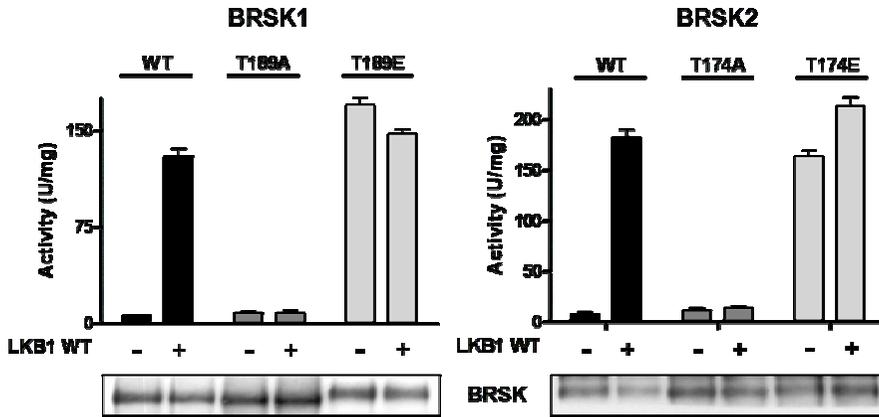


**Figura R.1 Activación *in vitro* de BRSK1 y BRSK2 por el complejo LKB1.** Ensayo de actividad de BRSK1 y BRSK2 recombinante frente 200  $\mu$ M de péptido sustrato AMARA y 100  $\mu$ M  $^{32}$ P- $[\gamma$ -ATP]/Mg $^{2+}$ , tras ser incubado con el complejo LKB1/STRAD/MO25 activo (*Wild Type*, WT) o inactivo (*Kinase Inactive*, KI). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

cuyo grupo carboxilo mimetiza las cargas negativas del fosfato). Tras expresarlos y purificarlos en *E. coli*, cada uno de los mutantes se incubó en presencia o ausencia del complejo activo de LKB1/STRAD/MO25 salvaje y se determinó su actividad mediante ensayo radiométrico. El complejo LKB1 activa ambas isoformas salvajes de BRSK mientras que es incapaz de activar los mutantes en que la treonina fue sustituida por alanina. Por tanto, la activación *in vitro* de BRSK1 y BRSK2 por LKB1 se debe a la fosforilación de las Thr189 y Thr174, respectivamente. Por otra parte, en ausencia de LKB1 los mutantes T/E expresados en *E. coli*, rindieron niveles de actividad comparables al de la quinasa salvaje, y representan por tanto mutantes constitutivamente activos (**figura R.2**).

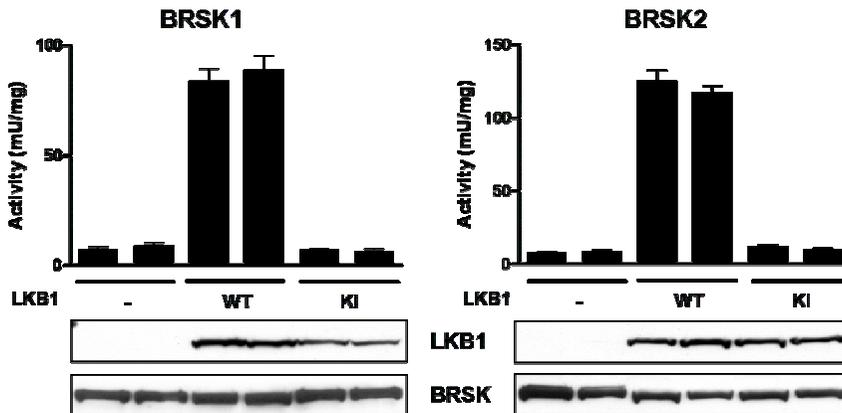
#### **LKB1 activa a BRSK1 y BRSK2 en células HeLa.**

A continuación, se diseñaron experimentos para estudiar si LKB1 es capaz de activar a las BRSKs en un sistema *in vivo*. Para ello se escogió la línea celular humana de adenocarcinoma cervical HeLa, que posee la particularidad de carecer de LKB1 (Tiainen *et al*, 1999) aunque sí expresa STRAD y MO25. De manera similar a como se ha descrito para AMPK y otras quinasas relacionadas (Hawley *et al*, 2003; Lizcano *et al*, 2004) se usó esta línea celular para reintroducir LKB1 y estudiar su efecto sobre la actividad de las BRSKs. Así, se transfectaron células HeLa con los vectores de expresión que codifican para BRSK1 o BRSK2, solas o junto LKB1 activa o inactiva, y se determinó su actividad mediante ensayo radiométrico. La **figura R.3** muestra como la expresión de las BRSKs en células HeLa no resulta en una forma activa de las quinasas, mientras que la co-expresión con LKB1 resulta en formas activas de ambas BRSKs, que presentan una actividad específica del orden a la observada *in vitro* en las figuras anteriores (**figuras R.1-2**). No se detectó actividad BRSK cuando estas proteínas fueron co-expresadas con la forma inactiva de LKB1. Como ocurre con otras quinasas de la subfamilia de AMPK (como las



