



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**

### **El mutante puntual sintaxina Ser188/Ala (S188A) es deficientemente fosforilado por BRSK1.**

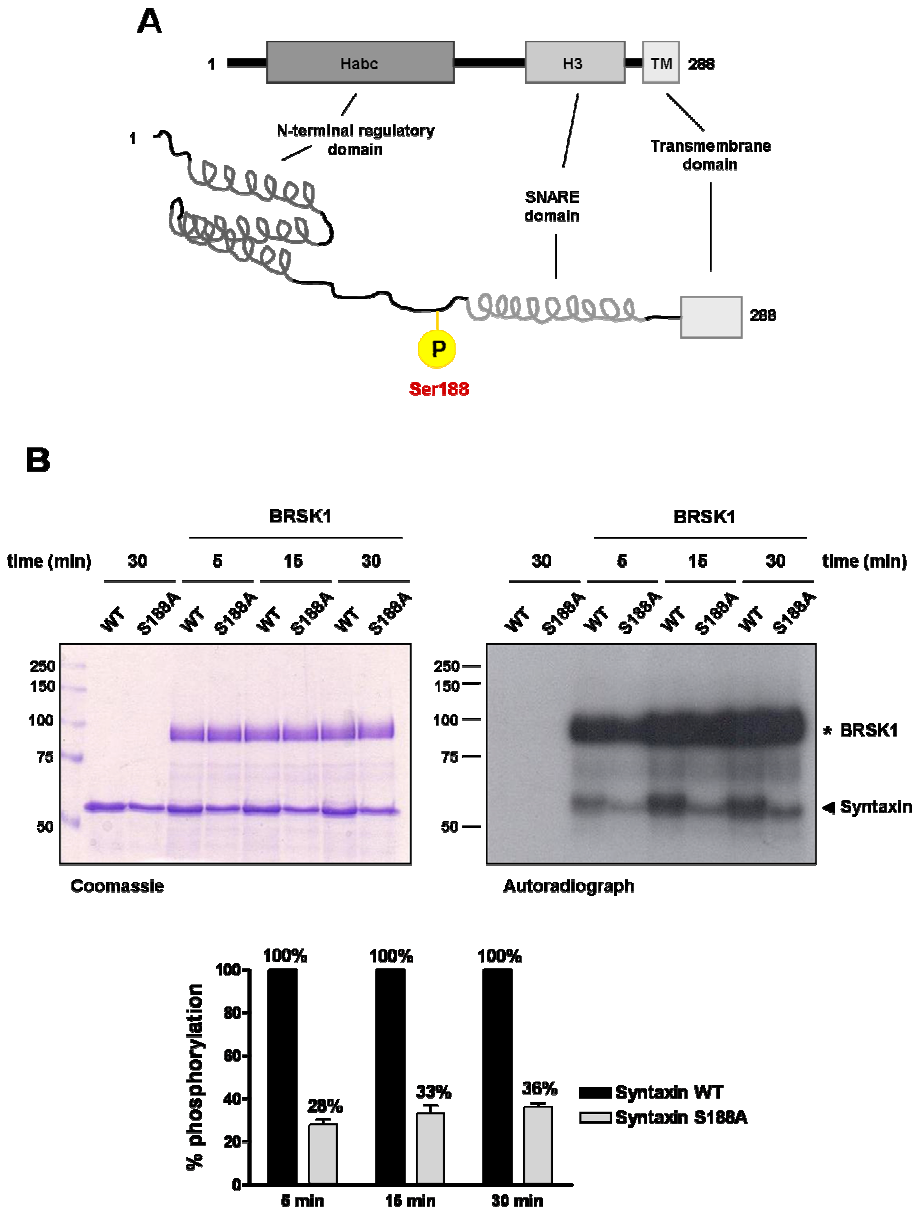
A continuación se mutó el residuo fosforilado identificado por espectrometría de masas (Ser188) para generar un mutante deficiente en fosforilación (S188A). La **figura R.44A** muestra una representación esquemática de los dominios de sintaxina-1A en conformación abierta en la que se señala la localización de la Serina-188 fosforilada por BRSK1. Se observa que este residuo se encuentra en una región no estructurada de la proteína entre los dominios Habc y H3, próximo a la hélice alfa del dominio SNARE. Para confirmar que este es el principal residuo fosforilado, se expresó y purificó el mutante S188A en células *E. coli* y se analizó su fosforilación por BRSK1 mediante ensayo radiométrico. La **figura R.44B** muestra la tinción Coomassie Blue y la autorradiografía de las proteínas separadas mediante gel SDS-PAGE. Se observa que a todos los tiempos de reacción estudiados (5, 15 y 30 minutos), la fosforilación del mutante S188A se reduce de forma significativa entre un 72-64% comparado con la forma salvaje. A los 5 minutos (en que la reacción de fosforilación se encuentra en la zona lineal), el mutante S188A presenta una fosforilación del 28%, muy similar al porcentaje de fosforilación que presentaba el mutante de delección sintaxina[1-168]. En conjunto, estos resultados muestran que el principal residuo de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1 es la Serina-188.

