

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



Regulació de la *Brain-specific Kinase 1* (BRSK1) neuronal per sulfàtid i modificacions post-traduccionals

Gerard Ruiz Babot

TESI DOCTORAL

Bellaterra, 2013



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



Regulació de la *Brain-specific Kinase 1* (BRSK1) neuronal per sulfàtid i modificacions post-traduccional

Memòria de tesi doctoral presentada per Gerard Ruiz Babot per optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del doctor José Miguel Lizcano de Vega i el doctor Néstor Gómez Trias a les Unitats de Medicina i Veterinària del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i a l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Director,

Director,

Doctorand,

Dr. José Miguel Lizcano de Vega

Dr. Néstor Gómez Trias

Gerard Ruiz Babot

Bellaterra, 2013

Aquest estudi ha estat realitzat gràcies a la financiació dels següents projectes:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT), ref.BFU2004-00757
- Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT), ref.BFU2007-60268

Aquest estudi també s'ha realitzat gràcies a la concessió d'una beca predoctoral de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) per a personal investigador en formació (PIF-UAB)

ÍNDEX

ÍNDEX	I
ABREVIATURES	VII
RESUM	XI
INTRODUCCIÓ	1
1. Proteïnes quinases	1
1.1. Classificació	1
1.2. Estructura	3
1.3. Les proteïnes quinases com a dianes terapèutiques	4
2. Via de senyalització LKB1	5
2.1. LKB1 i el síndrome de Peutz-Jeghers	5
2.2. Estructura i regulació de LKB1	5
2.3. LKB1, la quinasa màster	7
2.4. Funcions l'LKB1	7
2.4.1. LKB1 i el metabolisme cel·lular	7
2.4.2. LKB1 i el creixement cel·lular	8
2.4.3. LKB1 i la polaritat cel·lular	8
3. Brain Specific Kinases (BRSKs)	9
3.1. Estructura	9
3.2. Distribució	11
3.3. Regulació	11
3.3.1. Traduccional	11
3.3.2. Post-traduccional	12
3.3.2.1. Fosforilació/Defosforilació	12
3.3.2.2. Ubiquitinació	14
3.4. Funció	17
3.4.1. BRSKs en la funció neuronal	17
3.4.1.1. Polarització neuronal	17
3.4.1.2. BRSK1 i la transmissió sinàptica	24

3.4.2. BRSKs i control del cicle cel·lular	24
3.4.3. BRSK2 i control del metabolisme de la glucosa	26
3.4.4. BRSK2 i estrès reticular	28
3.4.5. BRSKs i malalties.....	28
OBJECTIUS	31
RESULTATS	35
PART 1 LOCALITZACIÓ I PALMITOILACIÓ DE LES BRSKs	37
1.1. Localització subcel·lular de BRSK1	39
1.2. Modulació de la localització subcel·lular de BRSK1 en resposta a l'agent despolaritzant KCl	44
1.3. Palmitoilació de BRSK1	45
- Assaig ABE de BRSK1	45
- Estudi del lloc de palmitoilació de BRSK1	47
PART 2: UNIÓ AL SULFÀTID DE LES BRSKs	51
2.1. Unió de BRSK1 a la sulfogalactosilceramida sulfàtid	53
2.2. Caracterització de la regió d'unió al sulfàtid de BRSK1	56
2.3. Estudi de la modulació de sulfàtid sobre BRSK1	60
2.4. Distribució del sulfàtid en cultius	62
2.5. Estudi de la distribució de BRSK1 en diferents tipus neuronals	65
2.6. BRSK1, sulfàtid i lipid rafts	66
2.7. Estudis de cristal·lització del domini SCR2 de BRSK1	67
- Obtenció del fragment His-SUMO-SCR2	67
- Separació dels fragments His-SUMO del fragment SCR2	68
- Dicroisme circular del fragment SCR2 de BRSK1	69
PART 3: POLARITZACIÓ I UBIQUITINACIÓ DE LES BRSKs	73
3.1. Ubiquitinació de les AMPK-related kinases	75
3.2. Identificació de E3 ubiquitina lligases de les BRSKs	77
3.3. Estudi de la ubiquitinació de BRSK1 per la lligasa Smurf1	79
3.4. Ubiquitinació <i>in vitro</i> de BRSK1	82
3.5. Estudi funcional de la ubiquitinació de les BRSKs durant la polaritat neuronal	84
3.6. Smurf1, associació a la membrana i sulfàtid	87
DISCUSSIÓ	91
CONCLUSIONS	119

MATERIAL I MÈTODES	123
1. Caracterització dels anticossos contra BRSK1 i BRSK2	125
1.1. Anàlisi de les BRSKs per <i>western blot</i>	125
1.2. Determinació de l'eficiència d'immunoprecipitació dels anticossos de les BRSKs	126
1.3. Determinació de la distribució de BRSK1 i BRSK2 utilitzant els anticossos d'ovella i conill	127
1.4. Anàlisi de la reacció creuada dels anticossos secundaris contra <i>sheep</i> i <i>goat</i>	129
2. Cultius cel·lulars	130
2.1. Línies	130
2.2. Cultius primaris	130
2.2.1. Cultius neuronals	131
2.2.2. Cultius d'astròcits	131
2.2.3. Oligodendròcits	131
2.3. Material pels cultius	132
3. Transfeccions i lisis cel·lular	132
3.1. Transfecció amb polietilenamina (PEI)	132
3.2. Electroporació	133
3.3. Llisi cel·lular	133
4. Fraccionament subcel·lular	133
5. Assaig ABE	135
6. Tècniques immunocitoquímiques	136
7. Tècniques de biologia molecular	137
7.1. Preparació de bacteris competents i emmagatzematge de plasmidis ..	137
7.1.1. Obtenició de bacteris supercompetents	137
7.1.2. Transformació de bacteris	138
7.1.3. Amplificació i emmagatzematge de plasmidis	138
7.2. Clonatge de vectors	139
7.2.1. Amplificació per PCR	139
7.2.2. Mutagènesis dirigida	139
7.2.3. Purificacions de DNA en gels d'agarosa, digestions i lligacions ...	140

8. Expressió de proteïnes en sistemes bacterians	140
8.1. Inducció de l'expressió proteica en <i>E.coli</i> BL21	140
8.2. Purificació i emmagatzemament de proteïnes recombinants	141
8.2.1. Purificació de proteïnes amb GST	141
8.2.2. Purificació de proteïnes amb His.....	141
9. Tècniques lipídiques	142
9.1. Obtenció de lipid rafts de sinaptosomes de rata	142
9.2. Extracció de lípids de fraccions "raft" i "no raft"	142
9.3. <i>Lipid-protein overlay assay</i>	143
9.4. Assaig d'unió a liposomes	143
9.5. Quantificació de sulfàtid de diferents extractes cel·lulars	144
10. Tècniques per a l'estudi de proteïnes	144
11. Tècniques per a la purificació de proteïnes	145
11.1. Immunoprecipitació (IP)	145
11.2. Pull-down (PD)	145
12. Assajos d'ubiquitinació	146
12.1. Ubiquitinació <i>in vitro</i>	146
12.2. Ubiquitinació <i>in vivo</i>	147
13. Obtenció del complex trimèric LKB1-STRAD-MO25	147
14. Obtenció de BRSK1 pura de cèl·lules d'insecte	147
15. Assajos d'activitat enzimàtica	148
16. Cristal·lització del domini SCR2 de BRSK1	149
16.1. Clonatge del vector pET28b-SUMO-SCR2	149
16.2. Inducció de l'expressió de His-SUMO-SCR2 i llisi bacteriana	149
16.3. Purificació del fragment His-SUMO-SCR2	149
16.4. Tall amb la proteasa de SUMO SENP2 i dialització de les mostres.	149
16.5. Proves d'obtenció del domini SCR2 pur	149
16.6. Dicroïsmes circulars del fragment SCR2	150
16.7. Gel filtració del fragment His-SUMO-SCR2	150
16.8. Proves de cristal·lització del fragment His-SUMO-SCR2	150
17. Eines bioinformàtiques	150
18. Anàlisi de dades	151
BIBLIOGRAFIA	153

ANNEXOS	185
Annex 1: Llistat de plasmidis utilitzats	187
Annex 2: Llistat de primers utilitzats	191
Annex 3: Tampons utilitzats pels talls amb enzims de restricció	193
Annex 4: Llistat d'anticossos utilitzats	195
Annex 5: Article: 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, <u>Ruiz-Babot G</u> , Romero W, Cubí R, Erazo T, Biondi RM, Bayascas JR, Aguilera J, Gómez N, Gil C, Claro E, Lizcano JM.	197

ÍNDIX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Fig. I1: El kinoma humà	1
Fig. I2: Estructura del domini catalític de les proteïnes quinases.....	4
Fig. I3: Representació esquemàtica de LKB1 humana	6
Fig. I4: El complex LKB1-STRAD-MO25 i els seus substrats	7
Fig. I5: Estructura de BRSK1 i BRSK2	9
Fig. I6: Alineament de BRSK1 i BRSK2	10
Fig. I7: Integració de senyals de la via LKB1-BRSKs i la via PI3K-PKB-Mtor.....	12
Fig. I8: Model de regulació de l'activitat de les <i>AMPK-related kinases</i> NUA1 i MARK4 per ubiquitinació.....	15
Fig. I9: Diferents estadis durant el desenvolupament neuronal <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	18
Fig. I10: Model d'especificació axonal controlada per Smurf1.....	21
Fig. I11: Model de funcionament de les BRSKs en la organització sinàptica i la polaritat neuronal proposat per Kim et al	23
Fig. I12: Regulació per BRSK2 de la secreció d'insulina en resposta als nivells de glucèmia	27

RESULTATS

Fig. R1: BRSK1 localitza al citosol i a la membrana cel·lular, de manera resistent a la solubilització pel detergent Triton X-100	39
Fig. R2: Efecte del detergent Triton X-100 en la tinció immunocitoquímica de BRSK1 en cultius de neurones corticals de rata i ratolí	40
Fig. R3: BRSK1, però no BRSK2, localitza als <i>lipid rafts</i> de sinaptosomes de rata	41
Fig. R4: BRSK1 es troba a les neurites i al soma, però no al nucli, en cultius de neurones hipocampals de rata a 3 DIV	41
Fig. R5: BRSK1 sobreexpressada en cèl·lules 293T i HeLa presenta el mateix patró de localització subcel·lular que la proteïna endògena	42
Fig. R6: Tant BRSK1 activa com inactiva presenten el mateix patró de localització subcel·lular	43
Fig. R7: El domini quinasa i la cua C-terminal de BRSK1 localitzen a la fracció Particulada	43
Fig. R8: La despolarització de neurones corticals de ratolí amb KCl provoca un augment en la localització particulada de BRSK1.....	44
Fig. R9: La despolarització de cèl·lules SH-SY5Y amb KCl provoca un augment en la localització particulada de BRSK1	45
Fig. R10: BRSK1, però no BRSK2, està palmitoilada en extractes de cervell de rata	46
Fig. R11: L'inhibidor de la palmitoilació 2-bromopalmitat (2-BP) redueix parcialment l'augment en la localització particula de BRSK1 induït per despolarització amb KCl.....	47
Fig. R12: Localització dels residus de cisteïnes de BRSK1.....	48
Fig. R13: La localització particulada del domini quinasa de BRSK1 no es veu afectada pels mutants de cisteïnes en posició 54 i 217	48
Fig. R14: La localització particulada del domini quinasa o de la proteïna BRSK1	