**Figura R.2** El complejo LKB1 activa a BRSK1 y BRSK2 mediante la fosforilación de la Thr189 y Thr174 respectivamente. Ensayo *in vitro* de actividad de GST-BRSK1 y GST-BRSK2 salvaje (WT, *wild type*) y mutantes T/A (Thr/Ala) y T/E (Thr/Glu) en presencia o ausencia del complejo activo de LKB1/STRAD/MO25 salvaje (WT). El gráfico superior muestra la actividad específica de BRSK1 y BRSK2 frente al péptido sustrato AMARA (200 $\mu$ M) tras ser incubada (+) o no (-) con el complejo activo de LKB1 en presencia de 100  $\mu$ M  $^{32}$ P-[ $\gamma$ -ATP]/Mg $^{2+}$ . Una alícuota de cada reacción fue analizada también mediante inmunoblot (anti-GST) para evaluar los niveles de BRSK en cada incubación (paneles inferiores). Los resultados mostrados son medias  $\pm$  s.d. de ensayos por triplicado, y representativos de dos experimentos independientes.

isoformas de MARK o NUAQ), estos resultados demuestran, en un sistema *in vivo*, que LKB1 es la quinasa activadora de las BRSKs.

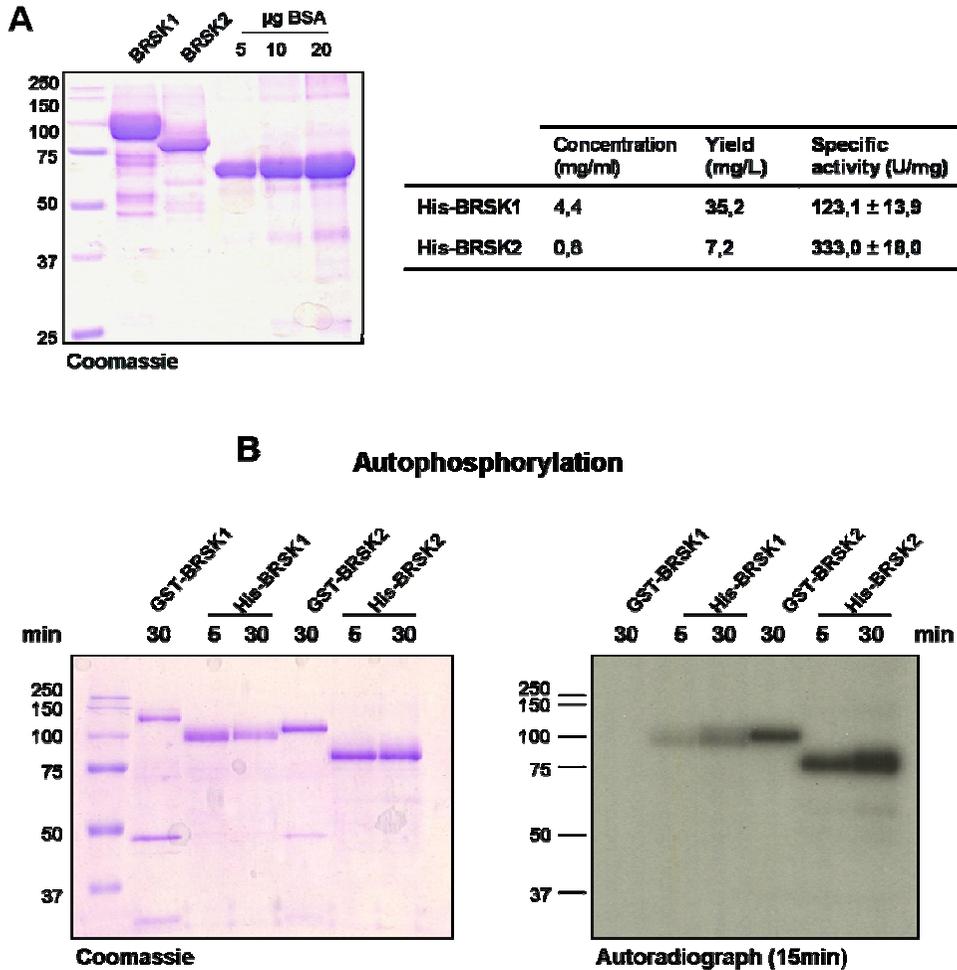


**Figura R.3** Actividad de BRSK1 y BRSK2 en células HeLa. Células HeLa fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para GST-BRSK1 o GST-BRSK2 solas (-) o junto con LKB1 activa (WT, *Wild Type*) o LKB1 inactiva (KI, *Kinase Inactive*). Los gráficos muestran la actividad específica de BRSK1 y BRSK2 purificadas de los extractos celulares mediante resina de Glutión-Sephareose utilizando 200  $\mu$ M de péptido sustrato AMARA y 100  $\mu$ M  $^{32}$ P-[ $\gamma$ -ATP]/Mg $^{2+}$ . Los niveles de expresión de las proteínas sobre-expresadas se analizaron mediante inmunoblot utilizando anticuerpos anti-LKB1 y anti-GST (BRSKs); paneles inferiores. Los resultados mostrados son medias  $\pm$  s.d. de ensayos realizados por triplicado, y representativos de dos experimentos independientes.

