



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioqímica i  
Biologia Molecular.  
Unitat de Medicina



**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS *BRAIN-SPECIFIC KINASES* 1 Y  
2 (BRSK1 Y BRSK2, TAMBIÉN LLAMADAS SAD QUINASAS) EN  
LA DIFERENCIACIÓN Y SINAPSIS NEURONALES.**

**Arantzazu Rodríguez Asiain**

**TESIS DOCTORAL**

**Bellaterra, 2012**

## **RESULTADOS-CAPÍTULO 4:**

**R.4 Sintaxina-1A: nuevo sustrato de BRSK1.**



## R.4 Sintaxina-1A: nuevo sustrato de BRSK1.

La observación que BRSK1 asociada a *lipid rafts* de sinaptosomas presenta una actividad más elevada que la proteína citosólica, induce a considerar la presencia de proteínas sustrato de BRSK1 en estos microdominios de membrana. Inoue *et al* demostraron que BRSK1 controla pre-sinápticamente la liberación de neurotransmisores, ya que la sobre-expresión de BRSK1 incrementaba la frecuencia de las corrientes excitatorias post-sinápticas miniatura (mEPSC) en neuronas hipocampales de rata (Inoue et al, 2006). Estos autores mostraron la fosforilación *in vitro* de la proteína vesicular RIM1 como posible sustrato, aunque especulan abiertamente con la existencia de otras proteínas sustrato de BRSK1 en vesículas sinápticas y la zona activa que contribuirían a la actividad mEPSC espontánea. Dados estos antecedentes, y de acuerdo con los resultados mostrados hasta ahora, nos planteamos si BRSK1 intervenía directamente en la mediación de la fusión de vesículas con la membrana pre-sináptica, a través de la fosforilación de alguna de las proteínas de la superfamilia SNARE (*SNAP REceptor*).

### R.4.1 Estudio de fosforilación de las proteínas SNARE por BRSK1.

La maquinaria mínima necesaria para que se dé el proceso de fusión de la vesícula con la membrana se compone de tres proteínas de la superfamilia SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)-Attachment protein REceptors*): dos *target*-SNARE (t-SNARE) de la membrana plasmática (SNAP25 y sintaxina) y una *vesicular*-SNARE (v-SNARE) de la membrana vesicular (sinaptobrevina o VAMP). Estas tres proteínas forman el núcleo del complejo indispensable para que se de una correcta orientación y proximidad entre la vesícula y la membrana (Weber et al, 1998). Sin embargo, existen otros actores en este proceso que ya sea por interactuar individualmente con alguna de las principales SNARE o asociarse directamente al núcleo intervienen de forma decisiva en la eficacia de la fusión. Es el caso, por ejemplo, de la proteína citoplasmática Munc18 (Han et al, 2010).

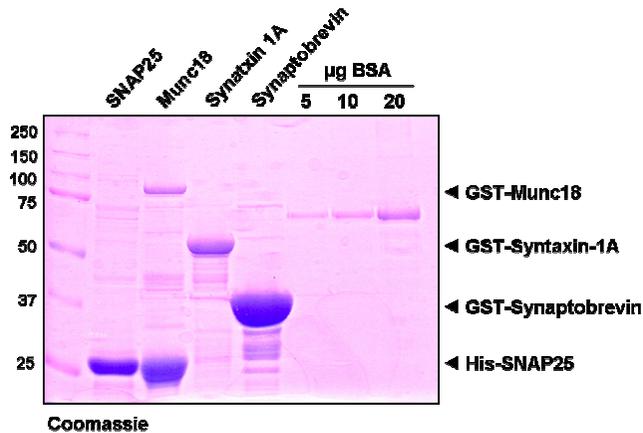
Así pues, se decidió expresar y purificar las proteínas SNARE (SNAP25, sintaxina-1A, sinaptobrevina y Munc18), para ser ensayadas como putativos sustratos de BRSK1 en ensayos de fosforilación *in vitro*.

### Expresión y purificación de las proteínas SNARE SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina.

Células *E.coli* de la cepa BL21 se transformaron con los vectores codificantes para las proteínas SNARE SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina (donación de Dr. Joan Blasi, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona), y las proteínas expresadas fueron purificadas

mediante una resina de afinidad (tabla **figura R.36**). Las proteínas purificadas que son integrales de membrana (sintaxina-1A y sinaptobrevina) carecen de la hélice transmembrana situada en su extremo C-terminal; la delección de este dominio es necesaria para la correcta solubilización y purificación de estas proteínas en células *E. coli*, y no afecta a la estructura secundaria del resto de proteína ni a sus motivos de interacción con otras proteínas (Kee et al, 1995). Como muestra la tinción Coomassie del correspondiente gel SDS-PAGE (**figura R.36**), la homogeneidad de las purificaciones de las proteínas SNARE fue superior al 90%.