salvatge no es veu afectada pels mutants de cisteïnes	49
Fig. R15: BRSK1 uneix la sulfogalactosilceramida sulfàtid en assajos de <i>lipid-protein overlay assay</i>	53
Fig. R16: BRSK1 i BRSK2 uneixen sulfàtid específicament	54
Fig. R17: Sinaptobrevina2 i, en menor mesura Munc18, uneixen sulfàtid	55
Fig. R18: BRSK1 no uneix fosfatidilinositols	55
Fig. R19: Anàlisi d'unió al sulfàtid de diferents mutants de delecció de BRSK1	56
Fig. R20: Anàlisi d'unió al sulfàtid de diferents mutants de delecció de BRSK1 en assajos d'unió a liposomes	57
Fig. R21: Anàlisi de la unió al sulfàtid de les regions SCR1 i SCR2 de BRSK1	58
Fig. R22: Anàlisi de la unió al sulfàtid de sondes peptídiques derivades del fragment SCR2 de BRSK1	59
Fig. R23: El sulfàtid augmenta l'activitat quinasa de BRSK1 <i>in vitro</i>	60
Fig. R24: Tau interacciona feblement amb sulfàtid	61
Fig. R25: El sulfàtid no modula l'activació de BRSK1 per LKB1	61
Fig. R26: Estudi de la distribució del sulfàtid en diferents tipus cel·lulars neuronals mitjançant assajos immunocitoquímics utilitzant anticòs contra el sulfàtid Sulph1	63
Fig. R27: Quantificació dels nivells de sulfàtid d'extractes cel·lulars utilitzant l'anticòs Sulph1	64
Fig. R28: Distribució de BRSK1 en diferents tipus cel·lulars	65
Fig. R29: BRSK1 uneix lípids extrets de lipid rafts	66
Fig. R30: Purificació de la regió SCR2 de BRSK1	67
Fig. R31: Efecte de NaCl en la solubilitat de la regió SCR2 de BRSK1 i His-SUMO	68
Fig. R32: Anàlisi de l'estructura secundària per dicromisme circular de la regió SCR2 ...	69
Fig. R33: Purificació per filtració en gel de la proteïna His-SUMO-SCR2	70
Fig. R34: La inhibició del proteasoma resulta en un augment de les espècies ubiquitinades de la BRSK1 i BRSK2 sobreexpressades	75
Fig. R35: Anàlisi d'ubiquitinació de BRSK1	76
Fig. R36: Estudi de la ubiquitinació de BRSK1 i BRSK2 per les E3 ubiquitina lligases reguladores de la polaritat neuronal	77
Fig. R37: La sobreexpressió d'Smurf1 indueix la degradació de BRSK1 i BRSK2, mentre que la sobreexpressió d'Smurf2 no afecta els nivells de BRSK2	78
Fig. R38: La sobreexpressió d'Smurf1 promou la degradació de la BRSK1 endògena ...	79
Fig. R39: La sobreexpressió del mutant d'Smurf1 sense activitat E3 lligasa (C699A) no promou la ubiquitinació i degradació de BRSK1	79
Fig. R40: BRSK1 interacciona amb el mutant inactiu d'Smurf1	80
Fig. R41: Smurf1 promou l'ubiquitinació del domini quinasa, però no la cua C-terminal de BRSK1	80
Fig. R42: Smurf1 utilitza la E2 lligasa Ubch5, però no la Ubch7, per induir la degradació de BRSK1	81
Fig. R43: Expressió i purificació dels components necessaris per a realitzar l'assaig d'ubiquitinació <i>in vitro</i>	82
Fig. R44: Ubiquitinació de Par6 per Smurf1 <i>in vitro</i>	83
Fig. R45: La E3 lligasa Smurf1 ubiquitina BRSK1 <i>in vitro</i>	84
Fig. R46: La fosforilació de la Thr306 d'Smurf1 regula els nivells d'expressió de BRSK1	84
Fig. R47: La proteïna quinasa A (PKA) regula l'estabilitat de BRSK1 per mitjà de la lligasa Smurf1	85

Fig. R48: Les BRSKs actives localitzen a l'axó en neurones hipocampals de rata	86
Fig. R49: BRSK1 i BRSK2 colocalitzen amb Par6 a l'axó en neurones hipocampals de Rata.....	86
Fig. R50: BRSK1 i BRSK2 no fosforilen Par6 o RhoA <i>in vitro</i>	87
Fig. R51: Smurf1 uneix sulfàtid i els fosfoinositids PI(3)P, PI(4)P i PI(5)P	88
Fig. R52: Estudi de la unió d'Smurf1 i els seus substrats Par6 i RhoA al sulfàtid	88
Fig. R53: El mutant del domini C2 de Smurf1, que no localitza a la membrana, no indueix la degradació de BRSK1	89

DISCUSSIÓ

Fig. D1: Orientació de les cadenes de palmitoil als <i>lipid raft</i>	97
Fig. D2: Model de palmitoilació de BRSK1 en resposta a la despolarització induïda per KCl	98
Fig. D3: Diversitat d'estructures del sulfàtid en funció de la cadena d'àcid gras	99
Fig. D4: Model de polarització neuronal induït per l'activació de la PKA	109
Fig. D5: Estudi de la fosforilació de la Ser262 de Tau per BRSK1 en diferents estadis de la polarització neuronal	112
Fig. D6: Senyalització orquestrada per GTPases de la família Rho en neurones	115

MATERIAL I MÈTODES

Fig. M1: Alineament de les regions C-terminal de BRSK1 i BRSK2	125
Fig. M2: Caracterització dels anticossos per BRSK1 i BRSK2 per immunoblot	126
Fig. M3: Caracterització dels anticossos per BRSK1 i BRSK2 per immunoprecipitació ...	127
Fig. M4: Immunofluorescència de BRSK1 i BRSK2 en neurones hipocampals.....	128
Fig. M5: Immunofluorescència de BRSK1 i BRSK2 astròcits de rata	128
Fig. M6: Patró de reconeixement dels anticossos secundaris d'ovella i cabra.....	129
Fig. M7: Representació esquemàtica del fraccionament subcel·lular	134
Fig. M8: Representació esquemàtica de l'assaig de palmitoilació ABE assay	135

LLISTAT ABREVIATURES

A β	Amyloid beta
ABE	Acyl biotin exchange
ALA (A)	Alanine
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
AMPKK	AMP-Activated Protein Kinase Kinase
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ASP (D)	Aspartic acid
ASA	Arylsulfatase A
ATP	Adenosine triphosphate
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BRSK1	Brain-specific kinase 1
BRSK2	Brain-specific kinase 2
CAMK	CaMK kinase
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CDC	Cell division cycle
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CGT	UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase
CST	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate:cerebroside sulfotransferase
CYS (C)	Cysteine
Db-cAMP	Dibutyryl cyclic AMP
DIV	Days in vitro
DUB	deubiquitylating enzyme
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GALC	Galactocerebrosidase
GAP	GTPase activating proteins
GDI	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
Gly (G)	Glycine
GSIS	<i>Glucose-stimulated insulin secretion</i>
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HECT	Homologous to the E6AP carboxyl terminus
HEK293T	Human embryonic kidney 293T cell line
His (H)	Histidine
Jab1	Jun activating binding <i>protein 1</i>

KCl	Potassium chloride
KD	Kinase domain
KO	Knock-out
Leu (L)	Leucine
LKB1	Liver kinase B1
Lys (K)	Lysine
MAP	Microtubule-associated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARK	Microtubule affinity-regulating kinase
MO25	Mouse protein 25
mTORC	Mammalian Target of Rapamycin Complex
NGF	Nerve growth factor
NAB-1	Neurabin-1
PAGE	Polyacrylamide gel
PAK1	P21-Activated <i>Kinase</i> 1
PAR	Partitioning-defective protein
PATs	palmitoil-transferases
PDK1	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP	phosphatidylinositol phosphate
PKA	Protein kinase A
PKB (AKT)	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PSD95	postsynaptic scaffolding protein 95
PTEN	Protein Tyrosine <i>Phosphatase</i>
ROCK	Rho-associated <i>protein</i> kinase
SAD	Synapses of amphids defective
SCR	Short conserved region
SEN2	<i>Sentrin-specific protease 2</i>
Ser (S)	Serine
SMURF1/2	<i>Smad</i> ubiquitin regulatory factor 1/2
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SNARE	SNAP receptor
STRAD	STE20-related adaptor
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAK1	Transforming growth factor β -activated kinase 1
Thr (T)	Threonine
TRIM2	tripartite motif2
TSC	Tuberous sclerosis complex
Tyr (Y)	Tyrosine
UBA	ubiquitin-associated domains
UBD	ubiquitin-binding domains
UPS	ubiquitin-proteasome system

RESUM

Les *Brain Specific Kinase 1 i 2* (BRSK1 i 2), també conegudes com a SAD quinases, són proteïnes Ser/Thr quinases de la família de les *AMPK-related kinases*. Les BRSKs són activades per fosforilació directa de la quinasa màster LKB1 en un residu conservat del *loop* d'activació o *T-loop* (Thr189 per BRSK1 i Thr174 per BRSK2). Les BRSKs presenten un domini quinasa a l'extrem N-terminal seguit d'un domini d'unió a ubiquitines (UBA) i una cua a l'extrem C-terminal sense dominis funcionals identificables. Aquestes quinases s'expressen majoritàriament al sistema nerviós, on regulen la polarització neuronal, la sinaptogènesis i l'alliberament de neurotransmissors. Malgrat això, els mecanismes implicats en la regulació d'aquestes quinases no han estat descrits.

En aquest treball, mitjançant fraccionament subcel·lular i tinció immunocitoquímica, demostrem en diferents tipus cel·lulars que una fracció de BRSK1 localitza en membranes i que és resistent a l'extracció pel detergent Triton X-100. A més, utilitzant sinaptosomes de cervell de rata, demostrem la presència de BRSK1, però no de BRSK2, en microdominis de membrana *lipid raft*. Amb l'objectiu de determinar el mecanisme d'associació a la membrana, s'ha observat en extractes de cervell de rata que BRSK1, a diferència de BRSK2, està palmitoilada. La palmitoilació és una modificació post-traducciona en la que un residu de cisteïna es modifica covalentment per palmitat. Malgrat que s'han generat diferents els mutants individuals i combinacions de tots els residus de cisteïna, no s'ha identificat el/s residu/s modificats per palmitoilació.

Estudis previs d'activitat quinasa realitzats al laboratori mostren que la incubació de BRSK1 amb vesícules generades amb els lípids dels *lipid rafts* resulta en un augment de l'activitat quinasa, el que suggereix que BRSK1 podria interaccionar amb algun dels lípids presents a *lipid rafts*. Mitjançant assajos de *lipid-protein overlay assay* i d'unió a liposomes, hem observat que BRSK1 uneix específicament la sulfogalactosilceramida sulfàtid. A més, liposomes que contenen sulfàtid activen a la BRSK1 *in vitro*, el que representa un nou mecanisme d'activació de BRSK1, possiblement al·lostèric. La generació de mutants de deleció de BRSK1 que codifiquen per diferents dominis i regions, ha permès la identificació de la regió de la cua C-terminal anomenada *short conserved region 2* (SCR2, responsable de la localització puntuada de BRSK1 en neurones), com la principal regió d'unió al sulfàtid.

D'altra banda, hem observat que BRSK1 està ubiquitinada *in vivo* en assajos en cèl·lules tractades amb l'inhibidor del proteosoma MG-132. Després de considerar diferents E3 ubiquitina lligases implicades en la polarització neuronal (Trim2 i Smurf1/2), hem determinat en cèl·lules en cultiu que Smurf1 interacciona amb BRSK1 i la ubiquitina. Aquesta observació ha estat corroborada mitjançant estudis d'ubiquitinació *in vitro* amb les proteïnes purificades, on també s'ha comprovat que la poliubiquitinació de BRSK1 per Smurf1 no genera ramificacions d'ubiquitina a través de les Lys 48 i 63. D'altra banda, la ubiquitinació de BRSK1 per Smurf1 és de tipus degradatiu, ja que la sobreexpressió de la lligasa salvatge, però no la inactiva, resulta en una disminució dels nivells de la BRSK1 cel·lular.