### R.1.2 Expresión, purificación y caracterización de BRSK1 y BRSK2 activa mediante infección de células de insecto con baculovirus.

La obtención de una quinasa pura y activa representa una herramienta imprescindible para profundizar en estudios de regulación de su actividad e identificación de sustratos. Para este fin se utilizó el sistema de expresión mediante infección de células de insecto con baculovirus ya que permite obtener grandes cantidades de proteína pura, modificada post-traduccionalmente y biológicamente activa. Comparado con otros sistemas de expresión en eucariotas, la infección con baculovirus tiene varias ventajas, como son: (1) una elevada expresión génica heteróloga, (2) permitir el cultivo en suspensión de las células infectadas, (3) expresión simultánea de complejos oligoméricos y (4) tener restringido el rango de células huésped a especies invertebradas. Como se indica en la sección de Material y Métodos, se subclonó en un vector pFastBac las dos BRSKs fusionadas a una cola de 6 histidinas (His-BRSK1 y His-BRSK2), y el DNA Bacmid recombinante resultante se transfectó en células Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda* para generar las partículas víricas. Se infectaron cultivos de células Sf9 con estas partículas y las BRSKs recombinantes expresadas se purificaron mediante resina de Ni-NTA-Agarosa. Como muestra la tinción Coomassie del gel SDS-PAGE de la **figura R.4A** la homogeneidad de las proteínas purificadas fue superior al 90%, obteniéndose un rendimiento final de 35,2 mg de BRSK1 y 7,2 mg de BRSK2 pura por litro de cultivo (tabla de la misma figura). Como se esperaba por el sistema de expresión utilizado (las células de insecto poseen LKB1) las quinasas purificadas resultaron activas, con una actividad específica de 125 U/mg y 330 U/mg para BRSK1 y BRSK2 respectivamente (tabla **figura R.4A**). A continuación se comparó, mediante un ensayo de autofosforilación, la actividad de estas quinasas purificadas a partir de células de insecto con las purificadas a partir de células humanas HEK-293. Para ello se sobre-expresó GST-BRSK1 y GST-BRSK2 en células HEK-293 y, tras la purificación mediante resina de Glutación-*Sepharose*, se realizó un ensayo de fosforilación en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ATP y magnesio. La **figura R.4B** muestra la tinción Coomassie y la autoradiografía de la reacción en la que se puede observar que la actividad (en clave de autofosforilación) de las quinasas purificadas en células de insecto es significativamente mayor que la actividad de las quinasas purificadas en HEK-293.

A continuación, se determinaron las constantes cinéticas de las BRSKs purificadas, utilizando los tres péptidos sustrato empleados en la literatura para monitorizar la actividad de AMPK y sus quinasas relacionadas (Dale et al, 1995; Ross et al, 2002). El péptido CHKtide resultó ser el mejor sustrato de BRSK1, con un valor de eficacia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) aproximadamente 4 veces superior al péptido LNR y unas 38 veces superior al péptido AMARA. Estos resultados recomiendan por tanto el uso del péptido CHKtide como sustrato de las BRSKs. La **figura R.5B**



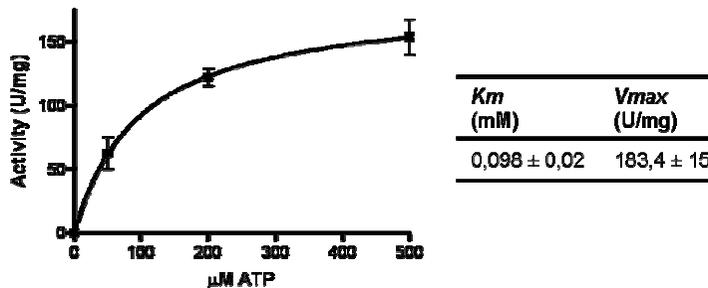
**Figura R.4** Expresión, purificación y caracterización de BRSK1 y BRSK2 de células de insecto Sf9. **(A)** Células Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda* fueron infectadas a MOI (*Multiplicity Of Infection*) 5 con el baculovirus codificante para His-BRSK1 o His-BRSK2. Las quinasas fueron purificadas como se describe en Material y Métodos utilizando una resina de Ni-NTA-Agarosa. La tinción Coomassie Blue del correspondiente gel SDS-PAGE muestra una pureza superior al 90%, con un rendimiento final de 35,2 mg de BRSK1 por litro de cultivo y 7,2 mg/L de BRSK2 (tabla). La actividad específica de las proteínas purificadas se midió utilizando 200  $\mu\text{M}$  de péptido sustrato CHKTide y 100  $\mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ -ATP]/ $\text{Mg}^{2+}$  (tabla). Los valores de actividad son medias  $\pm$  s.d. de ensayos por triplicado y representativos de dos experimentos independientes. **(B)** Ensayo de actividad en presencia de 100  $\mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ -ATP]/ $\text{Mg}^{2+}$  en el que se compara la autofosforilación de 1  $\mu\text{g}$  de GST-BRSK1 y GST-BRSK2 purificadas de células de mamífero HEK-293 (30 minutos de reacción) con 1  $\mu\text{g}$  de His-BRSK1 y His-BRSK2 purificadas de células de insecto Sf9 (5 y 30 minutos de reacción). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

