



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



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

Arantzazu Rodríguez Asiaín

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2012

RESULTADOS-CAPÍTULO 3:

R.3 Localización de BRSK1 en microdominios de membrana *lipid rafts*: efecto del entorno lipídico en su actividad quinasa.

R.3 Localización de BRSK1 en microdominios de membrana *lipid rafts*: efecto del entorno lipídico en su actividad quinasa.

Además de la activación por LKB1, a día de hoy poco más se sabe sobre la regulación de las BRSKs. Como se detalla en la Introducción, las evidencias experimentales obtenidas 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 podría ser también constitutiva. Esto hace suponer la existencia de otros mecanismos de regulación implicados en modular la actividad de estas quinasas. En el presente capítulo se presentan los resultados derivados de estudios sobre la localización celular de las BRSKs, en los que se describe la presencia de una población de BRSK1 en microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata. Se muestra que su localización en este peculiar entorno lipídico modula positivamente la actividad de BRSK1, lo que resulta en un nuevo mecanismo de regulación basado en la localización de la quinasa en un enclave *lipid rafts*. La mayor parte de los resultados que se muestran a continuación se han publicado en Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids, y se adjuntan en formato artículo en el Anexo I de esta Memoria.

R.3.1 Distribución de BRSK1 y BRSK2 en cultivos primarios de neuronas corticales.

En primer lugar se caracterizó en detalle el patrón de distribución de las BRSKs en cultivos de neuronas corticales. Para ello, se obtuvieron cultivos primarios de neuronas corticales de rata (E17) que fueron analizados a 4 y 10 días de diferenciación *in vitro* (DIV) mediante tinción inmunocitoquímica utilizando diferentes anticuerpos. Se escogieron estos días para cubrir dos etapas diferentes de diferenciación *in vitro*: una etapa más temprana (estadio 4 a 4 DIV) en que las neuronas, con una polaridad ya aparente, maduran las dendritas y el axón, y una etapa tardía (estadio 5 a 10 DIV) en la que finalmente se forman estructuras sinápticas funcionales. A pesar de tratarse cultivos puros de neuronas, se aprovechó la aparición esporádica de células gliales para estudiar también en la fase madura del cultivo (10 DIV) la presencia de las BRSKs en este tipo celular no neuronal.

Localización de BRSK1 y BRSK2 en neuronas corticales de rata.

Las **figuras R.24** y **R.25** muestran la localización de BRSK1 y BRSK2 respectivamente, mediante análisis inmunocitoquímico de neuronas corticales a 4 y 10 días de diferenciación *in vitro*. Los patrones de distribución celular se obtuvieron mediante doble tinción para cada BRSK (rojo) y para tres marcadores neuronales (verde): el marcador axonal tau-1 (**A**), el marcador dendrítico MAP2 (**B**) y el marcador de vesículas sinápticas sinaptofisina (**C**).

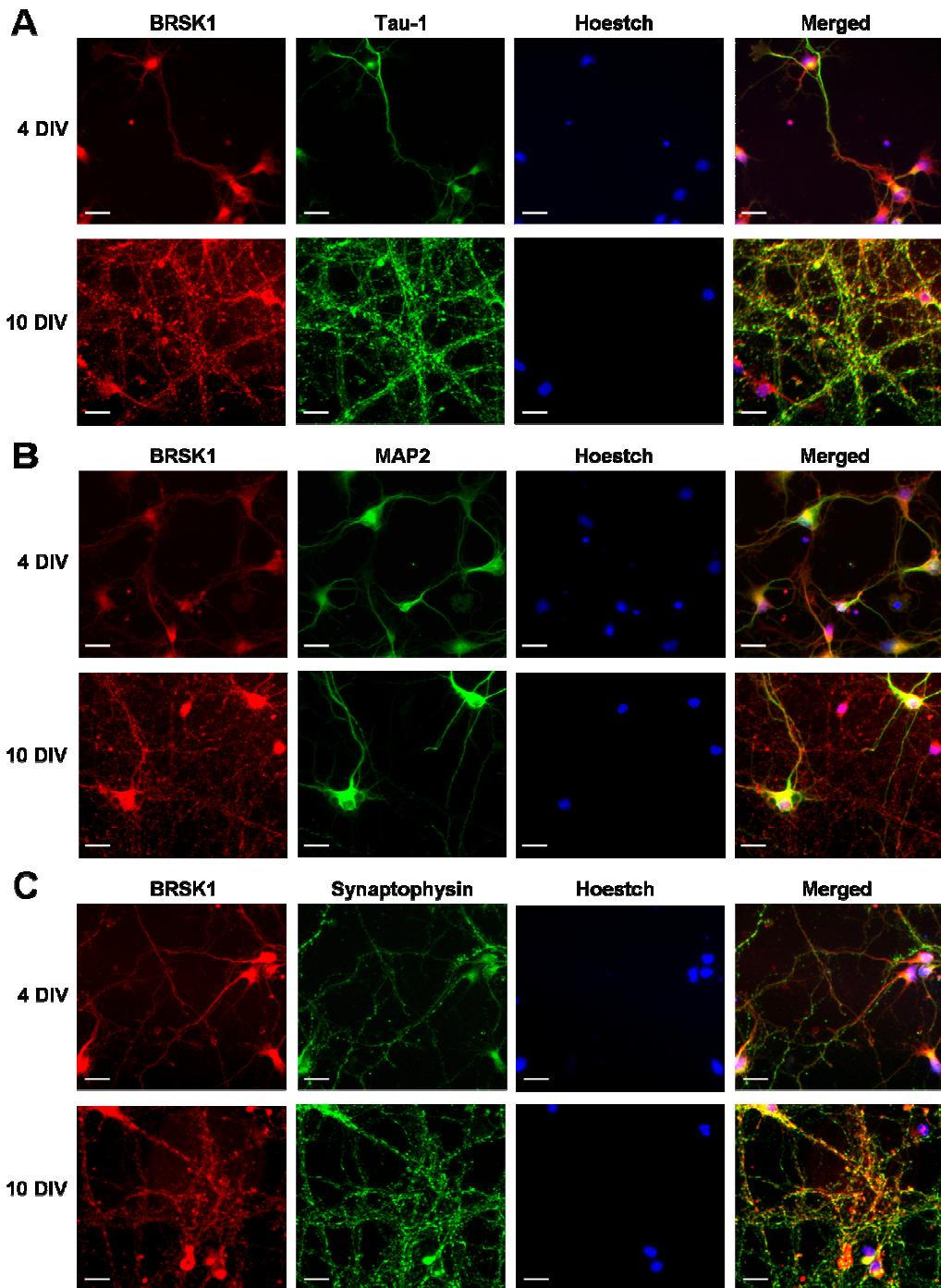


Figura R.24 Distribución de BRSK1 en neuronas corticales de rata a 4 y 10 días de diferenciación. Microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de rata cultivadas *in vitro* durante 4 o 10 días (DIV), fijadas con paraformaldehído y visualizadas mediante inmunofluorescencia para BRSK1 (rojo, primer panel) y los marcadores neuronales (verde, segundo panel) tau-1 (**A**), MAP2 (**B**) y sinaptofisina (**C**). El tercer panel muestra la tinción de núcleos (Hoescht), y el cuarto la superposición de los tres anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20 μ m. Resultados representativos de dos cultivos primarios independientes.