Smurf1 indueix la degradació específica de proteïnes implicades en l'establiment de la polaritat neuronal. En neurones no diferenciades Smurf1 ubiquitina i promou la degradació de proteïnes pro-polaritzants, com Par6. En resposta a augments de AMPc, la proteïna quinasa A (PKA) fosforila Smurf1 a la Thr306, promovent la degradació de proteïnes que inhibeixen el creixement axonal a la neurita que esdevindrà axó. En aquest treball demostrem que la forma no fosforilada d'ubiquitina BRSK1 i en promou la seva degradació, mentre que la fosforilació d'ubiquitina per PKA impedeix aquesta degradació. Ja que hem descrit un augment en els nivells de BRSK1 als primers estadis de la diferenciació neuronal, els nostres resultats suggereixen un mecanisme de regulació de la expressió BRSK1 controlat per Smurf1 durant l'establiment de l'eix axó-dendrita, com el descrit per Par6.

SUMMARY

Brain Specific Kinases 1 and 2 (BRSK1 and 2, also known as SAD kinases) are members of the family of AMPK-related Ser/Thr protein kinases. BRSKs are activated by the master kinase LKB1, through the phosphorylation of a threonine residue (T189 for BRSK1, T174 for BRSK2) within the activation loop of the kinase domain. BRSKs have a kinase domain located at the N-terminal, followed by an ubiquitin-binding domain (UBA) and a C-terminal tail with no identifiable functional domains. The BRSKs are mainly expressed at the nervous system, where regulate neuronal polarization, synaptogenesis and neurotransmitter release. However, the mechanisms remain to be described.

Here, using subcellular fractionation and immunocytochemical staining of different cultured cells, we show a pool of cellular BRSK1 that localizes at the membrane, which is resistant to Triton X-100 solubilization. We also show that BRSK1, but not BRSK2, a) associates to lipid rafts microdomains; and b) is palmitoylated. Palmitoylation is the post-translational modification in which the palmitic acid is covalently attached to a cysteine residue. In spite of generating different BRSK1 mutants in which single or several cysteines were mutated, we have not been able to identify primary Cys residue/s palmitoylated.

Previous studies carried out in our laboratory showed that liposomes generated with lipids extracted from raft fractions enhance BRSK1 kinase activity, suggesting that BRSK1 could interact with any of the lipids present in lipid rafts. Using lipid-protein overlay and liposome-binding assays, we show that BRSK specifically interacts with the galactosylceramide sulfatide. Furthermore, sulfatide-containing liposomes specifically enhance BRSK1 activity *in vitro*, underpinning that interaction with sulfatide represents a new, allosteric mechanism of BRSK1 activity modulation, additional to T-loop phosphorylation. Generation of BRSK1 deletion mutants of different regions and domains allowed the identification of the short conserved region 2 (SCR2, located at the C-terminal tail and responsible for the punctuate pattern of neuronal BRSK1) as the main region involved in the binding of sulfatide to BRSK1.

We found that BRSK1 is ubiquitylated in cells treated with the proteasome inhibitor MG-132. After studying the E3 ubiquitin ligases which regulate neuronal polarization (Trim2 and Smurf1/2), we show in cultured cells that Smurf1 interacts with and ubiquitylates BRSK1. This observation was confirmed by *in vitro* ubiquitylation assays, using purified proteins, and allowed to determine that Smurf1-mediated ubiquitylation of BRSK1 does not result in Lys-48 or Lys-63 polyubiquitin branches. On the other hand, Smurf1-mediated BRSK1 ubiquitylation leads to BRSK1 degradation, since over-expression of wild type Smurf, but not of the inactive protein, results in a drastic reduction of cellular BRSK1 expression levels.

Smurf1 induces specific degradation of proteins which control neuronal polarization. In undifferentiated neurons, Smurf1 ubiquitylates and promotes degradation of pro-polarization proteins, such Par6. In response to an increase on cAMP, protein kinase A (PKA) phosphorylates Smurf1 at Thr306, inducing the degradation of the proteins that inhibit axonal growth in the neurite that will become an axon. Here we show that a non-phosphorylatable form of Smurf1 ubiquitylates and promotes BRSK1 degradation, while PKA-mediated Smurf1 phosphorylation prevents BRSK1 degradation. Since we have shown increasing BRSK1 expression levels during the early stages of neuronal differentiation, our results suggest that Smurf1 might control BRSK1 expression during neuronal polarization, as it does for Par6.

INTRODUCCIÓ

1. Proteïnes quinases

La fosforilació de proteïnes és una modificació post-traducciona reversible basada en l'addició del fosfat γ de l'ATP al grup hidroxil lliure de serines, treonines o tirosines de proteïnes substrat, modificant així la seva activitat, localització subcel·lular, associació a altres proteïnes o la seva vida mitja.

Des del descobriment de les primeres proteïnes fosforilades a la primera meitat del segle XX (Levene and Alsberg, 1906; Lipmann and Levene, 1932) s'han descrit experimentalment més de 25.000 llocs fosforilats en més de 7.000 proteïnes (Lemeer and Heck, 2009), i molts d'ells conservats en proteïnes homòlogues de diferents espècies. Això fa que la fosforilació sigui una de les modificacions post-traduccionals de proteïnes amb més rellevància en la fisiologia cel·lular.

La majoria d'aquestes fosforilacions són en serina (aproximadament un 85%) seguides de les fosforilacions en treonina (11,8%) i en tirosina (1,8%) (Olsen et al., 2006). La resta són molt minoritàries en residus com histidines, lisines o arginines (Matthews, 1995)

A partir de la seqüència del genoma humà s'estima que el quinoma humà consisteix de 518 proteïnes quinases, de les quals 178 comparteixen homologia seqüencial en el seu domini catalític (Manning et al., 2002b) (Fig. I1).

1.1. Classificació

La primera classificació de les quinases data del 1995, quan Hanks i col·laboradors van descriure 9 grups, 134 famílies i 196 subfamílies (Hanks and Hunter, 1995). En l'actualitat, s'ha actualitzat aquesta classificació a partir de les seqüències de DNA dels genomes humà (Manning et al., 2002b), de llevats, *C.elegans* i *Drosophila* (Manning et al., 2002a) i el genoma de ratolí (Caenepeel et al., 2004). La classificació de les quinases s'ha fet tenint en compte la seqüència, l'estructura i en alguns casos característiques de dominis diferents del catalític. Així, actualment s'han descrit 10 grups de quinases, 100 famílies i 150 subfamílies. En termes generals, els grups fan referència a la especificitat de substrat, les famílies a conjunts de quinases amb similituds en la seqüència o en les funcions biològiques i les subfamílies en els casos en què, a més, hi ha conservació entre diferents fílums.

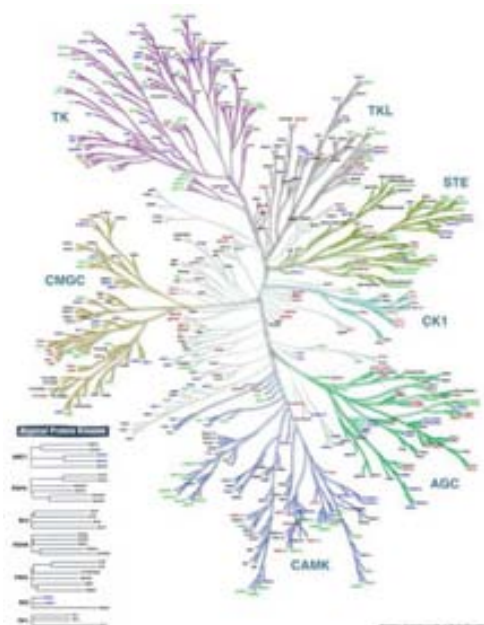


Fig. I1: El kinoma humà. L'esquema mostra l'arbre filogenètic agrupant les quinases per famílies segons la classificació del laboratori de Gerard Manning.

Figura obtinguda de: *Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree.* Chartier M. et al. (Peer J 2013)

Aquesta classificació està en revisió contínua, sobretot pel laboratori de Gerard Manning del *Salk Institute*. Els diferents grups descrits fins al moment per quinases eucariotes (ePK, *eukaryotic protein kinases*) són:

1. **Quinases AGC:** Són Ser/Thr quinases implicades en senyalització intracel·lular i són modulades per nucleòtids, fosfolípids i calci. Ex: PKA, PKG, PKC.
2. **Quinases CMGC:** Relacionades amb el control del cicle cel·lular, senyalització de la via de les MAPK, *splicing* i altres funcions. Ex: CDK, MAPK, GSK3 o CLK.
3. **Quinases CAMK:** Són Ser/Thr quinases i inclouen dos grans grups: les quinases depenents de calci (CAMK) i les quinases depenents d'AMP (AMPK). Ex: CAMK o AMPK.
4. **Quinases CK1:** Són un grup petit amb 4 famílies molt similars en seqüències però molt diferents respecte els altres grups. Les famílies són CK1 (**Cell Kinase 1**), VRK (**Vaccinia Related Kinase**), TTBK (**Tau-Tubulin Kinase**) i TTBKL (**TTBK-like kinases**)
5. **Quinases STE:** Consisteix en 3 famílies (STE20, STE11 i STE7) que s'activen entre elles mateixes per acabar activant la família de les MAPK. Transdueixen senyals del citosol al nucli.
6. **Quinases TK (*tyrosine kinase*):** Contenen les tirosina quinases. Els altres grups són principalment serina/treonina quinases. Actuen principalment en la regulació de la captació de senyals extracel·lulars i la seva transducció a la cèl·lula, essent més de la meitat d'aquest grup receptors de membrana i proteïnes associades a la membrana. Ex: EGFR, FGFR o Src.
7. **Quinases TKL (*tyrosine kinase-like*):** Són quinases semblants a les tirosina quinases però fosforilen els seus substrats en serines i treonines. Ex: Raf o IRAK.
8. **Quinases RGC (*receptor guanylate cyclase*):** Engloben el grup dels receptors de guanilat ciclases. Contenen un domini actiu que genera el missatger secundari cGMP i un domini catalíticament inactiu amb funció reguladora.
9. **Altres:** Són totes les quinases amb dominis d'ePK, però que no encaixen en cap dels grups anteriors. Ex: CAMKK, Wee
10. **Quinases Atípiques:** Conté les quinases que no estan relacionades amb les ePKs ni entre elles.
 - **Quinases PKL:** Contenen un plegament específic de quinases (plegament PKL, *protein kinase-like*), però no són ePKs.
 - **Quinases HisK:** *Histidine kinase fold kinases*.
 - **Quinases NDK:** *Nucleoside diphosphate kinases*.

1.2. Estructura

Les quinases comparteixen uns trets estructurals característics del seu domini catalític, anomenat domini quinasa.