muestra la curva de saturación de la actividad de BRSK1 en función de concentraciones crecientes de ATP, que determinó un valor de  $K_m$  para el ATP de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ .

**A**

Peptide	Sequence	<i>K<sub>m</sub></i> (mM)	<i>V<sub>max</sub></i> (U/mg)	<i>V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub></i>
CHKtide	KKKVSRLYRSPSPMPENLNRPR	0,17 ± 0,01	302 ± 26	1776
LNR peptide	KKLNRTLVA	0,10 ± 0,02	41 ± 10	410
AMARA peptide	AMARAASAAALARRR	0,35 ± 0,02	16 ± 3	46

**B**



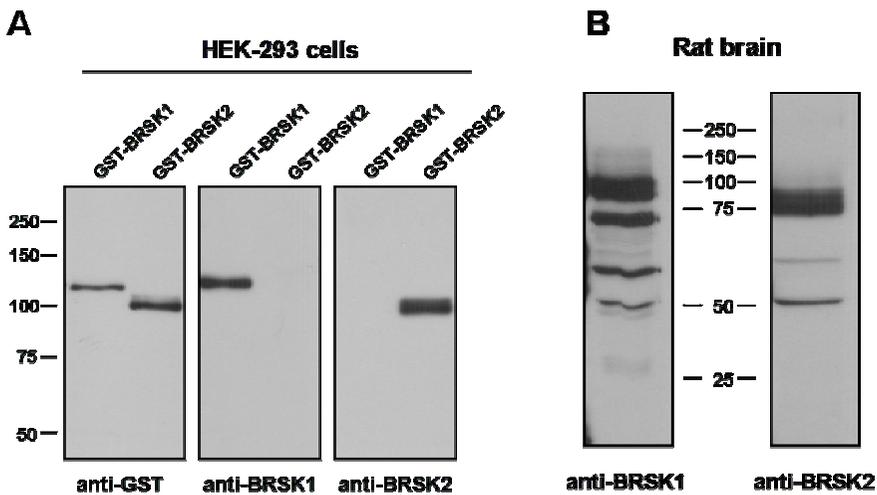
**Figura R.5 Análisis cinético de BRSK1 purificada de células de insecto Sf9. (A)** Constantes cinéticas de BRSK1 para los péptidos sustratos CHKtide, LNR y AMARA. Las actividades se determinaron utilizando 50, 100, 250 y 500 µM del péptido indicado, 60 ng de BRSK1 purificada en células Sf9 y 200 µM <sup>32</sup>P-[γ-ATP]/Mg<sup>2+</sup>. **(B)** Constantes cinéticas de BRSK1 para ATP. Las actividades se determinaron usando 50, 200 y 500 µM de ATP, 60 ng de BRSK1 purificada en células Sf9 y 200 µM de péptido sustrato CHKtide en presencia de <sup>32</sup>P-[γ-ATP]/Mg<sup>2+</sup>. Los valores de las constantes son medias ± s.d. de ensayos realizados por triplicado y representativos de dos experimentos independientes.

### R.1.3 Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 utilizados en este trabajo.

Los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 utilizados en este trabajo fueron donados por el Professor Dario Alessi (MRC Phosphorylation Unit, University of Dundee, Scotland). Estos anticuerpos fueron purificados a partir de varios sangrados de ovejas inmunizadas con dos péptidos inmunógenos diferentes correspondientes a los extremos amino- y carboxi-terminal de las BRSK1 y BRSK2 humanas. Se purificaron anticuerpos de tres sangrados C-terminal y tres N-terminal para BRSK1, y tres C-terminal y dos N-terminal para BRSK2 (tabla **figura R.7**), no caracterizados previamente. La caracterización de estos anticuerpos se realizó mediante análisis por inmunoblot e inmunocitoquímica; se analizó su especificidad frente a proteínas recombinantes y endógenas, y se determinó su habilidad para inmunoprecipitar BRSK1 y BRSK2 endógenas de cerebro de rata.

