



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**

# DISCUSIÓN



Las *Brain Specific Kinases 1/2* (BRSK1/2) son serin-treonin quinasas de la subfamilia de las *AMPK-related kinases* activadas por fosforilación de la treonina del T-loop (Thr189 en BRSK1 y Thr174 en BRSK2) por la quinasa supresora de tumores LKB1 (Lizcano et al, 2004; Barnes et al, 2007). La expresión de las BRSKs se restringe principalmente al cerebro, donde se han involucrado en el establecimiento del eje axón-dendrita durante la polarización neuronal (Crump et al, 2001; Kishi et al, 2005; Barnes et al, 2007; Shelly et al, 2007), y en la sinaptogénesis y regulación de la función sináptica en neuronas maduras (Crump et al, 2001; Inoue et al, 2006). A pesar de la relevancia de las BRSKs en la regulación de estos procesos, se desconocen los mecanismos implicados en la regulación de su expresión y/o actividad, así como los sustratos que fosforilan. Este trabajo ha supuesto el establecimiento de una nueva línea de investigación en el laboratorio, con el objetivo de abordar los mecanismos moleculares que regulan las BRSKs e identificar los sustratos a través de los cuales median su función. Los resultados obtenidos en esta tesis describen:

- a) una regulación de la expresión de las BRSKs durante el desarrollo ontogénico del cerebro y la diferenciación neuronal, mediado por la vía de las MAP-quinasas ERK1/2
- b) un mecanismo de regulación de la actividad quinasa de las BRSKs, independiente a LKB1, basado en su localización en *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro
- c) señalan a la proteína t-SNARE sintaxina-1A, implicada en la fusión de vesículas y liberación de neurotransmisores, como putativo sustrato de BRSK1.

En el primer capítulo de Resultados se desarrolló el material y las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo. Se ha corroborado que el complejo LKB1/STRAD/MO25 fosforila y activa a las BRSKs *in vitro* e *in vivo*, y se han determinado las constantes cinéticas de las BRSKs utilizando un método radiométrico que nos han permitido recomendar el uso del péptido sustrato CHKtide para la medición de la actividad quinasa de las BRSKs.

## **D.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS BRSKs DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL.**

La caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 realizada en la primera etapa de este proyecto (Capítulo 1 de Resultados) ha permitido llevar a cabo el estudio detallado sobre el patrón de expresión de las BRSKs en el organismo. Los resultados obtenidos completan la descripción previa de otros autores que restringen la expresión de BRSK1 y BRSK2 principalmente en cerebro (Kishi et al, 2005; Inoue et al, 2006), al mostrar que ambas quinasas

se expresan en todas las principales regiones cerebrales (hipocampo, córtex, cerebelo y bulbo olfatorio), aunque lo hacen en mayor grado en hipocampo y córtex donde también se detecta mayor actividad quinasa BRSK. BRSK2 presenta además una expresión significativa en páncreas, lo que sugiere una función adicional de BRSK2 en este órgano. Dado que la función pancreática se basa en la excreción de gránulos secretores, BRSK2 podría jugar un papel en la regulación de las vías de exocitosis pancreáticas, de manera similar al proceso de secreción de neurotransmisores en neuronas.

Dada la implicación de las BRSKs en la polarización neuronal (Kishi et al, 2005; Barnes et al, 2007) se consideró estudiar la expresión de estas quinasas a lo largo del proceso de diferenciación neuronal. Los resultados muestran un paralelismo entre el establecimiento de la polaridad neuronal en el cerebro en desarrollo y la expresión de las BRSKs. Así, durante el desarrollo ontogénico post-natal del cerebro se observa un aumento en la expresión y actividad quinasa de BRSK1 y BRSK2, que alcanza un máximo a las 4 semanas post-natales que correlaciona en el tiempo con la maduración del cerebro de la rata. En esta fase post-natal las neuronas completan su diferenciación al adquirir las espinas dendríticas y desarrollar entidades sinápticas funcionales (Barnes & Polleux, 2009), lo que sugiere una función de las BRSKs en neuronas maduras. Los análisis de expresión realizados en cultivos primarios de neuronas corticales muestran también un aumento de expresión de las BRSKs durante el proceso de diferenciación *in vitro* de neuronas corticales, desde el día de siembra hasta el último estadio de diferenciación *in vitro* (estadio 5). Ello sugiere que el aumento de expresión de las BRSKs observado en etapas post-natales es consecuencia de la regulación de la expresión iniciada en etapas embrionarias, lo que concuerda con la función de las BRSKs en el establecimiento del eje axón-dendrita en estadios tempranos de la diferenciación *in vitro* (Kishi et al, 2005; Barnes et al, 2007; Shelly et al, 2007).

Para elucidar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal se ha utilizado el modelo celular PC12, derivado de feocromocitoma de rata. La exposición prolongada de células PC12 a la acción de neurotrofinas (como el NGF) conduce a la adquisición de un fenotipo neuronal (Greene & Tischler, 1976; Dichter et al, 1977), por lo que esta línea celular es un modelo muy útil para el estudio de los mecanismos de señalización implicados en la diferenciación neuronal. Los análisis de expresión realizados muestran que durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF se produce un aumento en la expresión de BRSK1 y BRSK2, análogo al del marcador de diferenciación tubulina- $\beta$ -III, pero no de otros componentes de la vía de señalización LKB1-BRSKs, como LKB1 o STRAD $\alpha$ . Estos resultados muestran por primera vez la inducción de la expresión de las BRSKs en respuesta a factores neurotróficos como el NGF. Mediante experimentos de *gene reporter luciferase* utilizando una región del promotor de BRSK1, mostramos que el aumento de

expresión de BRSK1 durante la diferenciación inducida por neurotrofinas se debe a una activación génica, y por tanto a la síntesis *de novo* de proteína. De acuerdo con estos resultados, experimentos de real-time PCR realizados por Josep Espadamala (Tesis Doctoral en preparación), muestran un aumento en los niveles del mRNA de BRSK1 de unas 5 veces en respuesta a la acción del NGF.

Mediante experimentos de sobre-expresión de la forma constitutivamente activa de MEK1 (MEK-EE) y el uso de inhibidores específicos de la vía de las MAP-quinasas (PD98059 y U0126), mostramos que la inducción en la expresión de las BRSKs en respuesta a NGF está mediada por la vía de señalización de ERK1/2, vía necesaria y suficiente para inducir la diferenciación neuronal de células PC12 (Cowley et al, 1994; Skaper S., 2008; Vaudry et al, 2002). La activación constitutiva de H-Ras (provocada por sobre-expresión de la forma constitutivamente activa H-RasV12) también resulta en un aumento de expresión de las BRSKs, lo que confirma la implicación de la vía clásica Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 en la regulación de la expresión de estas quinasas durante la diferenciación inducida por NGF. Sin embargo, la activación constitutiva de H-Ras en células PC12 no induce el grado de diferenciación neuronal observado en respuesta a la activación constitutiva de MEK1, lo que se traduce también en un aumento menor de la expresión de las BRSKs. Este hecho puede explicarse por una activación de B-Raf (y por tanto de MEK1) durante el proceso de diferenciación a través de una vía independiente a Ras, que implica la generación de cAMP y la activación de la proteína Rap1 (Skaper S., 2008; Vaudry et al, 2002; Yung et al, 2010). De acuerdo con esta hipótesis, los resultados de expresión génica obtenidos por Josep Espadamala en el laboratorio, muestran que la estimulación de células PC12 con forskolina resulta en una activación sub-óptima del promotor de BRSK1. Sin embargo, esta activación no es bloqueada por el inhibidor específico de PKA (H-89), pero sí por el inhibidor de MEK1 PD98059, lo que muestra que la activación sub-óptima del promotor de BRSK1 en respuesta a forskolina es independiente a PKA. Por tanto, tanto vía Ras como vía Rap, la activación secuencial de Raf-MEK1-ERK1/2 es responsable del aumento de expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal de células PC12.

¿Qué factor de transcripción regulado por ERK1/2 es responsable de la activación génica de las BRSKs durante la diferenciación neuronal? En ausencia de NGF, la sobre-expresión del factor de transcripción *Specificity Protein 1* (Sp1) en células PC12 resulta en una activación del promotor de BRSK1, que se traduce en un aumento de la expresión de las BRSKs, aunque significativamente menor que el aumento inducido por NGF. De acuerdo a estos resultados, el tratamiento de células PC12 con el inhibidor específico de Sp1 Mitramicina A previene el aumento de expresión de las BRSKs inducido por NGF. Por tanto, el factor de transcripción Sp1 media en el aumento de expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal inducida por

NGF. Ello concuerda con el hecho de que la región clonada de 1 kb del promotor de BRSK1 presente múltiples secuencias potenciales de unión a Sp1.

Sp1 es una proteína de expresión ubicua que pertenece a la familia de factores de transcripción que contienen dominios de unión al DNA tipo *zinc-finger*, y se une a motivos ricos en CG activando o reprimiendo la transcripción de cientos de genes que carecen o presentan TATA box. Sp1 regula la transcripción mediante múltiples mecanismos, como interacción proteína-proteína o cooperando con otros factores de transcripción (como AP-2, Egr-1, CREB, c-myc o c-Jun). Aunque inicialmente se propuso que Sp1 activaba constitutivamente genes *housekeeping* (debido al gran abanico de genes que regula), hoy en día se asume que diferentes estímulos inducen modificaciones post-traduccionales que afectan a la actividad transcripcional y estabilidad de Sp1 (tales como la fosforilación, sumoilación, acetilación y glicosilación) (Tan & Khachigian, 2009). Entre las quinasas que regulan su actividad se encuentran ERK1/2, que fosforilan Sp1 en al menos tres residuos (Thr 355, Thr453 y Thr739), activando la transcripción de genes como VEGF, MMP2 o HO-1 (Tan & Khachigian, 2009). Existen precedentes de la implicación de Sp1 en la regulación génica que se da durante la diferenciación de células PC12, a través de su activación mediante fosforilación por ERK1/2. Así, la vía de ERK1/2 media directamente en el aumento de la unión de Sp1 al DNA observado tras el tratamiento de células PC12 con NGF (Atkins et al, 2003), lo que resulta en la inducción de la expresión de proteínas como la esfingosina quinasa 1 (SPHK1) y la Ciclina D1 (Sobue et al, 2005; Marampon et al, 2008).

Mediante experimentos de sobre-expresión de Sp1 y el uso de su inhibidor específico Mitramicina A, se muestra que Sp1 es necesario pero no suficiente en la inducción de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal. Así, la inhibición farmacológica de Sp1 bloquea completamente el aumento de expresión de las BRSKs inducido por NGF, mientras que la sobre-expresión de Sp1 provoca un aumento de expresión, que sin embargo no alcanza el inducido por NGF. Estos resultados sugieren una posible cooperación de Sp1 con otros factores de transcripción en la regulación de la expresión génica de las BRSKs. Las estrategias de regulación génica basadas en combinaciones de diferentes factores de transcripción están ampliamente documentadas en la literatura y de hecho, Sp1 interacciona y coopera funcionalmente con otros factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B (Marampon et al, 2008), Ets-1 (Gegonne et al, 1993), STAT1 (Look et al, 1995), Egr-1 (Khachigian et al, 1995) o AP-1 (Gao et al, 2009; Banks et al, 1998; Noti et al, 1996). Otra posibilidad es que la sobre-expresión de Sp1 no se produzca en el contexto celular adecuado para inducir de forma óptima la expresión de las BRSKs. Es decir, que el estado de las vías de señalación de las células PC12 diferenciadas sea determinante para inducir la expresión génica completa mediada por Sp1.

Recientemente se ha establecido una colaboración con el laboratorio de la Dra. Esther López Bayghen (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México DF), donde se llevan a cabo ensayos de retraso electroforético e inmunoprecipitación de la cromatina que permitirán, por un lado determinar la unión de Sp1 al promotor de BRSK1, y por otro la existencia de un mecanismo de cooperación con otros factores de transcripción. Los resultados preliminares derivados de estos estudios señalan al factor de transcripción AP-1 como candidato a colaborar con Sp1 en la regulación génica de las BRSKs. AP-1 es un factor de transcripción específico de secuencia (se une a secuencias consenso TGAGTCA), formado por un heterodímero de proteínas de las familias Jun (c-Jun, JunD y Jun $\beta$ ) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2). La región clonada de 1 kb del promotor de BRSK1 contiene una secuencia de unión a c-Jun y otra a c-Fos, por lo que es posible una cooperación entre Sp1 y AP-1 en la regulación de la expresión de las BRSKs. Además, de forma análoga a la regulación de Sp1, la actividad de AP-1 puede también ser regulada mediante fosforilación de ERK1/2 (Hibi et al, 1993; Monje et al, 2003), lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos que señalan a la vía de las MAP-quinasas como regulador clave de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal. Es posible que Sp1 y AP-1 interactúen formando un complejo, o que la unión de un factor de transcripción al DNA facilite la unión del otro en su lugar consenso. Diferentes autores han mostrado que la cooperación entre Sp1 y AP-1 no depende de la distancia entre sus respectivos lugares de unión al DNA (Noti et al, 1996; Banks et al, 1998), lo que podría explicarse si Sp1 provocara un cambio conformacional en el DNA que contribuyera a la activación génica, facilitando la unión de otros factores como AP-1.

En conjunto, los resultados obtenidos de los estudios de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal describen un nuevo mecanismo de regulación de estas quinasas a nivel génico. En respuesta a neurotrofinas, la activación de la cascada de señalización de las MAP-quinasas resulta en la fosforilación y activación del factor de transcripción Sp1 por ERK1/2, que tras su translocación al núcleo activaría la expresión de las BRSKs. La **figura D.9** (página 160) muestra este modelo de regulación de la expresión extrapolado a neuronas corticales, en el que la activación del promotor de BRSK1 en respuesta a BDNF en fases tempranas de la diferenciación, y el consecuente aumento de expresión de BRSK1, resultaría en la especificación del axón. Recientemente se ha sugerido que, de forma paralela a la activación de la expresión de las BRSKs, el BDNF induce la fosforilación de la quinasa activadora LKB1 en la Ser431 por PKA y p90rsk, fosforilación esencial para que se de la polarización axonal mediada por las BRSKs (Barnes et al, 2007; Shelly et al, 2007; Shelly et al, 2010). Estos autores muestran que LKB1 fosforilada en Ser431 localiza en las neuritas de neuronas no diferenciadas y se concentra drásticamente en el axón de neuronas polarizadas. La co-localización de BRSK1 y pSer431-LKB1 en las neuritas inmaduras podría explicarse, por tanto, por la acción simultánea del BDNF



activando la transcripción de las BRSKs e induciendo la fosforilación de LKB1, y en el que también es posible que coopere un mecanismo de regulación posterior de la expresión de las BRSKs a nivel de traducción. Así, tal y como proponen Choi *et al*, el aumento de actividad de mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin 1*) en las neuritas no diferenciadas provocaría la activación local de la síntesis proteica de las BRSKs en estas estructuras (Choi *et al*, 2008; Wildonger *et al*, 2008). La activación local de PKA en una neurita en concreto, resultaría en la acumulación de pSer431-LKB1, que activaría a las BRSKs mediante la fosforilación de la Thr del T-loop. Esta activación final de BRSK1 en una neurita dada resultaría en su desarrollo a axón, en parte a través de la regulación de la estabilidad de la red de microtúbulos mediada por la fosforilación de tau. Sin embargo, en nuestras manos, las BRSKs (sobre todo BRSK1) fosforilan pobremente a tau *in vitro*, comparado con otras AMPK-related kinases como las isoformas de MARK. Las MARKs fosforilan tau y otras proteínas asociadas a microtúbulos, controlando de esta manera la dinámica del citoesqueleto en las neuronas, por lo se han implicado en el desarrollo de “tau-patías” como la enfermedad de Alzheimer (Matenia & Mandelkow, 2009; Timm *et al*, 2006). Esta observación, coherente con los resultados obtenidos por otros autores recientemente (Yoshida & Goedert, 2011), sugiere la existencia de otros sustratos diferentes de tau a través de los cuales las BRSKs mediarían finalmente en la especificidad axonal. La identificación de estos efectores será determinante para elucidar los mecanismos moleculares implicados en el papel que juegan las BRSKs en el establecimiento de la polaridad neuronal.

### **D.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BRSK1 POR EL ENTORNO LIPÍDICO PROPORCIONADO POR LIPID RAFTS.**

Hoy en día se desconocen otros mecanismos de regulación de la actividad de las BRSKs, adicionales a su activación por LKB1. Las evidencias experimentales obtenidas en los últimos años indican que LKB1 se encuentra constitutivamente activa en la célula, de manera que la fosforilación del T-loop y activación de las BRSKs por LKB1 debería ser también constitutiva. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en la modulación de la actividad de estas quinasas. En este sentido, se han propuesto varios mecanismos que implican desde quinasas *upstream* (diferentes de LKB1) hasta interacción con otras proteínas (Fujimoto *et al*, 2008; Guo Z. *et al*, 2006; Al-Hakim *et al*, 2008). Sin embargo, los datos obtenidos de estos estudios, o bien son controvertidos y han sido rechazados posteriormente por otros autores (como la fosforilación de las BRSKs por las quinasas CaMKK o PKA), o bien proponen modelos de regulación en los que falta por determinar cómo afectan a la actividad y función de las BRSKs (como su ubiquitinación). Nuestros resultados derivados del estudio sobre la localización celular de las BRSKs, describen la presencia de una población de BRSK1 en microdominios de

membrana *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata, y muestran que su localización en este peculiar entorno lipídico modula positivamente la actividad de BRSK1. Ello constituye, por tanto, un nuevo mecanismo de regulación de la actividad de BRSK1 basado en la localización de la quinasa en un entorno hidrofóbico.

Mediante el análisis inmunocitoquímico de neuronas corticales en cultivo y estudios de fraccionamiento subcelular de sinaptosomas de rata, se muestra por primera vez que BRSK1, pero no BRSK2 o la quinasa activadora LKB1, se asocia a microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro. Esta conclusión se basa en cuatro evidencias experimentales:

1) el pre-tratamiento de neuronas corticales maduras con el detergente no iónico Triton X-100 no extrae completamente a BRSK1 de las extensiones neuronales (a diferencia del marcador sinaptofisina), lo que indica que un *pool* de BRSK1 se asocia fuertemente a los terminales sinápticos de neuronas corticales de forma resistente a la solubilización con Triton X-100.

2) mediante fraccionamiento subcelular de sinaptosomas de cerebro de rata, se observa que toda la BRSK1 de sinaptosomas se encuentra en la fracción de membrana, y es resistente a la solubilización con Triton X-100.

3) un *pool* de BRSK1 de la membrana de sinaptosomas de cerebro de rata (pero no BRSK2 o LKB1), localiza en la fracción *lipid raft* de sinaptosomas solubilizados con los detergentes Triton X-100 a 4°C o Brij 98 a temperatura fisiológica (37°C).

4) BRSK1 se asocia a *lipid rafts* de sinaptosomas de manera dependiente de colesterol, dado que puede extraerse mediante el tratamiento con el oligosacárido metil- $\beta$ -ciclodextrano (m $\beta$ CD), agente que deleciona el colesterol de estos dominios (Ilangumaran & Hoessli, 1998; Zidovetzki & Levitan, 2007).

¿Cómo se ancla BRSK1 a los dominios de membrana *lipid rafts*? Existen tres posibles mecanismos (Lucero & Robbins, 2004): a través de dominios transmembrana, mediante modificaciones postraduccionales que otorguen a BRSK1 una “cola” hidrofóbica, y mediante interacciones proteína-proteína o directamente proteína-lípido. El análisis *in silico* de BRSK1 revela que no posee hélices hidrofóbicas transmembrana ni dominios de unión a lípidos, lo que descarta estos mecanismos de asociación a *lipid rafts*. Ensayos de unión proteína-lípido (*lipid-protein overlay assays*) llevados a cabo por Gerard Ruiz en el laboratorio, demuestran que BRSK1 no une ninguno de los siguientes lípidos: fosfatidilinositoles [PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub>], otros fosfolípidos (PtdSer, PtdEtn, PtdCho y LysoPtdCho), ácido fosfatídico y liso-fosfatídico, esfingolípidos (esfingosina, esfingosina-1-fosfato y esfingomielina), gangliósidos (GM1 y GD3), ceramida o colesterol. Otra posibilidad es que BRSK1 se asocie a *lipid rafts* mediante una modificación postraduccional hidrofóbica, es decir,

por adición de un grupo glucosil-fosfatidilinositol (“anclas” GPI), miristil (miristilación) o palmitoil (palmitoilación). Mediante el uso de un nuevo método no radioactivo (*ABE-assay*), Gerard Ruiz en nuestro laboratorio ha observado que BRSK1 de cerebro de rata, pero no BRSK2, se encuentra palmitoilada *in vivo*. Esta modificación post-traducional explicaría la presencia de BRSK1, pero no de BRSK2, en microdominios *lipid rafts*.

Inoue *et al* demostraron que BRSK1 desempeña un papel importante en la función sináptica controlando pre-sinápticamente la liberación de neurotransmisores. Estos autores muestran que la sobre-expresión de BRSK1 salvaje en neuronas hipocámpales (pero no de una forma catalíticamente inactiva), incrementa la frecuencia de corriente excitatoria post-sináptica (mEPSC) (Inoue *et al*, 2006). Por otra parte, al igual que BRSK1, muchas de las proteínas que regulan la exocitosis de vesículas sinápticas se localizan en dominios *lipid rafts* (Gil *et al*, 2005; Gil *et al*, 2006), a los que se asocian también mediante palmitoilación. Es el caso de las proteínas que forman el complejo SNARE (sintaxina-1, SNAP25, sinaptobrevina y sinaptotagmina), responsable de la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática pre-sináptica que conduce a la secreción de neurotransmisores en los terminales neuronales (Prescott *et al*, 2009). Además, se ha propuesto que la excitabilidad neuronal resulta en un incremento rápido y generalizado de la palmitoilación de las proteínas sinápticas, permitiendo los cambios que dan forma a la morfología y función de las sinapsis activas (Kang R. *et al*, 2008). Así, es posible que, como ocurre para otras proteínas sinápticas, la excitabilidad neuronal resultaría en la palmitoilación de BRSK1, y por lo tanto, en su reclutamiento a los *lipid rafts* de terminales pre-sinápticos (**figura D.9**, página 160).

Nuestros resultados muestran que la asociación de BRSK1 a *lipid rafts* de sinaptosomas resulta en una forma de BRSK1 que presenta mayor actividad enzimática. Mediante el uso del anticuerpo fosfo-T-loop BRSK generado, mostramos que el *pool* de BRSK1 presente en fracciones *lipid rafts* de sinaptosomas posee una mayor fosforilación, y por tanto es más activa, que la BRSK1 de fracciones solubles. Debido a que LKB1 de sinaptosomas no localiza en *lipid rafts*, el mayor grado de fosforilación de BRSK1 en la Thr189 podría deberse a una protección de BRSK1 frente a la des-fosforilación. Así, el T-loop de BRSK1 podría ser menos accesible a la acción de fosfatasas en los *lipid rafts*, como se ha descrito para la tirosina quinasa Lyn, a la que el entorno *raft* protege de la desfosforilación de la tirosina del centro activo (Young *et al*, 2003). Alternativamente, la fosfatasa encargada de des-fosforilar el T-loop de BRSK1 podría estar ausente en *lipid rafts*. Hasta la fecha no se ha descrito esta fosfatasa, aunque Bright *et al* sugieren que podría tratarse de la fosfatasa insensible al ácido ocaidaico PP2C (Bright *et al*, 2008). La ausencia de PP2C en *lipid rafts* explicaría el mayor grado de activación de BRSK1 en estos microdominios de membrana.

La incubación *in vitro* de BRSK1 pura con vesículas multilamelares (SMVs) reconstituidas con lípidos extraídos de los *lipid rafts* de sinaptosomas, resulta en un aumento de un 300% de la actividad de BRSK1. Este efecto es específico para BRSK1 (no se da para BRSK2 o MARK4), y es independiente de la fosforilación del T-loop por LKB1, dado que también se observa para el mutante constitutivamente activo de BRSK1. Así, la asociación de BRSK1 a microdominios *lipid rafts* de sinaptosomas representa un nuevo mecanismo de regulación de la actividad quinasa, adicional a la fosforilación del T-loop por LKB1.

### **Otros aspectos de la regulación de las BRSKs: modificación de BRSK1 y BRSK2 por ubiquitina y proteínas relacionadas (*small ubiquitin-like modifier 2*, SUMO2).**

La regulación de la expresión de las BRSKs por neurotrofinas, y de su actividad por localización en *lipid rafts*, confirman la existencia de otros mecanismos de regulación que permitirían modular la función de estas quinasas. Estos resultados están en consonancia con los de otros autores, que han propuesto modelos de regulación que podrían aplicarse a las BRSKs, o a sus ortólogos de *C.elegans* y *Drosophila*, mediante interacción con otras proteínas. Un ejemplo es el modelo general propuesto por Al-Hakim *et al* de inhibición de la actividad de las AMPK-related kinases por ubiquitinación de cadenas atípicas de poli-ubiquitina (Al-Hakim *et al*, 2008). Estos autores muestran que varias AMPK-related kinases (entre ellas BRSK1 y BRSK2) están poli-ubiquitinadas *in vivo*, y proponen que esta modificación postraduccional no regula la estabilidad de las quinasas sino que afecta a su activación por LKB1, de acuerdo con estudios anteriores (Jaleel *et al*, 2006; Murphy *et al* 2007). Así, las cadenas de ubiquitina se unirían al UBA-domain de las AMPK-related kinases provocando la desestabilización del dominio quinasa y la inhibición de la fosforilación del T-loop por LKB1, y por tanto inactivando a las BRSKs. En sentido contrario, las proteasas de ubiquitina catalizarían la des-ubiquitinación de las BRSKs, permitiendo la fosforilación del T-loop, induciendo su activación. Los autores demuestran que la proteasa específica de ubiquitina USP9X es la responsable de la des-ubiquitinación de las quinasas NUAK1 y MARK4, con las que interacciona a través de un residuo de triptófano situado en el límite C-terminal del dominio quinasa. Este residuo es el único conservado en esa región en todas las AMPK-related kinases, por lo que es posible que en el caso de las BRSKs (Trp300 en BRSK1 y Trp269 en BRSK2) esté implicado en la interacción con proteasas específicas de ubiquitina que ejerzan su función en el cerebro (como USP14, que desempeña un papel crítico en la regulación de la actividad sináptica en mamíferos) (Wilson *et al*, 2002; Crimmins *et al*, 2006; Chen *et al*, 2011). La relevancia de la homeostasis de la ubiquitina en cerebro está ampliamente documentada, y su desequilibrio se ha involucrado en varias enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson (Leroy *et al* 1998; Coi *et al*, 2004; Moore D.J., 2006), Alzheimer (de Vrij *et al*, 2004; Scheper & Hol, 2005) o la enfermedad de Huntington (van Tijn *et al*, 2008; Valera *et al*,

2005). Los resultados obtenidos en el laboratorio (datos no mostrados), corroboran la ubiquitinación *in vivo* de las BRSKs mediante un mecanismo independiente al proteosoma (insensible al tratamiento con el inhibidor proteosomal MG-132).

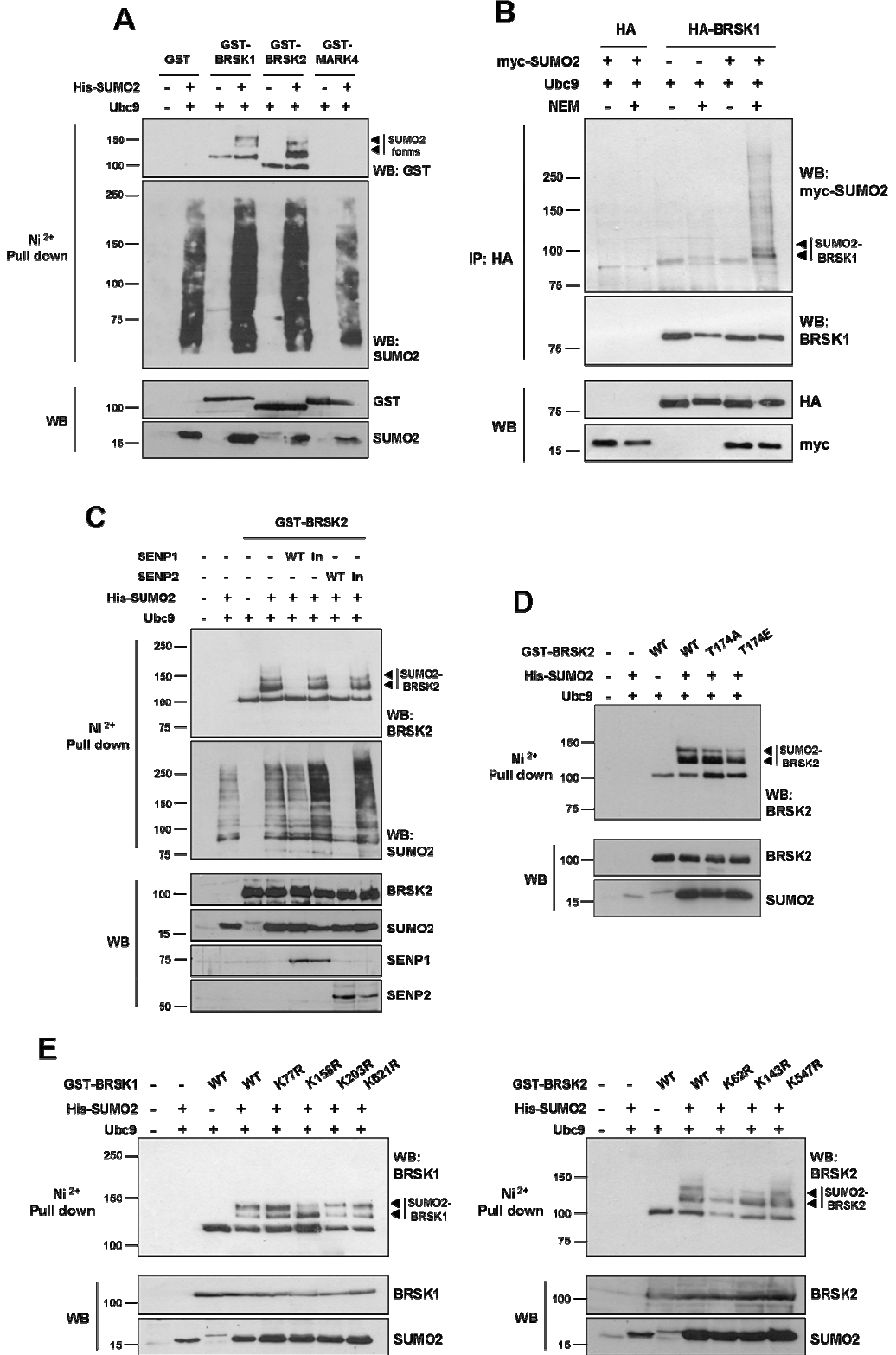
Además de ser modificadas por ubiquitina, hemos observado por primera vez que BRSK1 y BRSK2 también se modifican por SUMO2 (*small ubiquitin-like modifier 2*). La **figura D.1A** muestra que BRSK1 y BRSK2, pero no MARK4, se modifican *in vivo* por SUMO2, generando formas de mayor peso molecular detectables mediante inmunoblot. Como se ha descrito para otras proteínas, se requiere la presencia del inhibidor NEM de las peptidasas de SUMO (*N-ethylmaleimide*) para observar la sumoilación de las BRSKs (**figura D.1B**). Por último, las

isopeptidasas específicas de SUMO SENP1 y SENP2 catalizan la desumoilación de las BRSKs (**figura D1.C**).

Las proteínas SUMO son proteínas pequeñas (10-15 kDa) de la familia de proteínas relacionadas con ubiquitina (*ubiquitin-like proteins*, Ubls). A pesar de no compartir con ubiquitina una elevada similitud de secuencia, se pliegan formando la misma estructura tridimensional ( *$\beta$ -grasp fold* o *ubiquitin-fold*). Todas las Ubls comparten la presencia de un aminoácido de Gly en su extremo C-terminal, a través del cual se unen covalentemente a la cadena lateral de una Lys de las proteínas sustrato. Esta modificación reversible por Ubls regula las proteínas sustrato de diferentes maneras, afectando su estabilidad, localización, interacción con otras proteínas y/o actividad (Kerscher et al, 2006; Hay R.T., 2005) (**caja D.1**). Típicamente, los residuos de Lys susceptibles a ser sumoilados se encuentran en un motivo consenso  $\psi$ Kx/D/E (donde  $\psi$  es un residuo hidrofóbico grande, K la Lys modificada, x cualquier aminoácido y D/E residuos

**Caja D.1 Las proteínas SUMO (*small ubiquitin-like modifier*).** En vertebrados se han descrito 4 formas de SUMO (SUMO1-4); SUMO1 fue la primera descrita, al observarse que se unía a RanGAP1 modulando su asociación al complejo del poro nuclear (Matunis et al, 1996; Mahajan et al, 1997). Las formas SUMO2 y SUMO3 están estrechamente relacionadas entre si (solo difieren en tres aminoácidos en el extremo N-terminal), por lo que constituyen una subfamilia dentro de las Ubls (SUMO2/3). A diferencia de SUMO1 (que en la célula está enteramente conjugado a proteínas sustrato), existe un *pool* libre de SUMO2/3 en el citosol que es movilizado cuando las células se someten a diversos tipos de estrés, lo que indica una mayor dinámica y versatilidad en la sumoilación de proteínas por SUMO2/3 (Saitoh & Hinchev, 2000). SUMO4 es la forma más desconocida, y mutaciones en ella se han asociado recientemente con la diabetes tipo 1 (a través de la alteración de la regulación génica mediada por NF $\kappa$ B) (Guo D. et al, 2004; Hwang et al, 2011).