El domini quinasa consta de dos lòbuls estructural i funcionalment diferents:

- **Lòbul N-terminal:** és el més petit i està format per una fulla β de cinc cadenes acoblada a un domini α -helicoidal format bàsicament per l'hèlix-C. Les tres primeres cadenes β contenen dues seqüències altament conservades. Una d'elles és la seqüència GxGxxG, que es troba en el *loop* que connecta les cadenes $\beta 1$ i $\beta 2$ (*Gly-rich loop*). Aquest *loop* (*G-loop* a la **figura 12A**) és la part més flexible del lòbul N-terminal, i es plega sobre el nucleòtid de tal manera que el seu extrem queda completament tancat quan els grups de la cadena principal interaccionen amb el fosfat γ de l'ATP, ancorant-lo al centre actiu i el posicionen de manera òptima per a la catàlisi (**Fig. 12A i 12B**). Un altra motiu important és la seqüència AxK present a la cadena $\beta 3$. La lisina d'aquest motiu, juntament amb un residu d'àcid glutàmic conservat present a l'hèlix C, contribueixen al posicionament òptim dels grups fosfat α i β del nucleòtid (**Fig. 12B i 12C**). La interacció que s'estableix entre la lisina i el glutàmic es troba conservada en tota la família de les quinases i es considerada com una característica de la forma activa d'aquests enzims. La hèlix C, encara que pertany al lòbul N-terminal, ocupa una posició estratègica entre els dos lòbuls. Aquesta hèlix està connectada a diferents parts de la molècula i actua com a un motiu d'integració estructural. La seva regió C-terminal està unida al cos rígid del lòbul C-terminal a través del *loop* αC - $\beta 4$, mentre que la seva regió N-terminal interacciona amb el *loop* d'activació (**Fig. 12B**). El posicionament d'aquesta regió N-terminal de l'hèlix C és crítica per a que es produeixi l'activació de la quinasa i la distància entre ella i el *loop* d'activació és un indicador que defineix les conformacions oberta i tancada, que són essencials per a la catàlisi. En les quinases inactives aquesta regió està desordenada o bé ocupa una posició que no és òptima per a la catàlisi.
- **Lòbul C-terminal:** està format majoritàriament per hèlix α i una fulla β formada per quatre cadenes curtes. Aquesta fulla β conté gran part de les cadenes laterals que formen la maquinària catalítica associada amb la transferència de fosfat des de l'ATP al substrat (*catalytic loop*). En aquesta regió també es troba la seqüència conservada DFG. L'aspàrtic d'aquesta seqüència és necessari per a fixar el ions Mg^{2+} units a l'ATP (**Fig. 12C**). El fragment d'activació s'estén des de el motiu DFG fins a la següent hèlix α . La seqüència i longitud d'aquest fragment varia força entre quinases i la seva posició determina els estats actiu i inactiu d'aquests enzims. A partir d'aquí trobem una regió formada per tres hèlix α que és el lloc de fixació de molts substrats i altres proteïnes reguladores.

Hi ha un 10% de quinases que, tot i presentar estructura de quinasa, no conserven alguns dels residus claus per l'activitat catalítica (pseudoquinases). A la majoria d'elles

els manca activitat, mentre que d'altres en posseeixen però molt menys que les quinases convencionals.

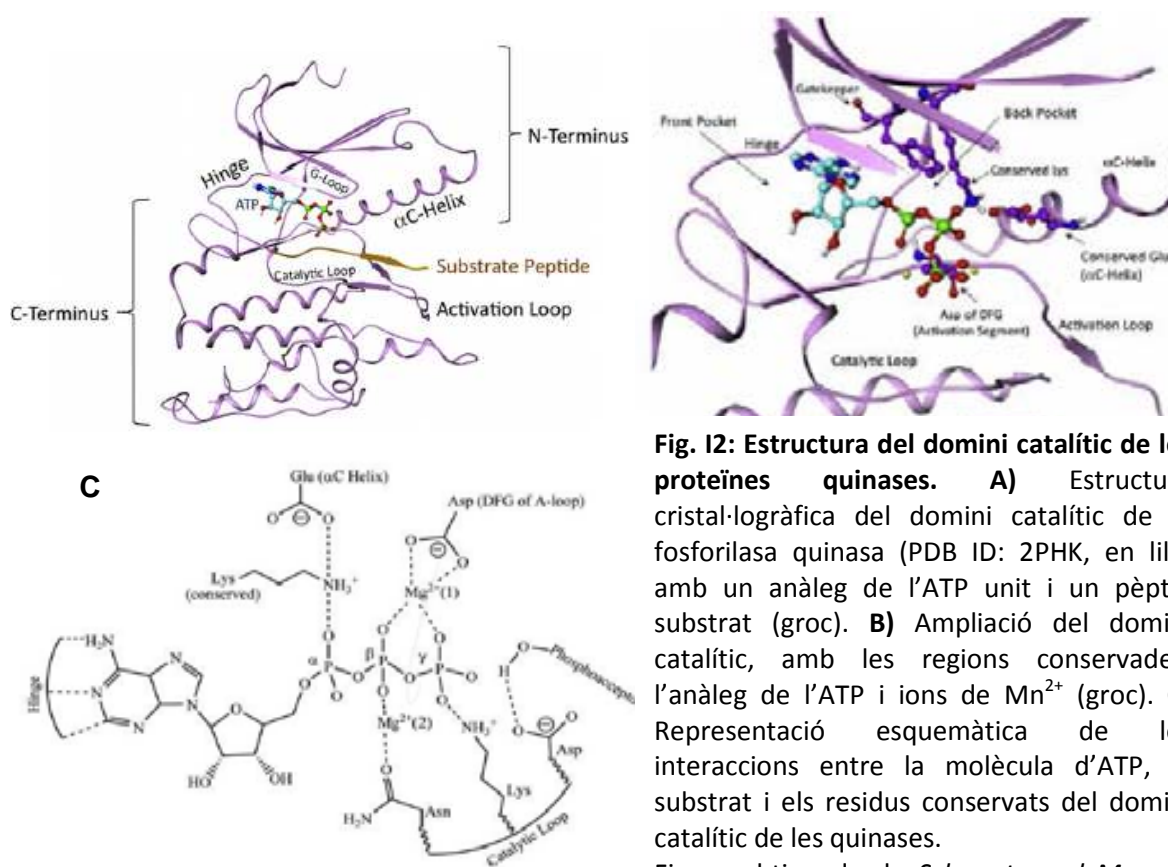


Fig. 12: Estructura del domini catalític de les proteïnes quinases. **A)** Estructura cristal·logràfica del domini catalític de la fosforilasa quinasa (PDB ID: 2PHK, en lila) amb un anàleg de l'ATP unit i un pèptid substrat (groc). **B)** Ampliació del domini catalític, amb les regions conservades, l'anàleg de l'ATP i ions de Mn^{2+} (groc). **C)** Representació esquemàtica de les interaccions entre la molècula d'ATP, el substrat i els residus conservats del domini catalític de les quinases.

Figura obtinguda de *Schwartz and Murray, Protein kinase biochemistry and drug discovery Bioorganic Chemistry 2013.*

1.3. Les proteïnes quinases com a dianes terapèutiques

Les quinases actuen en gairebé tots els processos fisiològics de la cèl·lula, com la proliferació, divisió, apoptosi o diferenciació (Manning et al., 2002a). Això fa que l'estudi de la funció i regulació del quinases sigui de vital importància per entendre tots aquests processos.

La fosforilació anòmala de determinades proteïnes està directament associada a diversos processos patològics i moltes de les malalties hereditàries provenen de mutacions en gens codificants per quinases. En aquest sentit, les proteïnes quinases han esdevingut dianes terapèutiques contra patologies com el càncer o diferents malalties neurodegeneratives. Tant és així, que aproximadament una quarta part de les dianes farmacològiques són proteïnes quinases (Cohen, 2002).

El repte en el desenvolupament de inhibidors de quinases és el d'obtenir-los amb una alta selectivitat. La majoria d'inhibidors actuals s'uneixen al lloc de fixació de l'ATP. Aquesta regió està altament conservada en les diferents quinases, la qual cosa dificulta obtenir inhibidors específics. En els últims anys s'estan intentant desenvolupar inhibidors dirigits a regions menys conservades com el lloc d'anclatge dels substrats peptídics (Gavrin and Saiah, 2013).

2. Via de senyalització LKB1

2.1. LKB1 i el síndrome de Peutz-Jeghers

La Ser/Thr quinasa LKB1 va ser descrita al 1998 com a una quinasa supressora de tumors associada al síndrome de *Peutz-Jeghers* (PJS) (Hemminki et al., 1998). El PJS és una malaltia autosòmica dominant que provoca pòlips gastrointestinals benignes, acumulacions de melanina a les mucoses (Jeghers et al., 1949) i predisposa a un alt risc de patir tumors malignes en múltiples teixits (Hearle et al., 2006). Entre el 80-94% dels pacients de PJS tenen mutacions del gen LKB1 (també conegut com STK11, *serine/threonine kinase 11*), localitzat al braç curt del cromosoma 19 (Ylikorkala et al., 1999; Westerman et al., 1999). Aquestes mutacions generen formes inactives o baixos nivells d'expressió de LKB1 (Zhong et al., 2006). També s'han observat mutacions en el gen d'LKB1 en càncer de pulmó (entre un 15-35% dels casos) (Ji et al., 2007) i en carcinoma cervical (aproximadament un 20%) (Wingo et al., 2009). Tot junt, ha despertat l'interès per determinar els mecanismes de regulació de LKB1 i l'estudi dels processos controlats per aquesta quinasa.

2.2. Estructura i regulació de LKB1

LKB1 està expressada arreu, tant a l'adult com a teixits fetals, especialment al pàncrees, fetge, testicles i múscul esquelètic (Rowan et al., 2000). Al genoma humà hi ha una sola còpia del gen LKB1, que codifica per una única isoforma proteica de 433 aminoàcids (436 en ratolí). LKB1 té homòlegs a *Xenopus* (XEEK1), en *C. elegans* (PAR-4) i *Drosophila* (dLKB1).

LKB1 està classificada dins del grup de les CAMK, tot i que el seu domini quinasa (aa 49-309) no presenta molta homologia amb altres quinases de mamífers.

LKB1 cel·lular funciona com un complex trimètric amb STRAD, que juga un paper regulador, i MO25, amb un paper estabilitzador (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003). El genoma humà codifica per dues isoformes de STRAD (STRAD α i STRAD β), proteïnes de la família de quinases STE20 que els manquen diversos residus necessaris per a l'activitat catalítica, pel que es consideren pseudoquinases (Boudeau et al., 2006). El genoma humà també codifica per dues isoformes de MO25 (MO25 α i MO25 β), que no presenten homologia amb cap altre proteïna i que s'encarreguen d'estabilitzar el complex actiu LKB1-STRAD (Alessi et al., 2006).

La resolució del complex trimèric ha posat de manifest que STRAD adopta una conformació tancada (activa), que l'habilita per unir LKB1 com a pseudosubstrat. Aquesta conformació, que està facilitada per interaccions cooperatives d'STRAD amb l'ATP i MO25, està a l'hora estabilitzada per les interaccions que estableix MO25 amb el *loop* d'activació d'LKB1 (Zeqiraj et al., 2009a; Zeqiraj et al., 2009b). El complex LKB1-STRAD-MO25 representa l'únic mecanisme al·lostèric d'activació de proteïnes quinases independent de fosforilació per la conformació activa d'una pseudoquinasa (STRAD).

Així, a la cèl·lula LKB1 està constitutivament activa i la seva regulació ve donada per modificacions post-traduccionals i per localització subcel·lular.

- **Modificacions post-traduccionals:** LKB1 humana està fosforilada al menys en 8 residus i farnesilada a l'extrem C-terminal (**Fig. 13**):
 - o **Autofosforilació:** Es dona en els residus de treonina 185, 189, 336 i 402. L'autofosforilació a la T336 no afecta la seva activitat quinasa o localització subcel·lular, però inhibeix la capacitat d'LKB1 de suprimir el creixement cel·lular (Sapkota et al., 2002a).
 - o **Fosforilació per quinases *upstream*.** Aquestes fosforilacions es localitzen als residus S31, S325, S363 i S428. Les quinases responsables de fosforilar els dos primers residus encara no es coneixen, però s'ha demostrat que la S363 (S366 en ratolí) és fosforilada per la quinasa *ataxia telangiectasia-mutated* (ATM) en resposta a radiacions ionitzants (Sapkota et al., 2002b). Per últim, LKB1 està fosforilada a la S428 (S431 en ratolí) per PKA, p90RSK i PKC ζ , sense afectació de l'activitat però sí modulació de les funcions de la quinasa (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001; Song et al., 2008).
 - o **Prenilació:** LKB1 està farnesilada a la Cys430 (C433 en ratolí) (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001). Aquesta modificació no afecta l'activitat de la quinasa ni la funció de supressió de tumors, però d'estudis en *Drosophila* s'ha proposat que la prenilació en aquest residu, juntament amb la fosforilació a la S428 (S535 en *Drosophila*) per PKA, actuaria regulant la polaritat cel·lular (Martin and St Johnston, 2003).