### Especificidad de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2.

En primer lugar se determinó la especificidad de los anticuerpos generados para cada BRSK. Para ello, se utilizaron extractos de células HEK-293 que sobre-expresan BRSK1 o BRSK2, que fueron analizados mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo representativo para cada isoforma. La **figura R.6A** muestra que los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 utilizados detectan de forma específica BRSK1 y BRSK2 respectivamente (segundo y tercer panel). A continuación se analizó la habilidad de los anticuerpos para detectar las quinasas endógenas. La **figura R.6B** muestra los inmunoblots de homogenados de cerebro de rata utilizando un anticuerpo anti-BRSK1 y otro anti-BRSK2. Se observa que el anticuerpo anti-BRSK1 detecta una banda de 85-90 kDa (correspondiente a BRSK1), así como otras bandas en menor medida. Por el contrario, el anticuerpo anti-BRSK2 detecta mayoritariamente una banda de 75-80 kDa que corresponde al peso molecular de BRSK2. Cuando se utilizaron lisados de neuronas corticales, estos anticuerpos no rindieron bandas inespecíficas (ver Capítulos 2 y 3 de Resultados).



**Figura R.6 Especificidad de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2.** (A) Inmunoblot de lisados de células HEK-293 que sobre-expresan GST-BRSK1 o GST-BRSK2. Se usaron los anticuerpos anti-GST (1/1000), anti-BRSK1 C-terminal (0,5 µg/ml) o anti-BRSK2 C-terminal (0,5 µg/ml). (B) Homogenados de cerebro de rata fueron analizados mediante inmunoblot utilizando anticuerpos anti-BRSK1 (C-terminal 0,5 µg/ml) o anti-BRSK2 (C-terminal 0,5 µg/ml). Se usó un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida para observar el patrón de bandas generado por cada anticuerpo. Se obtuvieron resultados similares en varios experimentos diferentes y con el resto de anticuerpos disponibles.

### **Caracterización de los anticuerpos para la inmunoprecipitación de BRSK1 y BRSK2 endógenas de cerebro de rata.**

Una herramienta importante para el estudio *in vivo* de proteínas es su inmunoprecipitación. Debido a la conformación que adoptan las proteínas en condiciones nativas, puede resultar que un determinado anticuerpo sea bueno en la detección de la proteína parcialmente desnaturalizada pero incapaz de reconocerla en la conformación que adopta en un entorno celular, y por tanto incapaz de inmunoprecipitarla. Para determinar la habilidad de los diferentes anticuerpos generados para inmunoprecipitar las BRSKs endógenas, se incubaron en paralelo con homogenados de cerebro de rata y mediante inmunoblot se detectó la proteína inmunoprecipitada. La **figura R.7** muestra que tanto para BRSK1 como para BRSK2, los anticuerpos que permiten la inmunoprecipitación son aquellos diseñados contra el extremo C-terminal de la proteína. La tabla de la misma figura resume las características de los anticuerpos disponibles y su valor para inmunoprecipitar.

### **Caracterización de los anticuerpos para monitorizar la actividad quinasa de BRSK1 y BRSK2 inmunoprecipitadas de lisados celulares.**

La caracterización de los diferentes anticuerpos disponibles se completó con la optimización para ser utilizados en ensayos de actividad. Para ello, se incubaron en paralelo con extractos de células HEK-293 que sobre-expresan BRSK1 o BRSK2, y se determinó la actividad de las quinasas inmunoprecipitadas mediante ensayo radiométrico. La **figura R.8** muestra que BRSK1 y BRSK2 inmunoprecipitadas con los anticuerpos diseñados contra el extremo C-terminal, presentan una actividad específica del mismo orden que las BRSKs precipitadas mediante *pull down* con Glutación-*Sepharose*. No se detectó apenas actividad cuando se utilizaron los anticuerpos diseñados contra el extremo N-terminal de la proteína, de acuerdo con la escasa capacidad de estos anticuerpos en la inmunoprecipitación de las BRSKs de cerebro de rata.

### **Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para análisis inmunocitoquímicos de neuronas en cultivo.**

Finalmente se optimizó el uso de los anticuerpos anti-BRSKs en ensayos inmunocitoquímicos de neuronas hipocampales de rata. La **figura R.9** muestra las fotografías de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo cultivadas durante 10 días *in vitro* (10 DIV) y teñidas para BRSK1 y BRSK2 utilizando el anticuerpo C-terminal de cada quinasa. Se observa que BRSK1 y BRSK2 (verde) localizan en el núcleo y las prolongaciones neuronales con un patrón de distribución similar al del marcador de vesículas sinápticas sinaptofisina (rojo) en el caso de BRSK1, y al del marcador de prolongaciones dendríticas MAP2 (rojo) en el caso de BRSK2. La incubación del anticuerpo anti-BRSK1 o anti-BRSK2 con el péptido inmunógeno correspondiente no generó