### **R.4.3 BRSK1 fosforila *in vitro* e *in vivo* la Serina-188 de sintaxina-1A.**

A continuación se planteó el estudio de la fosforilación de la Serina-188 por BRSK1 en sistemas celulares, por lo que se decidió generar un anticuerpo fosfoespecífico capaz de monitorizar la fosforilación de este residuo *in vivo*. El péptido inmunógeno diseñado presenta la serina fosforilada flanqueada por varios aminoácidos, los últimos del extremo C-terminal formando ya parte del dominio SNARE de sintaxina-1A (**figura R.45A**). Este fosfopéptido fue sintetizado e inyectado en conejos a partir del suero de los cuales se purificó el anticuerpo. El proceso fue realizado por la empresa GenScript, cuyo certificado final con los resultados obtenidos de análisis ELISA se adjunta al final de esta memoria (Anexo II).

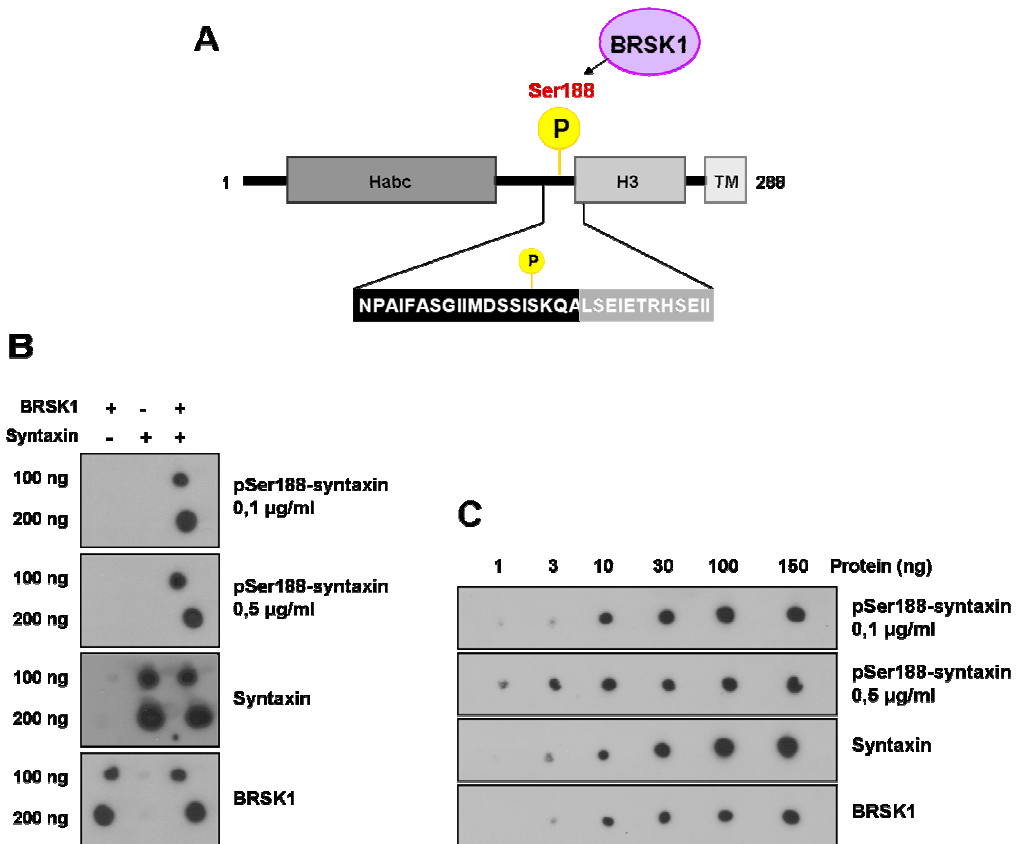
### **BRSK1 fosforila *in vitro* a sintaxina-1A en la Serina-188.**

Se diseñaron una serie de experimentos con la finalidad de caracterizar el anticuerpo anti-pSer188 generado. En primer lugar se estudió si el anticuerpo reconocía la sintaxina-1A fosforilada *in vitro* por BRSK1. Para ello se realizó un ensayo de fosforilación en el que se incubó sintaxina-1A desnaturalizada (purificada en células *E. coli*) con o sin BRSK1 activa, en presencia de ATP frío y magnesio. Mediante dotblot se analizaron 100 y 200 ng de la reacción utilizando dos concentraciones de anticuerpo fosfoespecífico (0,1 y 0,5 µg/ml). La **figura R.45B** muestra