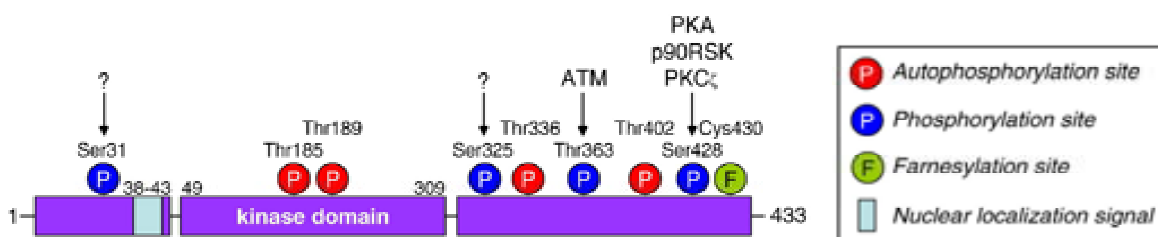


Fig. 13: Representació esquemàtica de LKB1 humana. L'esquema mostra els diferents llocs de fosforilació per quinases *upstream* (vermell) com d'autofosforilació (blau marí), així com el lloc prenilat (verd) i la senyal de localització nuclear (blau cel).

Figura extreta de Korsse S.E. et al. *Targeting LKB1 signaling in cancer Biochimica et Biophysica Acta* (2013)

2.3. LKB1, la quinasa màster

Tots els efectes produïts per la manca o mutacions en LKB1 són derivats de la diversitat d'efectors que controla la quinasa. Diversos grups van determinar el primer substrat conegut del complex LKB1-STRAD α -MO25, la quinasa dependent d'AMP (AMPK) (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003; Shaw et al., 2004b) i que aquesta via és la principal reguladora dels nivells energètics de la cèl·lula. Posteriorment, es va determinar que LKB1 actuava com a quinasa màster, activant 12 proteïnes de la subfamília d'AMPK mitjançant fosforilació directa de la treonina conservada de l'*activation loop* d'aquestes quinases (Lizcano et al., 2004) (**Fig. 14**). A través d'aquests efectors, el complex LKB1-STRAD α -MO25 controla diversos processos cel·lulars, com el metabolisme energètic, la polaritat i el creixement cel·lular.

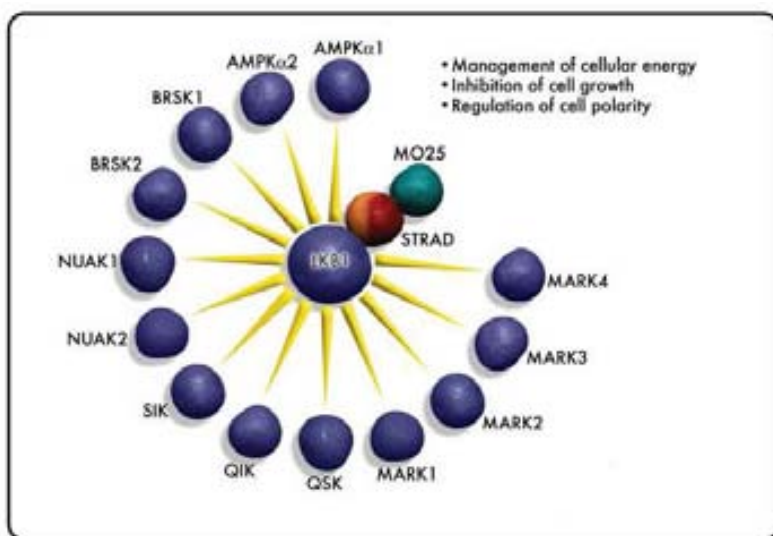


Fig. 14: El complex LKB1-STRAD-MO25 i els seus substrats. El complex trimèric LKB1-STRAD-MO25 fosforila i activa a 12 kinases de la subfamília d'AMPK, regulant diversos processos com el control de l'energia cel·lular, la inhibició del creixement i la regulació de la polaritat cel·lular.

2.4. Funcions d'LKB1

2.4.1. LKB1 i el metabolisme cel·lular

La via controlada per LKB1 i AMPK, regula tant el metabolisme de la glucosa com el lipídic. En resposta a l'augment de la ràtio AMP/ATP cel·lular, la subunitat γ d'AMPK uneix AMP, la qual cosa desencadena un canvi conformacional que deixa accessible la treonina 172 de l'*activation loop* de la subunitat catalítica AMPK α . Aleshores la fosforilació d'aquest residu per l'LKB1 resulta en l'activació de la quinasa. Un cop AMPK és activada, controla vies metabòliques com la de síntesi de isoprenoides, àcids grassos o glicogen. A través de la fosforilació d'alguns enzims claus en la regulació d'aquestes vies com la HMGCoA reductasa, l'acetil CoA carboxilasa o la glicogen sintasa (Carling et al., 1989; CARLING and Grahame Hardie, 1989) la via LKB1-AMPK regenera els nivells energètics cel·lulars disminuint els processos que consumeixen energia i promovent els que en produeixen.

2.4.2. LKB1 i el creixement cel·lular

LKB1 controla diversos processos implicats en el creixement cel·lular, com la síntesi proteica (Inoki et al., 2003; Shaw et al., 2004a), l'angiogènesis (Hudson et al., 2002) i l'autofàgia (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009), a través de la modulació de la via TSC1/2-mTORC1. LKB1 també participa en el cycle cel·lular i vies d'apoptosis i supervivència (Shaw et al., 2004b), regulant diversos efectors com la fosfatasa PTEN (Jimenez et al., 2003), inhibidors del cycle com p21 (Tiainen et al., 2002; Zeng and Berger, 2006) o p27 (Xie et al., 2007; Liang et al., 2007) per mecanismes tant dependents com independents de p53.

2.4.3. LKB1 i la polaritat cel·lular

LKB1 juga un paper fonamental en el control de la polaritat cel·lular. Par-4, l'ortòleg a *C. elegans* d'LKB1, és una proteïna essencial a l'hora d'establir una correcta polaritat cel·lular durant els primers cycles de l'embriogènesi (Kemphues et al., 1988; Watts et al., 2000). Així mateix, l'ortòleg a *Drosophila* (dLkb1) també s'ha relacionat amb els primers estadis de la formació de l'eix anterior-posterior de les mosques (Martin and St Johnston, 2003).

En cèl·lules epitelials de mamífer, el complex LKB1-STRAD és necessari per a la correcta polarització, induint la remodelació del citoesquelet d'actina i la separació dels components apicals i basolaterals de la membrana cel·lular (Baas et al., 2004).

Al sistema nerviós, LKB1 és essencial en el control de la polaritat neuronal mitjançant la fosforilació de diversos substrats. Els ratolins *knock-out* (KO) d'LKB1 moren entre els dies 8 i 11 del desenvolupament embrionari (E8 i E11), abans de la formació del còrtex (Ylikorkala et al., 2001; Miyoshi et al., 2002; Jishage et al., 2002). El ratolí KO condicional de còrtex d'LKB1 presenta una paret cortical més fina i uns ventricles significativament més grans que els dels controls, així com defectes en la organització i orientació dels tipus neuronals dins les capes del còrtex (Barnes et al., 2007). D'aquest treball també es desprèn que LKB1 fosforila i activa a les BRSKs *in vivo*, requeriment necessari per la iniciació de l'axó durant la polaritat neuronal al còrtex. És més, el ratolí KO condicional de còrtex d'LKB1 (Barnes et al., 2007) i el ratolí doble KO de les BRSKs (Kishi et al., 2005) presenten un fenotip neuronal similar, amb neurones incapaces d'especificar axons i dendrites.

Durant el procés de polarització neuronal en ratolins, s'ha observat que la fosforilació d'LKB1 a la S431 per PKA és essencial per la formació de l'axó tant *in vitro* com *in vivo*. Així, en resposta a neurotrofines com el BDNF o elevacions locals de cAMP es detecta una acumulació de LKB1 fosforilada a la S431 exclusivament a l'axó en neurones hipocampals en cultiu polaritzades i s'acumula en una sola neurita en neurones no diferenciades (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007).

3. Brain Specific Kinases (BRSKs)

Les *Brain Specific Kinases* (BRSKs) 1 i 2, també conegudes com a SAD-B (SAD-1) i SAD-A (SAD-2), respectivament, són proteïnes Ser/Thr quinases homòlogues de la família de les *AMPK-related kinases*, amb un patró d'expressió majoritari al sistema nerviós. Aquestes dues quinases es troben conservades evolutivament, trobant-ne ortòlegs a *S. cerevisiae* (Hsl1), *S. pombe* (Cdr2), *Halocynthia roretzi* (Hr-POPK-1), *C. elegans* (SAD-1, *Synapses of Amphids Defective*) i *Drosophila* (CG6114).

3.1. Estructura

BRSK1 i BRSK2 humanes consten de 778 i 674 aminoàcids, respectivament.

L'estructura de les BRSKs consta d'un domini quinasa i una regió C-terminal (**Fig. 15 i Fig. 16**):

- **Domini quinasa:** Està altament conservat entre BRSK1 i 2 (94% d'homologia) i localitza a l'extrem N-terminal. També comparteix un alt grau de similitud entre les quinases de la família d'AMPK.

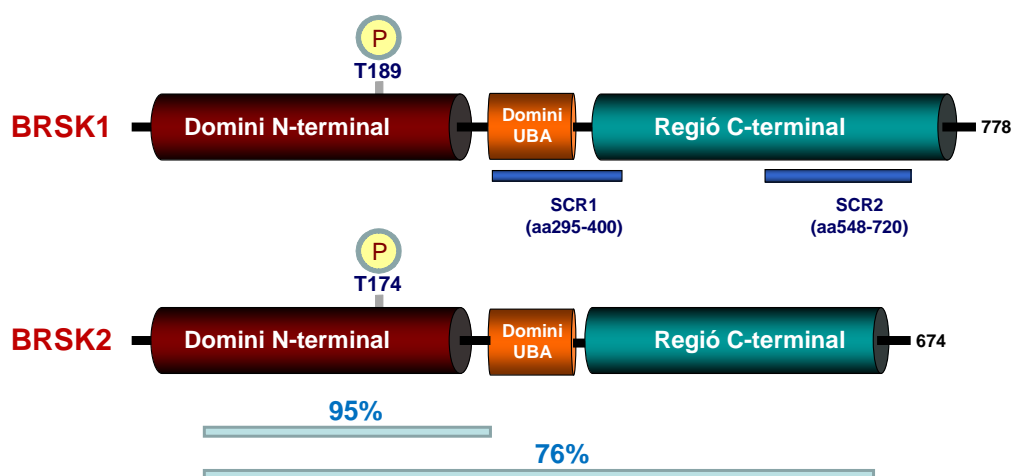


Fig. 15: Estructura de BRSK1 i BRSK2. Les quinases BRSK1 i BRSK2 consten d'un domini quinasa a l'N-terminal (vermell), amb la treonina fosforilada per LKB1 (T189 per BRSK1 i T174 per BRSK2), un domini d'unió a ubiquitines (taronja) i una regió C-terminal (blau-verd). A més, s'han descrit dues regions altament conservades en BRSK1 entre diferents espècies (*short conserved regions*, SCR, en blau). Els dominis quinasa d'ambdues quinases comparteixen un 95% d'homologia, mentre que les dues proteïnes senceres un 76%.