De forma análoga a la ubiquitinación, la sumoilación de proteínas sustrato ocurre a través de una cascada enzimática en la que están involucrados enzimas activadores (E1), conjugadores (E2) y ligasas (E3) (Hay R.T., 2005). En la primera reacción, el enzima activador de SUMO E1 (SAE1/SAE2), cataliza la adenilación de su grupo carboxilo en C-terminal, lo que supone la formación de un intermediario covalente entre SUMO y su activador SAE1/2. En la segunda reacción, SUMO se transfiere desde SAE1/SAE2 al enzima conjugador E2 Ubc9. Un trazo distintivo entre Ubc9 y los enzimas E2 de ubiquitina, es su habilidad de reconocer directamente proteínas sustrato. Así, Ubc9-SUMO cataliza la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de la Gly en C-terminal de SUMO y el grupo amino de una Lys en la proteína sustrato. Las SUMO E3 ligasas (PIAS) son necesarias para acelerar esta reacción, y actúan de moléculas adaptadoras acercando el sustrato al complejo Ubc9-SUMO.



**Figura D.1 Modificación de BRSK1 y BRSK2 por small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2).** (A) BRSK1 y BRSK2, pero no MARK4, se sumoilan *in vivo* por SUMO2. Análisis de sumoilación de BRSK1, BRSK2 o MARK4 mediante *pull down* de Ni<sup>2+</sup>-Agarose de lisados de células HEK-293 que sobre-expresan His-SUMO2, la enzima ligasa E2 de SUMO (Ubc9), y las quinasas indicadas. Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes y en presencia del inhibidor específico de la peptidasa de SUMO *N-ethylmaleimide* (NEM). Los paneles superiores muestran el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la sumoilación de BRSK1 y BRSK2 (anti-GST). Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de BRSK1, BRSK2 y MARK4 (anti-GST) y de SUMO2 (anti-SUMO2). (B) El uso de NEM preserva la sumoilación de las BRSKs. Análisis de sumoilación de BRSK1 en presencia o ausencia de NEM mediante inmunoprecipitación de BRSK1 de células HEK-293 que sobre-expresan myc-SUMO2, Ubc9 y HA-BRSK1. Los paneles superiores muestran la inmunoprecipitación de BRSK1 utilizando el anticuerpo anti-HA en el que se detecta la sumoilación de BRSK1 por SUMO2 solo en presencia de NEM (anti-myc). Los paneles inferiores muestran los niveles de sobre-expresión de BRSK1 (anti-HA) y SUMO2 (anti-myc). Resultados idénticos se obtuvieron para BRSK2. (C) Las peptidasas específicas de SUMO SENP1 y SENP2 catalizan la des-sumoilación de las BRSKs. Análisis de sumoilación de BRSK2 mediante *pull down* de Ni<sup>2+</sup>-Agarose de lisados de células HEK-293 que sobre-expresan His-SUMO2, Ubc9, BRSK2 y SENP1 o SENP2 salvajes (WT) o inactivas (In). Los paneles superiores muestran el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la des-sumoilación de BRSK2 en presencia de SENP1/2 salvajes (anti-BRSK2). Los paneles inferiores muestran los niveles de sobre-expresión de BRSK2, SUMO2, SENP1 y SENP2. Resultados idénticos se obtuvieron para BRSK1. (D) El estado de activación de las BRSKs no afecta su sumoilación. Análisis de sumoilación de BRSK2 salvaje (WT), mutante inactivo (BRSK2-T174A) o mutante constitutivamente activo (BRSK2-T174E). El análisis se realizó mediante *pull down* de Ni<sup>2+</sup>-Agarose igual que en (A). Los paneles superiores muestran el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la sumoilación de BRSK2, y los inferiores muestran los niveles de sobre-expresión de BRSK2 y SUMO2. Resultados idénticos se obtuvieron para BRSK1. (E) Ninguna de las Lys de BRSK1 y BRSK2 propuestas están modificadas por SUMO2. Análisis de sumoilación de las BRSKs salvajes (WT) o los mutantes Lys/Arg (K/R) de las Lys que rindieron un mayor score en el algoritmo SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/tools/>). El análisis se realizó mediante *pull down* de Ni<sup>2+</sup>-Agarose igual que en (A). Los paneles superiores muestran el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la sumoilación de las formas de BRSK1 (izquierda) y BRSK2 (derecha). Los paneles inferiores muestran los niveles de sobre-expresión de las BRSKs y SUMO2. Los resultados obtenidos de todos los apartados son representativos de al menos cuatro experimentos independientes.

ácidos) (Rodríguez et al, 2001; Sampson et al, 2001). SUMO2/3 poseen a su vez estos motivos, por lo que pueden formar cadenas de dos o más moléculas de SUMO sobre la proteína sustrato. En el caso de las BRSKs, la modificación por SUMO2 induce la aparición de dos bandas de mayor peso molecular (de unos 10 y 20 kDa de más cada una), lo que sugiere la adición de una o dos moléculas de SUMO2 (**figura D.1A**). Existen dos posibilidades, o bien que las BRSKs se sumoilen por una sola molécula de SUMO pero en dos Lys diferentes, o bien que se sumoilen en la misma Lys por una cadena de dos moléculas de SUMO. Con la finalidad de identificar la/s Lys modificada/s se generaron formas mutadas de las BRSKs en las que las Lys que presentaban el motivo consenso  $\psi$ KxD/E fueron mutadas a Arg. Los resultados obtenidos (**figura D.1E**) muestran que las principales Lys susceptibles a ser modificadas no están implicadas en la sumoilación de las BRSKs, o al menos de forma simple. Es posible, por tanto, que en la sumoilación de las BRSKs estén implicadas varias Lys, como se ha descrito para otras proteínas neuronales como axin, ataxin-1 o el canal de potasio Kv1.5 (Rui et al, 2002; Riley et al, 2005; Benson et al, 2007). Por otro lado, cada vez son más los trabajos que describen la sumoilación

de proteínas sustrato en Lys fuera del motivo consenso canónico (como es el caso de GSK3 $\beta$ , axin o TGF- $\beta$ I en neuronas) (Lee E.J. et al, 2008; Rui et al, 2002; Kang J.S. et al, 2008), por lo que también existe la posibilidad que el/los residuo/s modificado/s en las BRSKs no sean ninguna de las Lys estudiadas.

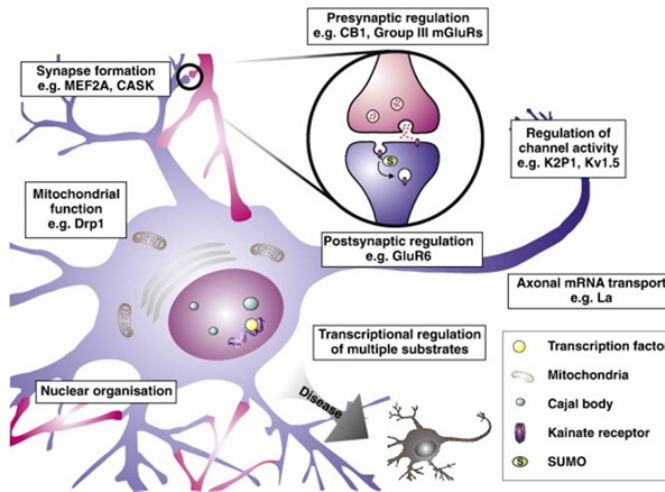
Como la ubiquitina, SUMO se sintetiza en forma de precursor largo que debe ser procesado para exponer la Gly en C-terminal que se unirá a las proteínas sustrato. Esta reacción la catalizan las peptidasas específicas de SUMO SENPs, que también se encargan finalmente de hacer reversible la reacción catalizando la des-sumoilación de las proteínas modificadas. En mamíferos se han descrito 6 SENPs (designadas SENP1-3 y SENP5-7), que exhiben diferente especificidad para las formas de SUMO y presentan diferente patrón de localización celular (Mukhopadhyay & Dasso, 2007; Yeh E.T.H., 2009). Los experimentos de des-sumoilación de las BRSKs utilizando SENP1 y SENP2 salvajes o inactivas (**figura D.1C**), muestran que ambas proteasas des-sumoilan las BRSKs. A diferencia de otras peptidasas de SUMO, SENP1/2 no presentan especificidad limitante para ninguna forma de SUMO, y son capaces de catalizar la des-sumoilación de tanto SUMO1 como de SUMO2/3 de forma eficaz.

¿Cómo afecta la sumoilación a las BRSKs? A diferencia de la ubiquitinación, que clásicamente marca a las proteínas para su degradación por el proteosoma, la sumoilación regula principalmente la actividad y función de las proteínas sustrato a través de cambios en la localización intracelular, interacciones proteína-proteína o afectando a otras modificaciones post-traduccionales como la fosforilación o la propia ubiquitinación (Hay R.T., 2005; Zhao J., 2007; Geoffroy & Hay, 2009). Aunque inicialmente se relacionó la sumoilación con proteínas implicadas exclusivamente en la regulación de la expresión génica (afectando mecanismos como la transcripción, mantenimiento de la estabilidad genómica y transporte citosma-núcleo), a día de se han descrito otras funciones que, en conjunto, ponen de manifiesto la importancia y versatilidad de la sumoilación en la fisiología de la célula eucariota. Así, en neuronas, la modificación por SUMO de varias proteínas extranucleares es un mecanismo muy relevante en la regulación de la función sináptica (Wilkinson et al, 2010) (**figura D.2 y caja D.2**). Por ejemplo, recientemente se ha

**Caja D.2 SUMO, ubiquitina y neurodegeneración.** Dada la relevancia de la sumoilación en la señalización, excitabilidad y desarrollo neuronal, no es sorprendente que la desregulación de esta modificación post-traduccionales se haya visto implicada en varios desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington, Alzheimer, Parkinson o ataxias espinocerebelares (SCAs) (Sarge & Park-Sarge, 2011; Wilkinson et al, 2010; Anderson et al, 2009; Dorval & Fraser, 2007). La proteína patogénica Huntingtin (Htt) por ejemplo, puede modificarse por SUMO y ubiquitina en las mismas Lys provocando efectos contrarios (Steffan et al, 2004); mientras la sumoilación promueve la enfermedad (Htt se convierte en una proteína más soluble, abundante y tóxica), la ubiquitinación disminuye la patogenicidad, sugiriendo una interacción entre ambas modificaciones en la regulación de la estabilidad y agregación de Htt. También se han identificado varias proteínas sustrato de SUMO relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, como APP (cuya sumoilación regula negativamente los niveles de A $\beta$ ) o tau (cuya estabilidad está regulada de forma coordinada entre su sumoilación y ubiquitinación) (Zhang & Sarge, 2008; Dorval & Fraser, 2006).



propuesto que las proteínas de la membrana pre-sináptica CB1 (receptor de cannabinoides 1) y mGluR (receptor metabotrópico de glutamato) son diana de sumoilación. Al contrario que muchos de los sustratos de SUMO identificados, CB1 se encuentra sumoilado de forma basal en la membrana pre-sináptica, y su activación por agonistas de cannabinoides provoca su rápida des-sumoilación (Gowran et al, 2009). Por su parte, los receptores mGluR son sumoilados por SUMO1 (Tang Z. et al, 2005; Wilkinson et al, 2008), y aunque falta por caracterizar su función, es posible que la sumoilación de estos receptores medie en la liberación pre-sináptica de neurotransmisores.



**Figura D.2 Sumoilación y función neuronal.** Varios aspectos de la función y morfología neuronal se han descrito que están regulados por sumoilación, entre ellos la formación sináptica y la regulación de la actividad pre-sináptica (ver texto para detalles). MEF2A; *myocyte enhancer factor 2A*; CASK, *calcium/calmodulin-dependent serine kinase*; CB1, *cannabinoid receptor 1*; mGluR, *metabotropic glutamate receptor*; Drp1, *dynamamin-related protein 1*. Figura extraída de Wilkinson et al, 2010.

Feligioni *et al* muestran con un elegante estudio que la introducción de SUMO en sinaptosomas de cerebro de rata provoca una disminución en la liberación de glutamato, mientras que la inclusión de SENP1 potencia la liberación de neurotransmisores (Feligiono et al, 2009). Esto sugiere que la sumoilación juega un papel negativo en la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, los mismos autores muestran que este efecto puede ser dependiente del estímulo, ya que la inclusión de SUMO potencia la liberación de glutamato estimulada por kainato, mientras que SENP1 la disminuye. Así, la sumoilación puede actuar estimulando e inhibiendo la liberación de glutamato dependiendo del estímulo, a través de la sumoilación o des-sumoilación de diferentes proteínas contenidas en los sinaptosomas. Dada la

localización de BRSK1 en estas estructuras, y su papel en la liberación de neurotransmisores (Inoue et al, 2006), es posible que la sumoilación de BRSK1 contribuya a regular pre-sinápticamente la liberación de neurotransmisores, de manera similar a como se ha descrito para la quinasa GSK3 $\beta$  (que es modificada por SUMO1 en una única Lys atípica afectando a su localización, estabilidad y actividad frente a la fosforilación de tau; Lee E.J. et al, 2008). La identificación de la/s Lys de BRSK1 modificada/s por SUMO, y la obtención de mutantes deficientes en sumoilación serán decisivos para elucidar su función. Por otra parte, la ubiquitinación no degradativa de BRSK1 podría afectar a su sumoilación, o viceversa, y por tanto (según el modelo propuesto por Al-Hakim et al, 2008) es posible que ambas modificaciones cooperen para regular la estabilidad del dominio quinasa, la fosforilación del T-loop por LKB1 y, en consecuencia, la activación de BRSK1.

### D.3 FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA t-SNARE SINTAXINA-1A POR BRSK1.

Una fracción de BRSK1 localiza en los terminales pre-sinápticos de neuronas maduras (fuertemente asociada a vesículas sinápticas y a la citomatriz de la zona activa), donde su actividad quinasa juega un papel relevante en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Inoue et al, 2006). Inoue et al, proponen que este proceso podría estar en parte mediado por la proteína RIM1 (que reside en la zona activa y está involucrada en el *priming* de vesículas), ya que es fosforilada *in vitro* por BRSK1. Sin embargo, esta fosforilación es pobre y no se ha observado *in vivo*, por lo que los autores especulan con la existencia de otros sustratos en la zona activa que pudieran contribuir a la función sináptica de BRSK1. Dada la presencia de BRSK1 en *lipid rafts* de sinaptosomas de rata (donde además es más activa), y la co-localización en estas estructuras con las proteínas SNARE (implicadas en la fusión de vesículas con la membrana pre-sináptica), nos planteamos si alguno de estos componentes de la maquinaria de fusión de membranas era sustrato de BRSK1. Los resultados obtenidos muestran que, de las principales proteínas SNARE estudiadas (SNAP-25, sintaxina1-A, sinaptobrevina y Munc18), BRSK1 fosforila *in vitro* e *in vivo* a la proteína t-SNARE sintaxina-1A en el residuo Serina-188, con una estequiometría de un mol de fosfato incorporado por mol de sintaxina. Ello supone la identificación de un nuevo sustrato de BRSK1, a través del cual regularía la fusión de vesículas con la membrana pre-sináptica y, por tanto la liberación de neurotransmisores. Estudios análogos de fosforilación de las proteínas SNARE por BRSK2 (resultados no mostrados), indican que BRSK2 también es capaz de fosforilar *in vitro* a sintaxina-1A, aunque es poco probable que lo haga *in vivo* ya que, a diferencia de BRSK1, BRSK2 no se encuentra presente en los microdominios *raft* de sinaptosomas.

Las evidencias experimentales que muestran la Ser-188 como principal residuo fosforilado por BRSK1 son (1) el mutante de delección de sintaxina que carece de los últimos 85 aminoácidos en C-terminal (sintaxina[1-168]) es pobremente fosforilado por BRSK1 (~25% de fosforilación de la forma salvaje). (2) El análisis de espectrometría de masas de la sintaxina fosforilada por BRSK1 identifica la Ser188 como principal residuo fosforilado. (3) La fosforilación del mutante de sintaxina Ser188-Ala (S188A) por BRSK1 se reduce en gran medida (~70%), comparado con la forma salvaje. (4) El anticuerpo fosfo-específico generado anti-pSer188-sintaxina, reconoce la sintaxina salvaje fosforilada *in vitro* por BRSK1, pero no el mutante S188A. (5) El anticuerpo pSer188-sintaxina reconoce *in vivo* la sintaxina sobre-expresada en células HEK-293 exclusivamente cuando co-expresan una forma activa de BRSK1 (salvaje o constitutivamente activa BRSK1-T189E), pero no la quinasa inactiva.

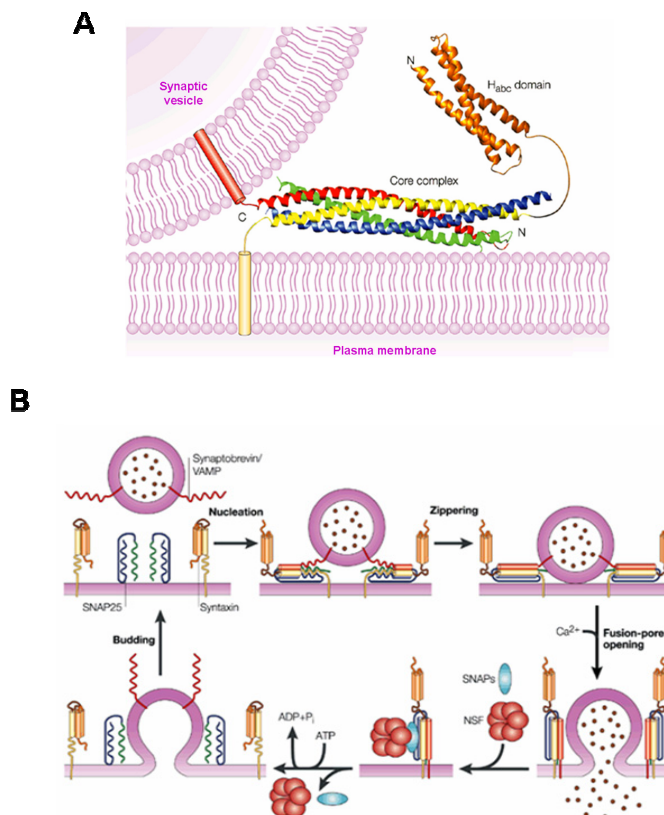
### El complejo SNARE.

La sintaxina forma parte de la superfamilia de proteínas SNARE (*soluble NSF-attachment protein receptor*), que constituyen la maquinaria molecular conservada y universal encargada de ejecutar la fusión de membranas intracelulares (a excepción de la mitocondria) en organismos eucariotas. Así, todos los pasos de las vías de secreción y endocitosis que se han estudiado en levaduras y eucariotas superiores requieren las proteínas SNARE (Jahn & Sudhof, 1999; Lin & Scheller, 2000; Pelham H.R., 1999). Estas constituyen una extensa familia de proteínas (36 miembros en humanos) que se caracterizan por poseer una secuencia de unos 60 residuos, conocida como motivo SNARE, con elevada predisposición a estructurarse en *coiled coil*. En muchos casos, el motivo SNARE precede una región transmembrana en C-terminal a través de la cual las proteínas SNARE se anclan a la membrana. Existen algunas excepciones, como SNAP25, que contiene dos motivos SNARE diferentes unidos por un *loop* flexible que es palmitoilado (a través del cual se asocia a la membrana). Es interesante que el dominio transmembrana de muchas SNARE puede también sufrir palmitoilación, lo que las reclutaría en *clusters* de membrana ricos en colesterol (Prescott et al, 2009).

Las primeras proteínas SNARE identificadas fueron las proteínas sinápticas sintaxina 1, SNAP25 (25 kDa *synaptosomal-associated protein*) y sinaptobrevina/VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), encargadas de la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica en neuronas (Bennett et al, 1992; Oylar et al, 1989; Trimble et al, 1988). Según el modelo propuesto por Söllner *et al* (SNARE hipótesis), las tres proteínas SNARE presentes en dos membranas opuestas (sintaxina y SANP en la membrana plasmática, y sinaptobrevina en la membrana vesicular) interaccionan formando un complejo proteico (complejo SNARE) que conduce a la fusión de membranas (Söllner et al, 1993). Así, según su localización, las proteínas

SNARE fueron clasificadas como t-SNARE (*target membrane*) o v-SNARE (*vesicular membrane*). Sin embargo, esta clasificación es ambigua para algunos eventos de fusión (como Sec22 que funciona en ambas direcciones en el tráfico entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi), por lo que se han reclasificado en R-SNARE (arginina) o Q-SNARE (glutamina), según la identidad de un residuo muy conservado del dominio SNARE (Fasshauer et al, 1998).

Análisis de cristalografía muestran que el complejo SNARE sináptico está formado por cuatro motivos SNARE (2 de SNAP25 y uno de sintaxina y sinaptobrevina) que están desestructurados cuando se encuentran aislados, pero que forman un haz paralelo de 4 hélices alfa muy estable cuando se juntan (Poirier et al, 1998a; Sutton et al, 1998) (**figura D.3A**). Este complejo SNARE (trans-SNARE) es resistente a la desnaturalización térmica (es estable a 90 °C), con SDS y a la



**Figura D.3 Complejo SNARE en la exocitosis de vesículas sinápticas. (A)** Modelo del complejo SNARE neuronal formado por un haz compacto de 4 hélices alfa paralelas (dos aportadas por SNAP25, azul y verde, y una de sintaxina-1 y sinaptobrevina cada una, amarilla y roja, respectivamente). Los cilindros representan las regiones transmembrana de sinaptobrevina y sintaxina, insertadas en la membrana de la vesícula sináptica y en la membrana plasmática pre-sináptica, respectivamente (ver texto para detalles). **(B)** Ciclo de ensamblaje/desensamblaje del complejo SNARE en la exocitosis de vesículas sinápticas. La formación del complejo SNARE provoca el acercamiento de la vesícula sináptica a la membrana, que conduce a la fusión de membranas y liberación de neurotransmisores. Después de la fusión, las proteínas NSF y SNAP desensamblan el complejo que permanece en la misma membrana para ser reciclado para otra ronda de fusión. Amarillo, sintaxina; azul y verde, SNAP25; rojo, sinaptobrevina. Figuras extraídas de Rizo & Südhof, 2002.

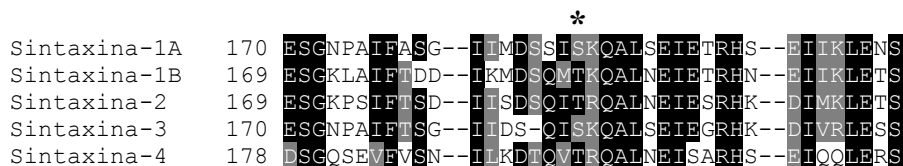
digestión con proteasas, evidencias bioquímicas que denotan su extrema estabilidad (Poirier et al, 1998b; Hayashi et al, 1994; Yang et al, 1999). Debido a que los motivos SNARE de sinaptobrevina y syntaxina son adyacentes a la región transmembrana (anclada a la vesícula sináptica y a la membrana plasmática, respectivamente), la formación del complejo SNARE fuerza a un acercamiento muy estrecho de las dos membranas que provoca su fusión. Dada la estabilidad del complejo, se requiere la hidrólisis de ATP para desasociar el complejo en componentes monoméricos y retornar a las proteínas SNARE a su estado desestructurado inicial. Este desensamblaje lo llevan a cabo la ATP-fosfatasa NSF y su proteína adaptadora SNAP, que con el coste energético de tres a seis moléculas de ATP reciclan las proteínas SNARE para otra ronda de fusión (Südhof & Rothman, 2009; Jahn & Scheller, 2006; Rizo & Südhof, 2002; Chen & Scheller, 2001) (**figura D.3B**) (**caja D.3**).

**Caja D.3 Regulación de las proteínas SNARE.** Además de las proteínas SNARE, que constituyen los generadores de la fuerza que se requiere para la fusión, existe otro componente esencial en la fusión de membranas: el conjunto de **proteínas hidrofílicas SM** (Sec1/Munc18-*like proteins*), que se unen a las proteínas SNARE en varias etapas del ciclo de fusión regulando su función. Por ejemplo, en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica en neuronas, la proteína SM **Munc18** juega un papel determinante en la organización del complejo trans-SNARE a través de su unión a la syntaxina (Südhof & Rothman, 2009; Rizo & Südhof, 2002). Además, las diferentes reacciones intracelulares de fusión, están sujetas a procesos regulatorios que adaptan esta maquinaria universal de fusión (formada por las proteínas SNARE y SM) a la fisiología de la célula. Estos reguladores son especialmente importantes en los procesos de fusión que requieren una elevada sincronización en espacio y tiempo, como la fusión de vesículas sinápticas en los terminales pre-sinápticos que conduce a la liberación de neurotransmisores. En neuronas, las vesículas sinápticas se reclutan en la zona activa de la membrana pre-sináptica, sin fusionarse, aguardando a un potencial de acción. En este estado, el complejo SNARE está estabilizado en una forma activa mediante la unión de elevada afinidad de la proteína **complexina** directamente al núcleo del complejo. Cuando ocurre el influjo de  $Ca^{2+}$ , la proteína sensor de  $Ca^{2+}$  **sinaptotagmina** (asociada a la membrana de la vesícula sináptica) se unirá al complejo SNARE desplazando a complexina, permitiendo la rápida y sincronizada fusión de vesículas, y la consecuente liberación de neurotransmisores (Tang J. et al, 2006; Jena B.P., 2008; Rizo & Rosenmund, 2008; Südhof & Rothman, 2009; Brunger et al, 2009).

Sin embargo, recientemente se han aportado evidencias que indican que la regulación de las proteínas SNARE no estaría solamente sujeta a interacciones con otras proteínas. Así, se ha sugerido que modificaciones postraduccionales como la **fosforilación** de las proteínas SNARE directamente, o de las proteínas asociadas a ellas indirectamente, podrían tener un papel relevante en la regulación de la fusión de membranas. En neuronas por ejemplo, se ha descrito que la fosforilación de proteínas implicadas en la fusión de vesículas sinápticas en la zona activa, podría promover la formación, estabilidad o desensamblaje del complejo SNARE, regulando por tanto la liberación de neurotransmisores (Snyder et al, 2006). Además, recientemente se ha sugerido que la fosforilación de estas proteínas será un mecanismo de regulación a tener en cuenta para explicar la plasticidad sináptica, en que las alteraciones dinámicas de la estructura y función de las sinapsis son fundamentales para los procesos adaptativos del cerebro como el aprendizaje y la memoria (Saneyoshi et al, 2010; Mayford M., 2007).

### Sintaxina-1A.

La sintaxina-1A y sus formas relacionadas forman una familia extensa de proteínas t/Q-SNARE que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo y en diferentes tejidos en el organismo adulto. Cada forma posee también una localización específica en la célula, por lo que se involucran en diferentes procesos intracelulares de fusión de membranas. En humanos, la familia de sintaxinas se constituye de 15 miembros, de los cuales sintaxina-1A y su isoforma generada por *splicing* alternativo sintaxina-1B, son las únicas que se expresan específicamente en neuronas y se localizan en la membrana plasmática pre-sináptica formando el complejo SNARE que conduce a la liberación de neurotransmisores (Teng et al, 2001) (**tabla D.1**). El análisis comparativo de las 15 formas de sintaxina, muestra que el residuo Ser188 de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1 está conservado en 4 formas más (sintaxina-1B, 2, 3 y 4), y presenta una leucina en posición +4, como se ha visto para otros sustratos de las *AMPK-related kinases* (**figura D.4**). Es posible, por tanto, que BRSK1 fosforile a estas formas en el residuo conservado, lo que la implicaría no solo en la fusión de vesículas sinápticas en la zona activa (sintaxina-1A y 1B) sino también en otros eventos de fusión en la membrana plasmática (sintaxina-2, 3 y 4). El hecho de que la secuencia no se encuentre conservada en el resto de sintaxinas descartaría que BRSK1 jugara un papel en procesos de fusión de membranas intracelulares (como el endosoma, retículo endoplasmático o aparato de Golgi). De las formas de sintaxina que son putativos sustratos de BRSK1, la Ser188 de sintaxina-1A es idéntica en sintaxina-3, y en cambio está conservada (Thr) en las sintaxinas 1B, 2 y 4. A pesar de tratarse de Ser/Thr quinasas, todos los sustratos de las BRSKs descritos *in vitro* e *in vivo* (tau, Wee, Cdc25 y  $\gamma$ -tubulina) son fosforilados en residuos de serina, lo que parece indicar una preferencia de las BRSKs hacia la fosforilación de estos residuos.



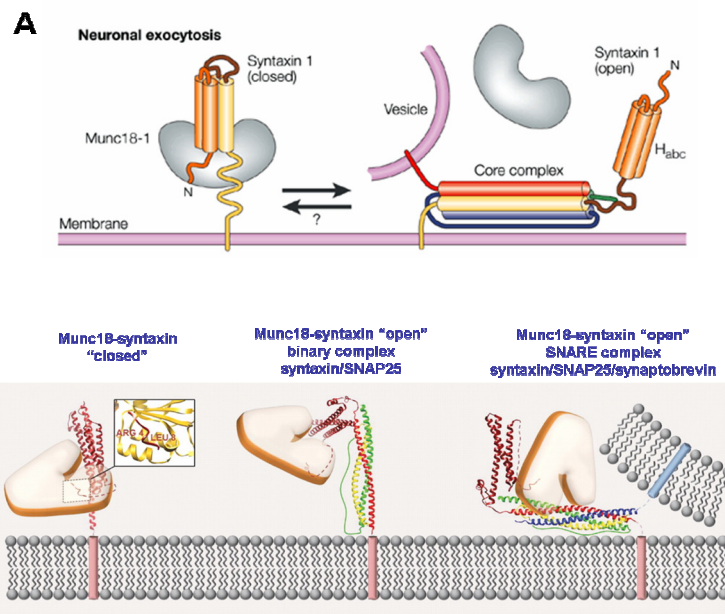
**Figura D.4 Alineamiento de las secuencias de sintaxina que contienen el residuo conservado fosforilado en sintaxina-1A por BRSK1.** Alineamiento múltiple de las secuencias de sintaxina-1A, 1B, 2, 3 y 4 que contienen el residuo conservado de sintaxina-1A (Ser188) fosforilado por BRSK1 (señalado con asterisco). La sombra negra indica residuos idénticos, y la gris conservados.

Sintaxinas	Localización subcelular	Distribución tisular	Función
<b>Sintaxina 1A (A y C)</b>	Membrana plasmática pre-sináptica	Neuronal y células secretoras	Exocitosis neuronal; secreción regulada
<b>Sintaxina 1B</b>	Membrana plasmática pre-sináptica	Neuronal y células secretoras	Exocitosis neuronal; secreción regulada
<b>Sintaxina 2 (A, B, C y D)</b>	Membrana plasmática	Ubicua	Exocitosis; morforegulador durante el desarrollo
<b>Sintaxina 3 (A, B, C y D)</b>	Membrana plasmática	Ubicua	Exocitosis
<b>Sintaxina 4</b>	Membrana plasmática	Ubicua	Translocación de GLUT4
<b>Sintaxina 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12/13, 16, 17 y 18</b>	RE, endosoma, TGN o Golgi	Ubicua	Transporte entre membranas intracelulares, fusión de gránulos secretores, fusión de membranas intracelulares, reciclaje de proteínas de superficie

**Tabla D.1 Localización subcelular, distribución tisular y función de las sintaxinas de mamíferos.** RE, retículo endoplasmático; TGN, *trans-Golgi network*; GLUT4, transportador de glucosa tipo 4.

Como el resto de sintaxinas (excepto sintaxina-11), sintaxina-1A se estructura en tres dominios bien definidos: (1) un dominio transmembrana en C-terminal con orientación tipo II (el extremo N-terminal y la mayor parte de la proteína encarado al citoplasma), (2) un dominio SNARE adyacente al dominio transmembrana (dominio H3), y (3) un dominio regulatorio en N-terminal estructurado en un haz de 3 hélices alfa (dominio Habc) conectado al dominio SNARE por un corto *linker*. Según la orientación del dominio Habc, sintaxina-1A puede adoptar dos conformaciones estables: una conformación cerrada en que el dominio Habc se pliega sobre el dominio SNARE impidiendo la formación del complejo SNARE, y una conformación abierta en que el dominio SNARE accesible (no impedido por el dominio Habc) puede interactuar con SNAP25 y sinaptobrevina formando el complejo trans-SNARE que conducirá a la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica (Dulubova et al, 1999; Misura et al, 2000). La interacción de sintaxina-1A con Munc18 es determinante para establecer la conformación que adopta sintaxina. Así, Munc18 une a sintaxina en su conformación cerrada, abrazando las 4 hélices internas de sintaxina exclusivamente, las 3 del dominio Habc y la del dominio SNARE (**figura D.5A**). Ello compite con la formación del complejo SNARE, lo que sugiere que la interacción de Munc18 con sintaxina estabilizando su conformación cerrada es una regulación inhibitoria del complejo (Dulubova et al, 1999; Yang et al, 2000). Sin embargo, recientemente se

ha observado que Munc18 puede interactuar con sintaxina también en su conformación abierta, lo que sugiere una regulación positiva del complejo SNARE. Este modelo reciente (figura D.5B) se basa en la observación de que Munc18 puede interactuar con sintaxina cuando está formando un complejo intermediario con SNAP25 (complejo binario sintaxina/SNAP25), o también directamente cuando forma el complejo SNARE (complejo ternario sintaxina/SNAP25/sinptobrevina). Se desconocen los mecanismos que inducen a Munc18 a interactuar de una u otra manera con sintaxina, aunque sí parece que, al contrario de lo que se creía clásicamente, la función de Munc18 no estaría restringida solamente a una regulación negativa del complejo SNARE (Zilly et al, 2006; Dulubova et al, 2007).