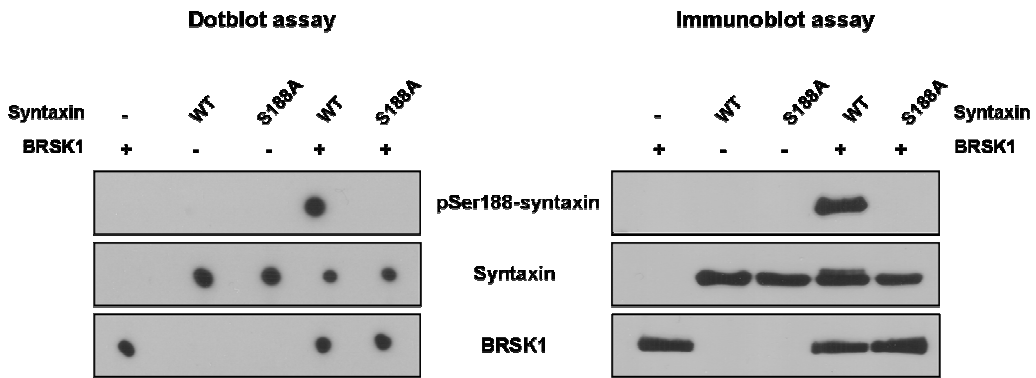
**Figura R.44 Análisis de fosforilación del mutante syntaxina-1A S188A por BRSK1. (A)** Representación esquemática de los dominios estructurales de syntaxina-1A en la que se señala la posición de la Serina-188 fosforilada por BRSK1. **(B)** Análisis de fosforilación de syntaxina-1A salvaje (*wild type*, WT) y el mutante S188A por BRSK1. 2  $\mu$ g de syntaxina purificada de células *E. coli* fue desnaturizada (5 minutos, 65°C) previa incubación con 1  $\mu$ g de BRSK1 activa durante 5, 15 y 30 minutos en presencia de 100  $\mu$ M  $^{32}$ P- $[\gamma$ -ATP]/Mg $^{2+}$ . La fosforilación se detectó mediante autorradiografía de las proteínas separadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Blue. Se indica la autofosforilación de BRSK1 (\*) y la fosforilación de la syntaxina (◄). El gráfico muestra el porcentaje de fosforilación del mutante S188A respecto a la forma salvaje (WT). La fosforilación incorporada se midió en cuentas por minuto (cpm) detectadas en contador de centelleo tras cortar las bandas del gel. Los valores son medias  $\pm$  s.d de tres experimentos diferentes.

como el anticuerpo, a ambas concentraciones y de forma proporcional a la cantidad de proteína analizada, reconoce la syntaxina-1A sólo cuando ésta fue incubada con BRSK1. Con la finalidad de determinar los límites de sensibilidad del anticuerpo, se analizaron cantidades crecientes de syntaxina-1A fosforilada por BRSK1 usando dos concentraciones de anticuerpo fosfoespecífico (0,1 y 0,5 µg/ml). El dotblot de la **figura R.45C** muestra que a bajas concentraciones (0,1 µg/ml), el anticuerpo reconoce 10 ng de fosfo-syntaxina, mientras que concentraciones mayores (0,5 µg/ml) detectan hasta 1 ng de fosfo-syntaxina. Por tanto, el anticuerpo anti-pSer188 generado es un anticuerpo potente que reconoce específicamente la syntaxina-1A fosforilada por BRSK1.



**Figura R.45 Titulación del anticuerpo anti pSer188-syntaxina. (A)** Representación esquemática de los dominios estructurales de syntaxina-1A en la que se amplía la secuencia que contiene la Serina-188 fosforilada por BRSK1, y a partir de la cual se diseñó el péptido inmunógeno utilizado para generar el anticuerpo fosfoespecífico. **(B)** Selectividad del anticuerpo fosfo-específico. Syntaxina-1A previamente desnaturizada (5 minutos, 65°C) purificada de células *E. coli* fue incubada con o sin BRSK1 durante 30 minutos, en presencia de 100 µM ATP frío y magnesio. 100 o 200 ng de la reacción se analizaron mediante dotblot utilizando el anticuerpo anti pSer188-syntaxina (0.1 y 0.5 µg/ml), anti-syntaxina y anti-BRSK1. **(C)** Sensibilidad del anticuerpo fosfo-específico. Igual que en (B), cantidades crecientes de syntaxina-1A fosforilada por BRSK1 fueron analizadas mediante dotblot. Resultados representativos de tres ensayos diferentes.

A continuación se ensayó la especificidad del anticuerpo generado en el reconocimiento de la fosfo-Ser188. Para ello se realizaron ensayos de fosforilación análogos a los del apartado anterior, usando además en este caso el mutante sintaxina-1A S188A. Una alícuota de las reacciones de fosforilación (100 ng) fueron analizadas en paralelo mediante dotblot (directamente sobre la membrana de nitrocelulosa) o mediante inmunoblot (previa separación de las proteínas en gel SDS-PAGE). La **figura R.46** muestra los correspondientes dotblot e inmunoblot, en los que se observa por ambas técnicas que el anticuerpo fosfoespecífico (anti-pSer188) reconoce la sintaxina-1A salvaje fosforilada por BRSK1, pero no la sintaxina-1A en que la Serina-188 fue mutada a alanina (S188A). Este resultado muestra la especificidad del anticuerpo fosfo-específico generado para el residuo Serina-188.