- **Regió C-terminal:** Divergeix molt en les dues formes de BRSKs i amb els dominis C-terminal de la resta d'*AMPK-related kinases*. En el cas de BRSK1 és necessari per a la unió de proteïnes com Neurabina (Hung et al., 2007), i semblaria necessari per a la interacció de BRSK2 amb dominis PDZ d'altres proteïnes (Belotti et al., 2013). Aquesta regió conté un domini putatiu d'unió a ubiquitina (UBA, *ubiquitin-associated domain*). L'estructura central d'aquests dominis són 3 hèlix α agrupades que formen una àmplia superfície hidrofòbica (Mueller and Feigon,

2002). La funció principal dels dominis UBA és la d'unir proteïnes poliubiquitinades (Wilkinson et al., 2001), tot i que s'ha demostrat que aquest no és el cas de les BRSKs (Jaleel et al., 2006). Entre d'altres funcions, els dominis UBA impedeixen l'elongació de cadenes d'ubiquitina i participen en el procés de dirigir proteïnes poliubiquitinades per a la seva degradació al proteasoma.

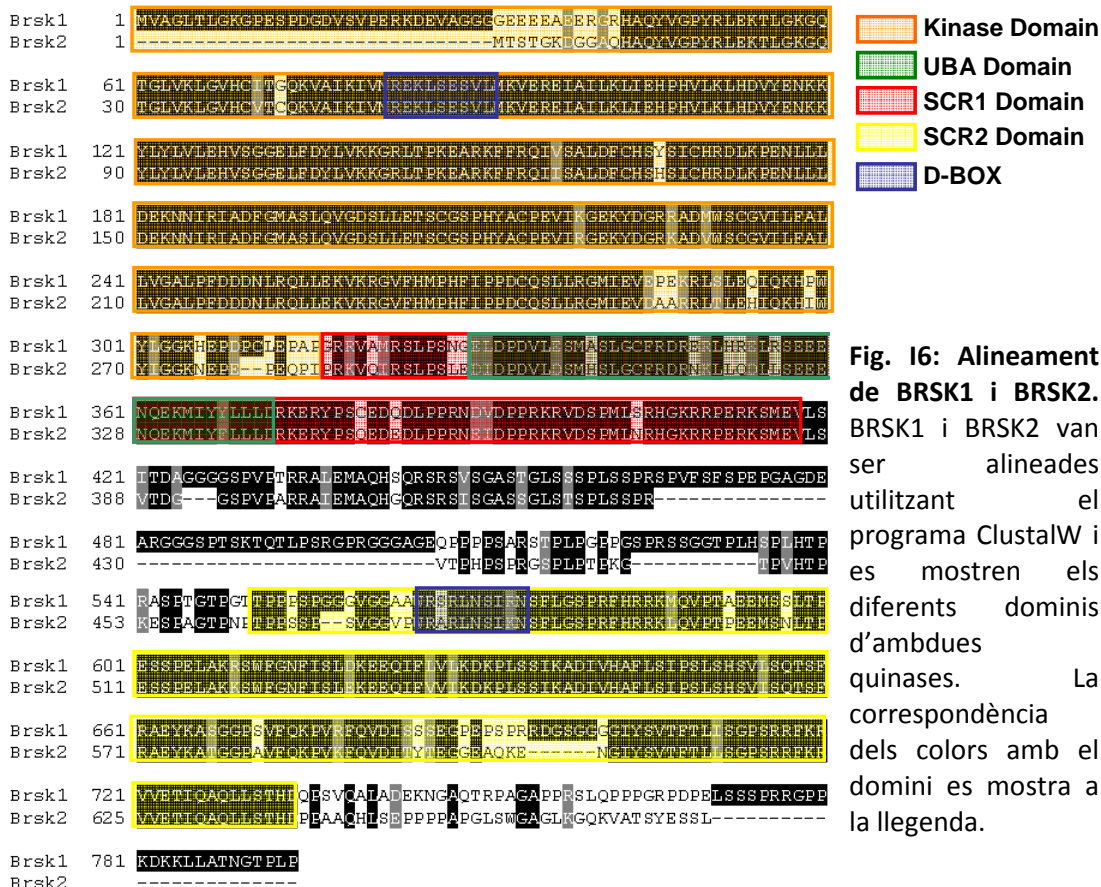


Fig. 16: Alineament de BRSK1 i BRSK2. BRSK1 i BRSK2 van ser alineades utilitzant el programa ClustalW i es mostren els diferents dominis d'ambdues quinases. La correspondència dels colors amb el domini es mostra a la llegenda.

En el cas de les BRSKs i altres *AMPK-related kinases*, l'eliminació del domini UBA impedeix la fosforilació i activació per LKB1. No obstant, el fet de que el domini UBA no actuï com a centre d'anclatge per LKB1 podria indicar que la interacció entre aquest domini i el domini quinasa és necessari per mantenir l'estructura de l'enzim (Jaleel et al., 2006; Bright et al., 2008).

Per altra banda, els dominis UBA poden homo i heterodimeritzar i participar en interaccions proteïna-proteïna. S'ha observat que BRSK1 forma *clusters* funcionals a les sinapsis i que la interacció entre els dominis quinasa i UBA de diferents molècules de BRSK1 n'és la responsable (Hung et al., 2007; Kim et al., 2010a; Kim et al., 2010b).

En BRSK1 s'han descrit dues regions evolutivament conservades entre diferents homòlegs (SCR, *short conserved region*): SCR1 (aa295-400) i SCR2 (aa548-720) (Crump et al., 2001). La regió SCR1 conté el domini UBA, mentre que la regió SCR2 s'ha proposat com la responsable del patró puntuat observat en BRSK1 a la sinapsis (Inoue et al., 2006). Aquestes regions també estan conservades en BRSK2 però no en altres membres de les *AMPK-related kinases*.

Per últim, les BRSKs tindrien dues regions anomenades caixes D (D-box), que en altres proteïnes s'han relacionat amb la degradació proteasomal (Wang et al., 2011).

En estudis en l'ortòleg de BRSK1 a *C. elegans* SAD-1, s'han detectat dues variants obtingudes per *splicing* alternatiu (Hung et al., 2007), una d'elles correspon a la quinasa sencera (SAD-1 L) i l'altre és una forma truncada a la cua C-terminal (SAD-1 S). Aquestes dues variants actuarien en diferents processos de la fisiologia de la neurona (Veure **BRSKs en la funció neuronal**).

Més recentment també s'han identificat dues isoformes de la quinasa de mamífer SAD-B (SAD-B_{LONG} i SAD-B_{SHORT}), implicades en la duplicació del centrosoma durant el cicle cel·lular (Alvarado-Kristensson et al., 2009).

3.2. Distribució

Les BRSKs s'expressen principalment al cervell i també es detecten baixos nivells a pàncrees i testicles (Lu et al., 2004; Kishi et al., 2005; Inoue et al., 2006; Chen et al., 2012). Mitjançant hibridació *in situ* s'ha observat que la distribució d'aquestes quinases és similar a les diferents regions del cervell (Kishi et al., 2005).

Dins la cèl·lula, les BRSKs es troben a diferents compartiments, com al citosol i membranes (Rodríguez-Asiain et al., 2011), a més de diversos orgànuls com els centrosomes (Alvarado-Kristensson et al., 2009) o el reticle endoplasmàtic (Wang et al., 2012).

3.3. Regulació

3.3.1. Traduccional

Les BRSKs són modulades traduccionalment per la via PI3K-PKB-mTOR en models neuronals, per mitjà dels complexos Tsc1/Tsc2. Els *tuberous sclerosis complex 1 i 2* (Tsc1/Tsc2) es troben *downstream* de PKB i inhibeixen la senyalització de la via, inhibint la GTPasa Rheb, que al seu torn activa mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), donant com a resultat la inhibició de la traducció de proteïnes. Choi i col·laboradors demostren que sobreexpressant els complexos Tsc1/Tsc2 s'inhibeix el creixement axonal, mentre que *down-regulant-los*, es generen neurones multiaxòniques *in vitro* i *in vivo* (Choi et al., 2008). Aquest efecte està mitjançat, en part, per una augment espacio-temporal dels nivells i l'activitat de les BRSKs a l'axó (veure apartat **BRSKs en la funció neuronal**). És més, pacients del síndrome TSC, caracteritzats per la formació d'hamartomes (tumors benignes) i mutacions inactivants dels complexos TSC1 i TSC2, que al seu torn poden generar epilèpsia, retràs mental o autisme (Crino et al., 2006), presenten una sobreactivació de la via mTORC1, elevats nivells de fosforilació del seu substrat S6 quinasa i un increment significatiu dels nivells de BRSKs en les cèl·lules derivades dels hamartomes.

Upstream dins de la mateixa via trobem a PDK1, la quinasa que fosforila i activa a PKB al *T-loop*, en la Thr308 (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997). PDK1 i PKB contenen un domini PH d'unió a fosfatidil-inositol-3-P (PIP3) (Currie et al., 1999; Komander et al., 2004), que els permet trobar-se en l'espai per activar la via PI3K-PKB

en resposta a factors de creixement, hormones i altres agonistes. L'anàlisi del ratolí *knock-in* de PDK1^{K465E/K465E} presenta una activació de PKB deficient (Bayascas et al., 2008), degut a que és incapaç d'unir fosfoinosítids, malgrat mantenir la seva activitat catalítica (Komander et al., 2004). En conseqüència, mTORC1 també presenta una activitat reduïda, el que comporta una reducció dels nivells de les BRSKs i defectes en la diferenciació neuronal (Zurashvili et al., 2012). Zurashvili i col·laboradors demostren com la sobreexpressió de les BRSKs en neurones hipocampals en cultiu provinents del ratolí PDK1^{K465E/K465E} recuperen els defectes en la diferenciació produïts per la mutació.

Tot junt, indica que la regulació dels nivells de les BRSKs està finament regulat per la via PKB-complexes Tsc1/2-mTORC1 i que juntament amb l'activació de les BRSKs per LKB1 promourien el procés de polaritat neuronal/formació de l'axó (Fig. 17 (Wildonger et al., 2008)).

La via de senyalització orquestrada per PI3K-Akt no seria l'única reguladora dels nivells de les BRSKs. L'activació del receptor TrkC en resposta a la neurotrofina NT-3, genera una activació de la via Raf/MEK/ERK, que estableix les BRSKs en neurones sensorials (Lilley et al., 2013).

En resum, la disponibilitat i la modulació de l'activitat de les BRSKs és regulada per donar resposta a estímuls en funció del tipus neuronal i procés en el què hagin de participar les quinases.

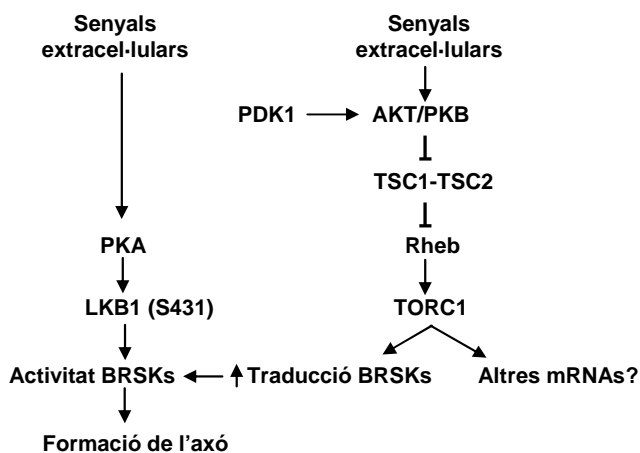


Fig. 17: Integració de senyals de la via LKB1-BRSKs i la via PI3K-PKB-mTOR. En resposta a senyals extracel·lulars s'activa la via PI3K-Akt que per mitjà dels complexos TSC1/2 i TORC1, promouen un augment localitzat dels nivells de BRSKs. En paral·lel, l'activació de la via cAMP/PKA, resulta en una acumulació de LKB1 fosforilada a la S431 i de BRSKs actives, que participarien en l'especificació axonal.