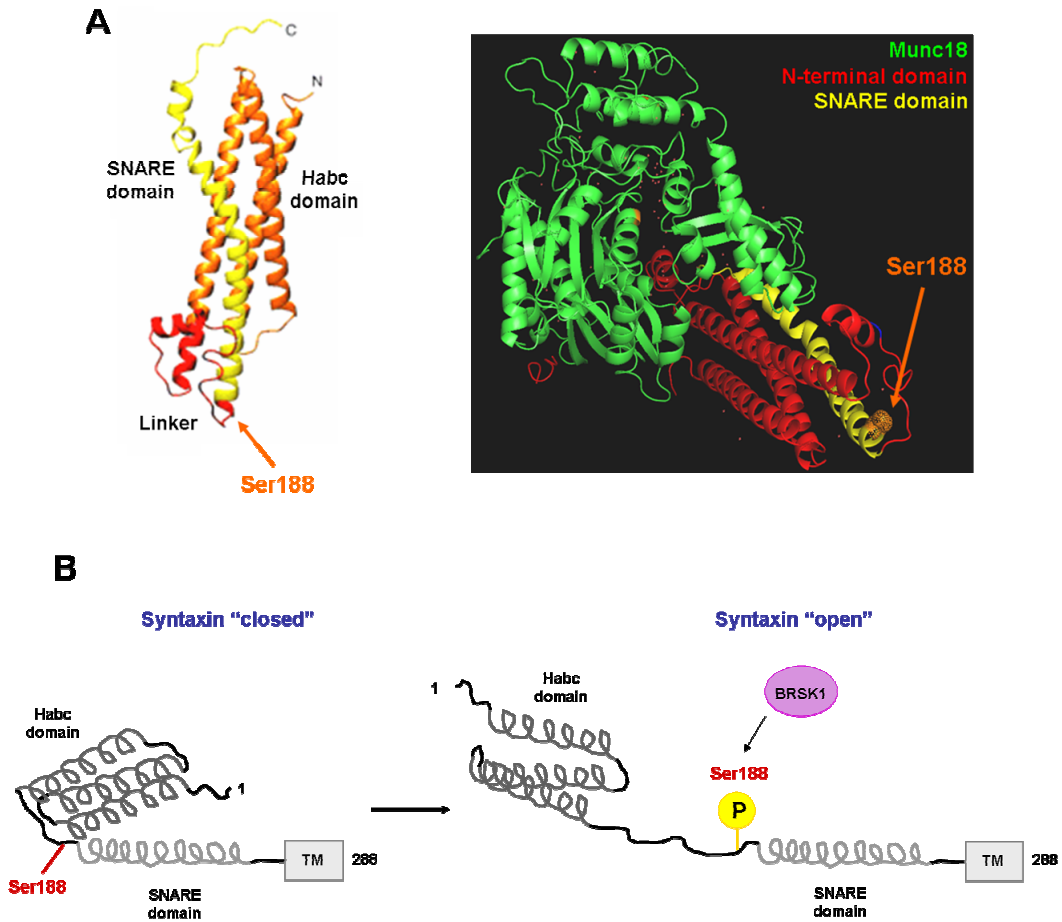


**Figura D.5 Switch de conformación cerrada y abierta de sintaxina-1A por interacción con Munc18.** (A) Modelo clásico de interacción de Munc18 con sintaxina-1A en conformación cerrada incompatible con la formación del complejo SNARE. Munc18, gris; Sintaxina, amarillo y naranja; SNAP25, azul y verde; Sinaptobrevina, rojo. Figura extraída de Rizo & Südhof, 2002. (B) Modelo actual de interacción de Munc18 con sintaxina en conformación cerrada y abierta, incompatible y compatible con el complejo SNARE respectivamente. En conformación abierta Munc18 puede interactuar con sintaxina cuando forma parte del complejo intermediario binario sintaxina/SNAP25, o del complejo trans-SNARE sintaxina/SNAP25/sinaptobrevina. Munc18, marrón; Sintaxina, rojo; SNAP25, amarillo y verde; Sinaptobrevina, azul. Figura adaptada de Südhof & Rothman, 2009.

El residuo Ser188 de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1 se localiza en la región de conexión entre el dominio regulatorio Habc en N-terminal y el motivo SNARE. De la estructura tridimensional de sintaxina asociada a Munc18 en conformación cerrada, se deduce que esta región *linker* forma un subdominio globular que contiene dos pequeñas hélices alfa unidas por



*loops* de estructura irregular (Misura et al, 2000). La primera hélice alfa representaría una extensión de la última hélice alfa (hélice C) del dominio Habc, seguida de un *loop* conector, otra pequeña hélice alfa y otro *loop* de conexión con el dominio SNARE; la Ser188 se localiza justo en el límite de este *loop* conector adyacente al motivo SNARE (**figura D.6A**). Los mapas de



**Figura D.6 Posición del residuo Ser188 de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1.** (A) Estructura tridimensional de sintaxina-1A en conformación cerrada. En la imagen de la izquierda se muestra el dominio regulatorio Habc en N-terminal (naranja), el dominio SNARE (amarillo) y el *loop* de conexión dominio Habc-dominio SNARE (rojo, *linker*). Se señala la posición en el *linker* de la Ser188. Figura adaptada de Rizo & Südhof, 2002. En la imagen de la derecha se muestra la estructura de sintaxina en conformación cerrada asociada a Munc18. Se muestra la región N-terminal de sintaxina que contiene el dominio Habc y el *loop* de conexión (rojo), el dominio SNARE (amarillo) y Munc18 (verde). En el *linker* se señala la posición de la Ser188 (naranja). Representación obtenida utilizando el software PyMOL (<http://www.pymol.org/ax>). (B) Modelo de accesibilidad del residuo Ser188 para su fosforilación por BRSK1 en la conformación cerrada y abierta de sintaxina-1A. Representación esquemática de ambas conformaciones en la que se señala la posición de la Ser188 (naranja) inaccesible a la fosforilación por BRSK1 en conformación cerrada, y accesible en la conformación abierta de sintaxina-1A.

superficie indican que la hélice alfa del *linker* Habc/dominio SNARE proporciona una gran carga negativa a esta región. El modelo estructural de la syntaxina en conformación abierta se basa en la reconstrucción de por un lado, los datos cristalográficos del dominio SNARE, y por otro el análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) del dominio Habc (Sutton et al, 1998; Fernández et al, 1998). Aunque no se dispone de la estructura en conformación abierta del *linker* Habc-dominio SNARE que contiene la Ser188, nuestros resultados muestran que la syntaxina desnaturalizada (conformación abierta) es mejor sustrato de BRSK1 (fosforilación de la Ser188). Ello indicaría que el drástico cambio conformacional entre ambas estructuras afectaría también al *linker* Habc-dominio SNARE, dejando la Ser188 más expuesta y accesible a la fosforilación por BRSK1 (**figura D.6B**). Un caso parecido le ocurre a la proteína ATP-asa del músculo esquelético miosina, que es fosforilada por la quinasa LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) solo cuando se encuentra en su conformación abierta y es capaz de unir el citoesqueleto de actina a la membrana plasmática (Jaleel et al, 2007).

El análisis comparativo entre diferentes organismos, muestra que la región adyacente al residuo Ser188 de syntaxina-1A fosforilado por BRSK1 se encuentra altamente conservado en todos los organismos mamíferos estudiados (humano, mono, vaca, rata, ratón y hurón), pero no en *Drosiphila* o *C. elegans*, en que la Ser188 es substituida por alanina (**figura D.7**). Ello sugiere que la posible función de la fosforilación de syntaxina-1A por BRSK1 en la regulación de la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica estaría restringida evolutivamente a mamíferos.

		*
<i>Homo sapiens</i>	166	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFASGIIMDSSISKQALSEIETRHS <sup>■</sup> EII
<i>Macaca mulata</i>	166	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFASGIIMDSSISKQALSEIETRHS <sup>■</sup> EII
<i>Bos taurus</i>	200	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFASGIIMDSSISKQALSEIETRHS <sup>■</sup> EII
<i>Rattus norvegicus</i>	166	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFASGIIMDSSISKQALSEIETRHS <sup>■</sup> EII
<i>Mus musculus</i>	166	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFASGIIMDSSISKQALSEIETRHS <sup>■</sup> EII
<i>Mustela putorius</i>	136	EDMLES <sup>■</sup> GNPAIFTS <sup>■</sup> -GIIDS <sup>■</sup> QISKQALSEI <sup>■</sup> GRHK <sup>■</sup> DIV
<i>Drosophila</i>	169	ER <sup>■</sup> MLE <sup>■</sup> EG <sup>■</sup> NS <sup>■</sup> SV <sup>■</sup> FTQ <sup>■</sup> GIIMET <sup>■</sup> QQA <sup>■</sup> KQTLADIEAR <sup>■</sup> HQ <sup>■</sup> DIM
<i>C. elegans</i>	167	EDMLES <sup>■</sup> GNPGV <sup>■</sup> FTQ <sup>■</sup> GIITDI <sup>■</sup> QQA <sup>■</sup> KQTLADIEAR <sup>■</sup> ND <sup>■</sup> DIM

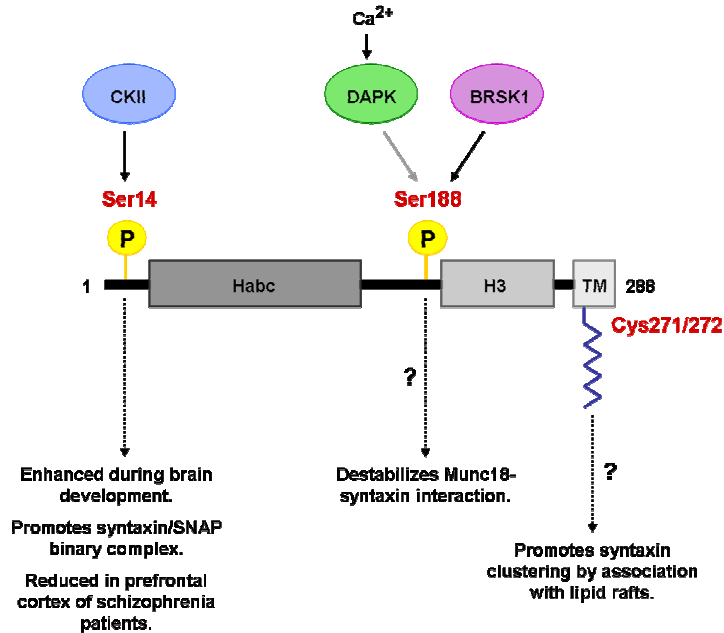
**Figura D.7 Alineamiento múltiple de las secuencias de syntaxina-1A de diferentes organismos que contienen la Ser188 fosforilada por BRSK1.** El residuo Ser188 de syntaxina-1A (señalado con asterisco) se encuentra conservado en mamíferos (humano, mono, vaca, rata, ratón y hurón), pero no en *Drosophila* o *C. elegans* (en que es substituido por Ala). La sombra negra indica residuos idénticos, y la gris conservados.

En 2003, Tian *et al* mostraron que el residuo Ser188 de syntaxina-1A es fosforilado *in vitro* por la quinasa DAPK (*death-associated protein kinase*). Estos autores proponen que DAPK interacciona *in vitro* con syntaxina-1A y la fosforila en la Ser188 de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup>

(Tian et al, 2003). Esta fosforilación inhibiría la unión de syntaxina con Munc18, al menos *in vitro*, regulando la estabilidad del complejo SNARE mediante un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  adicional a sinaptotagmina y complexina. Nuestros resultados muestran que, de forma análoga a como ocurre para DAPK, BRSK1 interacciona *in vitro* con syntaxina-1A, independientemente del estado de fosforilación de la Ser188 (ya que mutantes de syntaxina que mimetizan la fosforilación, S188E, o la inhiben, S188A, interaccionan con BRSK1 de igual modo que la syntaxina salvaje). Se necesitarán ensayos análogos de interacción con Munc18 (o otros componentes del complejo SNARE) para determinar si la fosforilación de la Ser188 por BRSK1 tiene el mismo efecto en la formación del complejo SNARE que el propuesto para la DAPK. Sin embargo, si así fuera, la fosforilación de syntaxina por BRSK1 no estaría regulada directamente por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Bright et al 2008), a diferencia de la llevada a cabo por la DAPK (**figura D.8**).

La caseína quinasa II (CKII) fosforila *in vivo* la Ser14 de syntaxina-1A. Esta fosforilación aumenta durante el desarrollo del cerebro de rata y está implicada en estabilizar la unión de syntaxina a SNAP25 en complejos binarios intermedios (Foletti et al, 2000). De acuerdo con las observaciones que muestran una disminución en los niveles de CKII en pacientes con esquizofrenia (Aksenova et al, 1991), Castillo *et al* han descrito que el córtex prefrontal de estos pacientes posee un déficit en la fosforilación de la Ser14 de syntaxina-1, que resulta en una reducción de syntaxina unida a SNAP25 y Munc18, y en una inhibición de la formación del complejo SNARE (Castillo et al, 2010). De interés, tanto la quinasa CKII (Yao et al, 2011) como BRSK1 son modificadas por SUMO2, de manera que la regulación por sumoilación de ambas quinasas podría coordinar la fosforilación de syntaxina-1 en dos residuos diferentes. Los resultados del análisis por espectrometría de masas del digerido triptico de syntaxina fosforilada por BRSK1 muestran que el péptido que contiene la Ser14 no se encuentra fosforilado, de manera que se descarta que BRSK1 fosforile este residuo. Sin embargo, es posible que la fosforilación de la Ser188 por BRSK1 afecte a la fosforilación de la Ser14 por CKII, o viceversa. Serán necesarios futuros estudios en este sentido para determinar si existe relación alguna entre ambas fosforilaciones (**figura D.8**).

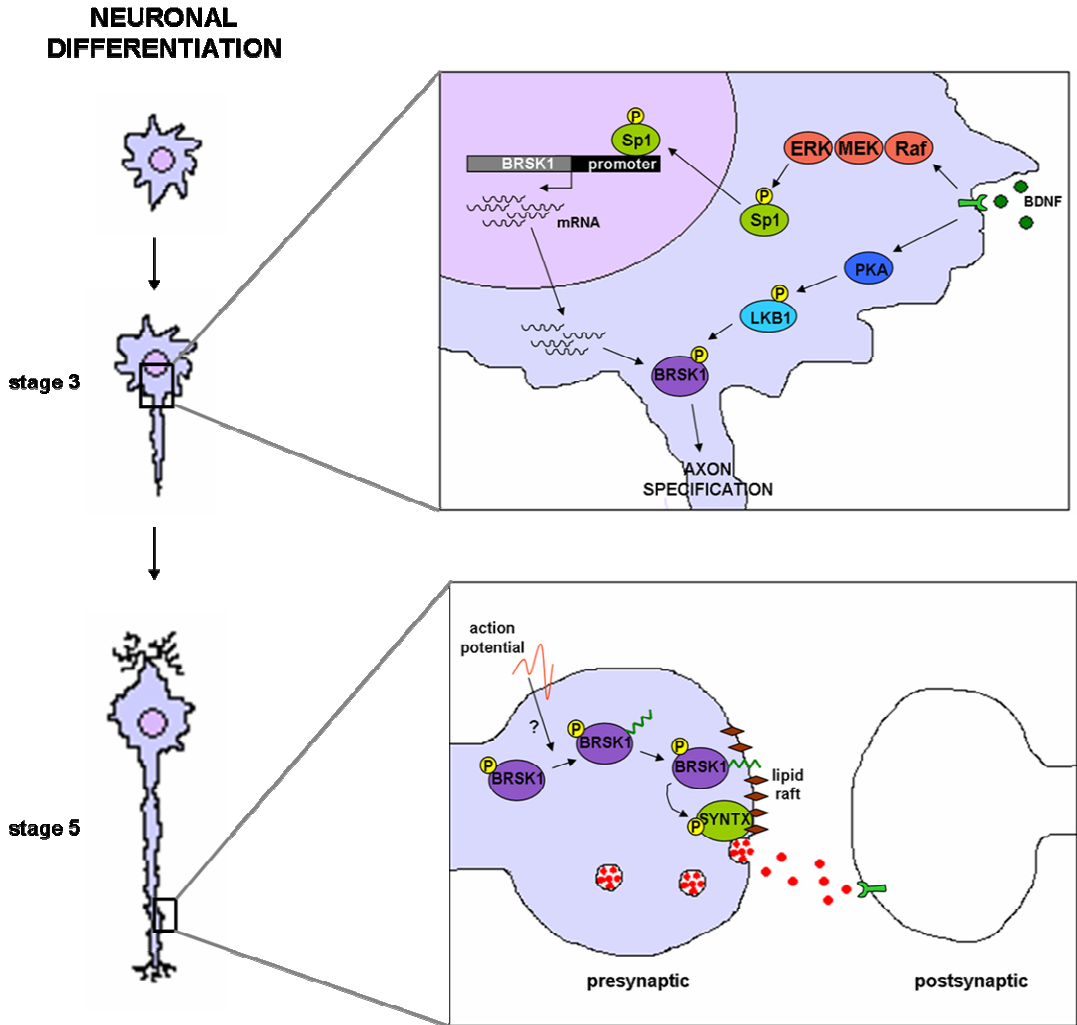
Por último, otra modificación postraduccional que afecta a syntaxina-1A (**figura D.8**), es la palmitoilación del extremo N-terminal de su dominio transmembrana. Aunque este dominio es suficiente para anclar a syntaxina en la membrana plasmática pre-sináptica, su palmitoilación la reclutaría hacia regiones discretas de la membrana ricas en colesterol (*lipid rafts*), formando *clusters* de syntaxinas asociadas entre ellas (Prescott et al, 2009). Mediante estudios inmunocitoquímicos y de fraccionamiento subcelular, mostramos que BRSK1 y syntaxina co-localizan en *lipid rafts* de sinaptosomas de rata y en regiones discretas de los terminales sinápticos de neuronas corticales siguiendo un patrón puntuado de distribución. Es posible que,



**Figura D.8 Modificaciones postraduccionales de sintaxina-1A.** Sintaxina-1A se fosforila en la Ser14 por CKII y en la Ser188 por DAPK y BRSK1. La flecha negra indica fosforilación *in vivo* detectada mediante un anticuerpo fosfo-específico, y la gris pendiente de validar. Sintaxina-1A se palmitoila en el dominio transmembrana, posiblemente en la Cys271 y Cys272. CKII, *casein kinase II*; DAPK, *death-associated protein kinase*; BRSK1, *brain-specific kinase 1*.

como hemos observado preliminarmente *in vitro*, BRSK1 interacciona con sintaxina en estas estructuras de la membrana, donde BRSK1 es activa y, por tanto, es factible que fosforile a sintaxina en la Ser188 (figura D.9). Además, nuestro modelo apunta a que la palmitoilación de BRSK1 localizaría esta quinasa en los dominios *raft*. Se ha postulado que en respuesta a la excitabilidad neuronal se da una palmitoilación generalizada de las proteínas sinápticas (Kang R. et al, 2008), de manera que la modificación coordinada de sintaxina y BRSK1 por palmitoil podría promover su co-localización en microdominios *lipid raft* de la membrana pre-sináptica.

La obtención por primera vez de un anticuerpo que reconoce específicamente la Ser188 fosforilada de sintaxina, permitirá estudiar en un futuro la relevancia de esta fosforilación *in vivo*, y la posible función fisiológica de BRSK1 en la regulación del complejo SNARE y la liberación de neurotransmisores. Por el momento, la caracterización del anticuerpo fosfo-específico generado, muestra que se trata de un anticuerpo potente, selectivo en el reconocimiento de la Ser188 fosforilada por BRSK1. Estudios preliminares en neuronas corticales en cultivo (observaciones de David Aguinaga en nuestro laboratorio), muestran un aumento significativo de la fosforilación de la Ser188 de sintaxina en respuesta a la despolarización inducida por KCl y forscolina. Aunque se necesitan experimentos adicionales y validar el papel de BRSK1 mediante siRNA, los



**Figura D.9 Modelo general propuesto de regulación y función de las BRSKs durante la diferenciación y sinapsis neuronales.** El estadio 3 de la diferenciación neuronal es una etapa crítica del proceso en la que se rompe la simetría celular, y una neurita crece rápidamente para formar el axón, mientras que las otras quedan retraídas y adquieren la identidad de dendritas. En este contexto, las neuronas están expuestas al factor de diferenciación neuronal BDNF, que a través de la activación de la vía de señalización de las MAP quinasas ERK1/2, conduce a la activación génica de las BRSKs, en un proceso en el que interviene el factor de transcripción Sp1. De manera paralela a la activación de ERK1/2, el BDNF provoca también un aumento en la concentración intracelular de cAMP, que conllevaría la fosforilación por PKA en la Ser431 de la quinasa activadora LKB1, y su acumulación en una neurita en concreto. En esta neurita, LKB1 activaría las BRSKs mediante la fosforilación de la treonina del T-loop, que mediante la fosforilación de sustratos efectores orquestarían la especificidad de la neurita a axón. En neuronas maduras (estadio 5 de diferenciación), BRSK1 localiza en la zona activa de los terminales pre-sinápticos regulando la liberación de neurotransmisores. En estas estructuras, BRSK1 se asocia a microdominios de membrana *lipid rafts*, donde resulta en una quinasa más activa. Es posible que su anclaje a *lipid rafts* esté regulado por palmitoilación, modificación post-traduccional que se induce en respuesta a la excitabilidad de la neurona. En *lipid rafts*, BRSK1 colocaliza con la proteína t-SNARE sintaxina-1A, a la que fosforila *in vitro* e *in vivo* en la Ser188. Esta fosforilación podría modular la función de sintaxina como componente del complejo SNARE en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica, y por tanto configurar el mecanismo molecular por el que BRSK1 media la liberación de neurotransmisores.

resultados son alentadores y podrían suponer el mecanismo molecular a través del cual BRSK1 regula la liberación de neurotransmisores.

El análisis inmunocitoquímico de células neuronales en cultivo describe por primera vez que BRSK1 se expresa también en astrocitos. Un nuevo concepto en la fisiología sináptica (sinapsis tripartita), postula que los astrocitos participan activamente en la actividad sináptica mediante la liberación de transmisores químicos (gliotransmisión), que a su vez controlan la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal (Perea & Araque, 2010). Los astrocitos expresan las proteínas SNARE de la maquinaria de fusión, entre ellas syntaxina-1 (Parpura & Zorec, 2010), de manera que BRSK1 también podría participar en la liberación de gliotransmisores y regular indirectamente la excitabilidad neuronal a través de la sinapsis tripartita.

La fosforilación anómala de proteínas está directamente asociada a diversos procesos patológicos, entre ellos disfunciones neurológicas y enfermedades neurodegenerativas. En muchos casos estas enfermedades están relacionadas con hiperfosforilación de proteínas (como tau en la enfermedad de Alzheimer, o  $\alpha$ -sucleína en la enfermedad de Parkinson o la demencia de Lewis). En otros casos se ha observado un déficit en la fosforilación de proteínas, como la disminución de los niveles de syntaxina-1A fosforilada en la Ser14 en pacientes de esquizofrenia (Sigurdsson E.M., 2009; Ferrer I., 2009; Castillo et al, 2010). Será interesante analizar el grado de fosforilación de syntaxina-1A en la Ser188 en pacientes con disfunciones neurológicas, y determinar si está involucrada en las alteraciones sinápticas observadas en estos pacientes. Por otro lado, en los últimos años, se han asociado ciertas enfermedades neurológicas a mutaciones en genes que codifican para proteínas quinasas. Entre otras, se han detectado mutaciones en la *leucin-rich repeat kinase 2* (LRRK2) asociadas a ciertas formas de Parkinson hereditario, en PINK1 en formas tempranas de Parkinson, en p90rsk en el Síndrome de Coffin-Lowry, y en ATM en la ataxia telangiectasia (Chico et al, 2009). Por tanto, será interesante estudiar también los niveles de expresión, actividad y localización de BRSK1 en pacientes con alteraciones neuronales. En algunas de estas enfermedades (como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntington), las membranas neuronales sufren cambios en el contenido de colesterol que afectan a la estructuración de los microdominios *lipid rafts* (Schengrund C.L., 2010; Stefani & Liguri, 2009). Es posible que, como pasa para otras proteínas, cambios en la composición lipídica de *lipid rafts* afectan a la localización de BRSK1, y por tanto a su actividad. Si la función sináptica de BRSK1 está mediada por la fosforilación de syntaxina en *lipid rafts*, estos cambios podrían comprometer la actividad sináptica, e igual contribuir a la degeneración neuronal observada en estas enfermedades.



# **CONCLUSIONES**



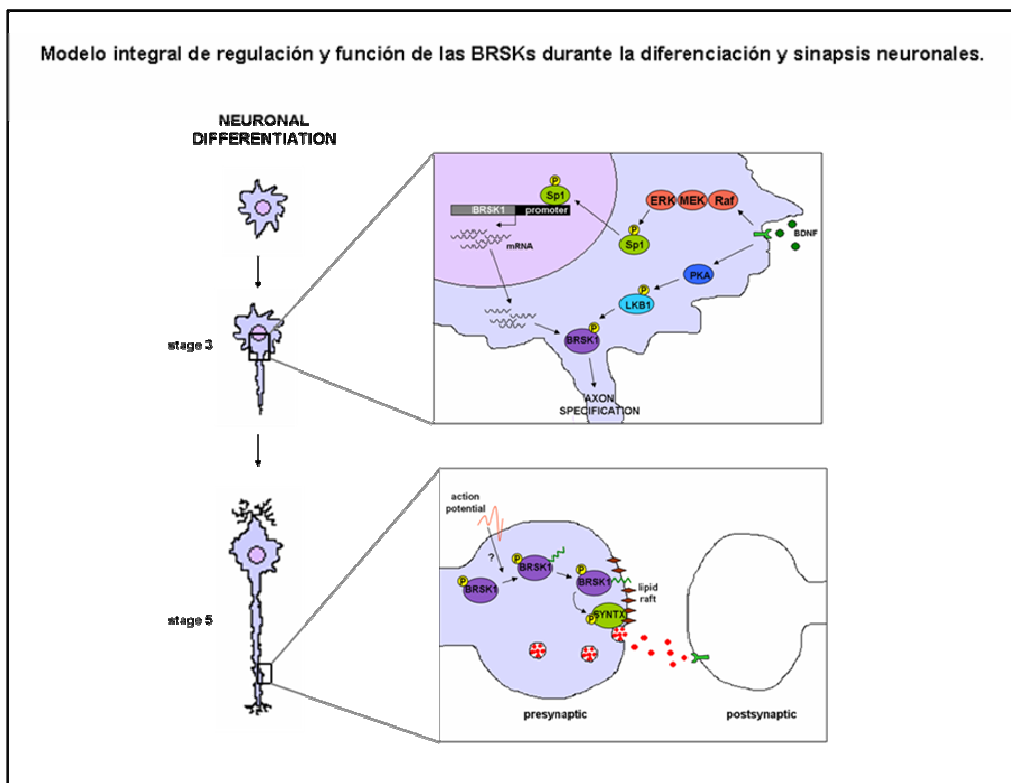


## CONCLUSIONES

1. Se han obtenido grandes cantidades de BRSK1 y BRSK2 puras y activas, lo que ha permitido poner a punto un método radiométrico de determinación de su actividad quinasa, así como la determinación de las constantes cinéticas para el ATP y diferentes péptidos sustrato. Se recomienda el uso del péptido CHKtide como sustrato para la determinación de la actividad BRSK.
2. Mediante ensayos de inmunoblot y actividad se ha determinado que las BRSKs se expresan específicamente en cerebro, donde son activas. Si bien se expresan en todas las regiones del cerebro, lo hacen en mayor grado en hipocampo y córtex (regiones con mayor actividad BRSK).
3. El desarrollo ontogénico del cerebro de rata y la diferenciación de neuronas corticales en cultivo transcurre con un aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2, pero no su activador LKB1. Idénticos resultados se observan en el modelo de diferenciación de células PC12 inducido por la neurotrofina NGF.
4. Mediante ensayos *gene reporter* del promotor de BRSK1, inmunoblot, sobre-expresión de proteínas y uso de inhibidores específicos, demostramos que el incremento de la expresión de las BRSKs en células PC12 y neuronas corticales en cultivo está mediado por la vía de señalización ERK1/2. Mediante ensayos análogos, demostramos que el factor de transcripción Sp1 es necesario pero no suficiente en la inducción de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal.
5. En neuronas corticales maduras, BRSK1 localiza homogéneamente en el soma y de manera puntuada en las prolongaciones neuríticas, similar al marcador de vesículas sinápticas sinaptofisina y al marcador axonal tau-1. BRSK2 presenta un patrón más homogéneo de distribución, similar al marcador MAP2 en las dendritas y tau-1 en los axones. BRSK1 y BRSK2 se expresan en astrocitos, donde se distribuyen de manera continua por el soma y las prolongaciones co-localizando con el marcador glial GFAP. Es la primera vez que se muestra que las BRSKs se expresan en células gliales.
6. Un pool de BRSK1 localiza en microdominios de membrana *lipid raft* de sinaptosomas de rata de manera dependiente de colesterol, lo que resulta en una quinasa más activa. La actividad quinasa de BRSK1 o de un mutante constitutivamente activo (T189E), pero no de BRSK2 o MARK4, aumenta 3 veces en presencia de vesículas lipídicas reconstituidas

con lípidos extraídos de la fracción *raft* de sinaptomas. Se propone que la localización de BRSK1 en *lipid rafts* de sinaptomas constituye un nuevo mecanismo de regulación de la actividad quinasa, adicional a la fosforilación del T-loop por LKB1.

7. BRSK1 fosforila *in vitro* e *in vivo* la proteína t-SNARE sintaxina-1A en el residuo Ser188, con una estequiometría de 1 mol de fosfato por mol de proteína. Se ha generado y caracterizado un anticuerpo fosfo-específico que reconoce selectivamente a sintaxina fosforilada en la Ser188 por BRSK1. Su utilización permitirá estudiar la relevancia fisiológica de la fosforilación de sintaxina en la formación del complejo SNARE, y su función en la fusión de vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica y liberación de neurotransmisores.
8. BRSK1 y sintaxina-1A co-localizan en microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptomas, y en puntos discretos de las prolongaciones sinápticas de neuronas corticales maduras. Es posible que BRSK1 y sintaxina 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 Ser188 no influye en su interacción con BRSK1.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## M.1 CULTIVOS CELULARES.

### M.1.1 LÍNEAS CELULARES.

#### Almacenamiento y mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas fueron obtenidas del banco celular *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Para preservar la integridad celular, los viales son conservados en nitrógeno líquido, por lo que en un primer momento se procedió a descongelar el vial, expandirlo y congelar de nuevo para obtener *stocks* celulares originales. La congelación de células para su preservación en nitrógeno líquido requiere la utilización de dimetilsulfóxido (DMSO), agente crioprotector que evita la formación de cristales de hielo. Así, las células expandidas fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo suplementado con 10% de DMSO. Se introdujeron en un criotubo y se almacenaron un mínimo de 24h a -80°C dentro de un contenedor CryoFreezing (Nalgene). Este contenedor, que envuelve a los viales de isopropanol, permite una congelación paulatina de las células. Una vez congeladas, los viales se sacan del contenedor y se guardan en un tanque de nitrógeno líquido, en el que se preservan durante varios años.

Tras obtener *stocks* originales de las células, se descongela un vial y (antes de establecer un banco de trabajo) se descarta que esté contaminado por hongos o bacterias. Tras comprobarlo, las células ya se pueden expandir y cultivarse en los soportes indicados según el experimento programado. Todas las células utilizadas en este estudio se mantuvieron en crecimiento en medio completo en un incubador en atmósfera húmeda, con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuando el cultivo alcanza el 90% de confluencia, se aspira el medio, se lavan las células con tampón PBS (*phosphate buffered saline*), se tripsinizan, se resuspenden en medio completo atemperado y se siembran a la densidad deseada mediante el recuento en una cámara de Neubauer. Tras unos pases de cultivo limitados, las células son desechadas para evitar que se alteren las características originales de la línea celular.

#### Líneas celulares utilizadas.

En el transcurso de esta tesis se han utilizado 3 líneas celulares inmortalizadas:

1. Células HeLa: derivadas de carcinoma epitelial de cerviz humano. Es el linaje celular humano más antiguo (obtenido de una muestra de la paciente Henrietta Lacks en 1951), con una carga cromosómica normal de 82. Poseen la particularidad de carecer de la quinasa supresora de tumores LKB1, aunque si expresan STRAD y MO25 (Tainen et al,

1999). Se han utilizado en este trabajo para reintroducir LKB1 y estudiar su efecto sobre la activación de las BRSKs.

2. Células HEK-293: procedentes de células de riñón embrionarias humanas (*human embryonic kidney cells experiment num. 293*). Por su fácil manipulación y elevado rendimiento de transfección, se han utilizado como sistema para expresar y purificar proteínas recombinantes.
3. Células PC12: derivadas de feocromocitoma de rata (tumor de células cromafinas de la médula adrenal). Desde la descripción de esta línea tumoral a mediados de los años 70 (Greene & Tischler, 1976) se conoce que la exposición prolongada de células PC12 a la acción de neurotrofinas conduce a la adquisición de un fenotipo neuronal. Se ha usado como modelo celular para el estudio de las BRSKs durante la diferenciación neuronal.