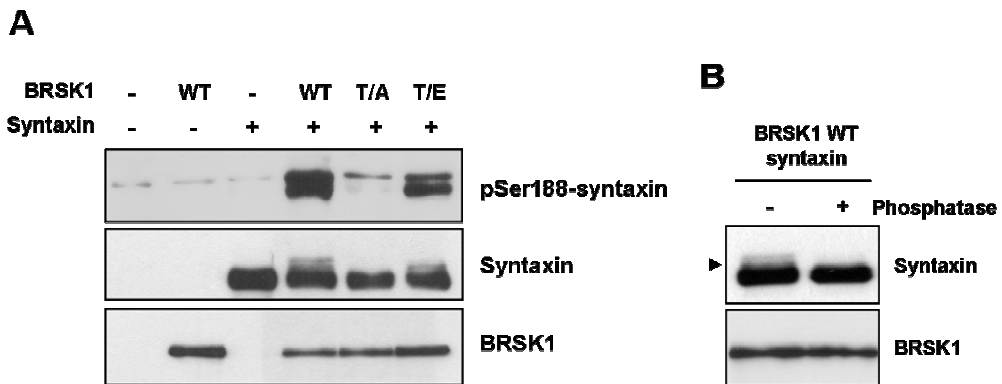
**Figura R.46 Análisis de la especificidad del anticuerpo anti pSer188-sintaxina generado.** Sintaxina-1A salvaje (*wild type*, WT) o mutante S188A purificadas de células *E. coli*, fueron incubadas (previa desnaturalización 5 minutos a 65°C) con o sin BRSK1 durante 30 minutos, en presencia de 100  $\mu$ M ATP frío y magnesio. 100 ng de la reacción fueron analizados en paralelo mediante dotblot (directamente en la membrana de nitrocelulosa) o mediante inmunoblot (previa separación de las proteínas en gel SDS-PAGE). Se utilizó el anticuerpo anti pSer188-sintaxina (0,1  $\mu$ g/ml) para detectar la fosforilación, y los anticuerpos anti-sintaxina y anti-BRSK1 para detectar la cantidad de proteína total en la reacción. Resultados representativos de tres ensayos diferentes.

#### BRSK1 fosforila *in vivo* a sintaxina-1A en la Serina-188.

A continuación se estudió la fosforilación de la Serina-188 por BRSK1 en un sistema *in vivo*. Para ello, se co-expresó en células humanas HEK-293 (que carecen de BRSKs) sintaxina-1A junto con BRSK1 salvaje, el mutante inactivo BRSK1-T189A o el mutante constitutivamente activo BRSK1-T189E, y se analizó el estado de fosforilación de sintaxina en la Serina-188 mediante el uso del anticuerpo fosfo-específico generado. La **figura R.47A** muestra que la sintaxina es fosforilada en la Serina-188 solo en aquellos casos en que se expresó alguna forma

activa de BRSK1 (WT o T189E), mientras que no se detectó fosforilación cuando se expresó el mutante inactivo BRSK1-T189A. Estos datos demuestran que en células HEK-293 la actividad de BRSK1 es necesaria para fosforilar la sintaxina-1A en la Serina-188.

De manera análoga a lo que ocurría *in vitro*, en células humanas la co-expresión de sintaxina-1A y BRSK1 activa provoca un retraso electroforético de una fracción de sintaxina, detectable mediante inmunoblot. Los datos de espectrometría de masas mostraban que, al menos *in vitro*, esta banda corresponde a una población de fosfo-sintaxina, de manera que se procedió a comprobar si también este era el caso en un sistema *in vivo* (células HEK-293). Para ello, se incubó una alícuota de lisado de células HEK-293 que sobre-expresan sintaxina y BRSK1 con fosfatasa alcalina. La **figura R.47B** muestra el inmunoblot correspondiente, en el que se observa que la banda retrasada desaparece tras el tratamiento con la fosfatasa. Así pues, también *in vivo*, el retraso electroforético de una fracción de sintaxina-1A es consecuencia de su fosforilación por BRSK1.