Protein	Weight (kDa)	Purification method	SNARE type	Localization	Function
His-SNAP25	25	Ni <sup>2+</sup> -Agarose	t / Q-SNARE	Plasmatic membrane	Assembles core SNARE complex
GST-Munc18	95	Gluthation-Sepharose	Q-SNARE	Cytoplasm	Binds syntaxin forming a complex which precede and regulate vesicle priming
GST-Syntaxin 1A	54	Gluthation-Sepharose	t / Q-SNARE	Plasmatic membrane	Assembles core SNARE complex
GST-Synaptobrevin	37	Gluthation-Sepharose	v / R-SNARE	Vesicular membrane	Assembles core SNARE complex

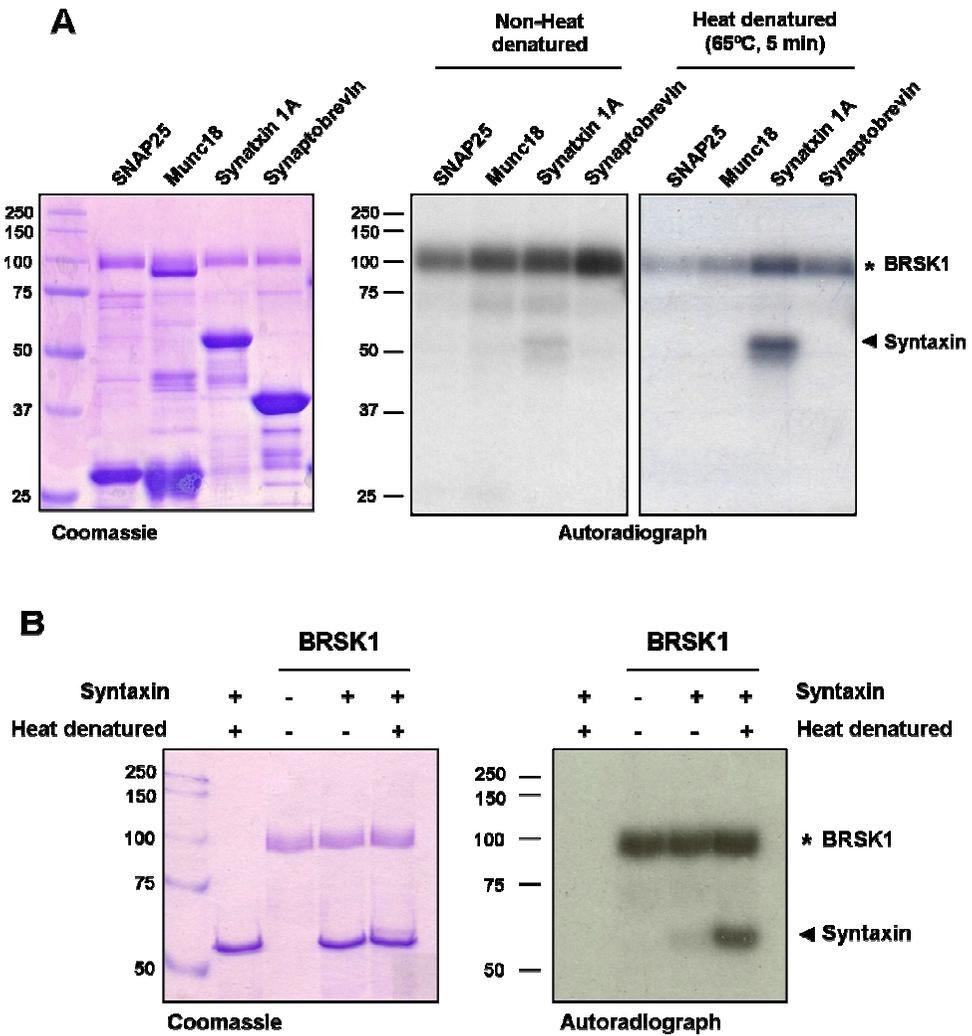


**Figura R.36** Expresión y purificación de SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina de células de *E. coli*. Células *E. coli* de la cepa BL21 fueron transformadas con los vectores de expresión que codifican para las proteínas SNAP25, Munc18, sintaxina y sinaptobrevina. Las proteínas se purificaron siguiendo el protocolo indicado en Material y Métodos. La tabla muestra el tipo de resina de afinidad utilizado, la clasificación de las proteínas SNARE purificadas (t, target; v, vesicular; Q, contribuye con una glutamina en la capa iónica cero del núcleo del complejo SNARE; R, contribuye con una arginina), su localización y la descripción de su función en el proceso de fusión de membranas. El gel SDS-PAGE con tinción Coomassie Blue muestra la pureza de la purificación y la cantidad de proteína detectada en 10 µl de eluido.