### **Material de cultivos.**

#### Medios de cultivo.

Según la línea celular:

1. Células HeLa y HEK-293: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma D5795), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).
2. Células PC12: DMEM (Sigma D5796), 7% FBS, 7% Fetal Horse Serum (FHS), 2.8 mM HEPES, 0.2% penicilina/estreptomicina (Gibco).

#### Material adicional.

- PBS (Sigma).
- Tripsina-EDTA (Gibco): 0.05% tripsina, 0.53 mM EDTA.
- Colágeno tipo I (BD Biosciences 354236): utilizado únicamente para adherir las células PC12 a la superficie de cultivo. Dos horas antes de sembrar las células se cubre la superficie con colágeno diluido 1/50 en agua estéril; justo antes de sembrar, se lava un par de veces con PBS para eliminar el exceso de colágeno.

### **Tratamiento de las células.**

#### Diferenciación de células PC12 con NGF.

Para inducir la diferenciación neuronal de células PC12, se trataron las células con 150 ng/ml de NGF (Sigma) al día siguiente de la siembra y de forma reiterada cada dos días de cultivo *in*

*in vitro* (cada vez que se administró NGF se reemplazó la mitad del medio de cultivo por medio nuevo atemperado). En el caso de células que fueron transfectadas previamente, el tratamiento se inicia al día siguiente de la transfección. Las células fueron lisadas y procesadas a diferentes días del proceso de diferenciación según el experimento. Las fotografías de contraste de fase corresponden a momentos antes de la lisis y fueron obtenidas con el microscopio Nikon Eclipse TE2000-E.

De forma puntual se comparó el efecto del tratamiento con NGF con el del factor de crecimiento EGF. Para ello, se trataron células PC12 con 50 ng/ml de EGF (Sigma) al día siguiente de la siembra y de forma reiterada cada dos días de cultivo *in vitro* durante 5 días.

#### Tratamiento de células PC12 con inhibidores específicos.

Para diseccionar las vías de señalización implicadas en la diferenciación de células PC12 inducida con NGF, se usaron los siguientes inhibidores:

- PD98059 (50  $\mu$ M): inhibidor específico de MEK1. Pre-tratamiento durante 45 minutos antes de estimular las células con 100 ng/ml de NGF. Reiterado cada dos días de cultivo *in vitro*.
- U0126 (10  $\mu$ M): inhibidor específico de MEK1. Pre-tratamiento durante 45 minutos antes de estimular las células con 100 ng/ml de NGF. Reiterado cada dos días de cultivo *in vitro*.
- Mitramicina A (40 nM): inhibidor específico del factor de transcripción Sp1. Pre-tratamiento durante 45 minutos antes de estimular las células con 100 ng/ml de NGF. Reiterado cada dos días de cultivo *in vitro*.

#### Tratamiento de extractos celulares con fosfatasa alcalina.

20  $\mu$ g de proteína de extractos celulares fueron tratados con 5 unidades de fosfatasa alcalina (Invitrogen) durante 45 minutos a 37°C en agitación suave para inducir la desfosforilación de proteínas. El efecto del tratamiento se analizó mediante inmunoblot, usando como control un extracto celular no tratado.

#### **Lisis y cálculo de la concentración de proteína.**

Para recoger los extractos celulares se sembraron placas de diferente diámetro según el experimento y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se realizaron 2



lavados con PBS, se añadió el tampón de lisis frío y se recogieron los extractos celulares con un *scraper* (Sarstedt). El lisado se centrifugó a 12.000 g 12 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante (fracción soluble) y descartando el *pellet* (fracción membranosa, nuclear y restos celulares). La concentración de proteína de los extractos se cuantificó por el método Bradford (Bradford M.M., 1976) mediante el *kit* Coomassie (Bradford) Protein Assay (Thermo Scientific, Pierce).

Tampón	Composición
Tampón de lisis	50 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.27M sacarosa; 1 mM ortovanadato sódico pH 10; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM glicerofosfato sódico; 50 mM NaF; 5mM pirofosfato sódico; 1% Triton X-100. Justo antes de usar añadir: 0,1% β-mercaptoetanol y <i>Cocktail</i> inhibidor de proteasas (SIGMA)

**Tabla M.1** Composición del tampón de lisis celular.

### M.1.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES.

Todos los cultivos primarios de neuronas corticales usados en este trabajo fueron realizados por Cristina Gutiérrez del Servei de Cultius Cel·lulars de l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Los cultivos fueron preparados a partir del córtex cerebral de embriones de rata Sprague-Dawley a 17 días de gestación. El córtex diseccionado se desasoció enzimáticamente y se diluyó en medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% de FBS y penicilina/estreptomicina. Las células fueron sembradas a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos pre-incubados con poli-D-lisina, y cultivadas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Dos horas después de la siembra, el medio fue remplazado por medio Neurobasal libre de suero (Invitrogen) suplementado con 2% de B27 (Gibco), 2 mM L-glutamina (Invitrogen), penicilina/estreptomicina y 0.6% (w/v) de glucosa. Cada 3 días la mitad del medio fue remplazado por medio fresco atemperado. Los experimentos fueron realizados a los días de cultivo *in vitro* (DIV) indicados.

Los animales fueron proporcionados por el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), y el procedimiento experimental se siguió según las directrices aprobadas por el Comité Ético de la UAB, en conformidad con el decreto de la Generalitat de Catalunya (Decreto 214/1997, DOG 2450).

### Tratamiento de los cultivos primarios.

En dos ocasiones, los cultivos primarios de neuronas corticales fueron tratados antes de ser analizados:

- Triton X-100 (0.1%): detergente no iónico utilizado para estudiar la resistencia de la unión de las BRSKs a estructuras celulares. Tras aspirar el medio de cultivo, neuronas corticales a 10 DIV fueron tratadas brevemente (90 segundos) con 0.1% Triton X-100 diluido en PBS en agitación suave, antes de ser fijadas con paraformadehído para su análisis inmunocitoquímico.
- BDNF (50 ng/ml): factor neurotrófico de diferenciación utilizado para estudiar la regulación de la expresión de las BRSKs. Neuronas corticales a 1 DIV fueron tratadas con 50 ng/ml de BDNF durante 24 o 48h antes de ser analizadas. En el caso de células previamente transfectadas, el tratamiento se realizó al día siguiente de la transfección (3 DIV).

## M.2 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

### M.2.1 PREPARACIÓN DE SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA.

Los sinaptosomas fueron aislados del cerebro de ratas Sprague-Dawley de entre 4 a 6 semanas de edad siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Gil et al, 2006). El cerebro de los animales (sacrificados por decapitación y sin anestesia) fue homogenizado en 40 volúmenes (w/v) de tampón de homogenización usando un homogenizador de vidrio Teflón (Braun), 12 *strokes* a 900 rpm. Tras una centrifugación a 1000g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el *pellet* (mayoritariamente núcleos y células sin romper), y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 12.000g durante 20 minutos a 4°C. El *pellet* (fracción enriquecida de sinaptosomas) fue resuspendido en 10 ml de tampón Sodio. Los sinaptosomas son estructuras artificiales formadas por la membrana pre-sináptica del terminal sináptico que se circulariza formando una vesícula (que se mantiene unida externamente a la membrana post-sináptica). Así se obtiene una estructura similar a la de la sinapsis nerviosa, además de encontrar también restos de mielina y mitocondrias.

Tampón	Composición
Tampón de homogenización	PBS suplementado con 0.32 M de sacarosa
Tampón Sodio	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1.2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 mM HEPES pH7.4; 10 mM glucosa

Tabla M.2 Composición de los tampones usados en la preparación de sinaptosomas de cerebro de rata.

### M.2.2 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA.

A partir de los sinaptosomas obtenidos como se indica en el apartado anterior, se separó el citosol de la membrana mediante una centrifugación a 200.000g durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante (fracción citosólica) se reservó a -20°C, y el *pellet* (fracción de membrana) se lavó resuspendiéndolo en tampón A. Tras una centrifugación a 200.000g durante 60 minutos a 4°C, el *pellet* (membranas) fue homogenizado en tampón A con 1% Triton X-100, incubado en rotación durante 45 minutos a 4°C y centrifugado a 200.000g durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (proteínas de membrana solubilizadas con Triton) fue reservado, y el *pellet* final resuspendido en tampón A con 1% SDS (proteínas de membrana resistentes a la solubilización con Triton).

Tampón	Composición
Tampón A	10 mM HEPES pH7.9; 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM KCl; <i>Cocktail</i> inhibidor de proteasas (SIGMA)

Tabla M.3 Composición del tampón A utilizado para obtener la fracción citosólica y de membranas (solubles y resistentes a Triton X-100) de sinaptosomas de cerebro de rata.

### M.2.3 AISLAMIENTO DE *LIPID RAFTS* DE MEMBRANAS DE SINAPTOSOMAS DE RATA.

Los dominios de membrana ricos en colesterol (*lipid rafts*) de sinaptosomas de cerebro de rata fueron aislados siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Gil et al, 2005). Sinaptosomas frescos fueron resuspendidos e incubados en rotación con tampón Sodio con 1% Triton X-100 (30 minutos a 4°C) o 1% Brij 98 (20 minutos a 37°C). Tras su solubilización, 1.5 ml de la muestra (aproximadamente 2 mg/ml de proteína) fueron ajustados a un 45% (w/v) de sacarosa mezclando en proporción 1:1 con una solución de tampón Sodio enriquecida con 90% (w/v) de sacarosa. La muestra se depositó en el fondo de un tubo de centrifuga *Ultra Clear* (Beckman), y se preparó un gradiente de sacarosa depositando encima 6 ml de tampón Sodio al 35% (w/v) de sacarosa y encima 3 ml de tampón Sodio al 16% (w/v) de sacarosa. Tras una centrifugación a 36.000 rpm durante 18h a 4°C en un rotor SW 41Ti (Beckman), se recolectaron 10 fracciones de 1 ml desde la parte superior del tubo. Las regiones de membrana no solubles al detergente (*lipid rafts*) se retienen en la fase de menor densidad del gradiente de sacarosa, por lo que son aisladas en las primeras fracciones recolectadas.

El tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrano (m $\beta$ CD) se realizó con sinaptosomas puros antes de su solubilización con Brij 98. Así, los sinaptosomas fueron resuspendidos en tampón Sodio con 50 mM de m $\beta$ CD (Sigma), e incubados a 37°C durante 30 minutos en agitación. Tras una centrifugación a 3000g durante 5 minutos, el *pellet* resultante fue resuspendido en tampón Sodio con 1% de Brij 98 y fraccionado en gradiente de sacarosa como se describe anteriormente.

### M.3 INMUNOCITOQUÍMICA.

Para los estudios de inmunocitoquímica, las neuronas corticales de rata de embriones E17 fueron sembradas en placas de 24 pocillos encima de cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina a 37°C. A los días indicados de cultivo *in vitro*, se aspiró el medio, se lavaron las células con PBS y se fijaron con 4% de paraformadehído en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación suave, las células se permeabilizaron con solución 1 durante 7 minutos y, tras un lavado de 5 minutos con PBS, se incubaron con solución 2 durante 15 minutos. Las células se bloquearon con solución 2 suplementado con 5% (w/v) de BSA (solución 3) durante 1 hora, y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución 4 durante 14 horas a 4°C. Una lista con la concentración y los anticuerpos utilizados para análisis inmunocitoquímicos se adjunta en el Anexo III de esta memoria. Tras 4 lavados de 5 minutos con PBS, las células se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario diluido 1/400 en

solución 4 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes (Invitrogen): Alexa fluor 594 donkey anti-sheep IgG, Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep IgG, Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG y Alexa fluor 555 donkey anti-rabbit IgG. Desde el momento de la incubación con el anticuerpo secundario y hasta el análisis final de la muestra, las células se preservaron de la luz para evitar la excitación de los fluorocromos. Tras lavar las células 4 veces con PBS, se incubaron con 5 ng/ml de Hoescht 33259 (Invitrogen) disuelto en agua durante 5 minutos para marcar los núcleos celulares. Tras eliminar el exceso de Hoescht con 4 lavados de PBS, se montaron las preparaciones con medio de montaje Fluorosave™ (Calbiochem), y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse 90i.

Solución	Composición
Solución 1	0.02% saponina en PBS
Solución 2	0.01% saponina; 10 mM glicina en PBS
Solución 3	0.01% saponina; 10 mM glicina; 5% BSA en PBS
Solución 4	0.01% saponina; 1% BSA en PBS

**Tabla M.4 Composición de las soluciones utilizadas para análisis inmunocitoquímicos.**

## M.4 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

### M.4.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA.

Para resolver las proteínas procedentes de lisados celulares se utilizó la electroforesis desnaturante en gel de SDS-poliacrilamida, utilizando el sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Las muestras lisadas con tampón de lisis (página 172) se diluyeron en tampón de muestra, se calentaron 5 minutos a 100°C y se separaron por electroforesis en geles de diferente porcentaje de acrilamida según el peso molecular de las proteínas a resolver. Si no se indica lo contrario, en

cada carril se cargaron 25 µg de proteína. Se aplicó un voltaje constante de 185 V durante 1 hora.

**M.4.2 ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS: WESTERN BLOT o INMUNOBLOT.**

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schurell) según los métodos descritos por Renart y Towbin en 1979 (Renart et al, 1979; Towbin et al, 1979). Para ello se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electroforesis Transfer Cell (Bio-Rad), aplicando un voltaje constante de 100 V durante 100 minutos. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con tampón de bloqueo durante una hora en agitación, y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante 14 horas en agitación. En el Anexo III se muestra una tabla con los anticuerpos utilizados y la concentración a la que fueron usados. Tras 3 lavados de 5 minutos con TBS-T, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa diluido 1/6000 en tampón de bloqueo. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes (Pierce): rabbit anti-sheep (# 31480), goat anti-mouse (# 31430) y goat anti-rabbit (# 31460). Tras 5 lavados de 5 minutos con TBS-T, las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia (ECL™ Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) utilizando películas fotográficas (Medical X-Ray Film, Agfa).

<b>Tampón</b>	<b>Composición</b>
<b>Tampón de muestra</b>	25 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 10% glicerol; 10 M DTT; 0.002% (w/v) azul de bromofenol
<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% SDS
<b>Tampón de transferencia</b>	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% Metanol
<b>TBS-T (TBS-Tween)</b>	20 mM Tris; 150 mM NaCl pH 7.6; 0.2 % Tween
<b>Tampón de bloqueo</b>	5% leche desnatada (Sveltesse) en TBS-T

**Tabla M.5 Composición de los tampones utilizados en el inmunoblot.**

## M.5 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

### M.5.1 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP).

Para cada muestra, de 0.5 a 2  $\mu\text{g}$  de anticuerpo contra la proteína a precipitar fue unido a 5  $\mu\text{l}$  de Proteína G-*Sepharose* (GE Healthcare) previamente pre-equilibrada en tampón de lisis (página 172). Tras 45 minutos de incubación a 4°C en agitación (1000 rpm), se realizaron dos lavados de la resina con tampón de lisis, y se incubó con el lisado celular durante 90 minutos a 4°C en agitación. Se realizaron dos lavados con tampón de lisis suplementado con 0.5 M NaCl y un lavado con tampón Quinasa (50 mM Tris pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 0.1 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol). El precipitado final se usó para llevar a cabo un análisis electroforético de la proteína inmunoprecipitada o un ensayo de actividad quinasa. En el primer caso, el *pellet* final se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra (página 177) y, tras calentar durante 5 minutos a 100°C, las proteínas inmunoprecipitadas fueron resueltas mediante electroforesis y analizadas mediante inmunoblot. Una lista con los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar proteínas se adjunta en el Anexo III de esta memoria. En paralelo a la inmunoprecipitación de las muestras, se realizó un control negativo utilizando Proteína G-*Sepharose* libre de anticuerpo para descartar detecciones de proteínas que pudieran unirse a la resina de manera inespecífica.

### M.5.2 ENSAYOS DE *PULL-DOWN*.

#### *Pull down* de proteínas de extractos celulares.

Para purificar proteínas recombinantes de extractos celulares se aprovechó la fusión de la proteína de interés a la proteína GST. Para ello, discos de 10 cm de células HEK-293 o células HeLa fueron transfectados (5  $\mu\text{g}$  de DNA) con el vector codificante para la proteína correspondiente fusionada a GST, incubadas durante 36 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, y lisadas con tampón de lisis. Se incubaron 100  $\mu\text{g}$  de extracto celular con 5  $\mu\text{l}$  de resina Glutación-*Sepharose* (GE Healthcare), que une específicamente GST, y se procedió, de igual manera que en la inmunoprecipitación, a la incubación, lavados de la resina y análisis de la muestra purificada (ya sea mediante inmunoblot o para ensayo de actividad).

#### *Pull down in vitro* de proteínas purificadas.

Para estudiar la interacción *in vitro* de sintaxina con BRSK1, se utilizó sintaxina fusionada a GST. 2  $\mu\text{g}$  de GST-sintaxina o GST sola, purificadas de células *E. coli*, fueron diluidas en tampón Tris 50 mM pH 7.5 e inmovilizadas en una resina de Glutación-*Sepharose* mediante su

incubación durante 90 minutos a 4°C en agitación (1000 rpm). Tras dos lavados con tampón Tris 50 mM pH 7.5 con 0.15 M NaCl y 0.5% (v/v) Triton X-100, el *pellet* se resuspendió en 35 µl del tampón anterior, se añadieron 2 µg de BRSK1 purificada de células de insecto, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación (1000 rpm). Tras centrifugar brevemente (20 segundos, 1000 rpm), se reservó el sobrenadante, y el *pellet* con la resina se lavó 3 veces con el tampón anterior. Tanto el *pellet* final como el sobrenadante se mezclaron con 35 µl de tampón de muestra (página 177) y se analizaron mediante electroforesis. La detección de las proteínas resueltas en el gel se realizó mediante tinción Coomassie (0.1% (w/v) Brilliant Blue; 40% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético) durante 20 minutos en agitación.

### Ensayo de sumoilación en células.

Para analizar la sumoilación de las BRSKs, se utilizaron formas de SUMO2 fusionadas a una cola de 6 histidinas. Discos de 10 cm de células HEK-293 fueron co-transfectadas con los vectores codificantes para las BRSKs y His-SUMO2, e incubadas durante 36 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Se aspiró el medio de cultivo y se recogieron las células en PBS suplementado con 10 mM de N-etilmaleimida (NEM). La modificación por SUMO es altamente reversible, de manera que para preservar la modificación se requiere la presencia de inhibidores de las peptidasas de SUMO (SENPs), como el NEM. Tras un lavado con PBS 10 mM NEM, una alícuota fue apartada, centrifugada, lisada con tampón de Lisis con 0.5% SDS y sonicada brevemente antes de ser analizada mediante inmunoblot. El resto de células fueron resuspendidas rápidamente en 5 ml de tampón B1 (la muestra puede almacenarse a -80°C en este punto). Tras comprobar los niveles de transfección mediante inmunoblot, se realizó una purificación de His-SUMO2 utilizando una resina de Ni<sup>2+</sup>-agarosa. Para ello, se añadió 10 mM imidazol y 10 mM β-mercaptoetanol a la muestra, se sonicó brevemente para reducir la viscosidad y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se incubó con 25 µl de resina Ni<sup>2+</sup>-agarosa pre-equilibrada con tampón B1 durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Tras una centrifugación (2 minutos a 2000 rpm), el *pellet* con la resina fue resuspendido en 1 ml de tampón B1 con 10 mM β-mercaptoetanol y traspasado a un eppendorf, donde fue lavado sucesivamente con 1 ml de las siguientes soluciones:

2 veces en tampón B1 10 mM β-mercaptoetanol

3 veces en tampón B2 10 mM β-mercaptoetanol

2 veces en tampón B3 10 mM β-mercaptoetanol

1 vez en tampón B3

1 vez en tampón B3 0.5 M NaCl, 0.2% Triton X-100



1 vez en tampón B3 0.5 M NaCl

1 vez en tampón B3 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X-100

3 veces en tampón B3

El *pellet* final fue eluido con 50  $\mu$ l de tampón de elución durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación (1000 rpm), y las proteínas purificadas modificadas por SUMO2 fueron analizadas mediante inmunoblot.

Tampón	Composición
Tampón B1	6 M Guanidinio; 0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0.01 M Tris pH 8
Tampón B2 (fresco)	8 M Urea; 0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0.01 M Tris pH 8
Tampón B3 (fresco)	8 M Urea; 0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0.01 M Tris pH 6.3
Tampón de elución	250 mM imidazol; 30% (v/v) tampón de muestra 5X

Tabla M.6 Composición de los tampones utilizados en el *pull down* de His-SUMO2.

### M.5.3 OBTENCIÓN DE PREPARACIONES PURAS DE PROTEÍNA.

#### Purificación de BRSK1 y BRSK2 en células de insecto Sf9.

Para obtener grandes cantidades de BRSK1 y BRSK2 pura y activa se generaron partículas víricas recombinantes que se usaron para infectar células de insecto, a partir de las cuales se purificaron las quinasas. Para ello, se generaron baculovirus recombinantes usando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) a partir del vector pFastBAC codificante para His-BRSK1 y His-BRSK2 (donación del Professor Dario Alessi, MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK). Un cultivo de 500 ml de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/ml fue infectado a una MOI (*multiplicity of infection*) de 5 con el baculovirus correspondiente. Tras 72 horas, se centrifugó el cultivo (4000 rpm durante 10 minutos) y el *pellet* resultante con las células se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (página 172) y se congeló en nitrógeno líquido. Para asegurar que las células están bien disgregadas, se homogenizaron con un homogenizador de vidrio (20 strokes), antes de ser centrifugadas otra vez a 8000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante se purificaron las proteínas mediante una

resina de Ni<sup>2+</sup>-agarosa. La obtención de las partículas víricas y la infección de células Sf9 fue realizada por el Dr. Ricardo Biondi (Research Group PhosphoSites, Johann Wolfgang Goethe University Hospital, Frankfurt, Deutschland).

Para la purificación, se añadió NaCl al lisado a una concentración final de 0.5 M y se incubó con 5 ml de resina Ni<sup>2+</sup>-agarosa durante 2 horas a 4°C en agitación. Tras lavar la resina 4 veces con tampón Tris 50 mM pH 7.4 con 0.5 M NaCl, se empaquetó en una columna y se lavó 14 horas con tampón Tris 50 mM pH 7.4 con 0.5 M NaCl y 10 mM imidazol. La proteína se eluyó con 12 ml de tampón Tris 50 mM pH 7.4 con 0.27 M sacarosa y 200 mM imidazol, y se recogieron fracciones de 1 ml, de las cuales se determinó la concentración de proteína. Aquellas fracciones en las que se detectó una concentración de proteína mayor a 2 mg/ml, se reservaron y se juntaron en un solo vial. La homogeneidad y concentración de las BRSKs purificadas se analizó mediante electroforesis y tinción Coomassie. Finalmente, se comprobó la actividad quinasa de las BRSKs purificadas mediante ensayo de auto-fosforilación y se calculó su actividad mediante método radiométrico utilizando <sup>32</sup>P-ATP y el péptido sustrato CHKtide.

#### **Purificación de proteínas en células *E. coli*.**

Células *E. coli* de la cepa BL21 fueron transformadas con los vectores pGEX codificantes para las proteínas de interés y sembradas en placa de medio Luria Broth (LB) agar en presencia de 50 µg/ml de ampicilina (Sigma). Se picó una colonia, y tras crecerla en un minicultivo de 3 ml de medio LB-Ampicilina, se traspasó a 500 ml de medio LB-Ampicilina que creció a 37°C en agitación (200 rpm/min) hasta que alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0.6-0.8 UDO (unidades de densidad óptica). Entonces, se indujo la expresión de proteína añadiendo IPTG (isopropil-β-D-galactósido) a una concentración final de 200 µM, y se dejó crecer el cultivo durante 3 horas a 37°C en agitación. Tras una centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se resuspendió el *pellet* de bacterias en 30 ml de tampón de lisis (página 172) frío, se lisó mediante una ronda de congelación/descongelación a -20°C, se sonicó (5 x 30 segundos) y se centrifugó a 25.000g durante 40 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante se purificaron las proteínas mediante una resina de afinidad de Glutación-*Sepharose* o Ni<sup>2+</sup>-agarosa, según estuvieran fusionadas a GST o a una cola de 6 histidinas, respectivamente. Para ello, se incubó la muestra con 200 µl de la resina pre-equilibrada correspondiente durante 2 horas a 4°C en agitación. Después de una centrifugación de 2 minutos a 2000 rpm, la resina se lavó sucesivamente con 10 ml de las siguientes soluciones: 4 veces en tampón de lisis 0.5 M NaCl (suplementado con 10 mM imidazol en el caso de proteínas purificadas con Ni<sup>2+</sup>-agarosa), y 3 veces en tampón Quinasa. El *pellet* final se resuspendió con 0.5 ml de tampón de elución suplementado con 40 µM final de glutación (para las proteínas fusionadas a GST) o con 200 mM de imidazol (para las proteínas fusionadas

a 6His). Tras 30 minutos de incubación a 4°C en agitación (1000 rpm), las proteínas eluidas fueron separadas de la resina mediante centrifugación en filtros Spin-X (Costar). Finalmente, 10 µl del eluido fue analizado mediante electroforesis y tinción Coomassie para determinar la pureza y concentración de las proteínas purificadas.

Tampón	Composición
Tampón Quinasa	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 0.1% (v/v) β-mercaptoetanol
Tampón de elución	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 0.27 M sacarosa; 0.1% (v/v) β-mercaptoetanol

**Tabla M.7 Composición de los tampones utilizados en la purificación de proteínas recombinantes de *E. coli*.**

## M.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

### M.6.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA.

#### Ensayos radiométricos de actividad quinasa utilizando péptido sustrato.

Los ensayos de actividad quinasa se realizaron en un volumen total de 50 µl de tampón Quinasa (50 mM Tris pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 0.1 % (v/v) β-mercaptoetanol), 10 mM acetato de magnesio, 100 µM <sup>32</sup>P-[γ-ATP] (GE Healthcare) (300 cpm/pmol) y 200 µM de péptido sustrato (AMARA, LNR o CHKtide). Las reacciones de llevaron a cabo a 30°C en agitación a 1000 rpm en thermomixer (Eppendorf), y a los tiempos indicados se finalizaron aplicando 40 µl de la mezcla de reacción sobre un papel (2x2 cm) de fosfo celulosa P81 (Whatman). Tras varios lavados en solución de 50 mM ácido fosfórico, los papeles fueron lavados con acetona, secados al aire y la radioactividad incorporada fue determinada mediante contaje Cerenkov en un contador de centelleo WallacII. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima requerida para catalizar la transferencia de un nmol de fosfato por minuto.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado un mínimo de tres veces. Previamente se determinó que el grado de fosforilación detectado en el tiempo y la cantidad de

proteína utilizados se encontraba en la zona lineal de la reacción. En todos los casos se usó como blanco de reacción una mezcla sin péptido sustrato.

### Ensayos radiométricos de fosforilación de proteínas en gel de poliacrilamida.

Para estudiar la fosforilación de proteínas por las BRSKs, la cantidad indicada de BRSK pura se incubó, en un volumen final de 30  $\mu$ l, con las proteínas sustrato a estudiar en una mezcla que contenía tampón Quinasa, 10 mM acetato de magnesio y 100  $\mu$ M  $^{32}$ P-[ $\gamma$ -ATP] (300 cpm/pmol). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C en agitación (1000 rpm), y a los tiempos indicados se finalizaron añadiendo 7  $\mu$ l de tampón de muestra (página 177) concentrado 5 veces. Las muestras se calentaron 5 minutos a 100°C, y las proteínas se resolvieron mediante gel SDS-PAGE y se visualizaron con tinción Coomassie. La incorporación de radioactividad se determinó mediante autorradiografía (Hyperfilm MP, GE Healthcare). Para medir la cantidad de radioactividad incorporada, se recortó la proteína del gel y se contó en un contador de centelleo WallacII.

En el caso de estimar la actividad de las BRSKs mediante auto-fosforilación, las reacciones se llevaron a cabo de la misma manera sin incluir proteínas sustrato.

### M.6.2 ENSAYOS DE GENE REPORTER POR ACTIVIDAD LUCIFERASA.

Para medir la actividad transcripcional de BRSK1, se clonó la región *upstream* de 1 kb del promotor de BRSK1 de rata en un vector luciferasa pGL2 (Promega). Este clonaje fue realizado por Josep Espadamala y el Dr. Néstor Gómez (Departament de Bioquímica i Biología Molecular, UAB), y la estrategia utilizada y el protocolo detallado se encuentran en la memoria de Tesis Doctoral de Josep Espadamala (en preparación).

Para los ensayos de *gene reporter*, se sembraron células PC12 en placas de 6 pocillos y se transfectaron al día siguiente con 125 ng de pGL2-BRSK1-*promoter* y 25 ng del vector SV40-renilla luciferasa (*simian virus*). En el estudio del factor de transcripción Sp1 en la activación génica del promotor, las células se co-transfectaron con 375 ng de pCMV-Sp1 o pCMV vacío. En los casos indicados, las células fueron tratadas con NGF, BDNF, EGF o Mitramicina A al día siguiente de la transfección durante los tiempos indicados. Tras lavar con PBS, las células se lisaron con 100  $\mu$ l de *Passive Lysis Buffer* (Promega) durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación fuerte, y se midió en un luminómetro la actividad Firefly (luciferasa de luciérnaga) y la actividad Renilla mediante el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Los datos representados corresponden a la actividad luciferasa bajo el control del promotor de BRSK1

normalizada con la actividad Renilla, y en niveles de actividad respecto al control del experimento.

### M.7 TÉCNICAS LIPÍDICAS.

Los diferentes métodos de extracción de lípidos y generación de vesículas lipídicas fueron realizados por el Dr. Enrique Claro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, i Institut de Neurociències, UAB).

#### M.7.1 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LAS FRACCIONES *RAFT* Y *NO-RAFT*, Y RECONSTITUCIÓN DE VESÍCULAS LIPÍDICAS.

Para estudiar el efecto del entorno lipídico *raft* en la actividad de las quinasas, se extrajeron los lípidos de las fracciones *raft* o *no-raft* de sinaptosomas de rata, y se reconstituyeron en vesículas lipídicas. La extracción de lípidos de las fracciones se realizó de acuerdo a lo descrito por Bligh & Dyer en 1959. A 1 ml de las fracciones *raft* o *no-raft* contenidas en un tubo de cristal se añadió 4.8 ml de cloroformo/metanol (en proporción 1:2 v/v), se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de cloroformo y 2 ml de agua para generar dos fases, y tras agitar otra vez con fuerza, se centrifugó 10 minutos a 2000g. La fase acuosa se desechó, mientras que 3.2 ml de la fase de cloroformo fueron traspasados (con cuidado de no perturbar la interfase) a un tubo de cristal nuevo. Los lípidos fueron re-extraídos añadiendo 6 ml de metanol/agua (1:1 v/v), agitando fuertemente y centrifugando de nuevo para separar las dos fases. Los 3 ml de la fase de cloroformo (extracto de lípidos) se traspasaron a un tubo de cristal nuevo donde se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno. Tras añadir 1 ml de tampón HEPES (20 mM HEPES pH 7.5 con 100 mM NaCl), el tubo se dejó 1 hora a temperatura ambiente, y se agitó en un vórtex para formar una suspensión turbia. Finalmente, las vesículas multilamelares de lípidos *raft* o *no-raft* se formaron sonicando la solución hasta que esta se volvió clara (~30 segundos).

Para analizar el efecto de las vesículas en la actividad de las quinasas, se pre-incubó el volumen de vesículas indicado en cada caso con la quinasa durante 30 minutos a 30°C en agitación suave (450 rpm). La reacción se inició añadiendo 10 mM acetato de magnesio y 100  $\mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -[ $\gamma$ -ATP] a la mezcla, y se midió la actividad quinasa como se describe anteriormente. En todos los casos se usó como control el mismo volumen de vesículas ensayado sustituido por tampón HEPES.

### M.7.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS CONTENIDOS EN LA FRACCIÓN *RAFT* Y GENERACIÓN DE VESÍCULAS SINTÉTICAS.

Para determinar la concentración de los principales lípidos (colesterol, fosfatidilcolina y esfingomielina) contenidos en la fracción *raft* de sinaptosomas de cerebro de rata, se depositaron diferentes volúmenes (10-40  $\mu\text{l}$ ) de la muestra en una placa de sílica gel HPTLC (Merck). Para determinar el colesterol, se aplicaron también en diferentes carriles varias cantidades (entre 5 y 20  $\mu\text{g}$ ) de colesterol (Sigma), y se desarrolló la placa en una fase móvil compuesta de hexano/dietiléter/ácido acético (70:30:1 v/v/v). Tras sprayar con primulina (5 mg primulina en 100 ml de acetona/agua 80:2 v/v), los lípidos fueron visualizados bajo luz ultravioleta. Las bandas resueltas correspondientes a colesterol fueron identificadas por comparación con los estándares de colesterol en los carriles vecinos, y fueron cuantificadas por densitometría utilizando el software ImageJ 1.43r (Wayne Rasband, National Institutes of Health). La concentración de colesterol (mg/ml) es el cociente entre el valor obtenido de la muestra *raft* ( $\text{ml}^{-1}$ ) y el valor de los estándares de colesterol ( $\text{mg}^{-1}$ ) calculados por regresión lineal. La misma aproximación se usó para determinar la concentración de fosfatidilcolina y esfingomielina de la muestra fracción *raft*, pero en este caso las placas se desarrollaron en una fase móvil compuesta de cloroformo/metanol/ácido acético/agua (60:50:1:4 v/v/v/v).