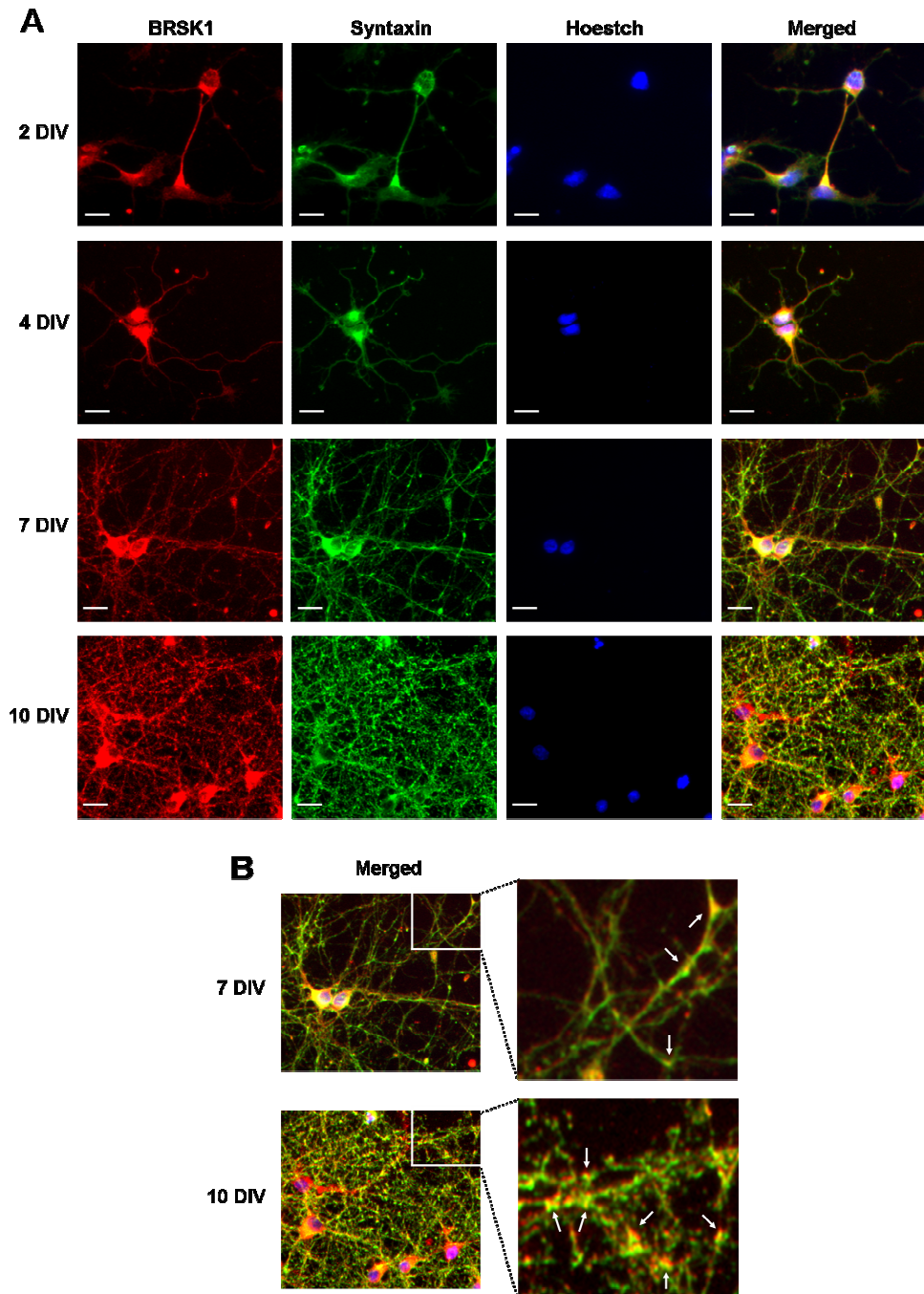
**Figura R.47 BRSK1 fosforila a sintaxina-1A en la Serina-188 en células HEK-293.** (A) Células humanas HEK-293 fueron co-transfectadas con los vectores de expresión para sintaxina-1A y BRSK1 salvaje (*wild type*, WT), BRSK1 inactiva (T189A, T/A) o BRSK1 constitutivamente activa (T189E, T/E), y la fosforilación de sintaxina se analizó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti pSer188-sintaxina. (B) Lisados (20 µg) de células HEK-293 que sobre-expresan sintaxina-1A y BRSK1 WT se trataron o no con 5 unidades de fosfatasa alcalina durante 45 minutos a 37°C. El efecto del tratamiento sobre la fosforilación de sintaxina-1A se analizó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-sintaxina. Se indica la fracción de sintaxina retrasada electroforéticamente que desaparece tras el tratamiento con fosfatasa (▶). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

#### R.4.4 BRSK1 y syntaxina-1A co-localizan en membranas de neuronas de rata.

La co-localización de la quinasa y su sustrato es imprescindible para que se produzca la fosforilación de la proteína, de manera que a continuación se planteó estudiar la distribución comparada de BRSK1 y syntaxina en neuronas corticales de rata. Para ello se siguieron dos aproximaciones: (a) estudio inmunocitoquímico de doble marcaje para BRSK1 y syntaxina en cultivos de neuronas corticales de rata a diferentes estadios de diferenciación, y (b) estudio subcelular en microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata.

#### Distribución de BRSK1 y syntaxina-1A en cultivos primarios de neuronas corticales de rata.

Como se ha mostrado anteriormente, la expresión de BRSK1 aumenta durante la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales hasta alcanzar un máximo de expresión cuando el cultivo se considera maduro (10 DIV). En este punto, BRSK1 se distribuye por el soma y las prolongaciones neuronales siguiendo un patrón puntuado similar al marcador de vesículas sinápticas sinaptofisina. Esta distribución se comparó con la de syntaxina, una proteína tipo t-SNARE situada en parte en la membrana de la zona activa en los terminales sinápticos de cultivos de neuronas maduros. Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales fueron analizados mediante inmunocitoquímica en diferentes estadios de diferenciación *in vitro* (2, 4, 7 y 10 DIV). La **figura R.48A** muestra la tinción inmunofluorescente para BRSK1 (rojo) y syntaxina (verde), así como la tinción de núcleos (Hoescht, azul) y la superposición de todas ellas (*Merged*). Se observa que, al igual que BRSK1, la expresión de syntaxina aumenta a medida que el cultivo se diferencia, alcanzando su máximo a los 10 DIV. El patrón de distribución de syntaxina-1A es muy similar al de BRSK1, relativamente homogéneo a lo largo de la neurona en estadios tempranos de diferenciación (2-4 DIV) y más puntuado en las prolongaciones neuronales en estadios más tardíos (7-10 DIV). La ampliación de la superposición de las dos tinciones en cultivos avanzados (7 y 10 DIV), muestra que parte de BRSK1 y syntaxina coinciden formando pequeños *pools* en algunos puntos de las terminaciones neuronales (puntas de flecha **figura R.48B**) donde la syntaxina se acumula para formar el complejo SNARE y mediar en el proceso de fusión de vesículas sinápticas. Sin embargo, serán necesarios estudios de localización más resolutivos, como análisis por microscopía confocal, para determinar exactamente la distribución de ambas proteínas en los terminales sinápticos. Dados estos resultados es factible especular que BRSK1 fosforile la Serina-188 de syntaxina-1A en estos terminales, lo que sugeriría que BRSK1 jugaría un papel en el proceso de fusión de membranas y en la modulación, por tanto, de la liberación de neurotransmisores.