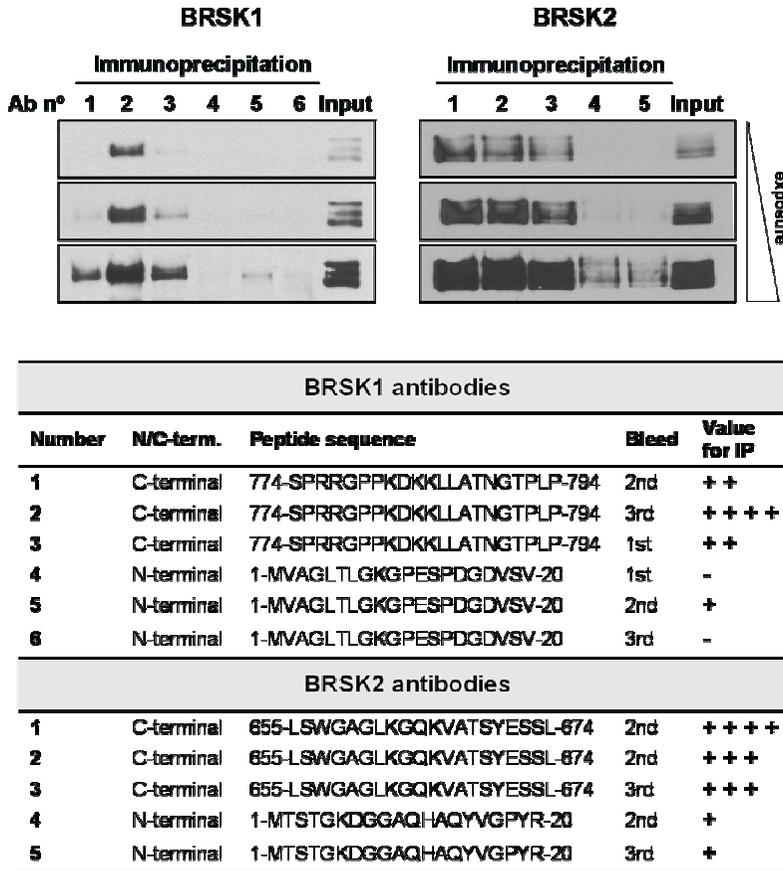
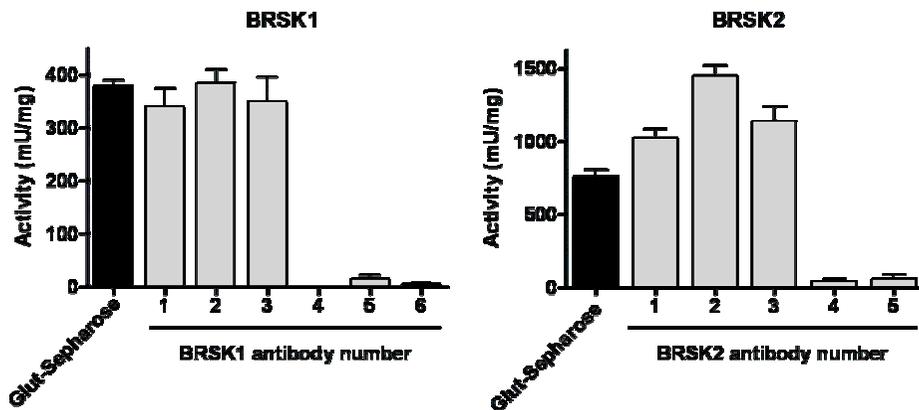
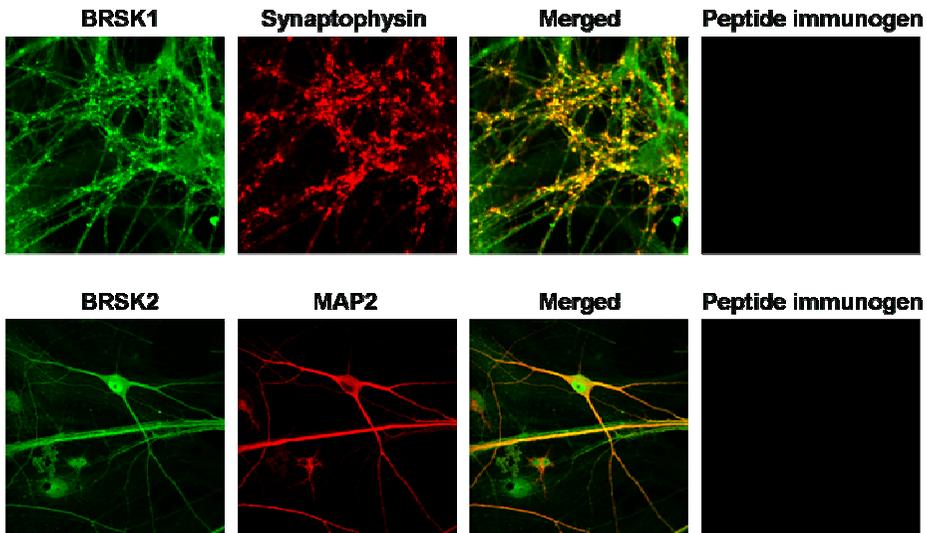