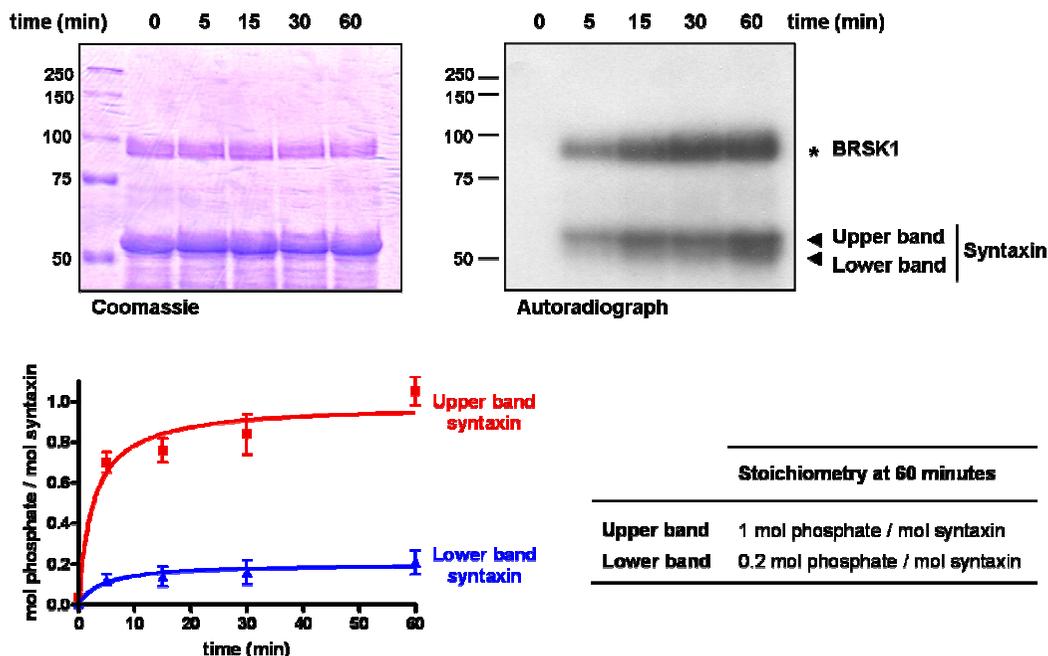
**BRSK1 fosforila *in vitro* a la proteína t-SNARE syntaxina-1A.**

A continuación se realizaron ensayos para monitorizar la fosforilación de las proteínas SNARE purificadas por BRSK1. Así, se incubó BRSK1 activa purificada de células de insecto con las proteínas SNARE purificadas de células *E. coli*, en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ATP y magnesio. Una de las hipótesis más aceptadas es que el núcleo del complejo SNARE está constituido por un haz de 4 hélices alfa, de las cuales la syntaxina y sinaptobrevina proporcionan una hélice cada una cada mientras que SNAP25 interviene con las dos restantes. La syntaxina puede adoptar dos conformaciones nativas drásticamente diferentes: una conformación abierta dentro del complejo SNARE en la que queda expuesta la hélice alfa y una conformación cerrada fuera del complejo en la que se pliega sobre misma (Gerber et al, 2008; Dulubova et al, 1999). Un recurso usado con éxito en el estudio de la fosforilación de proteínas en conformación abierta es inducir una previa desnaturalización térmica de la proteína. Así, por ejemplo, se identificó que la quinasa LRRK2 (*Leucin-rich repeat kinase 2*) fosforila la miosina sólo cuando ésta se encuentra en conformación abierta activa y cuando es hábil para unir actina (Jaleel et al, 2007). Se decidió por tanto estudiar la fosforilación de las proteínas SNARE en ambas conformaciones, para lo que se pre-incubaron o no a 65°C durante 5 minutos. La **figura R.37A** muestra las autorradiografías de las reacciones en ambas condiciones. Se observa que BRSK1 fosforila a syntaxina-1A sólo en condiciones desnaturalizantes (*heat denatured*), es decir cuando adopta su conformación abierta dentro del complejo SNARE. No se detectó incorporación de radioactividad en el resto de proteínas analizadas. Para confirmar la fosforilación de syntaxina-1A por BRSK1, se realizó un ensayo de fosforilación en el que se incluyó un control de syntaxina sola (sin BRSK1) y un control de la quinasa sola (sin la proteína t-SNARE). A pesar de la pureza de las purificaciones, estos controles aseguran por un lado la ausencia de quinasas en la purificación de syntaxina y por otro la ausencia de fragmentos de degradación de BRSK1 que pudieran dar señal de autofosforilación. Como muestra la **figura R.37B**, BRSK1 fosforila específicamente a syntaxina-1A.

El análisis de fosforilación en función del tiempo (**figura R.38**), indica que BRSK1 fosforila a syntaxina-1A de manera tiempo-dependiente. En la tinción Coomassie de la figura se observa que a medida que la syntaxina es fosforilada por BRSK1 aparece una banda unos 5 KDa por encima del peso esperado que también incorpora radioactividad (*upper band*). Esta banda, que representa aproximadamente el 10% de syntaxina-1A en el ensayo a 60 minutos de reacción, alcanza un máximo de estequiometría de 1 mol de fosfato por mol de syntaxina, y realmente corresponde a syntaxina, como se comprobó más adelante por espectrometría de masas e inmuno-análisis. La estequiometría para la banda que rinde el peso molecular esperado para syntaxina (*lower band*) y que representa la mayor parte de la proteína en el ensayo (~ 90%), resultó ser de 0.2 mol de fosfato por mol de syntaxina (gráfico y tabla **figura R.38**).