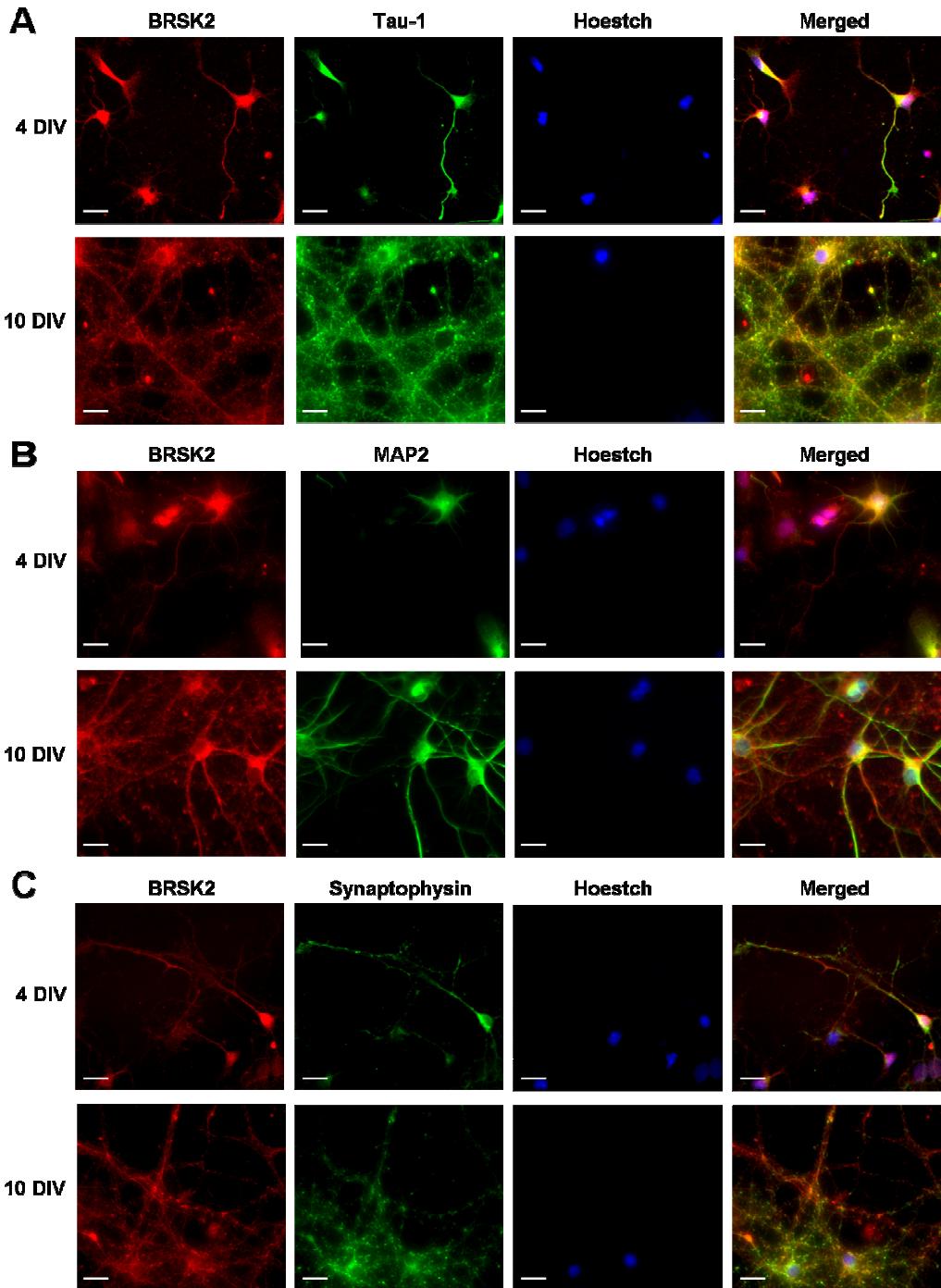


Figura R.25 Distribución de BRSK2 en neuronas corticales de rata a 4 y 10 días de diferenciación. Microscopía de fluorescencia de neuronas corticales de rata cultivadas *in vitro* durante 4 o 10 días (DIV), fijadas con paraformaldehído y visualizadas mediante inmunofluorescencia para BRSK2 (rojo, primer panel) y los marcadores neuronales (verde, segundo panel) tau-1 (**A**), MAP2 (**B**) y sinaptofisina (**C**). El tercer panel muestra la tinción de núcleos (Hoescht), y el cuarto la superposición de los tres anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20 μ m. Resultados representativos de dos cultivos primarios independientes.

Como se había mostrado anteriormente para neuronas hipocampales de ratón (Inoue et al, 2006), BRSK1 presenta un patrón de distribución puntuado en neuronas corticales maduras (10 DIV), similar al observado para los marcadores tau-1 y sinaptofisina (paneles inferiores **figura R.24A y C**). En este estadio, la doble tinción de BRSK1 y MAP2 muestra como una parte de la quinasa localiza con MAP2 en el soma y en las prolongaciones no axonales, aunque de manera puntuada y no siguiendo su distribución homogénea (paneles inferiores **figura R.24B**). Por tanto, BRSK1 se encuentra en el soma, axón y dendritas de neuronas maduras presentando un patrón puntuado.

A 4 días de diferenciación (4 DIV), el nivel de expresión de BRSK1 es menor que a 10 días y presenta por el contrario una distribución más homogénea a lo largo del soma y las prolongaciones neuronales, co-localizando con tau-1 en el axón y MAP2 en las dendritas (paneles superiores **figura R.24A y B**). En este estadio, la expresión del marcador vesicular sinaptofisina también es menor, aunque a diferencia de BRSK1 ya presenta un patrón puntuado de distribución que mantiene a lo largo de la diferenciación (paneles superiores **figura R.24C**).

Comparado con BRSK1, BRSK2 posee una distribución en neuronas maduras que presenta algunas diferencias. A 10 días de diferenciación (10 DIV), BRSK2 localiza de manera no tan puntuada y más homogénea a lo largo del soma y las prolongaciones neuronales, similar a la distribución de tau-1 en el axón y de MAP2 en dendritas (paneles inferiores **figura R.25A y B**). La doble tinción con sinaptofisina muestra la presencia de un *pool* de BRSK2 que co-localiza con este marcador vesicular, aunque se distribuye de forma más lineal y tiñendo mayormente otras regiones celulares (paneles inferiores **figura R.25C**).

En estadios más tempranos de diferenciación (4 DIV, estadio 4), BRSK2 presenta sin embargo una distribución muy similar a BRSK1, con presencia continua a lo largo del soma, dendritas y axón (paneles superiores **figura R.25**).

Las diferencias de distribución de las BRSKs se hacen por tanto más evidentes en la fase madura de la diferenciación (cuando se forman las estructuras sinápticas activas, 10 DIV), donde ambas quinasas están presentes en las mismas regiones pero de manera más puntuada para BRSK1 y lineal para BRSK2.

Localización de BRSK1 y BRSK2 en astrocitos corticales de rata.

Al analizar en detalle las preparaciones de los experimentos anteriores, en algunos campos se observó marcaje para las BRSKs en células no teñidas con los marcadores neuronales utilizados. Estas células de mayor tamaño rindieron tinción GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) positiva, y se tratan por tanto de células gliales astrocitarias. Para estudiar la presencia de las BRSKs en astrocitos se realizaron estudios de inmunofluorescencia con doble tinción para las BRSKs (verde) y GFAP (rojo) en cultivos primarios de neuronas corticales a 10 DIV. Estos cultivos, a pesar del uso de factores específicos de diferenciación neuronal, suelen presentar

esporádicamente células gliales, mayoritariamente astrocitos. Como muestra la **figura R.26**, tanto BRSK1 como BRSK2 se distribuyen de manera continua por el soma y las prolongaciones de astrocitos, donde co-localizan con el marcador específico GFAP. Esta es la primera vez que se describe la presencia de las BRSKs en células gliales.