Para generar las vesículas sintéticas, se combinaron en un tubo de cristal los volúmenes indicados de fosfatidilcolina (1-palmitoil, 2-oleoil), colesterol y esfingomielina disueltos en cloroformo (1 mg/ml). Se evaporó con nitrógeno para obtener la mezcla de fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina deseada, y a partir de estos lípidos se generaron las vesículas sintéticas, de la misma manera que se describe para las vesículas *raft*.

### M.8 ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETECCIÓN DE FOSFOPÉPTIDOS.

El análisis de espectrometría de masas para la identificación del residuo de syntaxina-1A fosforilado por BRSK1 fue realizado por el Dr. Joan Villanueva y la Dra. Montserrat Carrascal del Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB.

### M.8.1 OBTENCIÓN Y DIGESTIÓN DE LA MUESTRA.

Tras poner a punto las condiciones del ensayo, se incubaron 20 µg de syntaxina-1A purificada de células *E. coli* (previamente desnaturalizada 5 minutos a 65°C) con 20 µg de BRSK1 activa. La reacción de fosforilación se llevó a cabo en un volumen total de 120 µl que contenía tampón Quinasa (página 182), 10 mM acetato de magnesio y 100 µM ATP, durante 30 minutos a 30°C. Se finalizó añadiendo 28 µl de tampón de muestra (página 177), y tras calentar 5 minutos a 100°C, las proteínas se resolvieron en gel SDS-PAGE. Después de teñir el gel con Coomassie Blue siguiendo el protocolo estándar, las bandas correspondientes a la syntaxina fosforilada fueron recortadas manualmente y digeridas en gel con tripsina o endoGluC (Promega, Madison, WI) utilizando un Digest MSPro (Intavis, Koeln, Deutschland). Brevemente, las bandas recortadas del gel se lavaron con agua y 20 mM amonio bicarbonato pH 7.8, reducido con 10 mM DTT, alcalinizado con 55 mM iodoacetamina, y digeridas con tripsina o endoGluC durante 16 horas a 37°C. Los péptidos generados fueron extraídos con acetonitrilo/agua 0.25% TFA, evaporados por vacío y re-disueltos en 40 µl de 1% (v/v) ácido fórmico.

### M.8.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

#### Espectrometría de masas LC-MS/MS capilar.

Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida electrospray espectrometría de masas en tándem (LC-µESI-ITMS/MS), usando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap de elevada resolución (ThermoFisher, San Jose, CA) equipado con una interfase Proxeon microESI (Proxeon, Denmark). El sistema HPLC se compone de una nano bomba Agilent 1200, una bomba binaria, un microinyector termostatzado y una válvula microwitch. La separación se realizó a 0.4 µl/min usando un gradiente lineal de acetonitrilo (del 3 al 40%) durante 30 minutos (solvente A: 0.1% ácido fórmico; solvente B: acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico). El espectrómetro de masas operó en el modo ión positivo con un voltaje spray de 2 kV. El instrumento se estableció para realizar un *scan* MS completo de elevada resolución (60.000) en los rangos de *m/z* 400-1800, seguido por el MS/MS de las 8 cinco señales más abundantes. Un subsiguiente *scan* MS3 se realizó cuando se detectó una pérdida neutral de -98, -49 o -32.7 (pérdida de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para los iones cargados +1, +2 y +3, respectivamente) entre los 10 iones más intensos. Con el fin de minimizar la selección redundante de iones precursores, se estableció una exclusión dinámica de *scan* 2 MS/MS para cada ventana de tiempo de 180 segundos.

### **Búsqueda en la base de datos e interpretación de los resultados.**

El espectro de fragmentación MS2 y MS3 se buscó utilizando el software SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA) contra la proteína syntaxina-1A. Los parámetros de búsqueda fueron: tolerancia de masa del péptido, 20 ppm; tolerancia de fragmento, 0.8 Da; enzima establecido para tripsina o endoGluC, permitiendo una pérdida de 3 cortes; modificación estática, Cys carbamidometiladas (+57.0219 Da); modificación dinámica, oxidación de Met (+15.9949 Da) y fosforilación de Ser, Thr y Tyr (+79.96633 Da). Las identificaciones correctas de secuencias de péptidos fueron evaluadas utilizando tanto el score Xcorr de SEQUEST como el D value, que fue calculado según se describió anteriormente (Carrascal et al, 2010). Las identificaciones correctas fueron aquellas con scores de falso descubrimiento (FDR) menores al 1%. Finalmente, la asignación de fosfo-péptidos se validó manualmente.

## **M.9 BIOLOGÍA MOLECULAR.**

### **M.9.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE INTERÉS.**

#### **Preparación de bacterias DH5 $\alpha$ competentes.**

De una placa de medio LB agar sin antibiótico se picó una colonia de *E.coli* de la cepa DH5 $\alpha$  y se creció durante la noche en 5 ml de medio LB líquido sin antibiótico a 37°C en agitación (200 rpm/min). Al día siguiente, se traspasaron 150  $\mu$ l del cultivo a 5ml de medio LB nuevo y se dejó crecer durante 90 minutos a 37°C para obtener un cultivo fresco. Tras centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C, el *pellet* con las células se resuspendió en 2.5 ml de 50 mM CaCl<sub>2</sub> estéril y frío, y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Después de centrifugar (3000 rpm a 4°C durante 5 minutos), se volvió a resuspender el *pellet* con 500  $\mu$ l de 50 mM CaCl<sub>2</sub> estéril, obteniendo así células DH5 $\alpha$  competentes listas para ser transformadas.

#### **Transformación de las bacterias competentes y purificación de los plásmidos.**

Sobre 100  $\mu$ l de células competentes frescas, se añadió 1  $\mu$ l del plásmido a amplificar y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación se realizó un choque térmico calentando las células a 42°C durante estrictamente 2 minutos, para rápidamente devolverlas a un baño de hielo. A continuación, las células transformadas se crecieron en 400  $\mu$ l de LB líquido sin antibiótico durante 1 hora a 37°C en agitación. Una parte del cultivo (50  $\mu$ l) se sembró en placas



de LB agar con 50 µg/ml ampicilina, y se dejó crecer durante la noche en una estufa a 37°C. A la mañana siguiente, se picó una colonia y se creció en 3 ml de medio LB-Ampicilina durante 8 horas, para luego transferirse a 300 ml de LB-Ampicilina. El cultivo creció durante la noche a 37°C en agitación, se centrifugó, y el DNA plasmídico fue purificado mediante el *kit* QIAGEN Plasmid Maxiprep (QIAGEN).

Se utilizaron células *E.coli* de la cepa BL21 para expresar proteínas en bacterias, y se siguió el mismo protocolo para generar células BL21 competentes y transformarlas con los vectores pGEX de expresión.

La lista con los vectores utilizados en este trabajo se adjunta en el Anexo IV de la memoria.

### **M.9.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**

La mutagénesis dirigida permite introducir una mutación puntual en un DNA clonado en un plásmido de interés. Consiste en diseñar un *primer* (y su reverso) que contenga la mutación que se quiere introducir, y utilizarlo como cebador para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica fue utilizada para generar los mutantes de delección de sintaxina-1A (introduciendo una mutación que codifica para un codón STOP), los mutantes de sintaxina S188A y S188D, y los mutantes de BRSK1 y BRSK2 en que se substituyeron Lys por Arg para estudiar la sumoilización de las BRSKs.

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl que contenía: 10 o 25 ng DNA molde, 5 µl tampón 10X (Stratagen), 5 µl dNTPs 2 mM, 0.3 µl de cada *primer* (100 pmol/µl) y 1 µl de polimerasa pfu turbo (Stratagen). Como control se añadieron dos tubos control con la mezcla de PCR excepto la polimerasa pfu. El esquema general que se siguió de duración y temperatura de cada ciclo de la PCR es el siguiente:

Hot start: 1 minuto a 95°C	} 19 ciclos
Desnaturalización: 1 minuto a 95°C	
Re-hibridación: 1 minuto a 50°C	
Extensión: * a 72°C (* = 2 minutos / kb)	
Extensión final de reacción: 5 minutos a 72°C	
Preservación: ∞ a 4°C	

En el caso de sintaxina, la extensión se realizó durante 12 minutos, y en el caso de BRSK1 y BRSK2 durante 20 y 18 minutos respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

Tras la reacción, 10 µl fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% para comprobar la amplificación (las bandas se visualizaron mediante Sybr Safe 1:25000, Invitrogen). Los 40 µl restantes se incubaron con 10 unidades de DpnI (Stratagen) durante 4 horas a 37°C para degradar el DNA metilado (molde). A una de las reacciones control sin pfu no se añadió DpnI. A continuación, se transformaron 100 µl de células DH5α competentes frescas con el DNA mutado, y se sembraron en placas de LB-Ampicilina agar. Tras 14 horas creciendo a 37°C, se picó una colonia, se creció en 3 ml de LB-Ampicilina, y el plásmido amplificado se purificó mediante el *kit* QIAGEN Plasmid Miniprep (QIAGEN). En las reacciones control sin pfu pero con DpnI no creció ninguna colonia, mientras si lo hizo en las reacciones sin pfu que no fueron digeridas con DpnI (crecieron las colonias transformadas con el DNA molde). Las mutaciones introducidas fueron comprobadas mediante secuenciación del DNA en el Servei de Genòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

<b>Proteína</b>	<b>Primers (5'--&gt;3')</b>
<b>Sintaxina[1-102]</b>	Fw: CCATCGAGCAAGAGTAAGGCCTGAACCGC Rv: GCGGTTCAGGCCTTACTCTTGCTCGATGG
<b>Sintaxina[1-168]</b>	Fw: TGGAGGACATGCTGTAGAGTGGGAACCCC Rv: GGGGTTCCCACTCTACAGCATGTCCTCCA
<b>Sintaxina S188A</b>	Fw: TGGACTCCAGCATCGCGAAGCAGGCTCTG Rv: CAGAGCCTGCTTCGCGATGCTGGAGTCCA
<b>Sintaxina S188D</b>	Fw: TGGACTCCAGCATCGATAAGCAGGCTCTG Rv: CAGAGCCTGCTTATCGATGCTGGAGTCCA
<b>BRSK1 K77R</b>	Fw: GTCGGTGCTGATGAAGGTGGAGCGGGAGA Rv: TCTCCCGCTCCACCTTCATCAGCACCGAC
<b>BRSK1 K158R</b>	Fw: CCACAGAGACCTAAGGCCCGAGAACCTGC Rv: GCAGGTTCTCGGGCCTTAGGTCTCTGTGG
<b>BRSK1 K203R</b>	Fw: GTCCAGAGGTGATTAGGGGGGAAAAATATG Rv: CATATTTTTCCCCCTAATCACCTCTGGAC
<b>BRSK1 K621R</b>	Fw: CTCTCAGCAGCATCAGAGCAGACATCGTCC Rv: GGACGATGTCTGCTCTGATGCTGCTGAGAG
<b>BRSK2 K62R</b>	Fw: GTCGGTGCTGATGAGGGTGGAGCGGGAGA Rv: TCTCCCGCTCCACCCTCATCAGCACCGAC
<b>BRSK2 K143R</b>	Fw: CCACAGGGATCTGAGACCTGAAAACCTCC

	Rv: GGAGGTTTTTCAGGTCTCAGATCCCTGTGG
<b>BRSK2 K547R</b>	Fw: CTCTGAGCTCCATCAGGGCTGACATCGTGC Rv: GCACGATGTCAGCCCTGATGGAGCTCAGAG

**Tabla M.8** Secuencia de los *primers* utilizados para mutagénesis dirigida. Los *primers* fueron sintetizados por Isogen Life Science.

## M.10 TRANSFECCIÓN DE DNA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

La lista con los vectores de expresión en mamíferos utilizados en este trabajo se adjunta en el Anexo IV. La mayoría de ellos fueron clonados por la Dra. Maria Deak del *MRC Protein Phosphorylation Unit* (Dundee, UK) y donados por el Professor Dario Alessi. En todos los experimentos de transfección se usó el correspondiente plásmido vacío como control. En función del tipo celular, se utilizaron 2 métodos de transfección: polietilenamina (PEI) en células HEK-293 y HeLa, y lipofectamina 2000 en células PC12.

### M.10.1 TRANSFECCIÓN CON POLIETILENAMINA (PEI).

La técnica de transfección con polietilenamina (PEI, Polysciences Inc.) se basa en la formación de un complejo DNA-polímero catiónico: los cationes del polímero capturan el DNA en suspensión y lo condensan sobre sí, favoreciendo la entrada del DNA en la célula. Se preparó un *stock* de trabajo a una concentración de 1 mg/ml de PEI en agua pH 7.4, y se alicuotó y guardó a -80°C. La relación DNA:PEI ( $\mu\text{g}:\mu\text{l}$ ) para obtener niveles óptimos de transfección debe ser determinada previamente para cada tipo celular, y la encontrada en este trabajo para células HEK-293 y HeLa fue de 1:10.5 y 1:7.5 ( $\mu\text{g}:\mu\text{l}$ ), respectivamente.

Las células a transfectar fueron subcultivadas en placas de 10 cm el día de antes para obtener el 50-70% de confluencia. Al día siguiente de la siembra, y unas horas antes de la transfección, se cambió el medio de cultivo por 10 ml de DMEM fresco suplementado con 10% FBS. En 1 ml de DMEM libre de suero se diluyó el plásmido y el PEI a la relación descrita anteriormente, se agitó inmediatamente 5 segundos en un vórtex, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota a las células (repartiendo bien por toda la superficie y desde una cierta altura). Las células fueron incubadas durante 24-36 horas a 37°C antes de ser lisadas.

### **M.10.2 TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000.**

La técnica de transfección con lipofectamina (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen) se basa en la utilización de liposomas catiónicos de carga neta altamente positiva que interaccionan con los fosfatos del DNA, sirviendo de vehículo para su entrada en la célula. Debido al bajo rendimiento de transfección con PEI en células PC12, para este tipo celular se utilizó lipofectamina 2000, con el que se obtuvo alrededor del 90% de transfección. Células PC12 fueron subcultivadas en placas de 6 pocillos el día anterior a la transfección para obtener un 60-80% de confluencia. Tres o cuatro horas antes de la transfección, los 2 ml de medio de cultivo fueron sustituidos por 1 ml de medio sin antibiótico. En un tubo Falcon de 15 ml, se disolvieron 0.5 µg del DNA a transfectar en 0.5 ml de medio OPTIMEM (Gibco), y en otro tubo 5 µl de lipofectamina en 0.5 ml de OPTIMEM (relación DNA:lipofectamina 1:10 (µg: µl) recomendada por la casa comercial). Tras 5 minutos a temperatura ambiente, la lipofectamina se añadió sobre el DNA, se agitó suavemente, y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se añadió la mezcla gota a gota sobre las células a transfectar. Transcurridas 3-4 horas, el medio de transfección se cambió por medio completo atemperado, y se incubaron durante 24-36 horas a 37°C antes de ser lisadas.

### **M.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Las figuras, tablas y análisis estadísticos fueron generadas utilizando los *softwares* ImageJ 1.43r (Wayne Rasband, National Institutes of Health), Prism 3.0 (GraphPad) o Adobe Photoshop CS2. La significancia estadística se determinó mediante el programa Prism 3.0 utilizando el análisis de variancia ANOVA de una vía, seguido por el test de corrección Tukey de comparación múltiple. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$ , y los grados de significancia se expresaron como \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .



# **BIBLIOGRAFÍA**



## Reference List

## A

- Aksenova, M. V., Burbaeva, G. S., Kandror, K. V., Kapkov, D. V. and Stepanov, A. S. (1991). The decreased level of casein kinase 2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients. *FEBS letters* 279, 55-57.
- Al-Hakim, A. K., Göransson, O., Deak, M., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Prescott, A. R. and Alessi, D. R. (2005). 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *Journal of Cell Science* 118, 5661.
- Al-Hakim, A. K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M. and Alessi, D. R. (2008). Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys29/Lys33-linked polyubiquitin chains. *Biochemical Journal* 411, 249-260.
- Alessi, D. R., Sakamoto, K. and Bayascas, J. R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 137-163.
- Alvarado-Kristensson, M., Rodríguez, M. J., Silió, V., Valpuesta, J. M. and Carrera, A. C. (2009). SADB phosphorylation of  $\gamma$ -tubulin regulates centrosome duplication. *Nature cell biology* 11, 1081-1092.
- Anderson, D. B., Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2009). Protein SUMOylation in neuropathological conditions. *Drug News Perspect* 22, 255-265.
- Atkins, D. S. and Basha, M. (2003). Intracellular signaling pathways involved in mediating the effects of lead on the transcription factor Sp1. *International journal of developmental neuroscience* 21, 235-244.

## B

- Baas, A. F., Boudeau, J., Sapkota, G. P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N. A., Alessi, D. R. and Clevers, H. C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *The EMBO journal* 22, 3062-3072.
- Baas, A. F., Kuipers, J., van der Wel, N. N., Batlle, E., Koerten, H. K., Peters, P. J. and Clevers, H. C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457-466.
- Baas, S., Sharrow, M., Kotu, V., Middleton, M., Nguyen, K., Flanagan-Steet, H., Aoki, K. and Tiemeyer, M. (2011). Sugar-free frosting, a homolog of SAD kinase, drives neural-specific glycan expression in the Drosophila embryo. *Development* 138, 553-563.
- Banks, E. B., Crish, J. F., Welter, J. F. and Eckert, R. L. (1998). Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements-a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochemical Journal* 331, 61.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J. R. (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42, 841-848.



- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A. F., Signoretti, S., Hathaway, N. A., Sharpless, N. E., Loda, M., Carrasco, D. R. and DePinho, R. A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162-167.
- Barnes, A. P., Lilley, B. N., Pan, Y. A., Plummer, L. J., Powell, A. W., Raines, A. N., Sanes, J. R. and Polleux, F. (2007). LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549-563.
- Barnes, A. P., Solecki, D. and Polleux, F. (2008). New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Current opinion in neurobiology* 18, 44-52.
- Barnes, A. P. and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience* 32, 347.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J. and Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14, 83-114.
- Bennett, M. K., Calakos, N. and Scheller, R. H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255.
- Benson, M. D., Li, Q. J., Kieckhafer, K., Dudek, D., Whorton, M. R., Sunahara, R. K., Iñiguez-Lluhí, J. A. and Martens, J. R. (2007). SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1. 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 1805.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917.
- Bodmer, M., Meier, C., Krähenbühl, S., Jick, S. S. and Meier, C. R. (2010). Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes care* 33, 1304.
- Boudeau, J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H. C. and Alessi, D. R. (2003a). MO25 $\alpha/\beta$  interact with STRAD $\alpha/\beta$  enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *The EMBO journal* 22, 5102-5114.
- Boudeau, J., Deak, M., Lawlor, M. A., Morrice, N. A. and Alessi, D. R. (2003b). Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochemical Journal* 370, 849.
- Boudeau, J., Scott, J. W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D. G., Prescott, A. R., van Aalten, D. M. F. and Alessi, D. R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *Journal of Cell Science* 117, 6365.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J. and Alessi, D. R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* 16, 443-452.
- Bowker, S. L., Majumdar, S. R., Veugelers, P. and Johnson, J. A. (2006). Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes care* 29, 254.
- Bozulic, L., Morin Jr, P., Hunter, T. and Hemmings, B. A. (2007). Meeting report: targeting the kinome-20 years of tyrosine kinase inhibitor research in Basel. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2007, e8.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

- Bright, N. J., Carling, D. and Thornton, C. (2008). Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14946.
- Bright, N. J., Thornton, C. and Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiologica* 196, 15-26.
- Brown, D. A. and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 111-136.
- Brunger, A. T., Weninger, K., Bowen, M. and Chu, S. (2009). Single molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annual review of biochemistry* 78, 903.

---

**C**

---

- Carrascal, M., Gay, M., Ovelleiro, D., Casas, V., Gelpí, E. and Abian, J. (2010). Characterization of the human plasma phosphoproteome using linear ion trap mass spectrometry and multiple search engines. *Journal of proteome research* 9, 876-884.
- Carrera, A. C. and Alvarado-Kristensson, M. (2009). SADB kinases license centrosome replication. *Cell Cycle* 8, 4005-4006.
- Castillo, M. A., Ghose, S., Tamminga, C. A. and Ulery-Reynolds, P. G. (2010). Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex. *Biological psychiatry* 67, 208-216.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 5619.
- Chen, D. and Vogel, J. (2009). SAD kinase keeps centrosomes lonely. *Nature cell biology* 11, 1047-1048.
- Chen, P. C., Bhattacharyya, B. J., Hanna, J., Minkel, H., Wilson, J. A., Finley, D., Miller, R. J. and Wilson, S. M. (2011). Ubiquitin Homeostasis Is Critical for Synaptic Development and Function. *The Journal of Neuroscience* 31, 17505-17513.
- Chen, Y. A. and Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2, 98-106.
- Chico, L. K., Van Eldik, L. J. and Watterson, D. M. (2009). Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 892-909.
- Choi, J., Levey, A. I., Weintraub, S. T., Rees, H. D., Gearing, M., Chin, L. S. and Li, L. (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13256.
- Choi, Y. J., Di Nardo, A., Kramvis, I., Meikle, L., Kwiatkowski, D. J., Sahin, M. and He, X. (2008). Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes & development* 22, 2485.
- Claro, E., Wallace, M. A., Fain, J. N., Nair, B. G., Patel, T. B., Shanker, G. and Baker, H. J. (1991). Altered phosphoinositide-specific phospholipase C and adenylyl cyclase in brain cortical membranes of cats with GM1 and GM2 gangliosidosis. *Molecular brain research* 11, 265-271.

- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends in biochemical sciences* 25, 596-601.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 309-315.
- Collins, S. P., Reoma, J. L., Gamm, D. M. and Uhler, M. D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochemical Journal* 345, 673.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Craig, A. M. and Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience* 17, 267-310.
- Crimmins, S., Jin, Y., Wheeler, C., Huffman, A. K., Chapman, C., Dobrunz, L. E., Levey, A., Roth, K. A., Wilson, J. A. and Wilson, S. M. (2006). Transgenic rescue of ataxia mice with neuronal-specific expression of ubiquitin-specific protease 14. *The Journal of Neuroscience* 26, 11423-11431.
- Crump, J. G., Zhen, M., Jin, Y. and Bargmann, C. I. (2001). The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. *Neuron* 29, 115-129.
- Currie, C. J., Poole, C. D. and Gale, E. A. M. (2009). The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 1766-1777.

## D

---

- Dale, S., Wilson, W. A., Edelman, A. M. and Hardie, D. G. (1995). Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS letters* 361, 191-195.
- De Vrij, F. M. S., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W. and Hol, E. M. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Progress in neurobiology* 74, 249-270.
- Dichter, M. A., Tischler, A. S. and Greene, L. A. (1977). Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature* 268, 501.
- Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K. and Delaunoy, J. P. (1981). A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain research* 226, 107-118.
- Dorfman, J. and Macara, I. G. (2008). STRAD $\alpha$  regulates LKB1 localization by blocking access to importin- $\alpha$ , and by association with Crm1 and exportin-7. *Molecular biology of the cell* 19, 1614-1626.
- Dorval, V. and Fraser, P. E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Biological Chemistry* 281, 9919.

- Dorval, V. and Fraser, P. E. (2007). SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1773, 694-706.
- Dotti, C. G. and Banker, G. A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330, 254-256.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* 8, 1454-1468.
- Dubois, T., Kerai, P., Learmonth, M., Cronshaw, A. and Aitken, A. (2002). Identification of syntaxin 1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II. *European Journal of Biochemistry* 269, 909-914.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 7686.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *The EMBO journal* 18, 4372-4382.
- Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Südhof, T. C. and Rizo, J. (2007). Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2697.

---

**E**

- Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. and Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Bmj* 330, 1304-1305.

---

**F**

- Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., Möbitz, H. and Martiny-Baron, G. (2012). Targeting Cancer with Small-Molecular-Weight Kinase Inhibitors. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 795, 1.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15781.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feese, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A. and Hobbs, F. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18623.
- Felgioni, M., Nishimune, A. and Henley, J. M. (2009). Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *European Journal of Neuroscience* 29, 1348-1356.
- Feng, L., Wang, C. Y., Jiang, H., Oho, C., Mizuno, K., Dugich-Djordjevic, M. and Lu, B. (1999). Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. *Molecular brain research* 66, 62-70.
- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 94, 841-849.

- Ferrer, I. (2009). Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Progress in neurobiology* 88, 89-103.
- Filippi, B. M., de los Heros, P., Mehellou, Y., Navratilova, I., Gourlay, R., Deak, M., Plater, L., Toth, R., Zeqiraj, E. and Alessi, D. R. (2011). MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. *The EMBO journal* 30, 1730-1741.
- Fogarty, S. and Hardie, D. G. (2009). C-terminal phosphorylation of LKB1 is not required for regulation of AMP-activated protein kinase, BRSK1, BRSK2, or cell cycle arrest. *Journal of Biological Chemistry* 284, 77.
- Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J. and Hardie, D. G. (2010). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochemical Journal* 426, 109.
- Foletti, D. L., Lin, R., Finley, M. A. F. and Scheller, R. H. (2000). Phosphorylated syntaxin 1 is localized to discrete domains along a subset of axons. *The Journal of Neuroscience* 20, 4535.
- Fujimoto, T., Yurimoto, S., Hatano, N., Nozaki, N., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Mizutani, A., Mikoshiba, K., Kobayashi, R. and Tokumitsu, H. (2008). Activation of SAD Kinase by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase. *Biochemistry* 47, 4151-4159.

## G

---

- Gao, S. Y., Li, E. M., Cui, L., Lu, X. F., Meng, L. Y., Yuan, H. M., Xie, J. J., Du, Z. P., Pang, J. X. and Xu, L. Y. (2009). Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 284, 7995-8004.
- Gaude, H., Aznar, N., Delay, A., Bres, A., Buchet-Poyau, K., Caillat, C., Vigouroux, A., Rogon, C., Woods, A. and Vanacker, J. M. (2011). Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene*.
- Gegonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A. and Ghysdael, J. (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *The EMBO journal* 12, 1169.
- Geoffroy, M. C. and Hay, R. T. (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 564-568.
- Gerber, S. H., Rah, J. C., Min, S. W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., Meyer, A. C., Rizo, J., Arancillo, M. and Hammer, R. E. (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* 321, 1507.
- Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J. and Aguilera, J. (2005). Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochemical and biophysical research communications* 329, 117-124.
- Gil, C., Cubí, R., Blasi, J. and Aguilera, J. (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 1334-1342.
- Göransson, O., Deak, M., Wullschleger, S., Morrice, N. A., Prescott, A. R. and Alessi, D. R. (2006). Regulation of the polarity kinases PAR-1/MARK by 14-3-3 interaction and phosphorylation. *Journal of Cell Science* 119, 4059.

- Goslin, K. and Banker, G. (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology* 108, 1507-1516.
- Gowran, A., Murphy, C. E. and Campbell, V. A. (2009). [Delta] 9-Tetrahydrocannabinol regulates the p53 post-translational modifiers Murine double minute 2 and the Small Ubiquitin Modifier protein in the rat brain. *FEBS letters* 583, 3412-3418.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2424.
- Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R. H. and Muir, A. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I $\kappa$ B $\alpha$  modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature genetics* 36, 837-841.
- Guo, Z., Tang, W., Yuan, J., Chen, X., Wan, B., Gu, X., Luo, K., Wang, Y. and Yu, L. (2006). Brsk2 is activated by cyclic AMP-dependent protein kinase A through phosphorylation at Thr260. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 867-871.

---

## H

---

- Hagiwara, A., Harada, K., Hida, Y., Kitajima, I. and Ohtsuka, T. (2011). Distribution of serine/threonine kinase SAD-B in mouse peripheral nerve synapse. *NeuroReport* 22, 319.
- Han, G. A., Malintan, N. T., Collins, B. M., Meunier, F. A. and Sugita, S. (2010). Munc18 1 as a key regulator of neurosecretion. *Journal of neurochemistry*.
- Hanks, S. K. and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal* 9, 576.
- Hardie, D. G. (2005). New roles for the LKB1 $\rightarrow$  AMPK pathway. *Current opinion in cell biology* 17, 167-173.
- Hatanaka, Y. and Murakami, F. (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *The Journal of comparative neurology* 454, 1-14.
- Hawley, S., Boudeau, J., Reid, J., Mustard, K., Udd, L., Mäkelä, T., Alessi, D. and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADA $\beta$  and MO25 $\alpha/\beta$  are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology* 2, 28.
- Hawley, S., Pan, D., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism* 2, 9-19.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: A History of Modification. *Molecular cell* 18, 1-12.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C. and Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *The EMBO journal* 13, 5051.
- Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F. H., Olschwang, S., Boardman, L. A., Gille, J. J. P., Keller, J. J., Westerman, A. M., Scott, R. J. and Lim, W. (2006). Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research* 12, 3209.

- Hemminki, A., Tomlinson, I., Markie, D., Järvinen, H., Sistonen, P., Björkqvist, A. M., Knuutila, S., Salovaara, R., Bodmer, W. and Shibata, D. (1997). Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nature genetics* 15, 87-90.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M. and Höglund, P. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184-187.
- Herrmann, J. L., Byekova, Y., Elmets, C. A. and Athar, M. (2011). Liver Kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of epithelial cancers. *Cancer Letters* 306, 1-9.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein-and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development* 7, 2135.
- Hicke, L., Schubert, H. L. and Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 610-621.
- Hung, W., Hwang, C., Po, M. D. and Zhen, M. (2007). Neuronal polarity is regulated by a direct interaction between a scaffolding protein, Neurabin, and a presynaptic SAD-1 kinase in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 134, 237-249.
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. and Witters, L. A. (2005). The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 29060-29066.
- Hwang, K. W., Won, T. J., Kim, H., Chun, H. J., Chun, T. and Park, Y. (2011). Characterization of the regulatory roles of the SUMO. *Diabetes/metabolism research and reviews* 27, 854-861.

## I

---

- Ilangumaran, S. and Hoessli, D. C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochemical Journal* 335, 433.
- Inoue, E., Mochida, S., Takagi, H., Higa, S., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Yao, I., Takeuchi, K. and Kitajima, I. (2006). SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release. *Neuron* 50, 261-275.

## J

---

- Jahn, R. and Südhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annual review of biochemistry* 68, 863-911.
- Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 631-643.
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., van Aalten, D. M. F. and Alessi, D. R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemical Journal* 394, 545.

- Jaleel, M., Nichols, R. J., Deak, M., Campbell, D. G., Gillardon, F., Knebel, A. and Alessi, D. R. (2007). LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochemical Journal* 405, 307.
- Jeghers, H., McKusick, V. A. and Katz, K. H. (1949). Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits. *New England Journal of Medicine* 241, 993-1005.
- Jena, B. P. (2009). Membrane fusion: role of SNAREs and calcium. *Protein and Peptide Letters* 16, 712-717.
- Ji, H., Ramsey, M. R., Hayes, D. N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M. C., Shimamura, T. and Perera, S. A. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448, 807-810.
- Jishage, K., Nezu, J., Kawase, Y., Iwata, T., Watanabe, M., Miyoshi, A., Ose, A., Habu, K., Kake, T. and Kamada, N. (2002). Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 8903.

---

## K

---

- Kang, J. S., Saunier, E. F., Akhurst, R. J. and Derynck, R. (2008). The type I TGF- $\beta$  receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nature cell biology* 10, 654-664.
- Kang, R., Wan, J., Arstikaitis, P., Takahashi, H., Huang, K., Bailey, A. O., Thompson, J. X., Roth, A. F., Drisdell, R. C. and Mastro, R. (2008). Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456, 904-909.
- Kee, Y., Lin, R. C., Hsu, S. C. and Scheller, R. H. (1995). Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation. *Neuron* 14, 991-998.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-320.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 159-180.
- Khachigian, L. M., Williams, A. J. and Collins, T. (1995). Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27679.
- Kim, J. S. M., Hung, W., Narbonne, P., Roy, R. and Zhen, M. (2010a). *C. elegans* STRAD $\alpha$  and SAD cooperatively regulate neuronal polarity and synaptic organization. *Development* 137, 93-102.
- Kim, J. S. M., Hung, W. and Zhen, M. (2010b). The long and the short of SAD-1 kinase. *Communicative & integrative biology* 3, 251.
- Kishi, M., Pan, Y. A., Crump, J. G. and Sanes, J. R. (2005). Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* 307, 929.
- Kiss-Toth, E. (2011). Tribbles: 'puzzling' regulators of cell signalling. *Biochemical Society Transactions* 39, 684-687.



- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407.
- Kornev, A. P. and Taylor, S. S. (2009). Pseudokinases: functional insights gleaned from structure. *Structure* 17, 5-7.
- Kourelis, T. V. and Siegel, R. D. (2011). Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Medical Oncology*, 1-14.
- Krebs, E. G. and Fischer, E. H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 20, 150-157.