**Figura R.37 Fosforilación *in vitro* de sintaxina-1A por BRSK1.** (A) Ensayo de fosforilación de las proteínas SNARE SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina por BRSK1. 2 µg de las proteínas purificadas en *E. coli* fueron sometidas o no a desnaturalización por calor durante 5 minutos a 65°C (*Non-Heat denatured* y *Heat denatured*), antes de ser incubadas con 1 µg de BRSK1 purificada en células de insecto en presencia de 100 µM  $^{32}\text{P}$ -[γ-ATP]/Mg $^{2+}$ . Tras 30 minutos de reacción las proteínas se separaron mediante gel SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue. Las autorradiografías muestran la radioactividad detectada (\* señala la autofosforilación de BRSK1, y ◀ la fosforilación de sintaxina-1A). (B) Igual que en (A), ensayo de fosforilación de la sintaxina-1A en conformación abierta (*Heat denatured*) y cerrada por BRSK1. Resultados representativos de cuatro ensayos independientes.



**Figura R.38 Estequiometría de la fosforilación de sintaxina-1A por BRSK1.** Fosforilación de 2  $\mu\text{g}$  de sintaxina-1A desnaturalizada ( $65^{\circ}\text{C}$ , 5 min) por BRSK1 (1  $\mu\text{g}$ ) en presencia de  $100 \mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ -ATP]/ $\text{Mg}^{2+}$  a los tiempos de reacción indicados. La fosforilación se detectó mediante autoradiografía de las proteínas separadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue. Se indica la autofosforilación de BRSK1 (\*) y la fosforilación de sintaxina-1A ( $\blacktriangleleft$ , banda superior *upper band* e inferior *lower band*). El gráfico muestra la estequiometría de la fosforilación de sintaxina-1A a lo largo del tiempo. Las cuentas por minuto (cpm) incorporadas en sintaxina se midieron en contador de centelleo tras cortar las bandas del gel (rojo, banda superior *upper band*; azul, banda inferior *lower band*). La tabla muestra los valores de estequiometría de la banda superior e inferior de la sintaxina (*upper & lower band*) a los 60 minutos de reacción. Resultados representativos de dos experimentos diferentes.

#### R.4.2 BRSK1 fosforila a sintaxina-1A en el residuo Serina-188.

A continuación se diseñaron una serie de experimentos con la finalidad de proceder a la identificación del residuo o residuos de sintaxina-1A fosforilados por BRSK1.

##### El mutante de delección sintaxina[1-168] es pobremente fosforilado por BRSK1.

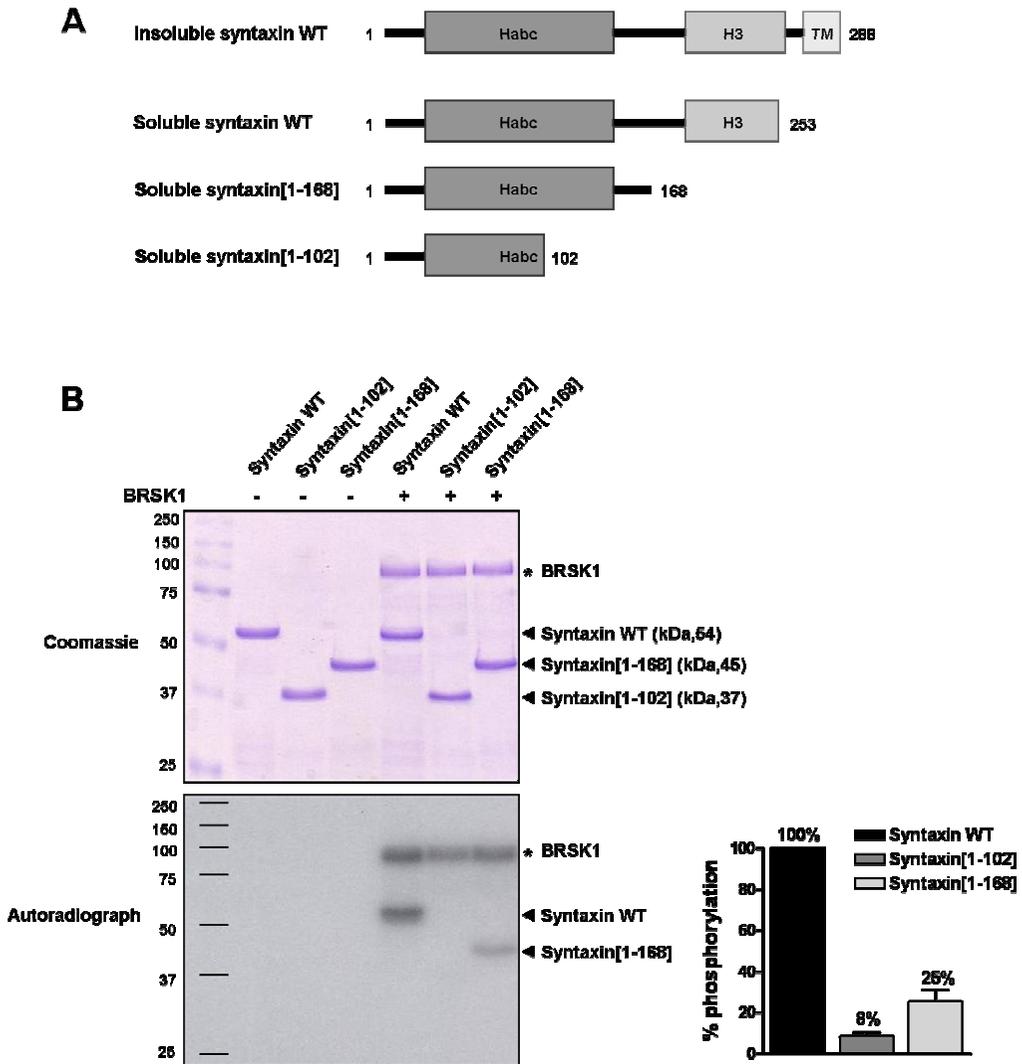
La primera aproximación utilizada para identificar el residuo fosforilado por BRSK1 fue generar mutantes de delección de sintaxina-1A. Mediante mutaciones puntuales se introdujeron dos codones STOP en las posiciones 102 y 168 generando dos formas truncadas de sintaxina-1A: sintaxina[1-102] y sintaxina[1-168]. La sintaxina posee tres dominios bien definidos: un