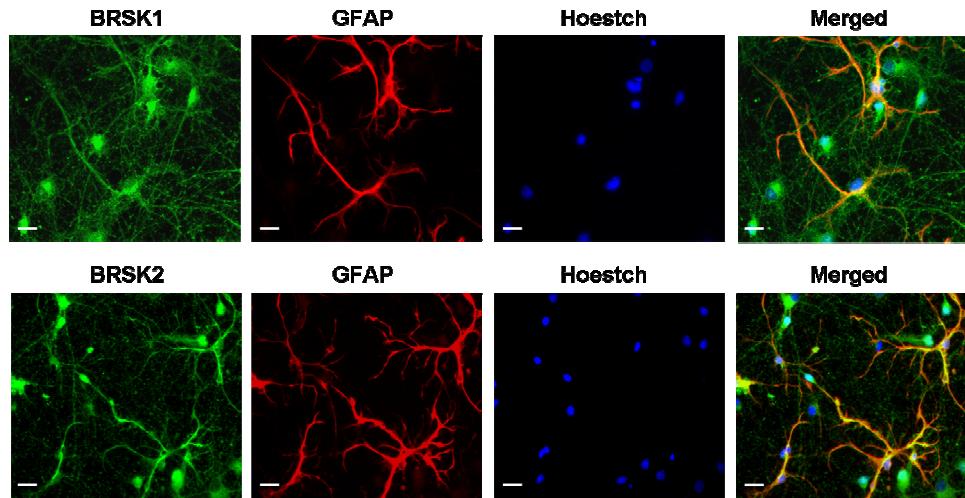


Figura R.26 Localización de BRSK1 y BRSK2 en astrocitos de rata. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata fueron fijados con paraformaldehído a 10 días de diferenciación *in vitro*. Mediante inmunofluorescencia se analizó la presencia de BRSK1 y BRSK2 en astrocitos (verde, primer panel) a través de la doble tinción con el marcador específico glial GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (rojo, segundo panel). El tercer panel muestra la tinción de núcleos (Hoechst), y el cuarto la superposición de los tres anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20 μm . Resultados representativos de dos cultivos primarios independientes.

R.3.2 Localización de BRSK1 en la fracción de membrana resistente a la solubilización con Triton X-100.

Inoue *et al.*, utilizando microscopía inmunoelectrónica, describen a la BRSK1 de neuronas hipocampales como una quinasa asociada fuertemente a vesículas sinápticas y a la cito-matriz presináptica de la zona activa (Inoue *et al.*, 2006). Para confirmar la fuerte asociación de BRSK1 a estas estructuras, neuronas corticales de rata cultivadas durante 10 días (10 DIV) fueron tratadas brevemente con el detergente no iónico Triton X-100 antes de ser fijadas con paraformaldehído. Mediante análisis inmunocitoquímico de doble marcaje se analizó la resistencia al lavado de BRSK1 (rojo) y del marcador soluble de vesículas sinápticas sinaptofisina (verde). La **figura R.27** (paneles inferiores), muestra que el detergente Triton X-100 es incapaz de extraer completamente a BRSK1 de las extensiones neuronales, mientras que sí extrae totalmente al marcador sináptico sinaptofisina. Así, y de acuerdo a lo observado por Inoue

Resultados – Capítulo 3

et al, un *pool* de BRSK1 se asocia a los terminales sinápticos de neuronas corticales, de manera resistente a la solubilización por el detergente Triton X-100.

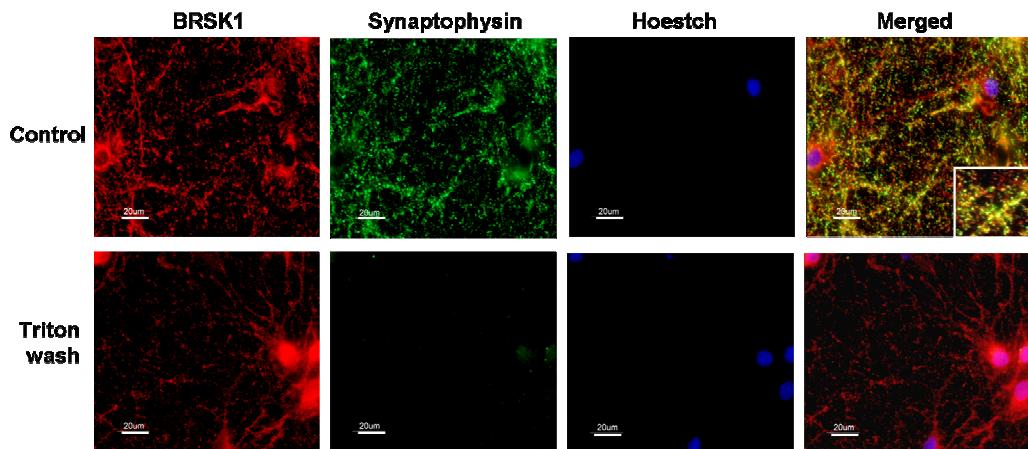


Figura R.27 BRSK1 se asocia fuertemente a los terminales sinápticos en neuronas corticales de rata. Neuronas corticales de rata cultivadas *in vitro* durante 10 días fueron pre-tratadas con 0,1% de Triton X-100 durante 90 segundos (*Triton wash*) o no (Control), previa fijación con paraformaldehído. BRSK1 (rojo) y el marcador de vesículas sinápticas sinaptosifina (verde) fueron visualizadas mediante inmunofluorescencia. El tercer panel muestra la tinción de núcleos (Hoescht), y el cuarto la superposición de los tres anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20 μm . Resultados representativos de dos cultivos primarios independientes.

La resistencia de BRSK1 a la solubilización con el detergente no iónico Triton X-100 sugiere que un *pool* de BRSK1 podría estar fuertemente unido a la fracción de membranas presinápticas. Para estudiarlo, se realizó un fraccionamiento subcelular de sinaptosomas de rata para separar el citosol y la fracción de membrana. La fracción de membrana fue sujeta a la solubilización con Triton X-100 para obtener la fracción de proteínas de membrana solubles al detergente y resistentes al detergente; este *pellet* fue finalmente resuspendido en una solución con detergente iónico SDS al 1%. La **figura R.28** muestra que toda la BRSK1 de sinaptosomas se encuentra en la fracción de membrana, y es resistente a la solubilización con Triton X-100. Por el contrario, la quinasa *upstream* LKB1 se encuentra excluida de la membrana y se localiza en la fracción citosólica de sinaptosomas. Se obtuvieron resultados similares en el fraccionamiento subcelular de células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y y neuronas corticales de rata y ratón (Anexo I), y en su conjunto muestran la presencia de un *pool* de BRSK1 fuertemente asociada a membranas celulares.

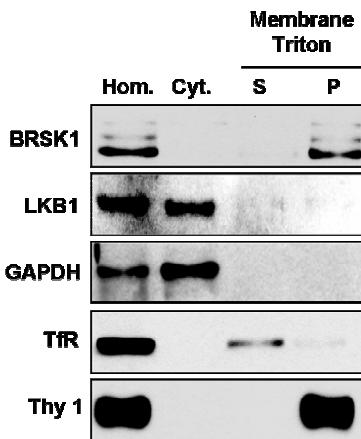


Figura R.28 Localización subcelular de BRSK1 de sinaptosomas de cerebro de rata. Sinaptosomas de rata fueron fraccionados según lo descrito en Material y Métodos. A partir del homogenado de sinaptosomas (Hom.), se separó la fracción citosólica (Cyt.) de la fracción de membrana, que fue solubilizada con Triton X-100 (1%) para obtener las proteínas solubles (S, sobrenadante) e insolubles al detergente (P, pellet). El pellet final se solubilizó con detergente iónico SDS (1%). Las fracciones obtenidas se analizaron mediante inmunoblot para las proteínas indicadas. GAPDH, marcador citosólico; TfR (receptor de Transferrina), marcador de proteínas de membrana solubilizadas con Triton X-100; Thy-1, marcador de proteínas de membrana resistentes a la solubilización con Triton X-100. Resultados representativos de tres fraccionamientos independientes.