**Figura R.48** Distribución de BRSK1 y sintaxina-1A durante la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales de rata. **(A)** Microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de rata cultivadas *in vitro* durante 2, 4, 7 y 10 días (DIV), fijadas con paraformaldehído y visualizadas mediante inmunofluorescencia para BRSK1 (rojo, primer panel) y sintaxina (verde, segundo panel). El tercer panel muestra la tinción de núcleos (Hoescht), y el cuarto la superposición de los tres anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Ampliación de la superposición de las tinciones para BRSK1 y sintaxina a 7 y 10 DIV. Las flechas marcan los puntos de co-localización. Resultados representativos de dos cultivos independientes.

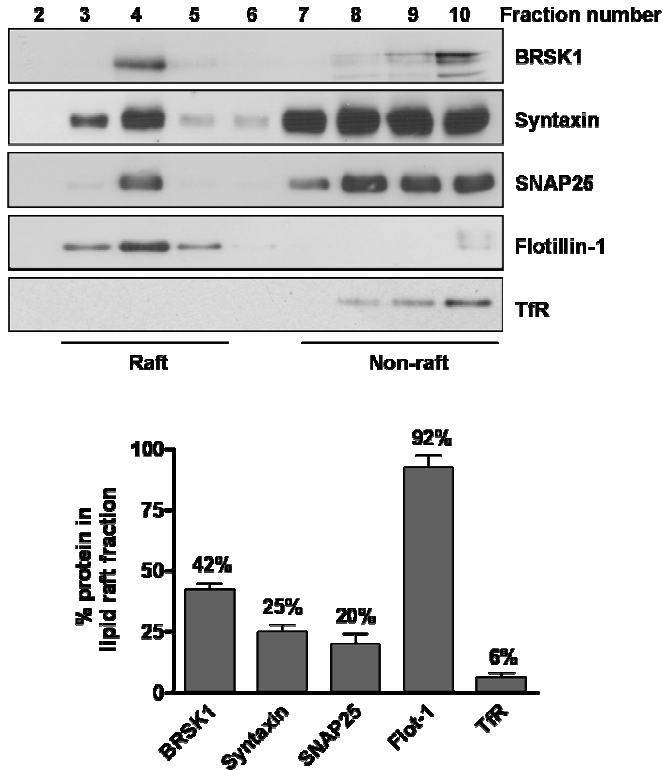


### **Localización de BRSK1 y sintaxina-1A en microdominios de membrana *lipid raft* de sinaptosomas de cerebro de rata.**

El fraccionamiento subcelular de la zona activa de los terminales sinápticos de neuronas llevado a cabo por Inoue *et al.*, mostraba que BRSK1 se encuentra concentrada en la fracción cruda de vesículas y membranas sinápticas. El fraccionamiento más fino de la fracción cruda de vesículas sinápticas, mostró que BRSK1 localiza tanto en las fracciones más puras de vesículas (marcadas con sinaptofisina), como en aquellas que contienen gran cantidad de membranas sinápticas (marcadas con sintaxina) (Inoue et al, 2006). Por otro lado, es conocido que varios componentes de la maquinaria molecular que regula la fusión de membranas (entre ellos la sintaxina) localizan en microdominios de membrana *lipid raft* de manera dependiente de colesterol, y que la disfunción de estos dominios altera el proceso de liberación vesicular (Chamberlain et al, 2001; Somanath et al, 2009). Como se mostró en el Capítulo 3, una población de BRSK1 localiza en dominios *raft* de membranas de sinaptosomas de rata, donde además es más activa. Por ello, se estudió a continuación si también este era el caso para sintaxina-1A. Así, se solubilizaron sinaptosomas de rata con 1% Triton-X100 y se centrifugaron en gradiente discontinuo de sacarosa para aislar la fracción resistente al detergente (*lipid rafts*). La **figura R.49** muestra los correspondientes inmunoblots de las fracciones recogidas, en los que se observa que BRSK1 localiza en los *lipid rafts* juntamente con sintaxina y la otra proteína t-SNARE SNAP-25. La proporción de sintaxina y SNAP25 detectada en *lipid rafts* de sinaptosomas (20-25%) es similar a la encontrada para otros tipos celulares, como por ejemplo en membranas de células de feocromocitoma de rata PC12 (Chamberlain et al, 2001). La correcta separación de las fracciones solubles e insolubles al detergente se comprobó mediante la detección del marcador de *lipid raft* flotilina-1 y el marcador de fracciones *no-raft* receptor de transferrina (TfR). Así pues, BRSK1 y sintaxina-1A co-localizan en regiones de la membrana sináptica ricas en colesterol, regiones en las que se ha mostrado que BRSK1 presenta mayor actividad.