dominio transmembrana en su extremo C-terminal (TM), un dominio SNARE estructurado en hélice alfa (H3) y un dominio regulatorio en N-terminal configurado por tres hélices alfa (Habc). El mutante de delección más corto generado (sintaxina[1-102]) solo posee parte del dominio Habc, mientras que el mutante sintaxina[1-168] mantiene intactos tanto el dominio Habc como el dominio SNARE H3. La **figura R.39A** muestra una representación esquemática de los dominios funcionales de la sintaxina salvaje y los mutantes generados. Como se ha mencionado anteriormente, la sintaxina salvaje soluble utilizada carece de los últimos 38 aminoácidos que configuran la hélice transmembrana, lo que genera una proteína de 253 residuos.

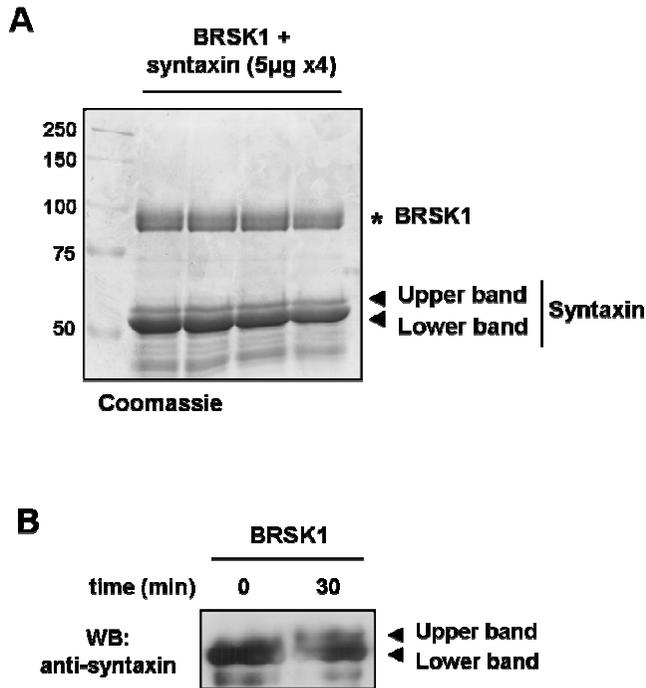
Una vez expresados y purificados en células *E. coli*, se analizó la fosforilación por BRSK1 de los mutantes de delección de sintaxina-1A generados. Así, previa desnaturalización térmica (65°C, 5 minutos), sintaxina-1A salvaje o mutante se incubó con BRSK1 activa en presencia de <sup>32</sup>P-ATP y magnesio durante 5 minutos. La **figura R.39B** muestra la tinción Coomassie Blue y la autorradiografía de las proteínas resueltas mediante gel SDS-PAGE. Se observa que el mutante más corto sintaxina[1-102] no es fosforilado por BRSK1, lo que descarta la presencia de residuos fosforilados en los 100 primeros aminoácidos de la proteína. La forma truncada sintaxina[1-168] presenta solo un 25% de fosforilación comparado con la proteína salvaje, lo que indica que el principal residuo de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1 se encuentra entre los aminoácidos 168 y 253. Cabe destacar que la detección del 25% de fosforilación en la sintaxina[1-168] indicaría que la región 102-168 contiene serinas o treoninas fosforiladas por BRSK1 de manera secundaria.