R.3.3 BRSK1 se asocia a microdominios de membrana *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata.

El hecho de detectar una población de BRSK1 asociada a la membrana y resistente a la solubilización con un detergente no iónico, planteó la posibilidad que BRSK1 localizara en *lipid rafts*. Los *lipid rafts* son microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, insolubles a detergentes no iónicos y con una baja densidad en equilibrio de sedimentación. Estas estructuras forman plataformas organizativas para la transducción de señales y están implicadas en multitud de procesos celulares, como la fusión de vesículas sinápticas con la membrana presináptica neuronal (Brown & London, 1998).

Con el fin de determinar la presencia de las BRSKs en *lipid rafts*, se solubilizaron sinaptosomas de rata con el detergente Triton X-100 a una temperatura de 4°C, y se separó la fracción de *lipid rafts* insoluble al detergente mediante una centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (ver Material y Métodos). Tras la centrifugación, los *lipid rafts* y sus proteínas asociadas migran a la parte superior del gradiente (de baja densidad de sacarosa), mientras que las proteínas solubles al Triton X-100 permanecen en la parte inferior del gradiente (de mayor densidad). Desde la parte superior del gradiente se recolectaron 10 fracciones de las

que se analizó la concentración de proteína y colesterol de cada una de ellas. El histograma de la **figura R.29A** muestra como la concentración de proteína presenta una distribución dual a lo largo del gradiente, con un pequeño pico en las fracciones de *lipid rafts* (fracciones 2-4) y un pico

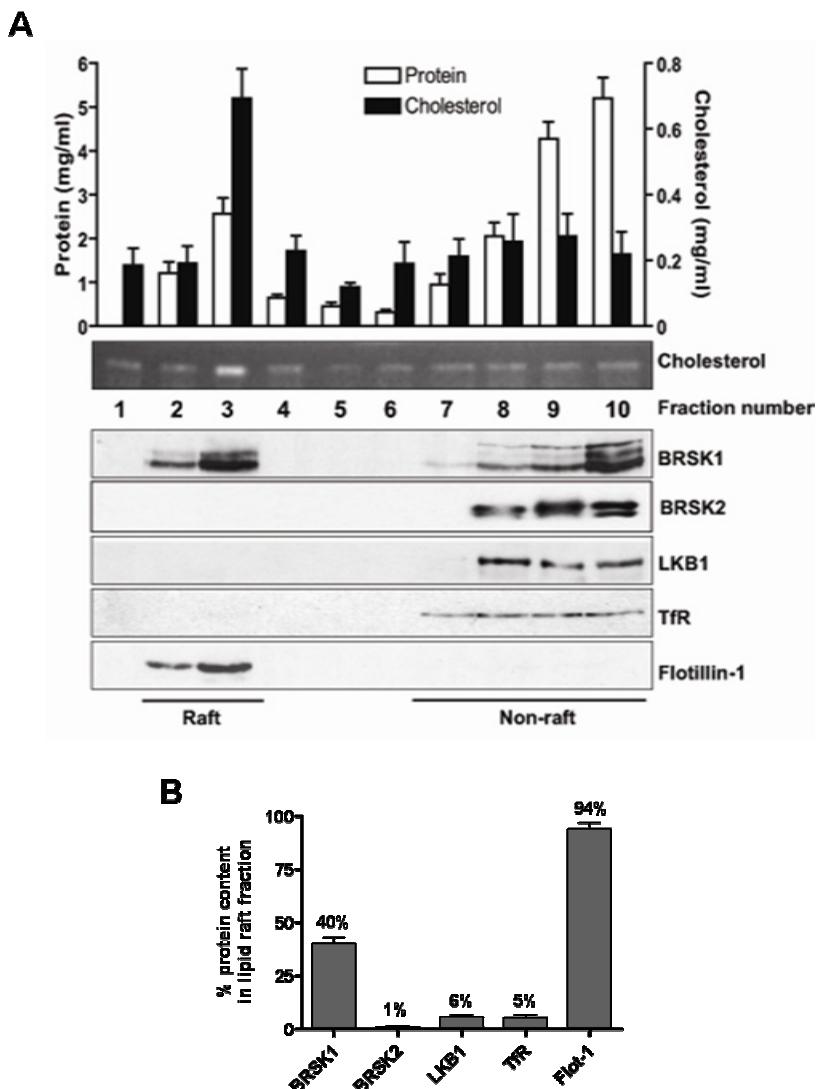


Figura R.29 Localización de BRSK1, pero no BRSK2 o LKB1, en *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata. (A) Fracciones de *lipid rafts* de sinaptosomas de rata solubilizados con 1% Triton X-100 a 4°C obtenidas mediante centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (ver Material y Métodos). El gráfico superior muestra la concentración de proteína (blanco) y colesterol (negro) de cada fracción. Los valores son medias ± s.d. de tres preparaciones diferentes. El colesterol se cuantificó mediante detección de la señal ultravioleta tras el marcaje con primulina de las placas de TLC (panel intermedio). Los paneles inferiores muestran los análisis de inmunoblot para BRSK1, BRSK2 y LKB1 en cada fracción. TfR (Receptor de Transferrina), marcador de fracción soluble no-raft; Flotilina-1, marcador de *lipid raft*. Resultados representativos de cinco fraccionamientos independientes. (B) Densitometría de las fracciones *lipid raft* (1-3) y no-raft (7-10) de los inmunoblot mostrados en (A). Se representa el % de distribución de cada proteína en la fracción *lipid raft*. Los valores son medias ± s.d. de cinco experimentos independientes.

mayor en las fracciones solubles al Triton X-100 (fracciones 7-10). Como han mostrado numerosos autores, la fracción 3 de *lipid raft* presenta un enriquecimiento de colesterol, con un contenido que triplica la de cualquiera del resto de fracciones. La correcta obtención de *lipid rafts* fue validada mediante la detección de proteínas marcadoras (paneles inferiores **figura R.29A**); así, el marcador de *lipid rafts* Flotilina-1 se detecta exclusivamente en las fracciones de baja densidad 2-3, y el marcador de fracción no-*raft* receptor de Transferrina (TfR) exclusivamente en las fracciones solubles de mayor densidad 7-10.

La **figura R.29A** (paneles superiores) y **R.29B** muestra que aproximadamente el 40% de BRSK1 de sinaptosomas se asocia a dominios *lipid raft* (fracciones 2-3), mientras que BRSK2 y la quinasa *upstream* LKB1 se detectan exclusivamente en las fracciones solubles no-*raft* (8-10).