## L

---

- Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N. and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27628.
- Landman, G. W. D., Kleefstra, N., Van Hateren, K. J. J., Groenier, K. H., Gans, R. O. B. and Bilo, H. J. G. (2010). Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes. *Diabetes care* 33, 322-326.
- Lee, E. J., Hyun, S. H., Chun, J., Shin, S. H., Yeon, K. H., Kwak, M. K., Park, T. Y. and Kang, S. S. (2008). Regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  functions by modification of the small ubiquitin-like modifier. *The open biochemistry journal* 2, 67.
- Lee, F. S. and Chao, M. V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 3555.
- Lee, F. S., Rajagopal, R., Kim, A. H., Chang, P. C. and Chao, M. V. (2002). Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* 277, 9096.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S. and Chernova, T. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451-452.
- Libby, G., Donnelly, L. A., Donnan, P. T., Alessi, D. R., Morris, A. D. and Evans, J. M. M. (2009). New users of metformin are at low risk of incident cancer. *Diabetes care* 32, 1620.
- Lin, R. C. and Scheller, R. H. (2000). Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 19-49.
- Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Mäkelä, T. P. and Hardie, D. G. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal* 23, 833-843.
- Look, D. C., Pelletier, M. R., Tidwell, R. M., Roswit, W. T. and Holtzman, M. J. (1995). Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *Journal of Biological Chemistry* 270, 30264-30267.
- Lu, R., Niida, H. and Nakanishi, M. (2004). Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *Journal of Biological Chemistry* 279, 31164.

Lucero, H. A. and Robbins, P. W. (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 426, 208-224.

---

## M

---

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002a). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912.

Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002b). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences* 27, 514-520.

Marampon, F., Casimiro, M. C., Fu, M., Powell, M. J., Popov, V. M., Lindsay, J., Zani, B. M., Ciccarelli, C., Watanabe, G. and Lee, R. J. (2008). Nerve growth factor regulation of Cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Molecular biology of the cell* 19, 2566.

Martin, S. G. and St Johnston, D. (2003). A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* 421, 379-384.

Matenia, D. and Mandelkow, E. M. (2009). The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends in biochemical sciences* 34, 332-342.

Matsuura, D., Taguchi, K., Yagisawa, H. and Maekawa, S. (2007). Lipid components in the detergent-resistant membrane microdomain (DRM) obtained from the synaptic plasma membrane of rat brain. *Neuroscience letters* 423, 158-161.

Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* 135, 1457-1470.

Mayford, M. (2007). Protein kinase signaling in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* 17, 313-317.

Misura, K. M. S., Scheller, R. H. and Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362.

Miyoshi, H., Nakau, M., Ishikawa, T., Seldin, M. F., Oshima, M. and Taketo, M. M. (2002). Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer research* 62, 2261.

Monje, P., Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2003). Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Molecular and cellular biology* 23, 7030.

Moore, D. J. (2006). Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochemical Society Transactions* 34, 749.

Morgan, J. L., Dhingra, A., Vardi, N. and Wong, R. O. L. (2005). Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nature neuroscience* 9, 85-92.

- Mukhopadhyay, D. and Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in biochemical sciences* 32, 286-295.
- Müller, M., Lutter, D. and Püschel, A. W. (2010). Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA-and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity. *Journal of Cell Science* 123, 286-294.
- Murphy, J. M., Korzhnev, D. M., Ceccarelli, D. F., Briant, D. J., Zarrine-Afsar, A., Sicheri, F., Kay, L. E. and Pawson, T. (2007). Conformational instability of the MARK3 UBA domain compromises ubiquitin recognition and promotes interaction with the adjacent kinase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 14336.

## N

---

- Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M. F., Imamura, M., Oshima, M. and Taketo, M. M. (2002). Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. *Cancer research* 62, 4549.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.
- Nony, P., Gaude, H., Rossel, M., Fournier, L., Rouault, J. P. and Billaud, M. (2003). Stability of the Peutz–Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. *Oncogene* 22, 9165-9175.
- Noti, J. D., Reinemann, B. C. and Petrus, M. N. (1996). Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Molecular and cellular biology* 16, 2940.

## O

---

- Oyler, G. A., Higgins, G. A., Hart, R. A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F. E. and Wilson, M. C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *The Journal of cell biology* 109, 3039-3052.

## P

---

- Pang, L., Sawada, T., Decker, S. J. and Saltiel, A. R. (1995). Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13585.
- Parpura, V. and Zorec, R. (2010). Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain research reviews* 63, 83-92.
- Pelham, H. R. B. (1999). SNAREs and the Secretory Pathway-Lessons from Yeast. *Experimental cell research* 247, 1-8.
- Perea, G. and Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain research reviews* 63, 93-102.

- Peutz, J. L. A. (1921). Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentation of skin and mucous membrane. *Ned Tijdschr Geneeskde* 10, 134-146.
- Poirier, M. A., Xiao, W., Macosko, J. C., Chan, C., Shin, Y. K. and Bennett, M. K. (1998a). The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nature Structural & Molecular Biology* 5, 765-769.
- Poirier, M. A., Hao, J. C., Malkus, P. N., Chan, C., Moore, M. F., King, D. S. and Bennett, M. K. (1998b). Protease resistance of syntaxin.SNAP-25.VAMP complexes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11370.
- Praefcke, G. J. K., Hofmann, K. and Dohmen, R. J. (2011). SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends in biochemical sciences*.
- Prescott, G. R., Gorleku, O. A., Greaves, J. and Chamberlain, L. H. (2009). Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *Journal of neurochemistry* 110, 1135-1149.

---

**R**

---

- Radeva, G. and Sharom, F. J. (2004). Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochemical Journal* 380, 219.
- Radeva, G., Perabo, J. and Sharom, F. J. (2005). P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *FEBS Journal* 272, 4924-4937.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 3116.
- Riley, B. E., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (2005). SUMOylation of the polyglutamine repeat protein, ataxin-1, is dependent on a functional nuclear localization signal. *Journal of Biological Chemistry* 280, 21942-21948.
- Rizo, J. and Südhof, T. C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 641-653.
- Rizo, J. and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 665-674.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M. and Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *biomedical science* 19, 5548-5557.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12654.
- Ross, H., Armstrong, C. G. and Cohen, P. (2002). A non-radioactive method for the assay of many serine/threonine-specific protein kinases. *Biochemical Journal* 366, 977.
- Rossi, D. J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., Henkemeyer, M., Ristimäki, A., Aaltonen, L. A. and Mäkelä, T. P. (2002). Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 12327.

Rowan, A., Churchman, M., Jefferey, R., Hanby, A., Poulson, R. and Tomlinson, I. (2000). In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours. *The Journal of Pathology* 192, 203-206.

Rui, H. L., Fan, E., Zhou, H. M., Xu, Z., Zhang, Y. and Lin, S. C. (2002). SUMO-1 modification of the C-terminal KVEKVD of Axin is required for JNK activation but has no effect on Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42981.

## S

---

Saitoh, H. and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6252.

Sakamoto, K., Göransson, O., Hardie, D. G. and Alessi, D. R. (2004). Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 287, E310-E317.

Sampson, D. A., Wang, M. and Matunis, M. J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21664-21669.

Saneyoshi, T., Fortin, D. A. and Soderling, T. R. (2010). Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Current opinion in neurobiology* 20, 108-115.

Sapkota, G. P., Kieloch, A., Lizcano, J. M., Lain, S., Arthur, J. S. C., Williams, M. R., Morrice, N., Deak, M. and Alessi, D. R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90RSK and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys433, is essential for LKB1 to suppress cell growth. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19469.

Sapkota, G. P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N. and Alessi, D. R. (2002a). Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *Biochemical Journal* 362, 481.

Sapkota, G. P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A. A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S. P. and Alessi, D. R. (2002b). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochemical Journal* 368, 507.

Sarge, K. D. and Park-Sarge, O. K. (2011). SUMO and Its Role in Human Diseases. *International review of cell and molecular biology* 288, 167.

Schaap, D., van der Wal, J., Howe, L. R., Marshall, C. J. and van Blitterswijk, W. J. (1993). A dominant-negative mutant of raf blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21ras. *Journal of Biological Chemistry* 268, 20232.

Schengrund, C. L. (2010). Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain research bulletin* 82, 7-17.

Scheper, W. and Hol, E. M. (2005). Protein quality control in Alzheimer's disease: a fatal saviour. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* 4, 283-292.

Schubert, D., Heinemann, S. and Kidokoro, Y. (1977). Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat nerve cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 2579.

- Shackelford, D. B. and Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 9, 563-575.
- Shaw, R. (2008). LKB1: cancer, polarity, metabolism, and now fertility. *Biochem. J* 416, e1-e3.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G. and Poo, M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.
- Shelly, M., Lim, B. K., Cancedda, L., Heilshorn, S. C., Gao, H. and Poo, M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* 327, 547.
- Shelly, M. and Poo, M. M. (2011). Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Developmental neurobiology* 71, 508-527.
- Sieburth, D., Ch'ng, Q. L., Dybbs, M., Tavazoie, M., Kennedy, S., Wang, D., Dupuy, D., Rual, J. F., Hill, D. E. and Vidal, M. (2005). Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature* 436, 510-517.
- Sigurdsson, E. M. (2009). Tau-focused immunotherapy for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research*.
- Skaper, S. D. (2008). The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS &# 38; Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets* 7, 46-62.
- Smith, C. M., Shindyalov, I. N., Veretnik, S., Gribskov, M., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F. and Bourne, P. E. (1997). The protein kinase resource. *Trends in biochemical sciences* 22, 444.
- Smith, D. P., Rayter, S. I., Niederlander, C., Spicer, J., Jones, C. M. and Ashworth, A. (2001). LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Human molecular genetics* 10, 2869.
- Snyder, D. A., Kelly, M. L. and Woodbury, D. J. (2006). SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell biochemistry and biophysics* 45, 111-123.
- Sobue, S., Hagiwara, K., Banno, Y., Tamiya Koizumi, K., Suzuki, M., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Nozawa, Y. and Murate, T. (2005). Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12. *Journal of neurochemistry* 95, 940-949.
- Somanath, S., Barg, S., Marshall, C., Silwood, C. J. and Turner, M. D. (2009). High extracellular glucose inhibits exocytosis through disruption of syntaxin 1A-containing lipid rafts. *Biochemical and biophysical research communications* 389, 241-246.
- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Spigelman, A. D., Murday, V. and Phillips, R. K. (1989). Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 30, 1588.
- Stefani, M. and Liguri, G. (2009). Cholesterol in Alzheimers Disease: Unresolved Questions. *Current Alzheimer Research* 6, 15-29.

- Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z. and Cattaneo, E. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304, 100.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-354.
- Südhof, T. C. and Røthman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474.
- Szeberenyi, J., Cai, H. and Cooper, G. M. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology* 10, 5324.

## T

---

- Tan, N. Y. and Khachigian, L. M. (2009). Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* 29, 2483.
- Tang, J., Maximov, A., Shin, O. H., Dai, H., Rizo, J. and Südhof, T. C. (2006). A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 126, 1175-1187.
- Tang, Z., Far, O. E., Betz, H. and Scheschonka, A. (2005). Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8. *Journal of Biological Chemistry* 280, 38153.
- Teng, F. Y. H., Wang, Y. and Tang, B. L. (2001). The syntaxins. *Genome biology* 2, reviews3012.
- Tiainen, M., Ylikorkala, A. and Mäkelä, T. P. (1999). Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G1 cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 9248.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A. and Mäkelä, T. P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21WAF1/CIP1. *Human molecular genetics* 11, 1497.
- Tian, J. H., Das, S. and Sheng, Z. H. (2003). Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26265-26274.
- Timm, T., Matenia, D., Li, X. Y., Grieshaber, B. and Mandelkow, E. M. (2006). Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation. *Neurodegenerative Diseases* 3, 207-217.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4350.
- Towler, M., Fogarty, S., Hawley, S., Pan, D., Martin, D., Morrice, N., McCarthy, A., Galardo, M., Meroni, S., Cigorraga, S. et al. (2008). A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem. J* 416, 1-14.
- Trimble, W. S., Cowan, D. M. and Scheller, R. H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 4538.

---

**U**

---

Ulrich, H. D. (2009). *SUMO protocols*. Humana Press.

**V**

---

Valdez-Taubas, J. and Pelham, H. (2005). Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *The EMBO journal* 24, 2524-2532.

Valera, A. G., Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Ortega, Z. and Lucas, J. J. (2005). The ubiquitin-proteasome system in Huntington's disease. *The Neuroscientist* 11, 583-594.

van Tijn, P., Hol, E. M., van Leeuwen, F. W. and Fischer, D. F. (2008). The neuronal ubiquitin-proteasome system: murine models and their neurological phenotype. *Progress in neurobiology* 85, 176-193.

van Veelen, W., Korsse, S. E., Van De Laar, L. and Peppelenbosch, M. P. (2011). The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* 30, 2289-2303.

Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P. and Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648.

**W**

---

Watts, J. L., Morton, D. G., Bestman, J. and Kempheus, K. J. (2000). The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 127, 1467.

Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H. and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.

Wildonger, J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2008). The Tsc1–Tsc2 complex influences neuronal polarity by modulating TORC1 activity and SAD levels. *Genes & development* 22, 2447.

Wilkinson, K. A., Nishimune, A. and Henley, J. M. (2008). Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs. *Neuroscience letters* 436, 239-244.

Wilkinson, K. A., Nakamura, Y. and Henley, J. M. (2010). Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain research reviews* 64, 195-212.

Wilson, S. M., Bhattacharyya, B., Rachel, R. A., Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D. B., Fletcher, C. F., Miller, R. J., Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. (2002). Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in *Usp14*, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nature genetics* 32, 420-425.

Wood, K. W., Qi, H., D'Arcangelo, G., Armstrong, R. C., Roberts, T. M. and Halegoua, S. (1993). The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: a potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 5016.



## Bibliografia

---

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-[beta] acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism* 2, 21-33.

## X

---

Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D. and Zou, M. H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C- $\zeta$  is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117, 952-962.

## Y

---

Yang, B., Gonzalez, L., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R. J. and Scheller, R. H. (1999). SNARE interactions are not selective. *Journal of Biological Chemistry* 274, 5649.

Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez Jr, L. C. and Scheller, R. H. (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *The Journal of cell biology* 148, 247-252.

Yao, Q., Li, H., Liu, B. Q., Huang, X. Y. and Guo, L. (2011). SUMOylation-regulated Protein Phosphorylation, Evidence from Quantitative Phosphoproteomics Analyses. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27342-27349.

Yeh, E. T. H. (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8223.

Ylikorkala, A., Rossi, D. J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M. and Mäkelä, T. P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* 293, 1323.

Yoshida, H. and Goedert, M. (2011). Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau by Ampk-Related Kinases. *Journal of neurochemistry*.

Young, R. M., Holowka, D. and Baird, B. (2003). A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20746.

Yung, H. S., Lai, K. H., Chow, K. B. S., Ip, N. Y., Tsim, K. W. K., Wong, Y. H., Wu, Z. and Wise, H. (2010). Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells Is Accompanied by Elevated Adenylyl Cyclase Activity. *Neurosignals* 18, 32-42.

## Z

---

Zeqiraj, E., Filippi, B. M., Deak, M., Alessi, D. R. and van Aalten, D. M. F. (2009a). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 326, 1707.

Zeqiraj, E., Filippi, B. M., Goldie, S., Navratilova, I., Boudeau, J., Deak, M., Alessi, D. R. and van Aalten, D. M. F. (2009b). ATP and MO25 $\alpha$  regulate the conformational state of the STRAD $\alpha$  pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS biology* 7, e1000126.

Zeqiraj, E. and van Aalten, D. M. F. (2010). Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators? *Current opinion in structural biology* 20, 772-781.

- Zhang, Y. Q. and Sarge, K. D. (2008). Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates A [beta] aggregate levels. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 673-678.
- Zhao, J. (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cellular and molecular life sciences* 64, 3017-3033.
- Zheng, B., Jeong, J. H., Asara, J. M., Yuan, Y. Y., Granter, S. R., Chin, L. and Cantley, L. C. (2009). Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell* 33, 237-247.
- Zidovetzki, R. and Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768, 1311-1324.
- Zilly, F. E., Sørensen, J. B., Jahn, R. and Lang, T. (2006). Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS biology* 4, e330.
- Zolessi, F. R., Poggi, L., Wilkinson, C. J., Chien, C. B. and Harris, W. A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural development* 1, 2.



# **ANEXOS**



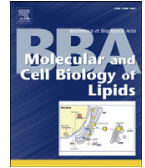
## **ANEXO I:**

**Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid raft:  
modulation of kinase activity by lipid environment.**

***Biochim Biophys Acta. 2011 Dec; 1811(12):1124-35.***

**Rodríguez-Asiain A, Ruiz-Babot G, Romero W, Cubí R, Erazo T, Biondi RM,  
Bayascas JR, Aguilera J, Gómez N, Gil C, Claro E, Lizcano JM.**





## Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment

Arantza Rodríguez-Asiain <sup>a,1</sup>, Gerard Ruiz-Babot <sup>a,1</sup>, Walter Romero <sup>a</sup>, Roger Cubí <sup>a</sup>, Tatiana Erazo <sup>a</sup>, Ricardo M. Biondi <sup>b</sup>, Jose R. Bayascas <sup>a</sup>, Jose Aguilera <sup>a</sup>, Nestor Gómez <sup>a</sup>, Carles Gil <sup>a</sup>, Enrique Claro <sup>a,\*</sup>, Jose M. Lizcano <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Research Group PhosphoSites, Johann Wolfgang Goethe University Hospital, D-60590 Frankfurt, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 July 2011

Received in revised form 29 September 2011

Accepted 5 October 2011

Available online 12 October 2011

#### Keywords:

BRSK1  
SAD kinase  
LKB1  
Lipid raft  
Palmitoylation  
Small multilamellar vesicle

### ABSTRACT

Brain specific kinases 1 and 2 (BRSK1/2, also named SAD kinases) are serine–threonine kinases specifically expressed in the brain, and activated by LKB1-mediated phosphorylation of a threonine residue at their T-loop (Thr189/174 in human BRSK1/2). BRSKs are crucial for establishing neuronal polarity, and BRSK1 has also been shown to regulate neurotransmitter release presynaptically. How BRSK1 exerts this latter function is unknown, since its substrates at the synaptic terminal and the mechanisms modulating its activity remain to be described. Key regulators of neurotransmitter release, such as SNARE complex proteins, are located at membrane rafts. Therefore we initially undertook this work to check whether BRSK1 also locates at these membrane microdomains. Here we show that brain BRSK1, but not BRSK2, is palmitoylated, and provide biochemical and pharmacological evidences demonstrating that a pool of BRSK1, but not BRSK2 or LKB1, localizes at membrane lipid rafts. We also show that raft-associated BRSK1 has higher activity than BRSK1 from non-raft environment, based on a higher T-loop phosphorylation at Thr-189. Further, recombinant BRSK1 activity increased 3-fold when assayed with small multilamellar vesicles (SMV) generated with lipids extracted from synaptosomal raft fractions. A similar BRSK1-activating effect was obtained with synthetic SMV made with phosphatidylcholine, cholesterol and sphingomyelin, mixed in the same molar ratio at which these three major lipids are present in rafts. Importantly, SMV also enhanced the activity of a constitutively active BRSK1 (T189E), underpinning that interaction with lipid rafts represents a new mechanism of BRSK1 activity modulation, additional to T-loop phosphorylation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Brain specific kinases 1 and 2 (BRSK1 and BRSK2, also referred as SAD-B and SAD-A, respectively) are mammalian serine/threonine kinases that belong to the AMPK-related subfamily of protein kinases, which are specifically expressed in the brain. The tumor suppressor protein kinase LKB1 activates BRSK1/2 by phosphorylating a

*Abbreviations:* ABE, acyl-biotinyl exchange; Biotin-BMCC, 1-biotinamido-4-(4'-[maleimidoethyl-cyclohexane]-carboxamido)butane; BRSK, brain specific kinase; DRM, detergent-resistant membranes; MARK, microtubule-associated protein kinase; mβCD, methyl-β-cyclodextrin; NEM, N-ethylmaleimide; SAD, synapses of amphids defective; SMV, small multilamellar vesicles; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

\* Corresponding authors at: Institut de Neurociències, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain. Tel.: +34 935 813 076; fax: +34 935 811 573.

E-mail addresses: [enrique.claro@uab.es](mailto:enrique.claro@uab.es) (E. Claro), [josemiguel.lizcano@uab.es](mailto:josemiguel.lizcano@uab.es) (J.M. Lizcano).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

conserved threonine residue in the T-loop of the kinase domain, Thr189 and Thr174 in human BRSK1 and BRSK2, respectively [3,7,25,37]. Fujimoto et al. also described that CAMKK also could act as a BRSK T-loop kinase in both, cell-free system and COS-7 cells over-expressing CAMKK and BRSKs [13]. However, other authors provided evidences that CAMKK is not an upstream kinase for the BRSKs when they over-expressed those proteins in HeLa cells [7]. Nevertheless, Barnes et al. showed the absence of p-Thr of BRSKs in cultures of cortical neurons lacking LKB1 (from cortical neuron conditional LKB1 KO mice) [3]. This work, thus, unequivocally demonstrates that LKB1 is the only BRSK upstream kinase in cortical neurons.

BRSK1<sup>-/-</sup> BRSK2<sup>-/-</sup> double knockout mice died within two hours of birth, showing a smaller forebrain and abnormal thin cortex compared to control mice [22]. Because hippocampal and cortical neurons from double knockout mice lack axons and dendritic processes, it was concluded that BRSKs are required for neuronal axon/dendrite specification *in vivo* [22]. The mechanisms by which BRSKs regulate such process include: a) phosphorylation of microtubule-associated protein Tau at Ser262 [22] that, in turn, allows the re-organization of microtubules required for axon growth;



and b) phosphorylation of cell-cycle checkpoint kinase Wee1 at Ser642 [26], promoting Wee1 down-regulation that is essential for neuronal polarity [29]. Interestingly, two independent laboratories have shown that LKB1, the BRSK1/2-activating kinase, is also required for axon initiation during cortical and hippocampal neuronal polarization [3,37]. Thus, the LKB1-BRSK1/2 is the first signaling pathway that has been proposed to specify neuronal polarity in vivo (reviewed in Ref. [4]).

BRSK1/2 proteins are evolutionarily conserved and single orthologs have been described in *Drosophila* (CG6114) and *Caenorhabditis elegans* (SAD-1, Synapses of Amphids Defective 1). First studies using a genetic screening for synapse-formation deficient mutants in *C. elegans* identified SAD-1 as a protein kinase that regulates correct synapse development and presynaptic vesicle clustering in both, sensorial and motor neurons [11]. Mammalian BRSK1 was later characterized as a presynaptic kinase that associates with synaptic vesicles at the active zone cytomatrix of presynaptic terminals [18]. Over-expression of active BRSK1, but not inactive BRSK1, in cultured hippocampal neurons results in an increase in the frequency of miniature excitatory postsynaptic current (mEPSC), indicating that BRSK1 presynaptically regulates neurotransmitter release [18].

Lipid rafts, also called detergent-resistant membranes (DRM), are cholesterol- and sphingolipid-rich dynamic membrane microdomains that incorporate specific proteins. Lipid rafts have a major impact on the physiology of the neuron. Among others, lipid rafts regulate neurotransmitter signaling by allowing the clustering of neurotransmitter receptors and, therefore, promoting close proximity or segregation of signaling molecules [2]. Synaptic proteins such as synaptotagmin and the soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor (SNARE) proteins that are essential for exocytosis of synaptic vesicles also localize in lipid rafts [15,23]. In the present study, we describe a pool of BRSK1 that tightly associates to membranes of cultured neuronal cells and rat brain synaptosomes, which is resistant to solubilization by nonionic detergents such as Triton X-100. We also provide biochemical evidences that show for the first time the association of BRSK1 with lipid rafts isolated from rat brain synaptosomes. We also show that raft-associated BRSK1 has higher kinase activity than BRSK1 from non-raft environment. Moreover, vesicles containing lipids extracted from raft fractions specifically activated BRSK1 kinase activity in vitro.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Antibodies

Affinity-purified polyclonal antibodies anti-BRSK1 or anti-BRSK2 were raised in sheep against the peptide SPRRGPPKDKKLLATNGTPLP (corresponding to the C-terminal residues 774–794 of human BRSK1) or the peptide LSWGAGLKGQKVATSYESSL (residues 655–674 of human BRSK2), as previously described [25]. These antibodies discriminate between BRSK1 and BRSK2, and can be used for immunoblot, immunoprecipitation or immunocytochemical analysis. The phosphospecific antibody recognizing the phosphorylated form of the T-loop (Thr189) was raised in sheep against the peptide VGDSLLE(p)TSCGSPHY (residues 182–196 of human BRSK1) and affinity-purified. Both anti-BRSK1 antibodies were a gift of D.R. Alessi (MRC Protein phosphorylation Unit, Dundee, UK). Antibody from clone OX-7 recognizing Thy1 protein was a gift of G. Schiavo (Cancer Research UK, London). Other antibodies were purchased from the suppliers as follows: anti-Transferrin Receptor (TfR) monoclonal antibody (Zymed Laboratories Inc.), anti-Flotillin-1 (BD-Transduction Laboratories), anti-GAPDH monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, USA), anti-Synaptophysin and anti-Src monoclonal antibodies (Sigma, Spain), anti phospho-S262Tau

(Biosource, UK), anti-LKB1 (Upstate, UK), anti-GST (Sigma, Spain), anti-GFAP (Abcam, Spain).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Cell culture

Human embryonic kidney HEK293 cells were cultured in 10-cm diameter dishes at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium (Sigma, Spain), containing 10% fetal bovine serum (FBS). Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured in 10-cm diameter dishes at 37 °C under humidified air (5% CO<sub>2</sub>) in DMEM F-12 HAM medium (Sigma, Spain), containing 15% fetal bovine serum (FBS). Primary cultures of rat and mouse cortical neurons were prepared from fetal Sprague–Dawley rats (17 days of gestation) or from fetal mice (15 days of gestation). Briefly, brain cortices were dissected, enzymatically dissociated and diluted in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Cells were plated in poly-D-lysine coated 24-well plate, at a density of 30,000 cells/cm<sup>2</sup>, and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Two hours after plating, the medium was replaced by serum-free Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Gibco, USA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, UK), penicillin/streptomycin and 0.6% (w/v) glucose. Every 3 days, half of the medium was replaced with fresh medium. The procedures followed were in line with the guidelines of the Animal Care and Use Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

#### 2.2.2. Preparation of purified rat brain synaptosomes

Purified rat brain synaptosomes were isolated from 4 to 6 weeks old Sprague–Dawley rats as previously described with minor modifications [12,14]. The whole brain was homogenized in 50 ml of 50 mM phosphate buffer containing 150 mM NaCl and 0.32 M sucrose using a Teflon glass homogenizer (12 strokes at 900 rpm). After centrifugation at 1000 g for 5 min at 4 °C, the resulting supernatant was overlaid on half volume of sodium buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.4) containing 1.2 M sucrose in Beckman SW41 ultracentrifuge tubes. After centrifugation at 180,000 g for 15 min, synaptosomes that fractionate at the interface were collected, mixed with an equal volume of sodium buffer containing 0.32 M sucrose and layered on one volume of sodium buffer containing 0.8 M sucrose in Beckman SW41 ultracentrifuge tubes. After centrifugation at 180,000 g for 15 min, pure synaptosomes precipitated at the bottom of the tube were resuspended in sodium buffer.

#### 2.2.3. Subcellular fractionation

Three 10-cm dishes of either SH-SY5Y cells, mouse or rat cortical neurons were homogenized in 3 ml of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, complete protease inhibitor cocktail (Sigma, Spain)) using a Dounce homogenizer (50 strokes). The homogenates were centrifuged twice at 3000 g for 10 min at 4 °C to remove unbroken cells and nucleus. The resulting supernatant was centrifuged at 200,000 g for + 60 min at 4 °C to obtain the cytosolic fraction (supernatant) and the membrane fraction (pellet). After washing the membranes by resuspending them in buffer A and centrifugation at 200,000 g 1 h at 4 °C, the pellet (membrane fraction) was homogenized in buffer A containing 1% (w/v) Triton X-100, rotated for 45 min at 4 °C and centrifuged at 200,000 g for 60 min at 4 °C. The resulting supernatant (Triton-solubilized membrane proteins) was collected, and the final pellet resuspended in 1% SDS (Triton-resistant membrane proteins). Protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard [6].

#### 2.2.4. Immunoblot analysis

Immunoblotting was performed as described previously [25]. Briefly, proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to

nitrocellulose membrane (Whatman, UK). Membranes were blocked with TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20) containing 5% skimmed milk, and incubated with the indicated primary antibody. Detection was performed incubating with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce, Rockford, IL, USA) and the enhanced chemiluminescence reagent (GE Healthcare, Spain).

#### 2.2.5. Isolation of detergent resistant membranes (DRM) from rat brain synaptosomes (sucrose density gradients)

The cholesterol-rich lipid rafts from rat brain synaptosomes were isolated as described previously [15,15]. Briefly, fresh purified synaptosomes were incubated with sodium buffer containing 1% Triton X-100 (30 min at 4 °C) or 1% Brij 98 (20 min at 37 °C). Then, 1.5 ml fractions (2 mg/ml protein) were mixed with 90% (w/v) sucrose in sodium buffer to give a final concentration of 45% (w/v), and then overlaid successively with 6 ml of 35% (w/v) sucrose and 3 ml of 5% (w/v) sucrose in sodium buffer in a SW41 centrifugation tube. After centrifugation at 35,000 rpm for 18 h at 4 °C in a SW 41Ti Rotor (Beckman, USA.), ten 1 ml fractions were collected from the top. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD, Sigma, Spain) treatments were performed with purified synaptosomes prior to detergent solubilization. M $\beta$ CD was added to purified synaptosomes to a final concentration of 50 mM, incubated at 37 °C for 30 min and centrifuged at 3000 g for 5 min. The resulting pellet was resuspended in sodium buffer containing 1% Brij 98 and sucrose density gradients were performed as stated above.

#### 2.2.6. Acyl-biotinyl exchange (ABE) assay for protein palmitoylation

Endogenous BRSK1 and BRSK2 palmitoylation assays were performed as described previously with minor modifications [16]. Briefly, after immunoprecipitating the corresponding protein from 1.5 mg of rat brain lysate, the immunoprecipitates were incubated with 10 mM N-ethylmaleimide (NEM) in buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) at 4 °C for 1 h, followed by treatment with either 1 M hydroxylamine (pH 7.2) or control 1 M Tris-HCl (pH 7.2) for 1 h at room temperature. This treatment cleaves the thioester bond and exposes the reactive cysteines by detaching the palmitic acid. Beads were then incubated with fresh made 1  $\mu$ M 1-biotinamido-4-(4'-[maleimidoethyl-cyclohexane]-carboxamido)butane (biotin-BMCC) (pH 6.2) for 1 h at 4 °C to label reactive cysteine residues, and washed twice with 1% Triton X-100 and 0.1% SDS in buffer B and one time with 10 mM Tris-HCl pH 7.4. Bound protein was eluted with 80  $\mu$ l of elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA and 2% SDS). After diluting 20 times in buffer B (containing 1% (w/v) Triton X-100), biotinylated BRSK was affinity-purified using avidin-conjugated agarose beads (Sigma) for 1 h at 4 °C. Beads were then washed twice with 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and bound protein was released by denaturing in SDS sample buffer and processed for immunoblotting with the appropriate antibody.

#### 2.2.7. Immunofluorescence microscopy

Mouse or rat cortical neurons grown for 12 days in vitro were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Fixed cells were permeabilized with 0.02% saponin in phosphate buffer saline (PBS) for 7 min, incubated with 0.01% saponin in PBS containing 10 mM glycine for 15 min, and blocked for 1 h with 5% (w/v) BSA in PBS containing 0.01% saponin and 10 mM glycine. Then, cells were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody diluted in 1% BSA in PBS containing 0.01% saponin, followed by incubation for 45 min with the corresponding secondary antibody (Alexa fluor 594 donkey anti-sheep IgG and Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG antibodies (1:400) and Hoechst 33259 (Invitrogen)). The cells were visualized by fluorescence microscopy in a Nikon Eclipse 90i epifluorescence microscope (Nikon Instruments, USA).

#### 2.2.8. Baculovirus expression of BRSK1 and BRSK2 and purification

pFastBAC vector encoding N-terminal hexahistidine-tagged BRSK1 or BRSK2 were a gift from D.R. Alessi (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK) and were used to generate recombinant baculovirus using the Bac-to-Bac system (Invitrogen, UK). Then, *Spodoptera frugiperda* 21 cells ( $1.5 \times 10^6$ /ml) were infected at a multiplicity of infection of 5 with the corresponding baculovirus and harvested 72 h post-infection. His-tagged proteins were purified as described for His-NEK6, using 5 ml Ni-NTA-agarose resin [25]. BRSK1 and BRSK2 were purified with yields of approx. 5 mg/L (BRSK1) or 10 mg/L (BRSK2) of infected cells, and were greater than 90% homogeneous as judged by densitometric scanning of Coomassie Blue-stained SDS/PAGE gels.

#### 2.2.9. Expression of MARK4 and LKB1:STRAD:MO25 complex in 293 cells and purification

pEBG-2T vector was used to express MARK4 with N-terminal glutathione S-transferase (GST) tag [25]. Twenty 10-cm diameter dishes of HEK293 cells were cultured and each dish transfected with 5  $\mu$ g of the pEBG2T-MARK4 vector, using polyethylenimine reagent (PEI, Warrington, USA). 36 h post-transfection cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% (w/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium- $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 M sucrose, 0.1% (vol/vol) 2-mercaptoethanol and complete protease inhibitor cocktail) and centrifuged at 12,000 g for 12 min at 4 °C. GST-MARK4 was purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose resin (GE Healthcare, Spain), and eluted in kinase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1% (vol/vol) 2-mercaptoethanol) containing 40 mM glutathione and 0.27 M sucrose. Purified MARK4 protein was 85% homogeneous as judged by densitometric scanning of Coomassie Blue-stained SDS/PAGE gels loaded with 20  $\mu$ g of protein.