### **Identificación mediante espectrometría de masas de la Serina-188 como el residuo de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1.**

A continuación, la sintaxina-1A fosforilada *in vitro* por BRSK1 fue analizada mediante espectrometría de masas con la finalidad de identificar el/los residuo/s fosforilado/s. Tras poner a punto las condiciones del ensayo en que se obtenía una gran cantidad de sintaxina fosforilada, se incubaron 20 µg de sintaxina-1A (previamente desnaturalizada) con 20 µg de BRSK1 durante 30 minutos en presencia de ATP frío y magnesio. La sintaxina-1A fosforilada se separó mediante gel SDS-PAGE. La **figura R.40A** muestra la tinción Coomassie Blue del correspondiente gel, en el que se observa el retraso electroforético de unos 5 kDa de una parte de la sintaxina hiperfosforilada (*upper band*). Con la finalidad de comprobar que esta banda correspondía a sintaxina, 50 ng de la reacción de fosforilación anterior fueron analizados mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-sintaxina. Como muestra la **figura R.40B**, el anticuerpo detecta también la banda retrasada *upper band*, lo que indica que se trata de sintaxina. Ambas bandas fueron recortadas y digeridas con diferentes proteasas para su análisis por espectrometría de masas.



**Figura R.39 Análisis de fosforilación de los mutantes de deleción de sintaxina-1A por BRSK1.** (A) Representación esquemática de los dominios funcionales de sintaxina salvaje (*wild type*, WT) insoluble y soluble, y los mutantes de deleción generados (TM, dominio transmembrana; H3, dominio SNARE; Habc, dominio regulatorio). (B) Análisis de fosforilación de sintaxina WT y sus formas truncadas por BRSK1. 2  $\mu$ g de sintaxina WT o sintaxina[1-102] o sintaxina[1-168] purificadas de *E. coli* fueron desnaturalizadas 5 minutos a 65°C previa incubación con 1  $\mu$ g de BRSK1 activa durante 5 minutos en presencia de 100  $\mu$ M  $^{32}$ P- $[\gamma$ -ATP]/Mg $^{2+}$ . La fosforilación se detectó mediante autorradiografía de las proteínas resueltas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue. Se indica la autofosforilación de BRSK1 (\*) y la fosforilación de la sintaxina-1A salvaje y los mutantes de deleción ( $\blacktriangleleft$ ). El gráfico muestra el porcentaje de fosforilación de las formas truncadas respecto a la sintaxina salvaje. La fosforilación incorporada se midió en cuentas por minuto (cpm) detectadas en contador de centelleo tras cortar las correspondientes bandas del gel SDS-PAGE. Los valores son medias  $\pm$  s.d de tres experimentos diferentes.



**Figura R.40** Obtención de syntaxin-1A fosforilada por BRSK1 para el análisis por espectrometría de masas. **(A)** Tinción Coomassie Blue del gel SDS-PAGE de las muestras de syntaxina-1A fosforilada por BRSK1 utilizada para el análisis de espectrometría de masas. Syntaxina-1A (desnaturalizada 5 minutos a 65°C) purificada de *E. coli* (20 µg) se incubó con BRSK1 activa purificada de células de insecto (20 µg) en presencia de 200 µM de ATP frío y magnesio durante 30 minutos. Las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE cargando 4 réplicas de 5 µg de syntaxina en cada carril. Se marca BRSK1 (\*) y syntaxina-1A (◀, *upper & lower band*). Tras teñir el gel con Coomassie Blue, se recortaron por separado las bandas superior e inferior de syntaxina-1A para su procesamiento por espectrometría de masas. **(B)** Una alícuota de la reacción de fosforilación anterior (50 ng de syntaxina) se analizó mediante inmunoblot utilizando anticuerpo anti-syntaxina.

El diseño de la estrategia de digestión de la muestra, su procesamiento y la interpretación de los resultados obtenidos del análisis de espectrometría de masas fue llevado a cabo por el Dr. Joan Villanueva y la Dra. Montserrat Carrascal del Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, UAB). La primera aproximación consistió en la digestión canónica de las muestras con tripsina. Esta proteasa corta preferiblemente en argininas (R) y lisinas (K) en posición P1, con mayor eficacia en argininas (con algunas excepciones dependiendo del residuo situado en P1' o P2). La digestión con tripsina es muy común para generar péptidos que serán analizados por espectrometría de masas, ya que la presencia de un aminoácido básico en C-terminal del péptido facilita la detección de los iones fosfato en el modo negativo del espectrómetro. De hecho, la digestión con tripsina fue utilizada en la identificación del único residuo fosforilado de syntaxina-1A reportado *in vivo*: la fosforilación de la Serina-14 por

la proteína quinasa CKII (Foletti et al, 2000; Dubois et al, 2002). La **figura R.41** muestra la secuencia de sintaxina-1A en la que se señalan los lugares de corte con tripsina predichos por el algoritmo *Peptide Cutter* del servidor ExPASy Bioinformatics Resource Portal ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter](http://web.expasy.org/peptide_cutter)). En rojo se resaltan los péptidos generados tras la digestión con tripsina, identificados mediante MS2 por comparación con una base de datos de la proteína esperada. La posición y secuencia de los 5 péptidos identificados se muestra en la tabla de la misma figura. Los espectros MS3 de los péptidos no mostraron fosforilación alguna en serina, treonina o tirosina, lo que descarta, entre otros, que BRSK1 fosforile la Serina-14 de sintaxina-1A (contenida en el péptido 1 analizado).