3.3.2. Post-traducciona

3.3.2.1. Fosforilació/defosforilació

Les BRSKs són activades i fosforilades als residus conservats Thr189 per BRSK1 i Thr174 per BRSK2 de l'*activation loop* (T-loop) per la quinasa màster LKB1 (Lizcano et al., 2004). A banda d'LKB1 també s'han descrit dues quinases que fosforilen el *T-loop*, la CaMKK i TAK1.

Al 2005, tres grups diferents van demostrar que la proteïna quinasa quinasa dependent de Ca²⁺/calmodulina (CaMKK) és capaç de fosforilar i activar la proteïna quinasa AMPK a la Thr172, en resposta a increments de Ca²⁺ intracel·lular (Hawley et al., 2005; Woods et al., 2005; Hurley et al., 2005). El fet que la seqüència consens al voltant de la Thr172 d'AMPK estigui altament conservada en les proteïnes de la

mateixa família, suggereix que la CaMKK podria actuar alternativament a LKB1 en la fosforilació d'aquest grup de proteïnes.

Al 2008, Fujimoto i col·laboradors proposen CaMKK α com a proteïna amb funció de fosforilació i activació de BRSK1 tant *in vitro* com *in vivo*, amb uns nivells equiparables als produïts pel complex LKB1-MO25-STRAD (Fujimoto et al., 2008). Tot i això, hi ha controvèrsia entre diferents autors respecte aquesta fosforilació. Semblaria que només la isoforma α de CaMKK tindria un efecte sobre l'activitat de BRSK1 i, en qualsevol cas, molt menor al produït sobre AMPK (Fogarty et al., 2010). La isoforma CaMKK β , que activa potentment AMPK, s'ha demostrat no tenir cap efecte sobre les BRSKs (Bright et al., 2008). Amb tot, s'hauria de determinar el possible paper de CaMKK α en la fosforilació i activació de BRSK1 *in vivo*, depenent del tipus cel·lular estudiat i la funció a exercir en un context determinat.

Per altra banda, també s'ha identificat la quinasa TAK1, juntament amb el seu coactivador TAB1, com a activador *upstream* del *T-loop* de les BRSKs tant *in vitro* com *in vivo* (Lilley et al., 2013). TAK1 anteriorment ja s'havia descrit com una quinasa amb capacitat de fosforilar AMPK (Xie et al., 2006; Momcilovic et al., 2006). Així, seria interessant veure si aquesta quinasa també pot fosforilar i activar a altres proteïnes de la família d'AMPK. Tot i això, no s'ha determinat quina rellevància pot tenir la fosforilació de BRSK1 pel tàndem TAK1/TAB1 dins la fisiologia cel·lular.

L'activació de les BRSKs està modulada també per altres quinases *upstream* mitjançant la fosforilació en residus diferents del *T-loop*.

Estudis *in vitro* demostren que la proteïna quinasa A (PKA) interacciona amb BRSK2 i la fosforila a la Thr260 (Guo et al., 2006). No obstant, en diferents línies cel·lulars sotmeses a una estimulació aguda de la via cAMP/PKA amb forskolina no s'ha detectat la fosforilació d'aquest residu (Bright et al., 2008). Malgrat tot, aquestes dades no descarten el possible paper d'aquesta fosforilació en un altre context o en altres tipus cel·lulars. En aquest sentit, s'ha descrit que la T260 de BRSK2 estaria implicada en la regulació de l'alliberament d'insulina en resposta a increments de glucosa en cèl·lules β -pancreàtiques MIN6 (Nie et al., 2012).

El grau de fosforilació del domini C-terminal de les BRSKs també modula els nivells de fosforilació de la treonina del *T-loop* i per tant, l'estat d'activació de la quinasa (Lilley et al., 2013). Així, quan el domini C-terminal està en forma defosforilada la conformació de l'enzim permet un millor accés al *T-loop* per part de les quinases *upstream* facilitant la seva fosforilació. En canvi, la fosforilació d'aquesta regió resulta en una conformació on aquests residus són menys accessibles. Els autors d'aquest treball identifiquen CDK5 (amb el seu coactivador p35) com una de les quinases que pot fosforilar diverses S/T de la regió C-terminal. Pel que fa a la defosforilació d'aquests residus, els mateixos autors descriuen que és estimulada a través de la via PLC γ -Ca²⁺. La participació del calci en la defosforilació de la cua C-terminal de les BRSKs suggereix que la fosfatasa responsable d'aquesta defosforilació és la PP2B. Anteriorment ja s'havia descartat que fosfatases sensibles a l'àcid okadaic tinguessin cap efecte sobre l'activitat de BRSK1 o BRSK2 *in vitro* (Bright et al., 2008).

Tot junt, indica que l'estat d'activació de les BRSKs està sotmès a una complicada regulació per fenòmens de fosforilació/defosforilació dels diferents dominis de les quinases.

3.3.2.2. Ubiquitinació

- *Introducció*

La ubiquitinació i degradació de proteïnes de manera localitzada i en moments determinats ha guanyat interès en els últims anys. Aquesta modificació juga un paper vital en la regulació de diversos processos cel·lulars. Inicialment la ubiquitinació es va considerar com un mecanisme exclusiu per a la degradació de proteïnes, on llargues cadenes d'ubiquitina, marcaven i dirigien les proteïnes per a la seva degradació al proteasoma. Més endavant però, s'han anat descobrint mecanismes d'ubiquitinació atípics, afectant processos com internalització de receptors (Boname et al., 2010), canvis en l'activitat de les proteïnes substrat (Deng et al., 2000; Zeng et al., 2010; Yang et al., 2010) o associació a altres proteïnes (Sato et al., 2009). La senyalització per ubiquitinació respon a un complex mecanisme de regulació (**Caixa 1**)

- *Ubiquitinació de les proteïnes de la família d'AMPK*

Com la gran majoria, les proteïnes de la família d'AMPK també estan subjectes a ubiquitinació. Les primeres evidències es van observar en les quinases NUAK1 i MARK4, que són ubiquitinades *in vivo* en cèl·lules HEK293 (Al-hakim et al., 2008). En aquest mateix treball també demostren la ubiquitinació de BRSK1 i en menor mesura BRSK2. A més, descriuen com la ramificació de les cadenes d'ubiquitina incorporades en aquestes quinases són atípiques essent, al menys en part, pels residus de lisina 29 i 33.

Les dades obtingudes indiquen que aquesta ubiquitinació no afecta a la estabilitat de les quinases, però si inhibiria la seva activitat i la capacitat de LKB1 per fosforilar-les, al menys en el cas de NUAK1 i MARK4.

Aquests resultats, juntament amb els anteriorment esmentats en els que el domini UBA de les proteïnes de la família de les AMPK afecten la seva conformació, fosforilació i activació (Jaleel et al., 2006), porten als autors a presentar un model en el que la ubiquitinació impediria el canvi conformacional de les quinases, necessari per permetre la fosforilació per part d'LKB1. Estudis de cristal·lografia i de ressonància magnètica de MARK3 donen força a aquesta hipòtesis, ja que demostren com el domini UBA interacciona amb el domini quinasa, estabilitzant d'aquesta manera una conformació oberta i activa (Murphy et al., 2007). Així, en el model proposat, l'acció dels enzims desubiquitinants (DUB, *deubiquitinating enzymes*), reorganitzaria l'estructura de la quinasa, permetent la interacció del domini UBA amb el domini quinasa i en conseqüència, l'estabilització de la conformació activa (**Fig. 18**).

Més recentment, han sortit treballs que descriuen la ubiquitinació degradativa de les BRSKs en el control del cicle cel·lular (Zhou et al., 2012; Li et al., 2012) (veure apartat **BRSKs i control del cicle cel·lular**). En aquests casos, la ubiquitinació afectaria els nivells de proteïna en comptes de modular l'activitat de la quinasa.

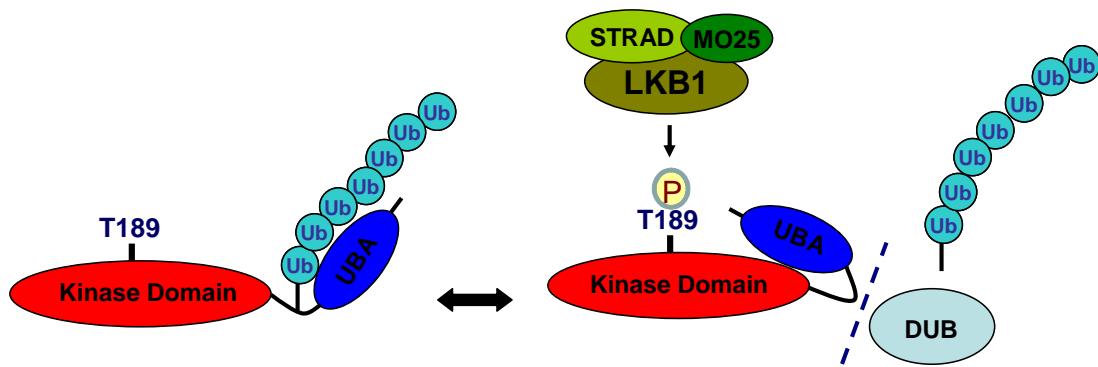


Fig. 18: Model de regulació de l'activitat de les AMPK-related kinases NUAK1 i MARK4 per ubiquitinació. Al-hakim i col·laboradors proposen un model en el qual la ubiquitinació sobre les AMPK-related kinases impediria la interacció entre el domini quinasa (vermell) i el domini UBA (blau marí). Al actuar els enzims desubiquitinants (DUBs, blau cel), es produiria un canvi conformacional que deixaria accessible la T189 del *T-loop* de les BRSKs per ser fosforilat pel complex LKB1-STRAD-MO25 (verd).

Figura modificada de AL-HAKIM A.K. *et al.* Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys29/Lys33-linked polyubiquitin chains *Biochem. J.* (2008)

CAIXA 1: Sistema d'ubiquitinació

La ubiquitina és una proteïna de 76 aa present en tots els organismes eucariotes. La modificació per ubiquitinació pot ser tant per una sola molècula d'ubiquitina (monoubiquitinació) com per cadenes d'ubiquitina (poliubiquitinació) sobre lisines de les proteïnes diana, a través d'un enllaç isopeptídic amb la glicina (Gly76) del C-terminal de la ubiquitina. La molècula té 7 residus de lisina, pels quals es poden incorporar noves molècules d'ubiquitina, formant ramificacions de diferent complexitat i mida. Les ramificacions per la cadena 48 s'han associat a processos degradatius, mentre que la ramificació via la lisina 63 participa en els mecanismes d'ubiquitinació atípics esmentats en la present introducció. Malgrat tot, a mesura que es coneixen més detalls sobre aquesta modificació, s'han anat descobrint altres maneres de ramificar i senyalitzar, com multi-monoubiquitinacions, ramificacions per alguna de les 5 lisines restants o cadenes ramificades per diferents lisines (Komander and Rape, 2012).