Para confirmar la presencia de BRSK1 en *lipid rafts*, se utilizó un método alternativo de extracción en el que los sinaptosomas son solubilizados a temperatura fisiológica (37°C) con el detergente no iónico Brij 98. La **figura R.30A** muestra como el contenido de proteína (blanco) y colesterol (negro) se distribuye por el gradiente de manera similar al observado con la solubilización con Triton X-100, con dos picos de proteína en las fracciones *lipid raft* (2-4) y soluble (8-10), y un enriquecimiento de colesterol en las fracciones de *lipid raft* (2-4). La detección mediante inmunoblot del receptor de Transferrina exclusivamente en las fracciones solubles no-*raft* (8-10) y de Flotilina-1 en las fracciones *raft* (2-4) muestra la correcta separación de *lipid rafts* en el gradiente. En estas condiciones de solubilización, la fracción 3 de *lipid raft* presenta una cantidad considerablemente mayor de BRSK1 que las fracciones solubles 8-10, mientras que LKB1 se detecta exclusivamente en las fracciones no-*raft* (**figura R.30C** paneles control, Ctrl). Por tanto, usando dos detergentes no iónicos diferentes y dos temperaturas diferentes de extracción, se muestra que un *pool* de BRSK1 de sinaptosomas de cerebro (pero no BRSK2 o la quinasa activadora LKB1) se encuentra asociado a los microdominios de membrana *lipid rafts*.

Con el fin de estudiar la dependencia de colesterol en la asociación de BRSK1 a los *lipid rafts*, se trataron sinaptosomas de rata con metil-β-ciclodextrano (mβCD) antes de su solubilización con Brij 98. Este oligosacárido permite la extracción selectiva del colesterol de las membranas, causando la dispersión de los dominios *raft*, y por tanto afectando a la localización de las proteínas asociadas a ellos (Zidovetzki & Levitan, 2007). Como se esperaba, el tratamiento con mβCD resulta en la pérdida de colesterol de las fracciones 2-4 (**figura R.30B**). La **figura R.30C** (paneles mβCD) muestra que el tratamiento con mβCD provoca la desaparición de BRSK1 y el marcador Flotilina-1 de las fracciones *raft* 2-4, lo que demuestra que BRSK1 se asocia a *lipid rafts* de manera dependiente de colesterol.

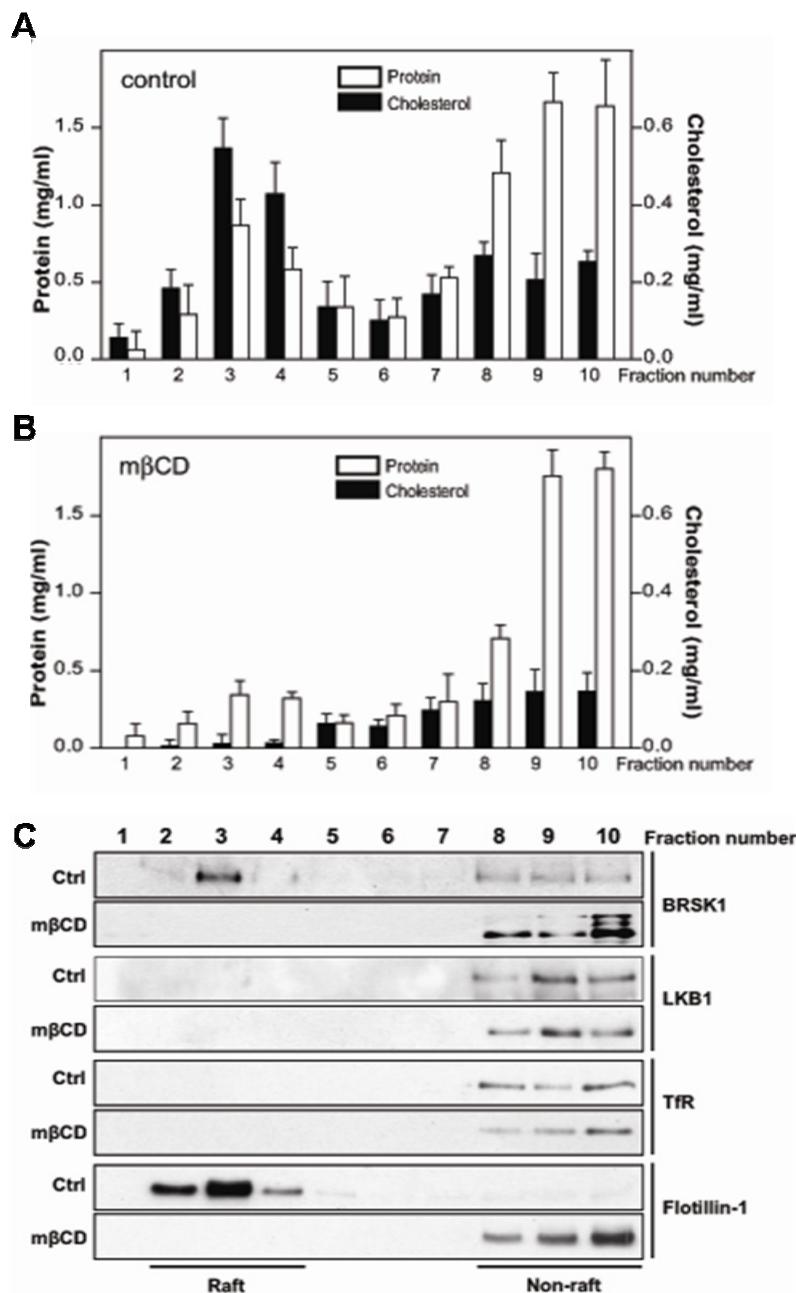


Figura R.30 Efecto de la depleción de colesterol de *lipid rafts* en la localización de BRSK1. Sinaptosomas de cerebro de rata fueron tratados con o sin 50 mM de metil- β -ciclodexano (m β CD) durante 15 minutos antes de su solubilización con 1% de Brij 98 a 37°C. Las fracciones de *lipid rafts* se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (ver Material y Métodos). Los gráficos muestran la concentración de proteína (blanco) y colesterol (negro) de las 10 fracciones recogidas de sinaptosomas control sin tratar (**A**) y tratados con m β CD (**B**). Los valores son medias \pm s.d. de tres experimentos diferentes. (**C**) Detección de BRSK1 y LKB1 mediante immunoblot de las fracciones obtenidas de sinaptosomas control y tratados con m β CD. Receptor de Transferrina (TfR), marcador de fracciones solubles no-raft; Flotilina-1, marcador de fracciones raft. Resultados representativos de tres fraccionamientos independientes.

R.3.4 La asociación de BRSK1 a *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata resulta en una quinasa más activa.

A continuación se estudió si el enclave de BRSK1 en *lipid rafts* tenía efecto sobre su actividad quinasa. En primer lugar se diseñaron experimentos para medir la actividad frente a péptidos sustrato mediante la inmunoprecipitación de BRSK1 de las fracciones soluble y *lipid raft*. Sin embargo, resultó imposible inmunoprecipitar BRSK1 de las fracciones *raft* usando el método estándar. De forma alternativa, diferentes autores han descrito que la inmunoprecipitación de proteínas de fracciones *raft* requiere la solubilización de la muestra con RIPA buffer (Radeva & Sharom, 2004). Este tampón contiene 0,1% de detergente iónico SDS, que desafortunadamente inhibe de forma irreversible la actividad quinasa de BRSK1. Así pues, se decidió estimar su actividad mediante la monitorización de la fosforilación de la Thr189 del T-loop utilizando el anticuerpo fosfo-específico generado (**figura R.10**, Capítulo 1). Como se ha mencionado anteriormente, la actividad quinasa de BRSK1 es proporcional al grado de fosforilación por LKB1 de la Thr189.