Figura R.7 Valor de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para inmunoprecipitar las quinasas endógenas. Inmunoprecipitación de BRSK1 y BRSK2 de 250 µg de cerebro de rata utilizando 1 µg de cada anticuerpo disponible. La cantidad de quinasas inmunoprecipitadas se analizó mediante inmunoblot (anticuerpo número 1 para BRSK1 y número 2 para BRSK2). Se muestran tres revelados de menor a mayor grado de exposición. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. La tabla resume las características de los diferentes anticuerpos y el valor para inmunoprecipitar de cada uno de ellos.

señal inmunofluorescente (cuarto panel), lo que indica la especificidad de los anticuerpos utilizados. Tampoco se obtuvo tinción en los controles sin anticuerpo primario o secundario, descartando así la posibilidad de tinciones inespecíficas en el cultivo (resultados no mostrados). Estos resultados validan el uso de los anticuerpos para los análisis inmunocitoquímicos que se muestran en los siguientes capítulos de esta Memoria, en los que se estudia en detalle la expresión, localización y patrón de distribución de las BRSKs durante la diferenciación neuronal.



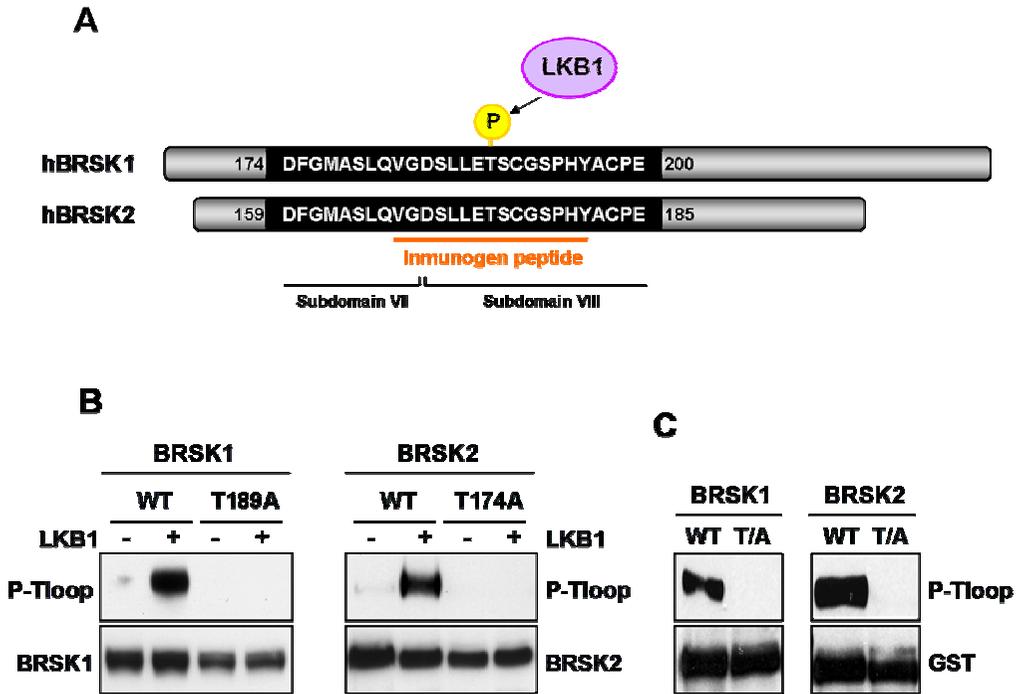
**Figura R.8** Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para monitorizar la actividad quinasa de las BRSKs inmunoprecipitadas. Actividad específica de BRSK1 y BRSK2 determinada mediante ensayo radiométrico tras la inmunoprecipitación de 50  $\mu\text{g}$  de extracto de células HEK-293 que sobre-expresan GST-BRSK1 y GST-BRSK2. Para la inmunoprecipitación se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de cada anticuerpo, numerado como en la figura R.7. En paralelo (barra negra), se purificó mediante resina de Glutión-Sepharose la misma cantidad de cada BRSK. La actividad específica se determinó mediante ensayo radiométrico utilizando 200  $\mu\text{M}$  de péptido sustrato AMARA y 100  $\mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ -ATP]/ $\text{Mg}^{2+}$ . Los valores son medias  $\pm$  s.d. de ensayos por triplicado y representativos de dos experimentos independientes.



**Figura R.9** Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para análisis inmunocitoquímico de neuronas en cultivo. Neuronas hipocampales de rata fueron cultivadas *in vitro* durante 10 días, fijadas con paraformaldehído y teñidas para BRSK1 y BRSK2 (verde, primer panel), junto con los marcadores neuronales sinaptofisina o MAP2 (rojo, segundo panel). El tercer panel (Merged) muestra la superposición de las dos tinciones anteriores. El cuarto panel muestra la ausencia de tinción al incubar el anticuerpo anti-BRSK en presencia del péptido inmunógeno correspondiente. Resultados representativos de dos cultivos primarios.