Enzyme	Num. of cleavages	Num. of peptides	Peptide number	Peptide position	Peptide sequence
Trypsin	10	5	1	10 - 41	TAKSDDDDDVTVTVD RDRFMDEFFEQVEEIR
			2	57 - 84	KHSAILASPNPDEKTKEELEELMSDIKK
			3	95 - 108	SIEQSIEQEEGLNR
			4	126 - 142	KFVEVMSEYNATQSDYR
			5	159 - 232	TTTSEELEDMLESGNPAIFASGII MDSSISKQALS E IETRHSEI IKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQG EMIDR

**Figura R.41** Péptidos de sintaxina-1A identificados mediante MS2 tras la digestión con tripsina. Secuencia de sintaxina-1A en la que se muestran los lugares de corte con tripsina predichos por la herramienta *Peptide Cutter* del servidor ExPASy Bioinformatics resource Portal. En rojo se resaltan los 5 péptidos identificados mediante MS2, separados por nano-HPLC y analizados por espectrometría de masas en tándem (LC- $\mu$ ESI-ITMS/MS). La tabla muestra la posición y la secuencia de los 5 péptidos analizados.

El análisis de fosforilación utilizando los mutantes de delección de syntaxina-1A (**figura R.39**) indicaba que el principal residuo fosforilado por BRSK1 se localiza entre los aminoácidos 168-253. Como se observa en la tabla de la **figura R.41**, la digestión con tripsina genera un péptido largo de 74 aminoácidos (péptido 5) que contiene esta región (159-232). El gran tamaño y carga iónica de este péptido implicaba la posibilidad de que el análisis de espectrometría realizado no fuera resolutivo en la detección de la pérdida iónica del fosfato en el caso que alguno de sus residuos estuviera fosforilado. Como consecuencia, se decidió digerir la syntaxina con un enzima que generara péptidos más cortos en esta región. Dada la abundancia de residuos ácidos en la estructura primaria de syntaxina-1A, se optó por una segunda estrategia de proteólisis, esta vez utilizando la endoproteinasa GluC (endoGluC). Esta enzima corta selectivamente en residuos ácidos en posición P1, con una eficacia unas 200 mayor para ácido glutámico (E) que para ácido aspártico (D). La **figura R.42** muestra la secuencia de syntaxina-1A en la que se marcan los lugares de corte con endoGluC predichos por el algoritmo *Peptide Cutter*. Al igual que para la



Enzyme	Num. of cleavages	Num. of peptides	Peptide number	Peptide position	Peptide sequence
EndoGluC	10	5	1	40 - 49	IRGFIDKIAE
			2	54 - 73	VKRKHSAILASPNPDEKTKE
			3	134 - 166	YNATQSDYRERCKGRIQRQLEITGRITTTSEE
			4	171 - 194	SGNPAIFASGII MDSSISKQALSE
			5	212 - 245	LHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHAVDYVE

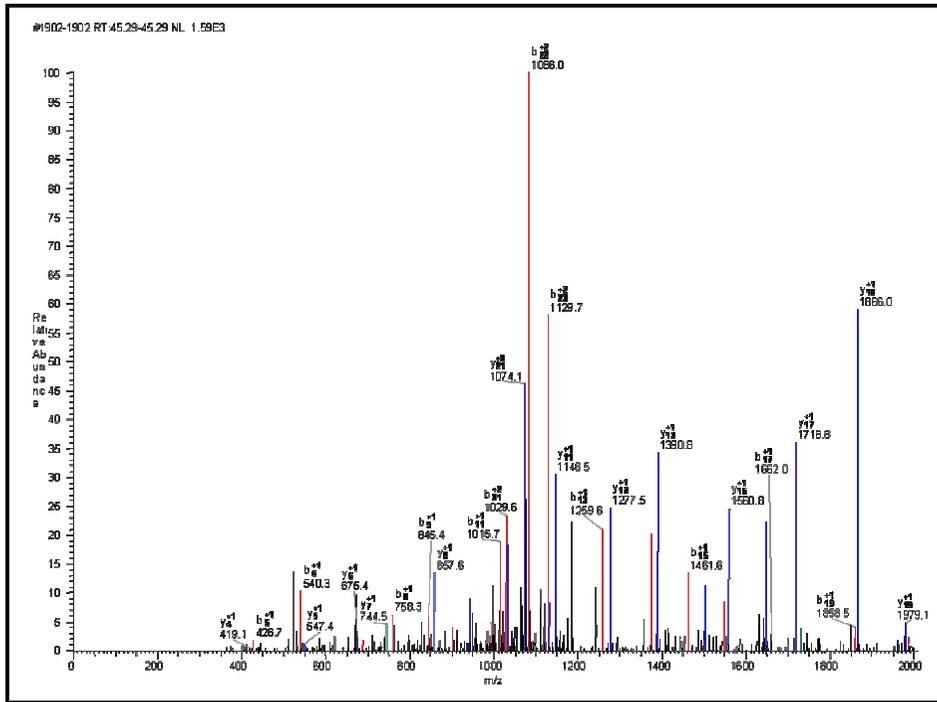
**Figura R.42** Péptidos de syntaxina-1A identificados mediante MS2 tras la digestión con endoproteinasa GluC (endoGluC). Secuencia de syntaxina-1A en la que se muestran los lugares de corte con endoGluC predichos por la herramienta *Peptide Cutter* del servidor ExpASY Bioinformatics resource Portal. En rojo se resaltan los 5 péptidos identificados mediante MS2, separados por nano-HPLC y analizados por espectrometría de masas en tándem (LC-μESI-ITMS/MS). La tabla muestra la posición y la secuencia de los 5 péptidos analizados.