Twenty 10-cm diameter dishes of HEK293 cells were transfected with 3  $\mu$ g each of the vectors encoding for GST-LKB1, FLAG-STRAD $\alpha$  and Myc-MO25 $\alpha$ . 36 h post transfection cells were lysed in ice-cold lysis buffer, centrifuged at 12,000 g for 12 min at 4 °C, and trimeric LKB1:STRAD:MO25 active complex affinity purified on glutathione-Sepharose as described previously [25].

#### 2.2.10. Expression and purification of proteins in bacterial cells

The pGEX constructs encoding for GST-tagged human Tau protein and BRSK1-T189E constitutively active mutant were transformed in *Escherichia coli* BL21 cells. One liter culture grown at 37 °C in Luria Broth (LB) supplemented with 50  $\mu$ g/ml ampicillin was grown until the absorbance at 600 nm was 0.8. 100  $\mu$ M isopropyl- $\beta$ -D-galactoside was then added, and cells were cultured for a further 18 h at 26 °C before harvesting by centrifugation at 4000 g at 4 °C for 30 min. Pelleted cells were resuspended in 50 ml of ice-cold lysis buffer, lysed in one round of freeze/thawing, sonicated (5  $\times$  30 s) and centrifuged at 25,000 g for 40 min. Recombinant proteins were affinity purified on glutathione-Sepharose resin (GE Healthcare, Spain) as described above for recombinant MARK4 [25].

#### 2.2.11. Kinase activity assay

Kinase activity assay was performed in a total assay volume of 40  $\mu$ l containing the stated amount of the kinase in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, 10 mM magnesium acetate, 0.2 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (300 cpm/pmol) and the indicated concentration of peptide substrate. Assays were carried out at 30 °C and at the time indicated reactions were terminated by applying 30  $\mu$ l of the reaction mixture onto p81 phosphocellulose paper (2  $\times$  2 cm). p81 papers were washed in phosphoric acid, and the incorporated radioactivity was measured by scintillation counting as described previously [25]. Time-course assays were carried out to ensure that rate of phosphorylation was linear with time and protein concentration. The

kinetic parameters were calculated according to the Michaelis–Menten relationship by non-linear regression analysis using the computer program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc). One unit of activity is the amount of enzyme that catalyzes the phosphorylation of 1 nmol of peptide substrate per min.

#### 2.2.12. Lipid extraction from rafts and non-rafts fractions and preparation of raft and non-raft vesicles

Lipids in raft fractions were extracted according to Bligh and Dyer [5]. In brief, 4.8 mL of chloroform/methanol (1:2, vol/vol) was added to 1 mL raft or non-raft fractions in glass tubes. The mix was thoroughly shaken, left at room temperature for 30 min and 2 mL each of chloroform and water were added to split two phases. After shaking again, the tubes were centrifuged 10 min at 2000 g, and the upper (aqueous) phase was discarded. 3.2 mL of the chloroform phase were then transferred to a new glass tube, taking care not to disturb the interface, and were re-extracted after adding 6 mL methanol/water (1:1, vol/vol). After shaking and centrifuging to separate the new phases, 3 mL of the chloroform phase (lipid extract) were evaporated in a new glass tube under a nitrogen stream. After adding 1 mL of 20 mM HEPES buffer, pH 7.5, containing 100 mM NaCl, the tube was left at room temperature for 1 h, then vortexed to form a cloudy suspension. Vesicles from raft or non-raft lipids were formed by sonicating with a probe until the suspension became clear (~30 s).

#### 2.2.13. Determination of major lipids in raft fractions and generation of synthetic vesicles containing defined lipids

Samples (10–40  $\mu$ L) of the lipid extract described above were spotted on silica gel HPTLC plates with concentration zone (Merck). To determine cholesterol, different amounts (5–20  $\mu$ g) of cholesterol (Sigma, Spain) were also applied in different lanes and the plate was developed with hexane/diethylether/acetic acid (70:30:1, vol/vol/vol). After spraying with primuline (5 mg of primuline in 100 mL of acetone/water (80:20, vol/vol)), lipids were visualized under UV light. Bands corresponding to cholesterol in extracts were identified by comparison with standard cholesterol in neighboring lanes, and were quantified by densitometry with ImageJ 1.43r (Wayne Rasband, National Institutes of Health; [rsb.info.nih.gov](http://rsb.info.nih.gov)). After calculating the slopes of cholesterol in lipid extract samples ( $\text{mL}^{-1}$ ) and standard cholesterol ( $\text{mg}^{-1}$ ) by linear regression, cholesterol concentration was the quotient between both slope values ( $\text{mg/mL}$ ). The same approach was used to determine phosphatidylcholine and sphingomyelin, but in this case plates were developed with chloroform/methanol/acetic acid/water (60:50:1:4, vol/vol/vol/vol) as mobile phase.

Appropriate volumes of 1 mg/mL chloroform solutions of phosphatidylcholine (1-palmitoyl, 2-oleoyl), cholesterol and sphingomyelin were pooled in a glass tube and evaporated with nitrogen to give the indicated mixture of phosphatidylcholine (1-palmitoyl, 2-oleoyl), cholesterol and sphingomyelin. Vesicles with defined lipids were formed exactly as those with raft lipids.

#### 2.2.14. Lipid–protein overlay assays

Lipid–protein overlay assays were performed using affinity purified GST-BRSK1 and PIP-Strips™ and SpHINGOSTRIPS™ membranes containing the indicated lipids (Echelon Biosciences, Salt Lake City), following the manufacturer's protocol. Briefly, membranes were blocked with blocking solution (3% BSA for PIP-strips, or 1% skimmed milk for SpHINGOSTRIPS in TBS-T), and incubated with either 0.5  $\mu$ g/ml of GST (control) or GST-BRSK1 for 1 h at room temperature. After three washes with TBS-T (10 min each), membranes were then incubated with rabbit anti-GST antibody in blocking solution, and washed three times with TBS-T (10 min each). Detection was performed incubating with an anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and the enhanced chemiluminescence reagent.

#### 2.2.15. Data analysis

Figures, tables, and statistical analyses were generated using Microsoft Excel, ImageJ, Prism 3.0, or Adobe Photoshop software. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA followed for Turkey's multiple comparison test correction. Student's *t* test analysis was performed when only two means were compared.

### 3. Results

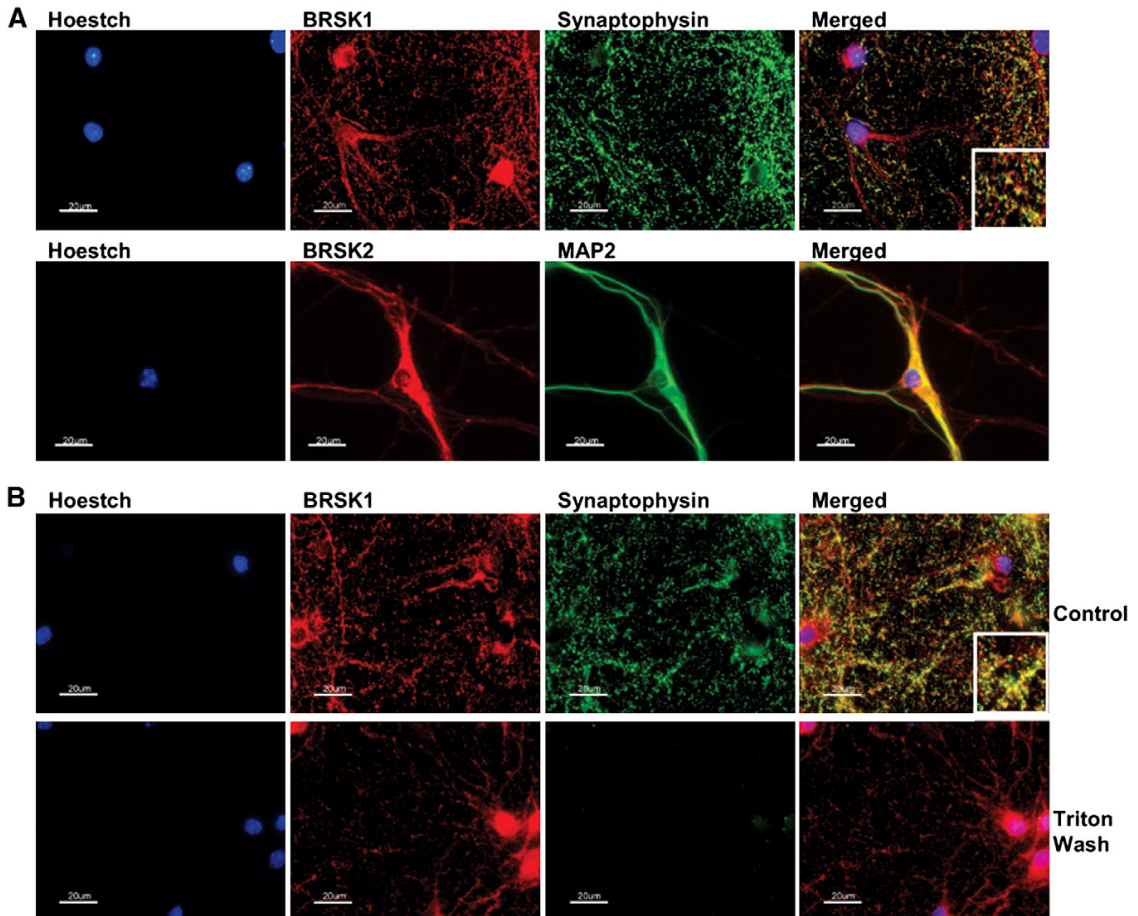
#### 3.1. Localization of BRSK1/SAD-B at a membrane fraction resistant to Triton-X100 solubilization

We first examined BRSK1 and BRSK2 localization by immunostaining mouse cortical cells and visualizing in a fluorescence microscopy. As it has been previously reported for mouse hippocampal neurons [18], BRSK1 showed a punctuate pattern, similar to that observed for the synaptic vesicle protein marker synaptophysin (Fig. 1A, upper panels). BRSK1 signal was also detected in cell bodies and co-localized with neuronal dendrite marker MAP2 (Supplementary Fig. 1A). In contrast, BRSK2 mainly located throughout the neuron in both axon and dendrites and co-localization with MAP2 is shown (Fig. 1A, lower panels), but showed poor co-localization with synaptophysin (Supplementary Fig. 1A). We also observed some glial (non-neuron) staining for both BRSKs. Supplementary Fig. 1B shows BRSK1 and BRSK2 staining thorough astrocyte cells (visualized with protein GFAP marker). This is the first report showing BRSKs proteins in glial cells.

As previously reported by Inoue et al. using hippocampal neurons [18], short treatment of rat cortical neurons with 0.1% Triton X-100 prior to formaldehyde fixation resulted in extraction of synaptophysin, a Triton X-100-soluble membrane protein, whereas it did not affect BRSK1 staining (Fig. 1B, Triton wash panels). These results suggest that BRSK1 is tightly associated at the synaptic terminal, perhaps located at the membrane of the synaptic vesicles.

Since the preceding data suggested that BRSK1 could localize at membranes, we next examined the subcellular localization of BRSK1. To do so, we performed subcellular fractionation to obtain cytosolic and membrane fractions from a human cell line (neuroblastoma SH-SY5Y), primary neuronal cells (mouse and rat cortical cells) and rat brain synaptosomes (Fig. 2). For all four samples the final pellet containing cellular membranes was subjected to Triton X-100 solubilization to obtain the Triton-soluble membrane proteins (S) and Triton-resistant membrane proteins (P). The quality of the different fractions was assessed by immunodetection of the proteins GAPDH (cytosolic marker), transferrin receptor (Triton-soluble membrane protein) and Thy-1 (Triton-insoluble membrane protein). Thy-1 rendered a very poor signal in mouse cortical neurons, so the purity of Triton-insoluble membrane fraction was re-assessed using an antibody that recognizes the tyrosine kinase Src.

BRSK1 was detected in both cytosolic and membrane fractions of SH-SY5Y, mouse cortical and rat cortical cells, whereas all BRSK1 from rat brain synaptosomes was obtained at the membrane fraction. BRSK1 upstream kinase LKB1 was absent from cellular and synaptosomal membranes. Consistent with results shown in Fig. 1B, the membrane pool of BRSK1 was resistant to Triton X-100 solubilization (Fig. 2). The cytosolic localization of BRSK1 observed in cultured cells (Fig. 2) is also consistent with BRSK1 immunostaining at the cortical neuron cell bodies (Fig. 1). It is important to mention that BRSK1 antibody rendered double bands (80–90 kDa) when used in western blot assays, as it has been reported by others using other anti-BRSK1 antibodies [3,18]. Treating cells with different stresses, factors, serum withdrawal or phosphatase inhibitors does not change this band pattern (results not shown). On the other hand, detailed analysis of BRSK1 genomic sequence reveals two ATG starting codons for this gene, so it is likely



**Fig. 1.** BRSK1 tightly associates with synaptic vesicles in cortical neurons. Immunofluorescence microscopy. (A) Mouse cortical neurons were cultured for 10 days, fixed with paraformaldehyde and immunofluorescent stained for BRSK1 (red, upper panels), BRSK2 (red, lower panels) and synaptophysin or MAP2 (green). Left panels show nuclei staining (Hoestch). (B) Rat cortical neurons were cultured, fixed and immunofluorescent stained as in (A). Where indicated (Triton wash), cells were pre-incubated with 0.1% Triton X-100 for 90 s, prior to paraformaldehyde fixation. Similar results were obtained in four independent experiments. The scale bar represents 20  $\mu$ m.

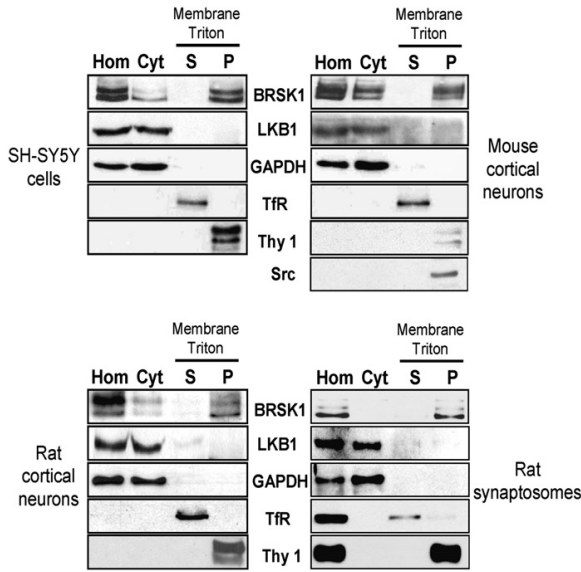
that the double band pattern observed could correspond to an alternative splicing of the BRSK1 gene.

### 3.2. Localization of BRSK1/SAD-B at membrane lipid rafts

Having shown that the pool of cellular BRSK1 associated with membrane fraction was resistant to nonionic detergent solubilization, we next asked if BRSK1 could localize at membrane rafts. Lipid rafts are membrane microdomains enriched with cholesterol and sphingolipids that are insoluble in nonionic detergents and display low density in equilibrium sedimentation [8]. We solubilized rat brain synaptosomes with Triton X-100 at 4 °C prior to separate the detergent resistant membranes (lipid rafts) by discontinuous sucrose gradient centrifugation. After centrifugation, 10 fractions from the top of the tube were collected; insoluble lipid rafts and their associated proteins migrate to the upper region of the gradient, whereas the detergent-soluble proteins remain at the lower region. The upper panel of Fig. 3A shows the protein and cholesterol concentration of the fractions collected. Protein concentration of the fractions showed a dual distribution, a minor peak at the low density fractions 2–4 and

a larger peak at the non-raft fractions 7–10. As it has been previously reported by others [28], lipid raft fraction 3 showed a 3-fold enrichment in cholesterol content. The efficient preparation of lipid rafts was also demonstrated by immunoblot analysis of collected fractions, which showed the presence of the lipid raft marker flotillin-1 in fractions 2–3 only, indicating that these fractions contained membrane raft microdomains. This analysis also showed the presence of the non-raft marker transferrin receptor at the soluble fractions. BRSK1 immunoreactivity was detected in both raft fractions 2–3 and non-raft fractions 8–10 (Fig. 3A, lower panels), whereas the closely related BRSK2 isoform and BRSK1/2 upstream activator LKB1 kinase were only present at the non-raft fractions. Densitometric analysis revealed that about 40% of synaptosomal BRSK1 is associated with membrane rafts (results not shown).

We also isolated rafts at physiological temperature (37 °C) using the nonionic detergent Brij 98. Fig. 3B (upper panel) shows the protein and cholesterol profile of the obtained fractions, that was increased in fractions 2–4. As shown in Fig. 3C (control panels), the efficiency of the preparation was assured by immunoblot analysis of the markers transferrin receptor (totally solubilized) and flotillin-1

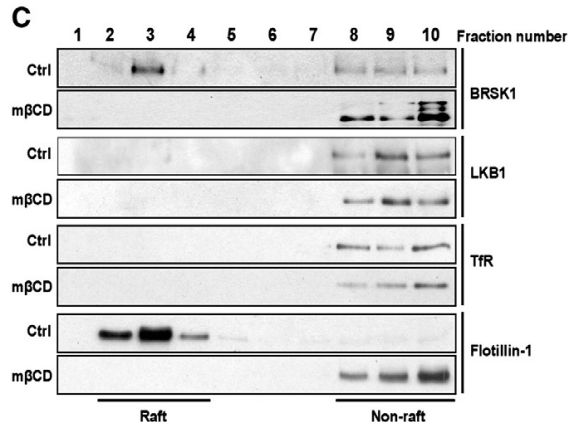
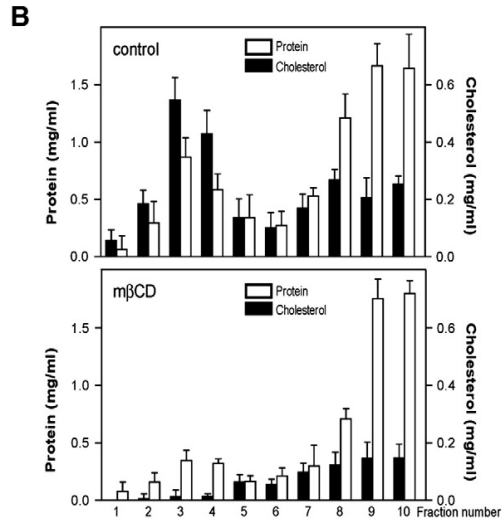
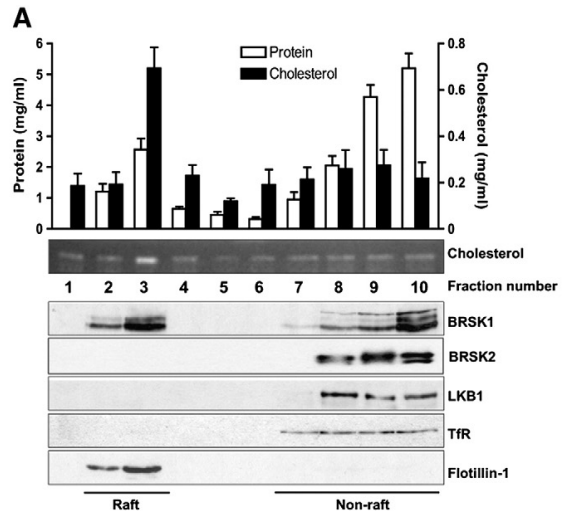


**Fig. 2.** Subcellular localization of BRSK1. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells, mouse cortical neurons, rat cortical neurons and rat synaptosomes were fractionated as described in the Materials and methods section. Hom, homogenate; Cyt, cytosol. The pellet containing the membrane fraction was solubilized with 1% Triton X-100 and centrifuged to obtain supernatant (S, Triton-solubilized proteins) and pellet (P, Triton-resistant proteins). 10 µg of each fraction was analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Similar results were obtained in three independent experiments.

(present only at the raft fractions 2–4). Regarding BRSK1, raft fraction 3 showed considerably higher BRSK1 content than non-raft fractions 8–10, whereas LKB1 was only present in the non-raft fractions. Thus, using two different nonionic detergents and two different extraction temperatures, we show that a considerable portion of synaptosomal BRSK1, but not BRSK2 or its upstream kinase activator LKB1, is associated to lipid raft microdomains.

As stated above, classical membrane lipid rafts are enriched in cholesterol. To further confirm the association of BRSK1 with membrane rafts, synaptosomes were treated with 50 mM methyl-β-cyclodextrin (mβCD), prior to Brij 98 extraction. mβCD is a drug widely used to selectively extract cholesterol from membranes, causing membrane rafts dispersion, therefore modulating the location of the raft-associated proteins. [41]. As expected, mβCD treatment resulted in loss of cholesterol in fractions 2–4 (Fig. 3B lower panel), and in disassociation of BRSK1 and flotillin-1 from lipid raft fractions

2–4, appearing instead in non-lipid raft fractions 8–10 (Fig. 3B, mβCD panels). Taken together these results demonstrate that BRSK1 associates with cholesterol-enriched membrane rafts.



**Fig. 3.** BRSK1 localization in lipid rafts from rat brain synaptosomes. (A) Distribution of protein, cholesterol, BRSK1, BRSK2, LKB1 and raft markers in sucrose gradient fractions from rat brain synaptosomes solubilized with 1% Triton X-100 at 4 °C. The upper panel shows the protein (open bars) and cholesterol (filled bars) content of each fraction, and represent the means ± SD from three different experiments. Cholesterol was visualized under UV light after primuline staining of the TLC plates, as shown in the middle panel, then quantified by densitometry. Lower panels show immunoblot analysis for the indicated proteins. TfR, transferrin receptor (non-raft protein marker); Flotillin-1, raft protein marker. Immunoblots are representative of five separate experiments. (B–C) Effect of cholesterol depletion on the levels of BRSK1 and raft makers proteins. Rat brain synaptosomes were treated with 50 mM methyl-β-cyclodextrin (mβCD) for 15 min, prior to solubilization with 1% Brij-98 at 37 °C and fractionation in discontinuous sucrose gradient. (B) Protein (open bars) and cholesterol (filled bars) content of each fraction collected in (B), and determined as stated in (A). Each value represents the means ± SD from three different experiments. (C) Representative immunoblots of four separate experiments.

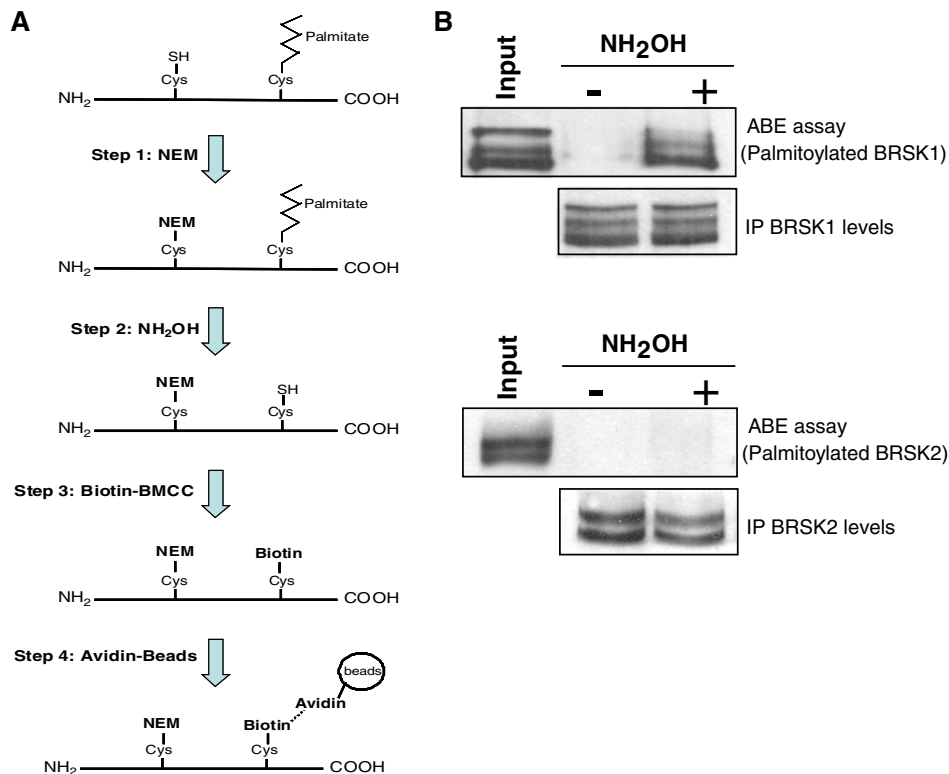
### 3.3. BRSK1, but not BRSK2, is palmitoylated in the brain

Next we asked how BRSK1 is targeted (anchored) at the membrane fraction. Since BRSK1 lacks transmembrane domain we explored the possibility of a lipid-binding motif within the BRSK1 sequence. We performed extensive lipid-protein overlay assay, and concluded that BRSK1 does not bind major lipids present at raft microdomains, such as sphingolipids (sphingosine-1-P, sphingomyelin), ceramide, or cholesterol (data not shown). We also observed that BRSK1 does not bind membrane lipid such as phosphoinositides, phosphatidylinositols, phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, or other phospholipids (PtdSer, PtdEtn, PtdCho) (data not shown). However, lipidic posttranslational modifications such as palmitoylation have been shown to be involved in the targeting of many proteins to membrane lipid rafts. Thus, we next studied if rat brain BRSK1 is palmitoylated, by using the acyl-biotin exchange (ABE) method. Briefly, this non-radioactive method replaces biotin for palmitoyl residues through three chemical steps (Fig. 4A): blockade free cysteine thiols with N-ethylmaleimide; Cys-palmitoyl thioester cleavage with hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ); and labeling newly exposed thiols with the thiol-specific reagent biotin-BMCC. Finally, the resultant biotinylated proteins are affinity purified using avidin-agarose beads, and the palmitoylated proteins detected by immunoblot [16]. Control samples not treated with  $\text{NH}_2\text{OH}$  do not have exposed cysteine thiols

and they are not labeled with biotin-BMCC. Fig. 4B (upper panels) shows that labeling was obtained only when rat brain BRSK1 immunoprecipitates were pretreated with hydroxylamine, indicating that endogenous BRSK1 is palmitoylated in the brain. In agreement with our result showing the absence of BRSK2 in lipid rafts, the corresponding ABE assay did not show any label for BRSK2 indicating that rat brain BRSK2 is not palmitoylated (Fig. 4B, lower panels).

### 3.4. Raft-associated BRSK1 has enhanced kinase activity

We next asked if the lipid raft environment could have any effect on BRSK1 activity. To do so, we first designed experiments to measure BRSK1 kinase activity from both, raft- and non-raft fractions. The antibody anti-BRSK1 used in this work is suitable for immunoprecipitating endogenous BRSK1, whose kinase activity can then be measured by the radiochemical *in vitro* kinase assay described in the section Methods. Using this assay we routinely measure BRSK1 activity from brain and cultured cell samples. Using our standard method, we were unable to immunoprecipitate BRSK1 from lipid raft fractions. As it has been described by others [34], it was necessary to dilute raft preparations into radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer to obtain BRSK1 in the immunoprecipitates. However, RIPA buffer contains 0.1% SDS that irreversibly inhibits BRSK1 kinase activity. To avoid this problem we decided to check BRSK1 activity status by



**Fig. 4.** Rat brain BRSK1, but not BRSK2, is palmitoylated. (A) Scheme of the acyl-biotin exchange (ABE) method. Lysing of the samples and immunoprecipitation of the protein is performed in the presence of NEM to block any preexisting free sulfhydryls (step 1). Unlike the thioester bonds (palmitoylated cysteines), Cys residues covalently attached to NEM are not sensitive to hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ). Thus,  $\text{NH}_2\text{OH}$  treatment generates free sulfhydryls (step 2), then react with biotin alkylating reagent (BMCC, Step 3). Finally, the biotin-alkylated Cys residues are pulled-down using avidin-agarose beads (step 4). (B) ABE assay for BRSK1 and BRSK2 palmitoylation. Method was performed as described in the Methods section. Protein was visualized by immunostaining with the corresponding antibody, and palmitoylated BRSK1, but not BRSK2, shows a hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ )-dependent detection. As control, lower panel shows the immunoblot of a portion of the starting protein, before ABE purification. Similar results were obtained from three independent experiments.

monitoring phosphorylation of Thr189. BRSK1 is activated by LKB1-catalyzed phosphorylation of the T-loop threonine 189. Since mutation of Thr189 to Ala prevents activation, and mutation to Glu results in a constitutively active form of BRSK1, phosphorylation of Thr189 correlates with BRSK1 kinase activity [25]. We generated and purified a phosphospecific antibody that recognizes phosphorylated BRSK1. Fig. 5A shows that the antibody recognized recombinant BRSK1 phosphorylated by purified LKB1, but not a mutant form of BRSK1 in which Thr189 was mutated to Ala (T189A). We also tested the antibody in vivo by over-expressing BRSK1 in HEK293 cells. Again, the antibody gave a strong signal for wild type BRSK1 (phosphorylated by endogenous LKB1), but no signal was obtained for mutant BRSK1 T189A (Fig. 5B). These results show that the generated antibody specifically recognizes BRSK1 phosphorylated at Thr189.

Raft and non-raft fractions having a similar amount of BRSK1 were immunoblotted for T189 phosphorylation. Fig. 5C shows that phosphorylated (active) BRSK1 was only observed in the raft fraction. This band was immunoprecipitated from RIPA-solubilized fractions with antibody anti-BRSK1, confirming that the signal observed with the use of p-T189 antibody corresponded in fact to BRSK1 (results not shown). Thus, lipid raft-associated BRSK1 has more activity than BRSK1 from soluble (non-raft) fractions.

### 3.5. Lipid raft environment enhances BRSK1 activity

The result showed in Fig. 5C suggested that BRSK1 lipid raft environment could have an enhancing effect on BRSK1 activity. To test this hypothesis, we performed in vitro kinase activity assays, incubating purified recombinant kinase in the presence/absence of vesicles that contain the major lipid species present at the raft fraction. As a control, we also performed similar experiments to measure the activity of the two closely related kinases from the subfamily of AMPK-

related kinases, BRSK2 and MARK4. We generated baculovirus encoding His-tagged human BRSK1 or BRSK2 that were used to infect Sf21 insect cells, and the expressed proteins were affinity-purified. MARK4 protein was affinity purified from HEK293 cells over-expressing GST-tagged MARK4.

Several peptide substrates have been used to perform in vitro BRSK1 kinase activity assay, including AMARA and SAMS peptides [13,25], LNR peptide [7] and CHKtide peptide (recommended by some commercial companies for measuring BRSK1/2 activities). We decided first to investigate the substrate specificity of BRSK1 by determining the kinetic constants ( $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $V_{max}/K_m$ ) for the phosphorylation of the peptide substrates AMARA, LNR and CHKtide (Fig. 6A). CHKtide resulted to be the best substrate tested, giving the highest  $V_{max}$  value (302 U/mg) and a  $K_m$  value of 170  $\mu$ M, whereas AMARA was the poorest substrate. In terms of catalytic efficacy ( $V_{max}/K_m$  values), BRSK1 phosphorylated CHKtide 38 times better than AMARA, and 9 times better than LNR peptides (Fig. 6A). Similar results were obtained for BRSK2 (results not shown), and we therefore recommend the use of the CHKtide peptide for measuring kinase activity of the BRSK enzymes.

Once the optimal conditions for kinase assays were established, we next performed experiments to test if lipid raft environment could affect BRSK1 activity. To do so, the lipids contained in raft fractions from Triton X-100-solubilized synaptosomes were extracted in chloroform/methanol, reconstituted as lipid vesicles (hereby called raft vesicles) and tested for the in vitro kinase activity assay. Fig. 6B shows that pre-incubation of pure recombinant BRSK1 with raft vesicles enhanced BRSK1 kinase activity in a dose-dependent fashion, with a maximum of ~3.5 fold activation when 1  $\mu$ l of vesicles was used in the assay. Under the same experimental conditions, raft vesicles had no effect on the activity of the closely related kinases BRSK2 or MARK4. We also performed additional control experiments to show that incubation of BRSK1 with vesicles obtained from the non-lipid raft fractions did not result in an increase of kinase activity (Fig. 6C).

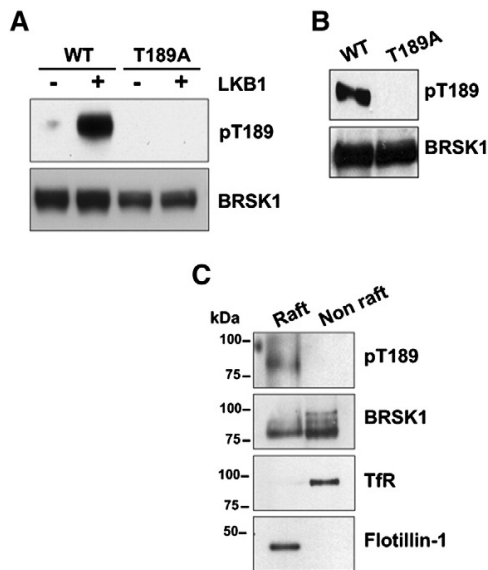
Next we checked if raft vesicles activate BRSK1 by enhancing T-loop phosphorylation in this kinase. We have previously demonstrated that LKB1 activates BRSK1 by direct phosphorylation of the Thr189 residue within the activation loop, and that mutation of this Thr to Glu (T189E) results in a constitutively active kinase [25]. Fig. 6D shows that raft vesicles activated ~3 fold the BRSK1-T189E constitutively active protein, as it did for wild type BRSK1. Thus, raft vesicles environment activates BRSK1 by a LKB1-phosphorylation and T-loop-phosphorylation independent mechanism.