La **figura R.31** muestra que la BRSK1 asociada a *lipid rafts* de sinaptosomas se encuentra más fosforilada en la Thr189 del T-loop y, por tanto, es más activa que la BRSK1 presente en la fracción soluble no-*raft*. Cabe destacar que la banda detectada con el anticuerpo pT189 en la fracción *lipid raft* corresponde a BRSK1, dado que puede ser inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-BRSK1 a partir de la muestra solubilizada con RIPA buffer.

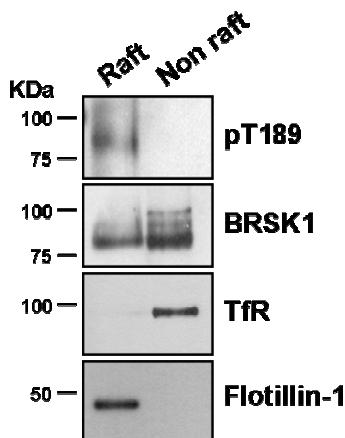


Figura R.31 Actividad de BRSK1 en *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata. Fracciones 3 (*raft*) y 10 (no-*raft*) de preparaciones de *lipid rafts* de sinaptosomas de rata (ver Material y Métodos) fueron analizadas mediante inmunoblot para la detección de BRSK1 fosforilada en la Thr189 de T-loop (pT189). Se muestran cantidades similares de BRSK1 en las dos fracciones (BRSK1). TfR (Receptor de Transferrina), marcador fracción soluble no-*raft*; Flotilina-1, marcador fracción *lipid raft*. Resultados representativos de tres fraccionamientos independientes.

R.3.5 Caracterización de la activación de BRSK1 por el contenido lipídico de microdominios *raft*.

Para comprobar que el microentorno hidrofóbico de los *lipid rafts* potencia la actividad BRSK1, se realizaron ensayos *in vitro* de actividad quinasa en los que se incubó una preparación pura de BRSK1 recombinante con vesículas lipídicas extraídas de la fracción *raft*.

Las vesículas lipídicas extraídas de la fracción *raft* activan BRSK1 *in vitro*.

En primer lugar, los lípidos de la fracción *raft* de sinaptosomas de rata solubilizados con Triton X-100 fueron extraídos con cloroformo/metanol y reconstituidos en vesículas lipídicas que denominamos “vesículas *raft*” (ver Material y Métodos). Tras establecer las condiciones óptimas del ensayo, las vesículas *raft* fueron incubadas con BRSK1 pura y, mediante ensayo radiométrico, se determinó la actividad quinasa utilizando péptido sustrato CHKtide y ^{32}P -ATP/Mg. El gráfico superior de la **figura R.32A** muestra la actividad específica de BRSK1 tras ser incubada con diferentes volúmenes de vesículas *raft*. La pre-incubación con vesículas lipídicas incrementa la actividad de BRSK1 de manera dosis dependiente, con un máximo de activación de 3.5 veces cuando se usó 1 μl de vesículas *raft* en el ensayo. Como control, se determinó la actividad de otras dos quinasas de la subfamilia de las AMPK-related kinases, la isoforma BRSK2 (ausente de la fracción *raft* de sinaptosomas de cerebro de rata) y MARK4 (gráficos inferiores **figura R.32A**). Bajo las mismas condiciones experimentales, las vesículas *raft* no tienen efecto alguno en la actividad de estas quinasas, lo que demuestra que la activación por vesículas de BRSK1 es específica para esta quinasa.

Adicionalmente se estudió si vesículas reconstituidas de lípidos extraídos de la fracción soluble (denominadas “vesículas no-*raft*”) afectaban la actividad de BRSK1. Como muestra la **figura R.32B**, la pre-incubación de BRSK1 con 1 μl de vesículas no-*raft* (negro) no tiene efecto en la actividad quinasa, lo que muestra que la activación de BRSK1 es específica de los lípidos presentes en microdominios *rafts*.

Finalmente, el estudio de activación de BRSK1 por vesículas *raft* se completó con la determinación de la actividad quinasa medida frente la fosforilación de un sustrato fisiológico de BRSK1. Varios autores han propuesto que las BRSKs fosforilan la proteína asociada a microtúbulos tau en la serina 262 (Barnes et al, 2007; Choi et al, 2008; Muller et al, 2010), de manera que se realizó un ensayo en el que se pre-incubó BRSK1 con vesículas *raft* y se midió la fosforilación de tau en presencia de ATP frío y magnesio. El correspondiente inmunoblot (**figura R.32C**) muestra un incremento en la fosforilación de tau en la Ser262 cuando BRSK1 fue incubada con vesículas *raft*. Así, tanto mediante el uso de un péptido sustrato (CHKtide) como de

un sustrato fisiológico (tau), se muestra que los lípidos extraídos *lipid raft* de sinaptosomas activan BRSK1.