tripsina, en rojo se resaltan los 5 péptidos identificados mediante MS2, cuya secuencia y posición se recogen en la tabla de la misma figura.

El análisis de los espectros MS3 de los péptidos identificados tras la digestión con endoGluC reveló que el péptido 4 (171-SGNPAIFASGIIMDSSISKQALSE-194) contenía un residuo fosforilado. La **figura R.43** muestra el espectro MS3 correspondiente a este fosfopéptido, en el que se representan los picos Yn y Bb esperables en función de los patrones teóricos de fragmentación en un sistema de trampa iónica. La tabla recoge la interpretación de los picos observados. Se marcan en rojo y azul las coincidencias entre las asignaciones esperadas y las observadas. De las 6 serinas contenidas en el fosfopéptido, el espectro MS3 descarta como posibles candidatas fosforiladas la serina en posición 1 (Ser171), 9 (Ser179), 15 (Ser185) y 16 (Ser186). Sin embargo, los datos del espectro crean cierta incertidumbre sobre la localización de la fosforilación entre las serinas en posición 18 (Ser188) y 23 (Ser193), debido a que la calidad por debajo de  $m/z$ 900 y por encima de  $m/z$ 1750 no es suficiente. El análisis en profundidad favoreció la hipótesis de fosforilación en la Serina-188, puesto que se observa un pico poco intenso a 675 (esperado si la Serina-188 está fosforilada), mientras que no se observa pico a 657 (esperado si no está fosforilada).

En las dos bandas de sintaxina-1A fosforilada por BRSK1 recortadas del gel (*upper & lower band*), se identificaron los mismos péptidos mediante MS2 (tanto con la digestión con tripsina como con endoGluC), corroborando que la banda superior se trata de sintaxina, como ya se observó mediante inmunoblot. Los resultados de los espectros MS3 de los péptidos de las dos bandas fueron también iguales, lo que muestra que ambas poblaciones de sintaxina se encuentran fosforiladas en la Serina-188.

Por tanto, los análisis de espectrometría de masas mostraron que BRSK1 fosforila a sintaxina-1A en la Serina-188, en concordancia con los resultados procedentes del análisis de fosforilación de los mutantes de delección, que restringían la posición del principal residuo fosforilado entre los aminoácidos 168 y 253.



NumB	AA	B m/z	Y m/z	NumY
1	S	88.04	-	24
2	G	145.06	2318.19	23
3	N	259.10	2261.16	22
4	P	356.16	2147.12	21
5	A	427.19	2050.07	20
6	I	540.28	1979.03	19
7	F	687.35	1865.95	18
8	A	758.38	1718.88	17
9	S	845.42	1647.84	16
10	G	902.44	1580.81	15
11	I	1015.52	1503.79	14
12	I	1128.60	1390.70	13
13	M	1259.65	1277.62	12
14	D	1374.67	1146.58	11
15	S	1461.70	1031.55	10
16	S	1548.74	944.52	9
17	I	1661.82	857.49	8
18	S@	1730.88	744.40	7
19	K	1858.95	675.37	6
20	Q	1987.01	547.27	5
21	A	2058.05	419.21	4
22	L	2171.13	348.18	3
23	S	2258.16	236.09	2
24	E	-	148.06	1

**Figura R.43 Espectro MS3 correspondiente al péptido fosforilado.** Análisis de espectrometría de masas en tándem por cromatografía líquida (LC-μESI-ITMS/MS) de sintaxina-1A fosforilada por BRK1. Se muestra el espectro MS3 del fosfopéptido identificado en la fase MS2 tras la digestión de la proteína con endoGluC. Se representan los picos Y y B esperables en función de los patrones teóricos de fragmentación en un sistema de trampa iónica. Se marcan en rojo y azul las coincidencias entre las asignaciones esperadas y las observadas. La tabla muestra la interpretación del espectro, en la que se señala la serina en posición 18 del péptido (Ser188 de la proteína) como el residuo fosforilado por BRK1 (@).