### **R.4.5 BRSK1 y sintaxina-1A interaccionan *in vitro*, independientemente de la fosforilación de sintaxina-1A en la Serina-188.**

Para un numeroso grupo de proteínas quinasas (como las MAPKs), se ha descrito una región en la superficie de la quinasa a través de la cual interaccionan con las proteínas sustrato (*docking site*). Para determinar si este es también el caso para las BRSKs, a continuación se diseñaron experimentos con la finalidad de estudiar si sintaxina-1A interacciona con BRSK1. Para ello, se incubó sintaxina-1A inmovilizada en una resina de Glutación-*Sepharose* con BRSK1, y se analizó la interacción mediante resolución de las proteínas en gel SDS-PAGE. La **figura R.50A** muestra la tinción Coomassie del correspondiente gel, donde se observa que BRSK1 y

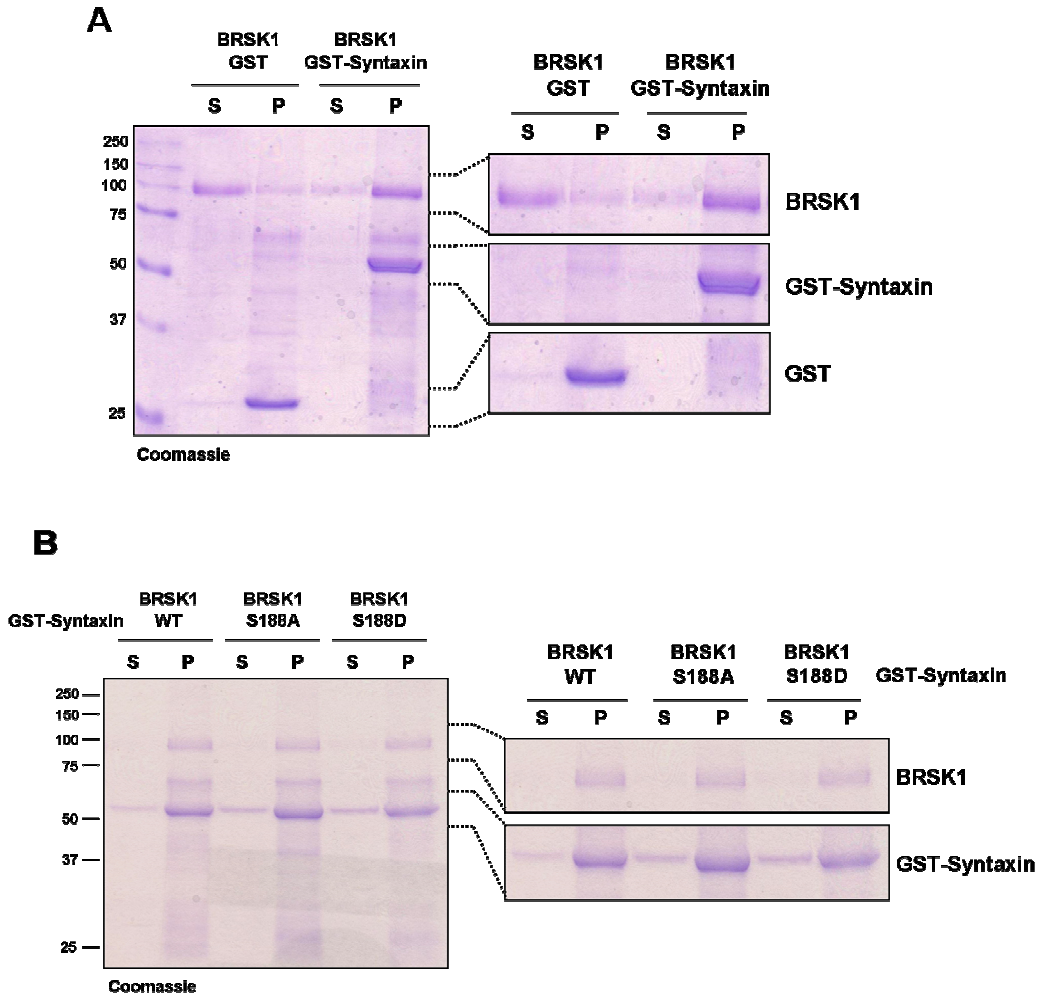


**Figura R.49** Localización de BRSK1 y sintaxina-1A en *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata. Sinaptosomas de cerebro de rata solubilizados con Triton-X100 a 4°C se sometieron a una centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa para obtener las fracciones de membrana insolubles (*raft*) y solubles (*no-raft*) al detergente (ver Material y Métodos). Mediante inmunoblot se analizó la presencia de BRSK1, sintaxina y SNAP25 en cada fracción. Flotilina-1, marcador de fracciones insolubles *raft*; receptor de Transferrina (TfR), marcador de fracciones solubles *no-raft*. El gráfico muestra la densitometría de las fracciones *raft* (3-5) y *no-raft* (7-10) de los inmunoblots anteriores. Se representa el porcentaje de distribución de cada proteína en la fracción *raft*. Los valores son medias  $\pm$  s.d. de dos experimentos independientes.

sintaxina-1A interaccionan *in vitro*, ya que BRSK1 se recupera mayoritariamente en el *pellet* de Glutación-*Sephrose* cuando fue incubada con GST-sintaxina, mientras que permanece en el sobrenadante cuando se incubó solo con GST.