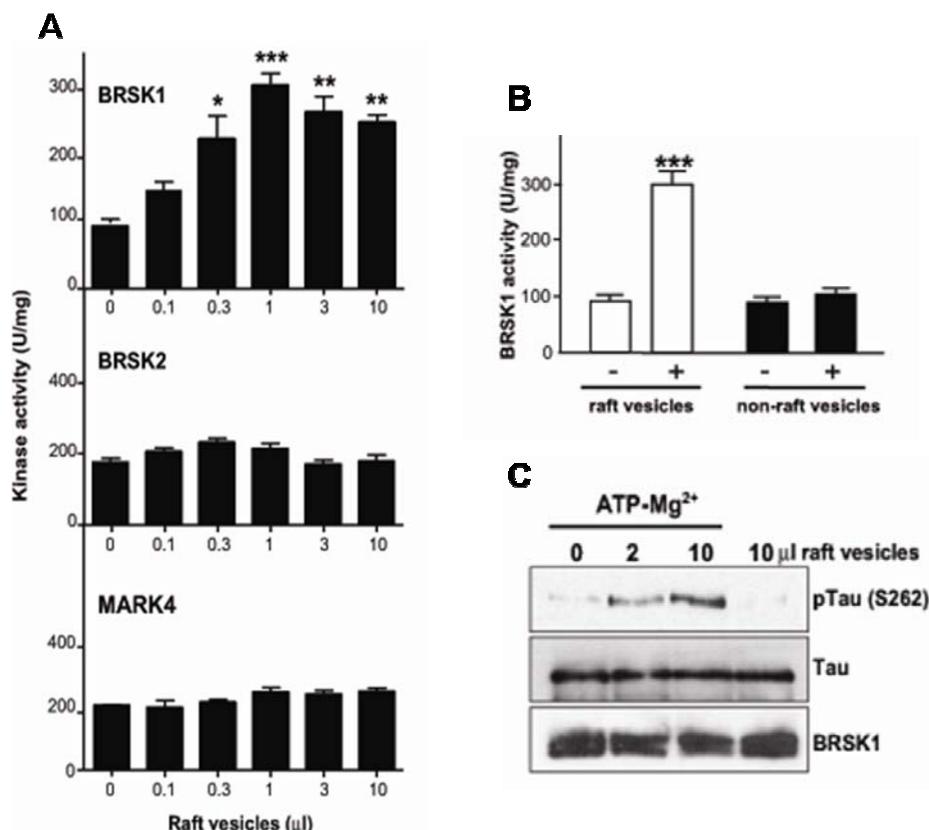


Figura R.32 Las vesículas lipídicas extraídas de *lipid rafts* (vesículas *raft*) activan BRSK1 *in vitro*. (A) Efecto de las vesículas reconstituidas con lípidos de las fracciones *raft* sobre la actividad quinasa *in vitro* de BRSK1, BRSK2 y MARK4 puras. Lípidos de la fracción 3 (*raft*) del gradiente de sacarosa de sinaptosomas de cerebro de rata fueron extraídos y reconstituidos como vesículas multilamelares tal y como se describe en Material y Métodos. Tras la incubación de 60 ng de cada quinasa purificada con los volúmenes indicados de vesículas *raft* (30 minutos en agitación suave), se determinó la actividad quinasa usando 200 μ M 32 P-[γ -ATP]/Mg²⁺ y 200 μ M de péptido sustrato CHKtide (BRSK1 y BRSK2) o AMARA (MARK4). Los valores de actividad específica son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado de cuatro experimentos independientes (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001). (B) Como en (A), comparación de la actividad específica de BRSK1 en presencia de vesículas *raft* (blanco) y vesículas no-*raft* (negro). Estas últimas fueron reconstituidas con lípidos de la fracción 10 del gradiente de sacarosa. Los resultados son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado de cuatro experimentos independientes (** P<0.001). (C) Efecto de las vesículas *raft* en la fosforilación de Tau mediada por BRSK1. Tras incubar 60 ng de BRSK1 con 2 o 10 μ l de vesículas *raft* (30 minutos en agitación suave), se determinó la actividad BRSK1 utilizando 200 μ M ATP frío y 100 ng de Tau pura como sustrato. La fosforilación de Tau en Ser262 se detectó mediante inmunoblot [pTau(S262)]. Se muestran también los inmunoblots correspondientes a los niveles de Tau y BRSK1. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

La activación de BRSK1 por vesículas *raft* es independiente de la fosforilación de la Thr189 del T-loop.

A continuación se estudió si la activación de BRSK1 por vesículas *raft* era mediada por un incremento en la fosforilación de la Thr189 del T-loop de la quinasa. Como se ha mencionado con anterioridad, LKB1 activa a BRSK1 mediante la fosforilación directa de la Thr189, y la mutación de este residuo a glutámico (T189E) resulta en una forma de BRSK1 constitutivamente activa. Así, se incubó BRSK1 salvaje o el mutante BRSK1-T189E con vesículas *raft*, y se determinó la actividad quinasa mediante ensayo radiométrico utilizando péptido sustrato CHKtide. La figura R.33 muestra como las vesículas reconstituidas con lípidos *raft* aumentan unas tres veces la actividad de la forma constitutivamente activa BRSK1-T189E, de la misma manera que lo hace con la quinasa salvaje. Por tanto, las vesículas *raft* activan a BRSK1 a través de un mecanismo independiente de la fosforilación del T-loop por LKB1.

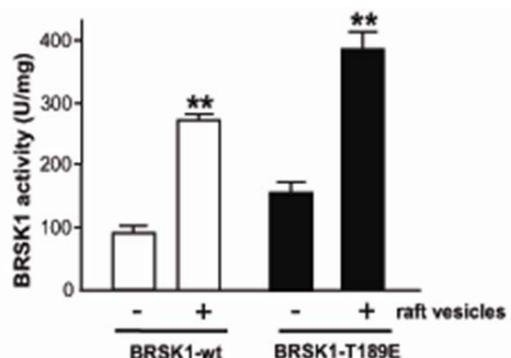


Figura R.33 Aumento de la actividad de la forma constitutivamente activa de BRSK1 (BRSK1-T189E) por vesículas *raft*. Lípidos de la fracción 3 (*raft*) del gradiente de sacarosa de sinaptosomas de cerebro de rata fueron extraídos y reconstituidos como vesículas multilamelares tal y como se describe en Material y Métodos. Tras la incubación de 60 ng de BRSK1 salvaje (BRSK1-wt) o el mutante BRSK1-T189E con 1 μ l de vesículas *raft* (30 minutos en agitación suave), se determinó la actividad quinasa utilizando 200 μ M [32 P]-[γ -ATP]/Mg²⁺ y 200 μ M de péptido sustrato CHKtide. Los valores de actividad específica corresponden a medias \pm s.d. de ensayos por triplicado de tres experimentos independientes (** P<0.01).

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que BRSK1 se asocia a *lipid rafts* de sinaptosomas de cerebro de rata, enclavándose en un entorno lipídico peculiar que resulta en una forma de BRSK1 con mayor actividad quinasa, mediante un mecanismo independiente de la fosforilación del T-loop por LKB1. De interés, las vesículas *raft* no activan a otras quinasas de la misma subfamilia de BRSK1 (como BRSK2 o MARK4) que, por otra parte, no se encuentran localizadas en estos microdominios de membrana.

R.3.6 Vesículas sintéticas con el mismo contenido lipídico de vesículas raft activan BRSK1.

Con la intención de identificar qué lípido contenido en vesículas *raft* era responsable de la activación de BRSK1, se generaron vesículas lipídicas sintéticas. Para ello, en primer lugar se analizó la concentración de los principales lípidos presentes en vesículas *raft*. Por definición, los *lipid rafts* son dominios de membrana ricos en colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos y glicolípidos. Dado que el método de extracción por cloroformo/metanol utilizado en la reconstrucción de vesículas *raft* no permite la obtención de glicolípidos (Claro et al, 1991), se determinó la concentración de los otros tres componentes lipídicos mayoritarios. La tabla de la figura R.34A muestra la relación molar de esfingolípidos / colesterol / esfingomielina encontrada,