#### R.1.4 Caracterización del anticuerpo anti-pTloop BRSK fosfoespecífico.

Por último, se caracterizó el anticuerpo que reconoce el T-loop de las BRSKs fosforilado. Este anticuerpo, procedente también del laboratorio del Professor Alessi, fue diseñado contra una secuencia de 15 aminoácidos del dominio quinasa idéntica en las dos isoformas de BRSKs. Esta secuencia corresponde a los últimos residuos del subdominio VII y los primeros del subdominio VIII, y contiene la treonina fosforilada por LKB1 (Thr189 en BRSK1 y Thr174 en BRSK2) (**figura R.10A**). La detección específica de la fosforilación en este residuo constituye una herramienta importante ya que permite monitorizar mediante inmunoblot el estado de actividad de las BRSKs. Así, con la finalidad de caracterizar el anticuerpo anti-pTloop, se llevaron a cabo ensayos de fosforilación por LKB1 de preparaciones puras de BRSK1 y BRSK2 salvajes y de los mutantes Thr-Ala (T189A y T174A, respectivamente), purificadas de células *E. coli*. La **figura R.10B** muestra como el anticuerpo anti-pTloop reconoce exclusivamente las BRSKs fosforiladas, ya que solo rindió señal cuando las quinasas fueron incubadas con el complejo LKB1. Además, reconoce de forma específica la treonina del T-loop fosforilada, dado que no se obtuvo señal cuando se probaron los mutantes T/A aún en presencia de LKB1 activa. Para comprobar la eficacia del anticuerpo en un sistema *in vivo*, se sobre-expresó BRSK1 o BRSK2 salvajes y los correspondientes mutantes T/A en células humanas HEK-293. Como se observa en la **figura R.10C**, el anticuerpo reconoce exclusivamente las formas salvajes fosforiladas por LKB1 endógena, y no los mutantes en que la treonina fue sustituida a alanina.



**Figura R.10 Caracterización del anticuerpo anti-P-Tloop BRSK.** (A) Representación esquemática de BRSK1 y BRSK2 humanas en la que se muestra la secuencia del T-loop del dominio quinasa (idéntica en ambas isoformas) que contiene la treonina fosforilada por LKB1 (Thr189-BRSK1 y Thr174-BRSK2). Se indican los subdominios VII y VIII del T-loop, así como el péptido inmunógeno utilizado para la síntesis del anticuerpo fosfo-específico. (B) BRSK1 y BRSK2 salvajes (WT, *wild type*) o los mutantes T/A (T189A en BRSK1 y T174A en BRSK2) purificados de bacterias fueron incubados en presencia (+) o ausencia (-) de LKB1 activa y 100  $\mu$ M ATP/Mg durante 30 min. Los paneles superiores muestran los niveles de fosforilación de las BRSKs detectados mediante inmunoblot (anti-pTloop), y los inferiores la BRSK utilizada (anti-BRSK1 o anti-BRSK2). (C) Lisados de células HEK-293 que sobre-expresan GST-BRSK1 o GST-BRSK2 salvajes (WT) o sus mutantes T/A fueron analizados mediante inmunoblot para detectar su fosforilación (anti-pTloop, paneles superiores). Los paneles inferiores muestran la quinasa sobre-expresada (anti-GST). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

## RESUMEN

Se han obtenido vectores de expresión en procariotas y eucariotas que permiten sobre-expresar formas de BRSK1 y BRSK2 salvajes, inactivas (BRSK1-T189A y BRSK2-T174A) y constitutivamente activas (BRSK1-T189E y BRSK2-T174E). Ello ha permitido corroborar que el complejo LKB1 activa a las BRSKs *in vitro* e *in vivo*. Mediante la infección con baculovirus de células de insecto Sf9 se han obtenido grandes cantidades de BRSK1 y BRSK2 puras y activas, que fueron caracterizadas mediante la determinación de sus constantes cinéticas para el ATP y los péptidos sustrato CHKtide, LNR y AMARA. Los resultados obtenidos recomiendan el uso del péptido CHKtide como sustrato de las BRSKs. Se han caracterizado anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para su uso en ensayos de inmunoblot, inmunoprecipitación e inmunocitoquímica. Estos anticuerpos reconocen de manera isoforma-específica las BRSKs humanas, de rata y de ratón. La utilización de estos anticuerpos ha permitido poner a punto un método radiométrico para monitorizar la actividad de las BRSKs de extractos celulares y tisulares. Por último, se ha caracterizado un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce el residuo de treonina del T-loop de las BRSKs fosforilado por LKB1. Este anticuerpo fosfoespecífico (pT-loop) reconoce *in vitro* e *in vivo* las formas de BRSK1 y BRSK2 activas (fosforiladas en la treonina conservada del T-loop por LKB1), por lo que constituye una herramienta importante ya que permite monitorizar el estado de activación de las BRSKs mediante inmunoblot.