We also performed additional experiments using a physiological substrate, Tau protein, instead of a peptide substrate. Several authors have proposed that BRSKs phosphorylate Tau protein at Ser262, and neurons lacking BRSKs show impaired Tau phosphorylation [3,22,29]. Consequently, most authors use pS262-Tau as the canonical in vivo BRSK1 substrate [3,9,29]. Fig. 6E shows that incubation of BRSK1 with raft vesicles resulted in an increase on Tau phosphorylation at Ser262.

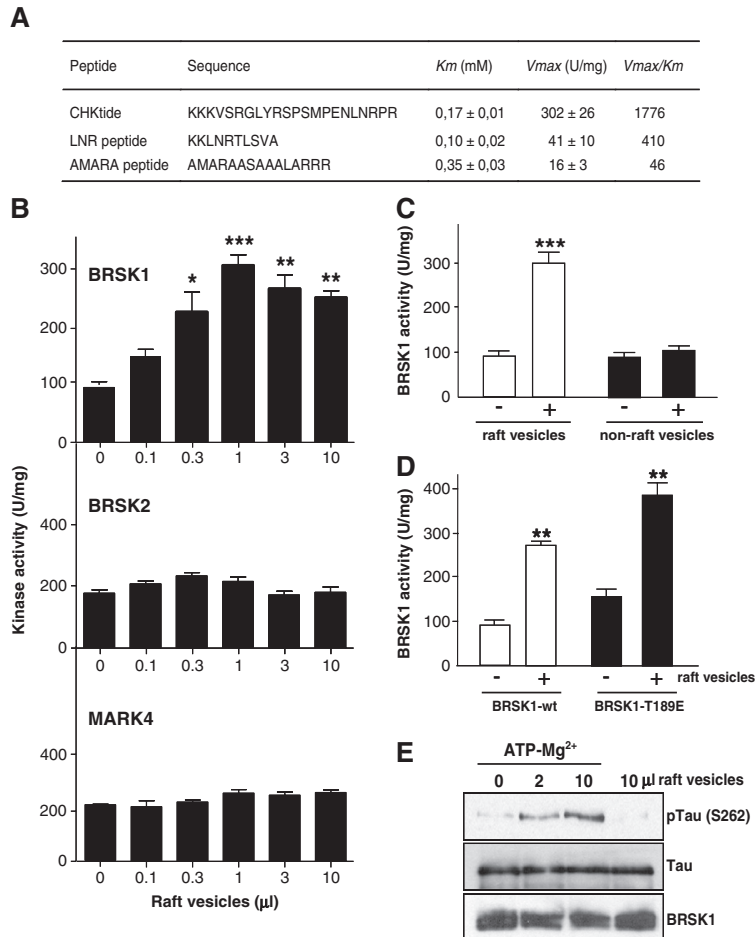
Taken together, these results demonstrate that raft vesicles specifically activate BRSK1, a raft-associated kinase. Interestingly, BRSK2 or MARK4 kinases, that were not present at the membrane rafts microdomains, were not activated by raft vesicles.

### 3.6. Synthetic lipid vesicles activate BRSK1

In order to identify which lipid from the raft vesicle was responsible for BRSK1 activation, we next generated synthetic lipid vesicles. To do so, we first measured the concentration of the major lipids present in the raft vesicles obtained from brain synaptosomes. Lipid rafts are membrane domains enriched in cholesterol, sphingolipids, phospholipids and glycolipids such as GM1. Since glycolipids such as GM1 are not extracted by the chloroform/methanol mix used for



**Fig. 5.** Lipid raft environment enhances BRSK1 activity. Characterization of a phosphospecific antibody that recognizes active BRSK1 (pT189). (A) 200 ng of affinity purified, bacterially expressed BRSK1-wt and BRSK1-T189A mutant were incubated with active LKB1 and Mg-ATP for 30 min, and Thr189 phosphorylation was monitored by immunoblotting. (B) Lysates of HEK293 cells over-expressing BRSK1-wt or BRSK1-T189A mutant were immunoblotted for BRSK1 phosphorylation at T189. (C) 30  $\mu$ g of protein from sucrose density fraction 3 (raft fraction) and 10 (non-raft fraction) were immunoblotted for BRSK1 phosphorylation at T189, transferrin receptor (TfR, non-raft protein marker), and Flotillin-1 (raft protein marker). Similar results were obtained in three independent experiments.



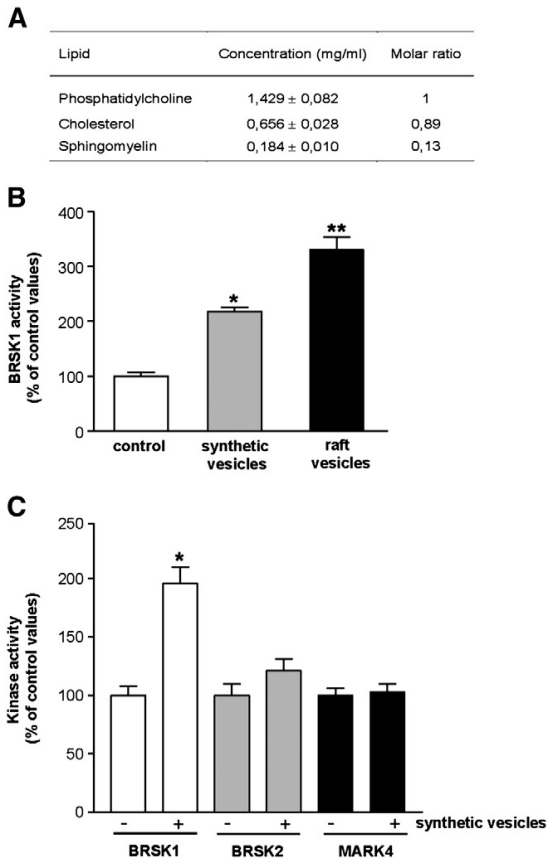
**Fig. 6.** Lipid raft vesicles from rat brain synaptosomes enhance BRSK1 kinase activity in vitro. (A) Kinetic analysis of the pure preparation of recombinant BRSK1 used in this work. Enzyme activities were determined at different concentrations of the indicated peptide substrate, using 60 ng of pure BRSK1, 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP, 10 mM magnesium acetate, as described in [Methods](#) section. Each value is the mean  $\pm$  SD of at least three different determinations, each performed in triplicate. (B) Effect of reconstituted lipid raft vesicles on the activity of pure BRSK1, BRSK2 and MARK4. Lipids from the sucrose density fraction 3 (raft fraction) were chloroform/methanol extracted and reconstituted as small multilamellar vesicles, as described in the section [Methods](#). After pre-incubating 60 ng of each purified protein with the indicated amount of lipid raft vesicles for 30 min, kinase activity was determined at 30 °C using 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP and 200  $\mu$ M of the peptide substrate CHKtide (BRSK1 and BRSK2) or AMARA (MARK4). The activities are presented as means  $\pm$  SD for four separate experiments, each performed in triplicate. (C) As in B, but reconstituted vesicles from raft and non-raft fractions were tested for BRSK1 kinase activity. Each value is the mean  $\pm$  SD of four different determinations, each performed in triplicate. (D) As in B, but lipid raft vesicles were tested using wild type BRSK1 and the constitutively active mutant BRSK1-T189E. Each value is the mean  $\pm$  SD of three different determinations, each performed in triplicate. (E) Effect of lipid raft vesicles on BRSK1 phosphorylation of Tau. After pre-incubating 60 ng of purified BRSK1 with the indicated amount of lipid raft vesicles for 30 min, reaction took place using 200  $\mu$ M ATP and 100 ng of purified Tau as substrate, and phosphorylation of Tau at Ser262 monitored by immunoblotting. Similar results were obtained in three separate experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, compared with 100% (control).

preparing the raft vesicles [10], we determined the concentration of the other three major lipid components. The results are shown in [Fig. 7A](#) and they were used to generate vesicles containing the same concentration of cholesterol, sphingomyelin and phosphatidylcholine (hereby called synthetic vesicles) as the raft vesicles. Incubation of BRSK1 with synthetic vesicles containing all three lipids and at the same concentrations found in raft fractions enhanced  $\sim$ 2.5 fold BRSK1 kinase activity ([Fig. 7B](#)). However, maintaining a fixed molar ratio in the ternary lipid mixture, but doubling total lipid concentration resulted in “suboptimal” activation of BRSK1, and quadrupling it was no longer stimulatory (Supplementary Fig. 2A). Also, binary vesicles of phosphatidylcholine/cholesterol or phosphatidylcholine/sphingomyelin did not activate the enzyme, and doubling or even quadrupling sphingomyelin content in ternary mixtures did not activate it further (Supplementary Fig. 2B).

#### 4. Discussion

In this work we demonstrated for the first time that BRSK1, but neither BRSK2 nor the upstream activator kinase LKB1, is partitioned into lipid rafts in brain synaptosomes. This conclusion is based on four biochemical and pharmacological evidences. First, immunocytochemical studies in rat and mice cortical neurons showed a punctuate localization for BRSK1 that, unlike the synaptic vesicle marker synaptophysin, was preserved after Triton X-100 pre-treatment of the cells ([Fig. 1B](#)). Similar results have been described for BRSK1 from rat hippocampal neurons [18]. Second, we have shown that a portion of cellular BRSK1 and the whole synaptosomal BRSK1 localizes at the membrane fraction. This BRSK1 population was resistant to Triton X-100 solubilization, as it happened for the lipid raft protein marker Thy-1 ([Fig. 2](#)). Third, BRSK1 was present in sucrose





**Fig. 7.** Synthetic lipid vesicles activate BRSK1 kinase activity. (A) Concentration and molar ratio values of the major lipid species present in raft fractions from brain synaptosomes. Lipids from the sucrose density fraction 3 (raft fraction) were chloroform/methanol extracted, and concentration of cholesterol, sphingomyelin and phosphatidylcholine determined as described in the section *Methods*. Each value is the mean  $\pm$  SD of three different determinations (B) Effect of synthetic lipid vesicles versus lipid raft vesicles on BRSK1 kinase activity. 10  $\mu$ l of raft vesicles or synthetic vesicles containing sphingomyelin, phosphatidylcholine and cholesterol at the concentrations stated in Fig. 6A were prepared, pre-incubated with pure BRSK1 and kinase activity determined as for Fig. 5B. (C) As in (B), but 10  $\mu$ l of synthetic vesicles were tested for BRSK1, BRSK2 and MARK4 kinase activities. Activity values are the mean  $\pm$  S.D. of three different determinations, each performed in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with 100% (control).

gradient purified rafts from brain synaptosomes, obtained by extracting proteins at 4 °C using the canonical nonionic detergent Triton X-100 (Fig. 3A). By using this method we found that ~40% of the membrane synaptosomal BRSK1, but not BRSK2 or LKB1, was located at the lipid rafts fraction. However, membrane rafts are heterogeneous in respect with their resistance to solubilization by different nonionic detergents [33]. It has also been reported that the use of Triton X-100 to extract lipid rafts at low temperature can result in the generation of nonspecific aggregates, therefore leading to the mistaken assignment of proteins to the rafts [8]. Because of the above, and in order to confirm the association of BRSK1 with membrane rafts, we also isolated rafts at physiological temperature (37 °C) using the nonionic detergent Brij 98. This method resulted in an even greater localization (~65%) of BRSK1 at this fraction (Fig. 3C). Fourth, BRSK1 and the raft protein marker flotillin-1 were not observed at the raft fractions after depletion of synaptosomal cholesterol by m $\beta$ CD treatment. Since lipid

rafts are membrane microdomains enriched in sphingolipids and cholesterol, depletion of cholesterol with drugs such as m $\beta$ CD compromise the integrity of these domains and results in the dissociation of the associated proteins [17].

How is BRSK1 targeted to the membrane lipid rafts? BRSK1 has an N-terminal kinase domain (residues 34–285 for human BRSK1), followed by a putative ubiquitin-associated (UBA) domain (residues 330–372) and a long C-terminal region with unknown structure and function (residues 373–778) [1,20]. We performed an exhaustive *in silico* analysis that revealed that BRSK1 has no apparent lipid binding domains or transmembrane hydrophobic  $\alpha$ -helices. We also performed lipid–protein overlay assays to observe that BRSK1 does not bind the following membrane lipids: phosphatidylinositols (PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), other phospholipids (PtdSer, PtdEtn, PtdCho, LysoPtdCho), phosphatidic acid, lysophosphatidic acid, sphingolipids (sphingosine, sphingosine-1-P, sphingomyelin), gangliosides (GM1, GD3), ceramide, or cholesterol (Supplementary Fig. 3). Unexpectedly, we found that BRSK1 bound the galactocerebroside sulfatide (3-O-sulfogalactosylceramide). Since further analysis showed that BRSK2, which is not present at lipid rafts, also binds sulfatide (results not shown), it is rather unlikely that sulfatide is involved in the location of BRSK1 at these membrane microdomains.

On the other hand, proteins present in lipid rafts can interact directly with cholesterol or, alternatively, are posttranslationally modified with lipids such as glycosylphosphatidylinositol (GPI), myristate or palmitate [27]. The use of predictive algorithms for posttranslational modification revealed the absence of putative GPI, farnesylation or myristoylation sites in BRSK1, but suggested that BRSK1 might be palmitoylated. Specifically, CSS-Palm 2.0 software for palmitoylation sites [35] predicted several cysteine residues at both, the kinase domain and the C-term tail of BRSK1. We have used a novel non-radioactive method (acyl-biotinyl exchange, ABE assay) to show that brain BRSK1, but not BRSK2, is palmitoylated *in vivo* (Fig. 4).

Protein palmitoylation is a posttranslational modification where the 16-carbon fatty acid palmitate is covalently linked to a cysteine residue through a thioether linkage, increasing the overall hydrophobicity of the targeted protein [38]. Like phosphorylation, palmitoylation is a reversible modification and proteins often undergo dynamic cycles of palmitoylation (catalyzed by palmitoyl transferases) and depalmitoylation (catalyzed by palmitoyl thioesterases) [19]. Therefore, palmitoylation can act as a reversible membrane localization signal. Interestingly, this posttranslational modification is a well characterized signal for targeting proteins to rafts, including integral membrane proteins such as G protein-coupled receptor and neurotransmitter receptors [19].

As mentioned above BRSK1 plays an important role in the synapses. Over-expression of BRSK1 (but not a mutant form lacking kinase activity) increases neurotransmitters release in neuronal cells [18]. Remarkably, many of the proteins that regulate synaptic vesicle exocytosis are located at lipid rafts [14,15] and they are indeed palmitoylated. That is the case for the proteins of the SNARE complex Syntaxin-1, SNAP-25 and VAMP2 (synaptobrevin), as well as the Ca<sup>2+</sup> sensor protein of the synaptic vesicle synaptotagmin [32]. According to this, it has also been shown that palmitoylation plays a key role in targeting proteins for transport to nerve terminals and in regulating trafficking at synapse [24]. Furthermore, a recent work described that neuronal excitability (activation) results in a rapid and overall increase on palmitoylation of the synaptic proteins, allowing the activity-driven changes that shape synapse morphology and function [21]. Thus, it is possible that, as it happens for other synaptic proteins, neuronal activity could increase BRSK1 palmitoylation and, therefore its recruitment to the raft domains of the presynaptic terminals. Once there, BRSK1 would co-localize and phosphorylate its putative/s substrate/s (that remain to be characterized). We are currently performing experiments to identify which of the Cys residue/s of BRSK1 is/are palmitoylated. There are 11 Cys within rat BRSK1

sequence, and 10 of them are conserved in human and mouse. 7 out of the 10 Cys present in mammalian BRSK1s are not found (or conserved) in the BRSK2 sequence, so these residues should be the first candidates to be tested.

Obtaining a palmitoylation-deficient mutant will allow one to determine which is the role of palmitoylation in targeting BRSK1 to the membrane rafts, and how this modification affects the function of BRSK1 at the synapses.

Our results show that lipid raft environment regulates the kinase activity of BRSK1. LKB1 activates BRSKs by phosphorylating residues Thr189 (BRSK1) and Thr174 (BRSK2) at the T-loop. This phosphorylation is necessary and sufficient to activate both kinases, and correlates well with BRSK1/2 kinase activity [7,25]. In this work we have obtained and optimized a polyclonal antibody that allows one to detect T-loop phosphorylation of the BRSKs enzymes. The phospho-specific antibody generated recognizes well BRSK1 phosphorylation (Fig. 5A and B), and it can be also used to monitor endogenous BRSK2 phosphorylation (result not shown). Using this antibody we have shown that BRSK1 from lipid raft fractions have much higher T-loop phosphorylation than BRSK1 from non-lipid raft fractions (Fig. 5C). Since brain synaptosomal LKB1 is not present at membrane rafts (Fig. 3A and B), the higher level of phospho-Thr189 observed in rafts may be the consequence of BRSK1 being protected from dephosphorylation. One possibility is that, in a raft microenvironment BRSK1 T-loop is less accessible for the action of the phosphatase, as it has been suggested for the Lyn tyrosine kinase. Young et al. reported that lipid rafts enhance Lyn kinase activity by protecting the critical Tyr residue at the active site from dephosphorylation [40]. Alternatively, the inactivating phosphatase would be absent from these membrane microdomains. The phosphatase that regulates dephosphorylation/deactivation of the BRSKs remains to be described. Nevertheless, Bright et al. reported that this phosphatase is okadaic acid-insensitive, and showed that PP2C $\alpha$  can dephosphorylate BRSK2 *in vitro* [7]. To our knowledge, PP2C phosphatase has never been reported to localize at membrane rafts.

Incubation of purified recombinant BRSK1 with small multilamellar vesicles (SMV) containing lipids extracted from raft fraction resulted in a ~3-fold increase on BRSK1 activity measured using both, a peptide substrate and the physiological protein substrate Tau (Fig. 6B and E). This effect was BRSK1 specific, since it was not observed for the two closely related proteins BRSK2 and MARK4 (Fig. 6B). Vesicles containing lipids from non-raft fractions did not activate BRSK1. Furthermore, synthetic SMV containing the major lipids present in lipid rafts (cholesterol, sphingomyelin and phosphatidylcholine) also specifically enhanced BRSK1 kinase activity (Fig. 7B and C). To our knowledge this is the first time that lipids from raft microdomains are extracted, reconstituted and successfully tested for enzyme modulation. We also provided biochemical evidences showing that a fully activated form of BRSK1 (T189E) can be further activated ~3-fold by lipid raft environment (Fig. 6D). Thus, localization of BRSK1 at the membrane rafts might represent a novel mechanism of regulation of BRSK1 kinase activity. Although not yet identified, the presence of a lipid-interacting motif cannot be ruled out. The interaction of this motif with lipid/s would result then in a conformational change of the protein. This change will in turn, stabilize the active conformation of BRSK1 kinase domain, resulting in the increase on the kinase activity observed. The kinase and UBA domains of BRSK1 and BRSK2 are 90% identical. Thus, it seems more likely that this putative lipid-binding domain would localize at C-terminal tail of BRSK1, which only shares a 60% homology with the C-terminal end of BRSK2. According to this, Inoue et al. over-expressed BRSK1 deletion mutants in rat hippocampal neurons and showed that BRSK1 localizes at the synapse through its C-terminal tail [18].

BRSK1 regulates presynaptically the neurotransmitter release [18]. Given the role of the kinase activity of BRSK1 at the synapses, and the localization of BRSK1 and the SNARE complex proteins (that regulate

synaptic vesicle docking and fusion) at the membrane rafts, it would be important to study if some of these proteins can be phosphorylated by BRSK1. In fact, our results suggest that the ordered lipid raft environment not only allows BRSK1 to co-localize with the SNARE complex proteins, but also results in a more active form of this kinase.

In this work we describe for the first time that BRSK1 is expressed in astrocytes. Recent studies have suggested a new concept in synaptic physiology, the tripartite synapse, in which the presynaptic and postsynaptic neurons are also associated with astrocytes. In such structure, astrocytes sense synaptic activity and release chemical transmitters (gliotransmission) which in turn control synaptic transmission and neuronal plasticity [31]. Gliotransmission can be through different mechanisms including calcium-regulated exocytosis, and indeed, astrocytes express proteins of the SNARE complex [30]. Therefore, BRSK1 could well participate in the release of gliotransmitters (such as D-serine, ATP or glutamate) and indirectly regulate neuron excitability through the tripartite synapse.

During the last few years many authors have reported changes in cholesterol and lipid raft microdomains in brains from patients suffering neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's diseases [36, 39]. The working hypothesis is based on the idea that changes in cholesterol, sphingolipids and/or ganglioside content of the lipid rafts may affect the activity of proteins that play key roles in regulating neuronal physiology. It will be important to study if, as reported for other proteins, changes on lipid raft composition result in alteration of BRSK1 membrane location and activity. If so, these changes would compromise the neuronal synaptic activity, perhaps contributing to the neuronal degeneration observed in these diseases.

## 5. Conclusions

A pool of brain BRSK1, but not BRSK2 or its upstream activator LKB1, localizes at membrane lipid rafts. Based on 1) phosphorylation analysis of BRSK1 T-loop in raft and non-raft brain synaptosomal fractions; and 2) BRSK1 activity assays with small multilamellar vesicles made from lipids from raft fractions or with synthetic lipids, we conclude that interaction with lipid rafts represents a new mechanism of BRSK1 activation, additional to T-loop phosphorylation.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbali.2011.10.004.

## Acknowledgments

We thank Dr Dario Alessi (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, U.K.) for BRSK1 antibodies and DNA plasmids, and Dr Juan Blasi (IDIBELL, Barcelona, Spain) for the pGEX-Tau plasmid. We are also grateful to Dr Roser Masgrau for discussion, Cristina Gutierrez for tissue culture assistance and to the Servei de Genòmica from the Universitat Autònoma de Barcelona. AR-A is supported by a FPI fellowship from the Spanish Ministry of Education. TE and GR-B are supported by a PIF fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-00757 and BFU2007-60268 to J.M.L.; BFU2009-07823 to E.C., SAF2009-13626 to J.A. and AES-PI10/00333 to J.R.B.).

## References

- [1] D.R. Alessi, K. Sakamoto, J.R. Bayasas, LKB1-dependent signaling pathways, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 137.
- [2] J.A. Allen, R.A. Halverson-Tamboli, M.M. Rasenick, Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 128.
- [3] A.P. Barnes, B.N. Lilley, Y.A. Pan, L.J. Plummer, A.W. Powell, A.N. Raines, J.R. Sanes, F. Polleux, LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons, *Cell* 129 (2007) 549.
- [4] A.P. Barnes, D. Solecki, F. Polleux, New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity *in vivo*, *Curr. Opin. Neurobiol.* 18 (2008) 44.

- [5] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911.
- [6] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- [7] N.J. Bright, D. Carling, C. Thornton, Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 14946.
- [8] D.A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 111.
- [9] Y.J. Choi, N.A. Di, I. Kramvis, L. Meikle, D.J. Kwiatkowski, M. Sahin, X. He, Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation, *Genes Dev.* 22 (2008) 2485.
- [10] E. Claro, M.A. Wallace, J.N. Fain, B.G. Nair, T.B. Patel, G. Shanker, H.J. Baker, Altered phosphoinositide-specific phospholipase C and adenylyl cyclase in brain cortical membranes of cats with GM1 and GM2 gangliosidosis, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11 (1991) 265.
- [11] J.G. Crump, M. Zhen, Y. Jin, C.I. Bargmann, The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination, *Neuron* 29 (2001) 115.
- [12] P.R. Dodd, J.A. Hardy, A.E. Oakley, J.A. Edwardson, E.K. Perry, J.P. Delaunoy, A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures, *Brain Res.* 226 (1981) 107.
- [13] T. Fujimoto, S. Yurimoto, N. Hatano, N. Nozaki, N. Sueyoshi, I. Kameshita, A. Mizutani, K. Mikoshiba, R. Kobayashi, H. Tokumitsu, Activation of SAD kinase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase, *Biochemistry* 47 (2008) 4151.
- [14] C. Gil, R. Cubi, J. Blasi, J. Aguilera, Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 1334.
- [15] C. Gil, A. Soler-Jover, J. Blasi, J. Aguilera, Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005) 117.
- [16] K. Huang, S. Sanders, R. Singaraja, P. Orban, T. Cijssouw, P. Arstikaitis, A. Yanai, M.R. Hayden, A. El-Husseini, Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity, *FASEB J.* 23 (2009) 2605.
- [17] S. Ilangumaran, D.C. Hoessli, Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane, *Biochem. J.* 335 (Pt 2) (1998) 433.
- [18] E. Inoue, S. Mochida, H. Takagi, S. Higa, M. guchi-Tawarada, E. Takao-Rikitsu, M. Inoue, I. Yao, K. Takeuchi, I. Kitajima, M. Setou, T. Ohtsuka, Y. Takai, SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release, *Neuron* 50 (2006) 261.
- [19] T. Iwanaga, R. Tsutsumi, J. Noritake, Y. Fukata, M. Fukata, Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 117.
- [20] M. Jaleel, F. Villa, M. Deak, R. Toth, A.R. Prescott, D.M. van Aalten, D.R. Alessi, The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation, *Biochem. J.* 394 (2006) 545.
- [21] R. Kang, J. Wan, P. Arstikaitis, H. Takahashi, K. Huang, A.O. Bailey, J.X. Thompson, A.F. Roth, R.C. Drisdell, R. Mastro, W.N. Green, J.R. Yates III, N.G. Davis, A. El-Husseini, Neuronal palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation, *Nature* 456 (2008) 904.
- [22] M. Kishi, Y.A. Pan, J.G. Crump, J.R. Sanes, Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization, *Science* 307 (2005) 929.
- [23] T. Lang, SNARE proteins and 'membrane rafts', *J. Physiol.* 585 (2007) 693.
- [24] M.E. Linder, R.J. Deschenes, Palmitoylation: policing protein stability and traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 74.
- [25] J.M. Lizcano, O. Goransson, R. Toth, M. Deak, N.A. Morrice, J. Boudeau, S.A. Hawley, L. Udd, T.P. Makela, D.G. Hardie, D.R. Alessi, LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1, *EMBO J.* 23 (2004) 833.
- [26] R. Lu, H. Niida, M. Nakanishi, Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 31164.
- [27] H.A. Lucero, P.W. Robbins, Lipid rafts–protein association and the regulation of protein activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 426 (2004) 208.
- [28] D. Matsuura, K. Taguchi, H. Yagisawa, S. Maekawa, Lipid components in the detergent-resistant membrane microdomain (DRM) obtained from the synaptic plasma membrane of rat brain, *Neurosci. Lett.* 423 (2007) 158.
- [29] M. Muller, D. Lutter, A.W. Puschel, Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA- and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 286.
- [30] V. Pappas, R. Zorec, Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes, *Brain Res. Rev.* 63 (2010) 83.
- [31] G. Perea, A. Araque, GLIA modulates synaptic transmission, *Brain Res. Rev.* 63 (2010) 93.
- [32] G.R. Prescott, O.A. Gorleku, J. Greaves, L.H. Chamberlain, Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery, *J. Neurochem.* 110 (2009) 1135.
- [33] G. Radeva, J. Perabo, F.J. Sharom, P-glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains, *FEBS J.* 272 (2005) 4924.
- [34] G. Radeva, F.J. Sharom, Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells, *Biochem. J.* 380 (2004) 219.
- [35] J. Ren, L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue, X. Yao, CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction, *Protein Eng. Des. Sel.* 21 (2008) 639.
- [36] C.L. Schengrund, Lipid rafts: keys to neurodegeneration, *Brain Res. Bull.* 82 (2010) 7.
- [37] M. Shelly, L. Cancedda, S. Heilshorn, G. Sumbre, M.M. Poo, LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization, *Cell* 129 (2007) 565.
- [38] J.E. Smotrys, M.E. Linder, Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 559.
- [39] M. Stefani, G. Liguri, Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions, *Curr. Alzheimer Res.* 6 (2009) 15.
- [40] R.M. Young, D. Holowka, B. Baird, A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 20746.
- [41] R. Zidovetzki, I. Levitan, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1311.

## **ANEXO III:**

**Lista de anticuerpos utilizados.**



Anticuerpo contra:	Suministrado por:	Fabricado en:	Usado para:	MW (kDa)
<b>Actina</b>	Sigma #A-1978	Mouse	WB 1:20000	45
<b>BRSK1</b>	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK) *	Sheep	WB 0.1-2 µg/ml IP 1 µg IC 0.5 µg/ml	85
<b>BRSK2</b>	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK) *	Sheep	WB 0.1-2 µg/ml IP 1 µg IC 0.5 µg/ml	75
<b>pT-loop BRSK</b>	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK) *	Sheep	WB 1 µg/ml	85 & 75
<b>ERK1/2</b>	Cell Signaling #4695	Rabbit	WB 1:1000	44 & 42
<b>pERK1/2</b>	Cell Signaling #4370	Rabbit	WB 1:1000	44 & 42
<b>Flotilina-1</b>	BD-Transduction laboratories #610820	Mouse	WB 1:1000	47
<b>GAPDH</b>	Ambion #4300	Mouse	WB 0.2 µg/ml	37
<b>GFAP</b>	Abcam #ab7260	Rabbit	IC 1:200	--
<b>GST</b>	Santa Cruz #sc-459	Rabbit	WB 1:5000	--
<b>HA</b>	Sigma #H-3663	Mouse	WB 1:1000-10000	--
<b>LKB1</b>	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK) *	Sheep	WB 0.5-2 µg/ml	55
<b>MAP2</b>	Sigma #M-9942	Mouse	IC 1:200	--
<b>Myc</b>	Sigma #M-4439	Mouse	WB 1:1000-5000	--
<b>Receptor de transferrina</b>	Zymed Laboratories #136800	Mouse	WB 1:1000	90

<b>SENP1</b>	College of Life Sciences (Dundee, UK) **	Sheep	WB 1:1000	75
<b>SENP2</b>	College of Life Sciences (Dundee, UK) **	Sheep	WB 1:2000	60
<b>Sinaptofisina</b>	Sigma #S-5768	Mouse	IC 1:200	--
<b>Sintaxina-1</b>	Sigma #S-0664	Mouse	WB 1:10000-150000 IP 0.5 µg IC 1:200	35
<b>pSer188-sintaxina</b>	<i>In house</i> (Anexo II)	Rabbit	WB 0.1-1 µg/ml	35
<b>SNAP25</b>	Sigma #WH0006616M1	Mouse	WB 1:2000	25
<b>STRADα</b>	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK) *	Sheep	WB 0.5-2 µg/ml	50
<b>SUMO2</b>	College of Life Sciences (Dundee, UK) **	Sheep	WB 1 µg/ml	--
<b>Tau</b>	Milipore #MAB3420	Mouse	IC 1:200	70
<b>pSer262-tau</b>	Biosource #44-750G	Rabbit	WB 1:5000	70
<b>Thy-1</b>	Cancer Research Institute (London, UK) ***	Mouse	WB 1:1000	27
<b>β-III-tubulina</b>	Abcam #ab7751	Mouse	WB 1:1000-10000	50

**Tabla Anexo III: Lista de anticuerpos utilizados.** WB, western blot; IP, immunoprecipitation; IC, immunocytochemistry. Los asteriscos señalan anticuerpos cedidos por: \* Dario R. Alessi; \*\* Ron T. Hay; \*\*\* Giampietro Schiavo.

## **ANEXO IV:**

**Lista de plásmidos utilizados.**





Vector	Proteína de fusión	Procedencia
<b>VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS PROCARIOTAS</b>		
pGEX	GST-HA-BRSK1 WT	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-HA-BRSK1 T189A	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-HA-BRSK1 T189E	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-HA-BRSK2 WT	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-HA-BRSK2 T174A	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-HA-BRSK2 T174E	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST-tau-1	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pTrcHis A	His-SNAP25	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pGEX	GST-sinaptobrevina	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pGEX	GST-Munc18	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pGEX	GST-sintaxina-1A WT	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pGEX	GST-sintaxina-1A[1-102]	In house
pGEX	GST-sintaxina-1A[1-168]	In house
pGEX	GST-sintaxina-1A S188A	In house
pGEX	GST-sintaxina-1A S188D	In house
pGEX	GST	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
<b>VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS</b>		
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 WT	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 T189A	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)

pEBG2T	GST-HA-BRSK1 T189E	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 K77R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 K158R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 K203R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK1 K621R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 WT	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 T174A	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 T174E	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 K62R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 K143R	In house
pEBG2T	GST-HA-BRSK2 K547R	In house
pEBG2T	GST-HA-MARK4	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-LKB1 WT	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST-LKB1 KI	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEBG2T	GST	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	Flag-STRAD $\alpha$	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	Flag-MO25 $\alpha$	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	Sp1	Dr. Tjien University of California (USA)
pCMV		Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pCDNA3	MEK1-EE	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pCDNA3	H-Ras V12	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pCDNA3	H-Ras N17	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

pCDNA3	Syntaxina-1A	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona (UB)
pCDNA3	His-SUMO2	Dr. Ron T. Hay College of Life Sciences (Dundee, UK)
pCMV	Myc-SUMO2	Dr. Sadowski University of Toronto (Canada)
pCDNA3	Ubc9	Dr. Ron T. Hay College of Life Sciences (Dundee, UK)
pCDNA-Myc9	Myc-SEN1 WT	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pCDNA-Myc9	Myc-SEN1 Inactive (C630A)	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pCDNA-Myc9	Myc-SEN2 WT	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pCDNA-Myc9	Myc-SEN2 Inactive (C466A)	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pCDNA3		Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pFastBAC	His-BRSK1	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pFastBAC	His-BRSK2	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGL2	Luciferase-BRSK1 promoter	Josep Esadamala Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pGL2		Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

**Tabla Anexo IV: Lista de plásmidos utilizados.** Todos los vectores de expresión utilizados se seleccionan por resistencia a ampicilina; el vector pFastBAC lo hace también por gentamicina.