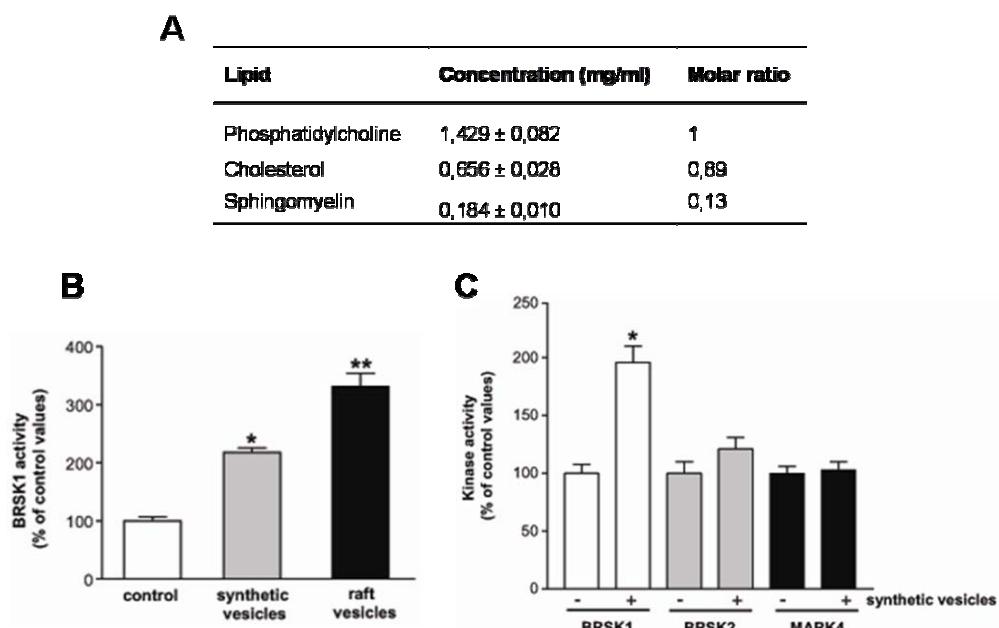


Figura R.34 Aumento de la actividad de BRSK1 por vesículas sintéticas. (A) Concentración y relación molar de los lípidos mayoritarios presentes en la fracción *raft* de sinaptosomas de rata. Lípidos de la fracción 3 (*raft*) del gradiente de sacarosa fueron extraídos mediante cloroformo/metanol, y se determinó la concentración de fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina según se describe en Material y Métodos. Los valores son medias ± s.d. de tres determinaciones diferentes. (B) Efecto de las vesículas sintéticas versus vesículas *raft* en la activación de BRSK1. 10 µl de vesículas *raft* o sintéticas (compuestas por fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina a las concentraciones encontradas en (A)) fueron incubadas con 60 ng de BRSK1, y la actividad quinasa determinada utilizando 200 µM ^{32}P -[γ-ATP]/Mg²⁺ y 200 µM de péptido sustrato CHKtide. Los valores de actividad específica son medias ± s.d. de ensayos por triplicado de tres experimentos independientes (* P<0,05, ** P<0,01). (C) Como en (B), 10 µl de vesículas sintéticas fueron incubados con preparaciones puras de BRSK1, BRSK2 y MARK4, y sus actividades quinasa determinadas utilizando 200 µM ^{32}P -[γ-ATP]/Mg²⁺ y 200 µM de péptido sustrato CHKtide (BRSK1 y BRSK2) o AMARA (MARK4). Los valores de actividad específica corresponden a medias ± s.d. de ensayos por triplicado de tres experimentos independientes (* P<0,05).

y que fue utilizada para generar vesículas multilamelares que denominamos “vesículas sintéticas”. La **figura R.34B** muestra que la incubación de BRSK1 con vesículas sintéticas resulta en un aumento de 2.5 veces de su actividad quinasa, en comparación con las tres veces que aumenta en presencia de vesículas *raft*. Sin embargo, e igual que ocurre para las vesículas *raft*, las vesículas sintéticas no presentan efecto alguno en la actividad de BRSK2 o MARK4 (**figura R.34C**).

Por último, y con la finalidad determinar la importancia relativa de cada lípido en la activación de BRSK1, se generaron vesículas sintéticas en las que se modificó el contenido lipídico encontrado en vesículas *raft*. En primer lugar se aumentó la concentración de fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina, manteniendo fija la relación molar encontrada en las vesículas *raft*. La **figura R.35A** muestra que doblar la concentración de lípidos resulta en una activación “subóptima” de BRSK1, mientras que el aumento de 4 veces no provoca efecto activador significativo en la actividad quinasa. También se estudió el efecto individual del colesterol y de la esfingomielina, para lo que se generaron vesículas binarias (de fosfatidilcolina y colesterol o fosfatidilcolina y esfingomielina) con la misma concentración lipídica que contenían las vesículas *raft*. La incubación de estas vesículas sintéticas binarias no presenta ningún efecto en la actividad de BRSK1, como tampoco lo tiene el aumento de 2 o 4 veces del contenido de

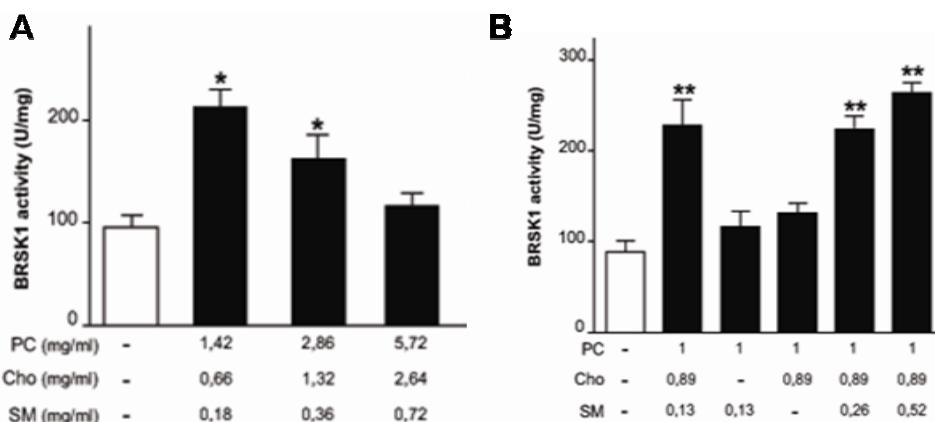


Figura R.35 Efecto de la variación en el contenido lipídico de las vesículas sintéticas sobre la actividad de BRSK1. **(A)** Efecto sobre la actividad de BRSK1 de vesículas sintéticas fabricadas con concentraciones crecientes de lípidos (x2 y x4), manteniendo la relación molar con la se encuentran en vesículas *raft*. 10 μ l de vesículas sintéticas se incubaron con 60 ng de BRSK1, y se determinó la actividad quinasa utilizando 200 μ M 32 P-[γ -ATP]/Mg²⁺ y 200 μ M de péptido sustrato CHKtide. Los valores de actividad específica son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado de dos experimentos diferentes (* P<0.05). **(B)** Efecto del colesterol y esfingomielina en la activación de BRSK1. Como en (A), se determinó la actividad quinasa BRSK1 tras ser incubada con vesículas sintéticas binarias fabricadas con fosfatidilcolina y colesterol o esfingomielina, y con vesículas sintéticas con concentraciones crecientes (x2 y x4) de esfingomielina. Los números indican la relación molar referida a fosfatidilcolina. Los valores son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado de dos experimentos diferentes (** P<0.01). PC, fosfatidilcolina; Cho, colesterol; SM, esfingomielina.

esfingomielina (**figura R.35B**). En su conjunto, estos resultados muestran que la relación molar de lípidos sintéticos que más eficazmente aumenta la actividad BRSK1, es la que se encuentra en las fracciones *lipid raft*.

RESUMEN

Mediante análisis inmunocitoquímico se muestra que BRSK1 localiza en el soma y en las prolongaciones neuríticas de neuronas corticales maduras, presentando un patrón puntuado similar al descrito para el marcador vesicular sinaptofisina y el marcador axonal tau-1. BRSK2 presenta en cambio un patrón más homogéneo de distribución, similar al marcador MAP2 en las dendritas y al marcador tau-1 en los axones. Por primera vez se describe la expresión de BRSK1 y BRSK2 en astrocitos, dónde se distribuyen de manera continua por el soma y las prolongaciones y co-localizan con el marcador glial GFAP.

Un *pool* de BRSK1 neuronal es resistente a la solubilización con detergente no iónico Triton X-100, como muestran análisis inmunocitoquímicos de neuronas corticales y fraccionamientos subcelulares de sinaptosomas de cerebro de rata. Esta resistencia se explica por la localización de un *pool* de BRSK1 en microdominios de membrana *lipid rafts*, de manera dependiente de colesterol. La asociación de BRSK1 a *lipid raft* de sinaptosomas resulta en una quinasa más activa, como muestra el incremento de fosforilación de la Thr189 del T-loop de BRSK1. La incubación *in vitro* de BRSK1 pura con vesículas lipídicas reconstituidas con lípidos extraídos de la fracción *raft* de sinaptosomas, activa 3 veces la actividad quinasa de BRSK1, pero no la de las quinasas de la misma familia BRSK2 o MARK4. El mismo efecto activador en la actividad BRSK1 se obtiene al utilizar vesículas multilamelares fabricadas con los lípidos sintéticos fosfatidicolina, colesterol y esfingomielina, a una relación molar idéntica a la presente en *lipid rafts*. Por último, las vesículas lipídicas también aumentan la actividad quinasa del mutante constitutivamente activo BRSK1-T189E, que mimetiza la fosforilación por LKB1. En conjunto, estos resultados muestran que la localización de BRSK1 en *lipid rafts* de sinaptosomas representa un nuevo mecanismo de regulación de la actividad quinasa, adicional a la fosforilación del T-loop por LKB1.