Para estudiar el papel de la fosforilación de la Serina-188 en la interacción de sintaxina-1A con BRSK1, se realizaron ensayos análogos de interacción utilizando dos formas mutadas de sintaxina: sintaxina-1A S188A, en que la serina fue substituida por alanina, generando una forma incapaz de fosforilarse; y sintaxina-1A S188D, en que la serina fue substituida por ácido aspártico (la carga negativa de este residuo mimetiza la carga negativa del fosfato y, por tanto la forma fosforilada de la proteína). La **figura R.50B** muestra la tinción Coomassie del gel, en el que se observa que las tres formas de sintaxina-1A (salvaje, S188A y S188D) interaccionan de la misma manera con BRSK1. Así, estos resultados preliminares indican que el estado de

fosforilación de syntaxina en Serina-188 no influye en su interacción con BRSK1. Será de interés realizar experimentos análogos utilizando los demás componentes que intervienen en la formación del complejo SNARE (Munc18, SNAP25 y sinaptobrevina), con la finalidad de determinar si la fosforilación de syntaxina-1A en Serina-188 por BRSK1 es un proceso implicado en la función fisiológica de las proteínas SNARE.



**Figura R.50 Interacción *in vitro* de BRSK1 y syntaxina-1A.** (A) 2 µg de GST-syntaxina o GST purificadas de células *E. coli* fueron inmovilizadas en resina de Glutación-*Sepharose*. A continuación, la resina se incubó con 2 µg de BRSK1 pura durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar 20 seg x 1000 rpm se reservó el sobrenadante, y el *pellet* con la resina se lavó con tampón Tris-HCl 50 mM 0.5% Triton X-100 antes de ser analizado mediante gel SDS-PAGE. La figura muestra la tinción Coomassie Blue del gel (S, sobrenadante; P, *pellet*) en el que se amplía la fracción correspondiente a BRSK1, syntaxina y GST. (B) Efecto de la fosforilación de syntaxina-1A en Serina-188 en la interacción con BRSK1. Igual que en (A), se analizó la interacción de BRSK1 con syntaxina salvaje (*wild type*, WT) y los mutantes syntaxina S188A y syntaxina S188D. La figura muestra la tinción Coomassie Blue del gel (S, sobrenadante; P, *pellet*) en el que se amplía la fracción correspondiente a BRSK1 y syntaxina. Resultados representativos de tres ensayos independientes.

## RESUMEN

De los principales componentes del complejo SNARE (SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina), BRSK1 fosforila la proteína t-SNARE sintaxina-1A en conformación abierta, con una estequiometría de 1 mol de fosfato incorporado por mol de proteína. Mediante la generación de diferentes mutantes de delección, se ha observado que BRSK1 fosforila la región C-terminal (aminoácidos 168-253) de sintaxina-1A. El análisis de espectrometría de masas de los péptidos generados tras la digestión de sintaxina fosforilada por BRSK1 con la proteasa endoGluC, muestra la Serina-188 como el principal residuo fosforilado por BRSK1. Este punto fue confirmado mediante el uso de mutantes de sintaxina-1A en los que se substituyó la Serina-188 por alanina (S188A), en los que la fosforilación por BRSK1 se reduce en gran medida (~70%) comparado con la forma salvaje. Se ha generado y caracterizado un potente anticuerpo fosfo-específico que reconoce la Serina-188 fosforilada por BRSK1. Los correspondientes ensayos de dotblot e inmunoblot muestran que BRSK1 fosforila *in vitro* a sintaxina-1A específicamente en la Ser188, dado que el mutante S188A no rindió señal de fosforilación alguna. Por otra parte, el anticuerpo anti-pSer188 reconoce exclusivamente la sintaxina-1A sobre-expresada en células HEK-293 (que carecen de BRSKs) solo cuando se co-expresó con formas activas de BRSK1 (BRSK1 salvaje o constitutivamente activa BRSK1-T189E), pero no con la forma inactiva BRSK1-T189A. El uso del anticuerpo generado (anti-pSer188) ha permitido demostrar, por tanto, que BRSK1 fosforila *in vitro* e *in vivo* a sintaxina-1A específicamente en la Ser188.

Mediante fraccionamiento subcelular de sinaptosomas de rata se muestra que BRSK1 y sintaxina co-localizan en microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptosomas. Además, los análisis inmunocitoquímicos de neuronas corticales de rata muestran que ambas proteínas co-localizan en puntos discretos de las prolongaciones sinápticas en el último estadio de diferenciación *in vitro* (estadio 5), en el que las neuronas corticales maduras presentan entidades sinápticas funcionales. Es posible que BRSK1 y sintaxina-1A interactúen en estas regiones, como se ha observado de forma preliminar con ensayos de *pull down in vitro*, en los que se muestra que el estado de fosforilación de sintaxina-1A en la Serina-188 no influye en su interacción con BRSK1. Se necesitarán análogos estudios de interacción utilizando otros componentes el complejo SNARE, para determinar si la fosforilación de sintaxina por BRSK1 está involucrada en la función fisiológica de estas proteínas. De ser así, BRSK1 podría regular el proceso de fusión de vesículas sinápticas y liberación de neurotransmisores.