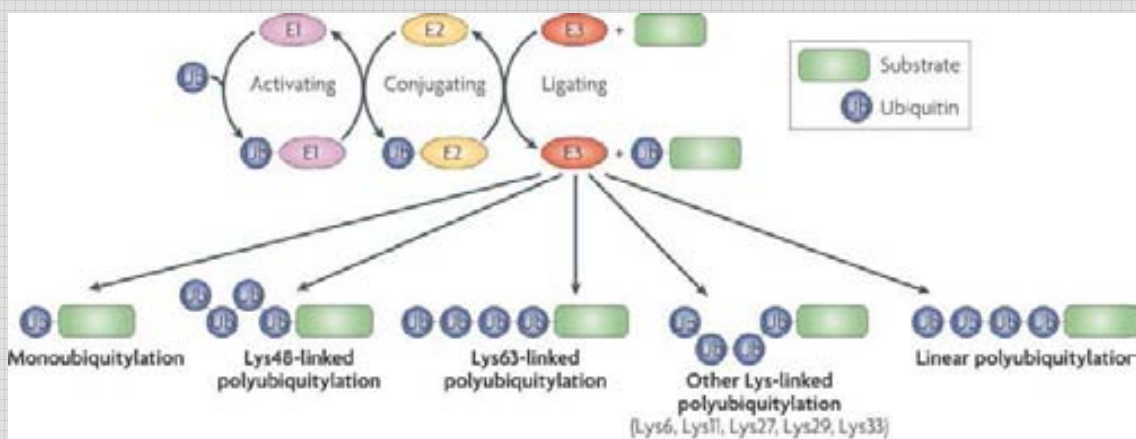
En l'actualitat, el sistema d'ubiquitinació ha adquirit un grau més de complexitat, amb inter-relacions amb altres sistemes de senyalització com la fosforilació o sumorilització.

La ubiquitinació de proteïnes és un mecanisme que actua en resposta a diferents estímuls, en moments i ubicacions concretes, així que necessita estar altament regulat. Per aconseguir-ho, l'acció seqüencial de les lligases d'ubiquitina és essencial: la reacció comença quan una E1 lligasa activa la ubiquitina (amb despesa d'ATP), i la transfereix a una molècula d'E2 lligasa, que al seu torn, i amb l'ajuda d'un enzim E3 lligasa transfereixen la ubiquitina al substrat. Una vegada ubiquitinades i en funció de la naturalesa i ramificacions d'aquesta ubiquitinació, les proteïnes marcades realitzaran diferents funcions dins la cèl·lula.

En mamífers, existeixen dos isoformes d'enzims E1 (E1a i E1b), obtingudes per *splicing* alternatiu i aproximadament unes 30 E2 lligases, que comparteixen un domini de conjugació a ubiquitina (UBC, *ubiquitin-conjugating domain*) conservat de 150 aminoàcids (Pickart, 2001). Per últim, s'estima que existeixen més de 600 tipus diferents d'enzims E3 ubiquitina lligases, responsables del reconeixement i ubiquitinació d'un nombre encara més elevat de proteïnes substrat (Grzegorz et al., 2006). La importància dels enzims E3 lligasa és que donen especificitat de substrat.

Una de les característiques del sistema d'ubiquitinació és la gran varietat de respostes en funció de la combinació de lligases i substrats que participen en cada procés. Així, trobem una mateixa E3 lligasa responsable de la ubiquitinació de diferents substrats de igual manera que un substrat pot ser ubiquitinat per diferents E3 lligases.

La molècula d'ubiquitina conté una regió hidrofòbica exposada (Leu8, Ile11 i Val70) que és reconeguda per diversos substrats mitjançant els anomenats *ubiquitin-binding domains* (UBDs). Els UBDs tenen la capacitat d'unir i discernir entre els diferents tipus de modificacions per ubiquitina, resultant en una modulació específica de la proteïna substrat.



3.4. Funció

3.4.1. BRSKs en la funció neuronal

Les BRSKs estan involucrades en diversos aspectes de la fisiologia de la neurona, tant en estadis primerencs, orquestrant la polarització neuronal, com en la neurona madura, on controlaria l'alliberament de neurotransmissors, la organització sinàptica i l'arborització de l'axó.

3.4.1.1. Polarització neuronal

La polarització neuronal és el procés mitjançant el qual les cèl·lules progenitores no diferenciades esdevenen neurones madures. Durant aquest procés, a la neurona es produeixen una sèrie de canvis morfològics que deriven en la formació de diverses dendrites curtes ramificades i un únic axó. L'adquisició d'aquesta polaritat axó/dendrita és essencial per la funció de les neurones, des de la captació de senyals a les dendrites fins a la transducció i resposta a través de l'axó. Per aconseguir polaritzar, les neurones integren factors intracel·lulars (acumulació localitzada de components dins la neurona) i extracel·lulars (factors de l'ambient tissular circumdant). Com hem introduït anteriorment, la via LKB1/BRSKs és un dels principals "actors" de la polaritat neuronal *in vivo*. Malgrat tot, són moltes les vies inter-relacionades que convergeixen en l'espai i el temps per aconseguir la citoestructura necessària per al bon funcionament de la neurona.

- Polarització *in vitro* i *in vivo*

En els últims anys s'ha avançat molt en l'estudi dels determinants de la polarització neuronal. *In vivo*, les neurones corticals adquireixen l'eix axó/dendrita durant la migració radial en estadis embrionaris. La sinèrgia entre factors extrínsecs del medi i l'asimetria de components cel·lulars és el desencadenant del procés de polarització (Arimura and Kaibuchi, 2007; Barnes AP FAU - Polleux and Polleux, 2009; Barnes et al., 2008)). Aquestes neurones es generen en dos indrets: a la zona ventricular, a partir de cèl·lules de la glia radial, i a zona subventricular, a partir de cèl·lules progenitores intermèdies (Noctor et al., 2004). Les neurones migren des de la zona ventricular cap a la placa cortical (Hatanaka and Murakami, 2002; Noctor et al., 2004). Durant aquest procés, les neurones passen d'un estat multipolar, on no hi ha diferència entre les neurites, a un estat unipolar, on es diferencia la neurita que esdevindrà axó. L'anomenat procés retardat (*trailing process*), és a dir, la part de la neurona en orientada cap a la zona ventricular, esdevindrà l'axó, mentre que l'extrem oposat (*leading process*), orientat cap a la placa cortical esdevindrà l'arbre dendrític (**Fig 19A**).

El procés de polarització observat a neurones corticals (Noctor et al., 2004; Hatanaka and Murakami, 2002) és extrapolable a neurones granulars del cerebel o neurones piramidals hipocampals (Komuro et al., 2001), en el sentit que aquestes també adquireixen el fenotip neuronal durant la migració cap als seus nínxols respectius. Altres tipus cel·lulars, com neurones bipolars (Morgan et al., 2006) o les ganglionars de la retina (Zolessi FR FAU - Poggi et al., 2006), obtenen la polaritat axó/dendrita a partir de progenitors ja polaritzats.

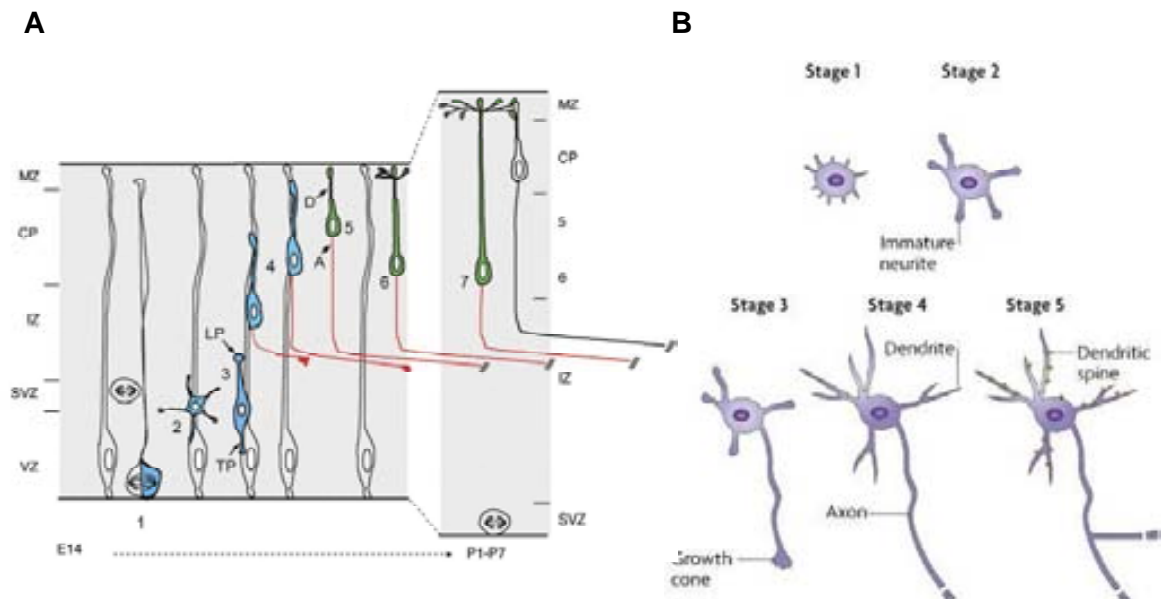


Fig. 19: Diferents estadis durant el desenvolupament neuronal *in vitro* i *in vivo*. A) Representació esquemàtica de la migració i diferenciació/polarització de neurones corticals durant el desenvolupament *in vivo*. Figura extreta de Barnes et al *New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo* *Curr. Opin. Neurobiol* 2008

B) Esquema dels diferents estadis de la polarització neuronal *in vitro* en cultius neuronals. Figura extreta de Arimura i Kaibuchi *Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms* *Nature* 2007

Molts dels avenços en la comprensió de la polarització neuronal s'han produït gràcies a l'estudi de models de polarització *in vitro* en els que s'utilitzen cultius de neurones hipocàmpals (Dotti and Banker, 1987; Dotti et al., 1988) i corticals (Hatanaka and Murakami, 2002) embrionaris. En aquests models, les neurones polaritzen en absència de factors extracel·lulars externs (Banker and Cowan, 1977), passant de cèl·lules amb neurites de mides similars a neurones madures amb un axó clarament diferenciat de les dendrites de menor mida (Dotti et al., 1988). Durant aquest procés les neurones travessen 5 estadis (Fig. 19B): inicialment les neurones post-mitòtiques adopten una forma esfèrica amb petites protuberàncies membranoses (estadi 1), que entre les 6 i 12 hores creixeran lleugerament esdevenint neurites immadures de no més de 30 μm de llargada (estadi 2). A partir de llavors, una neurita comença a augmentar el ritme de creixement respecte a les neurites germanes, esdevenint el futur axó (estadi 3). Els dies posteriors, aquesta neurita creixerà i adquirirà les característiques axonals mentre que les neurites restants maduraran fins a formar les dendrites (estadi 4). Després de 15-25 dies *in vitro* (DIV), les neurones formen sinapsis funcionals i comencen a aparèixer estructures presents en les neurones madures, com les espines dendrítiques (estadi 5). Malgrat tot, s'ha de tenir en compte que en aquests models les cèl·lules provenen de neurones prèviament polaritzades *in vivo*, així que es pot considerar el model com una repolarització *in vitro*. En l'actualitat, altres models més fisiològics com l'electroporació *in utero* o *ex utero* permeten manipular l'expressió gènica de progenitors neurals així com avaluar el procés de polarització neuronal en un context tissular.

○ Factors extracel·lulars

L'ambient cel·lular en el que es troba la neurona durant la migració i maduració és clau pel procés la polarització neuronal *in vivo*. Són molts els factors als que els progenitors neuronals estan exposats i que modulen la direccionalitat i especificació de la neurona. Per mitjà de cultius de neurones hipocampals s'ha determinat que factors extracel·lulars com el BDNF (Yoshimura et al., 2005; Shelly et al., 2007), NGF (Da Silva et al., 2005), Wnt5A (Zhang et al., 2007), Netrina-1 (Adler et al., 2006), NgCAM (Esch et al., 1999) o semaforina3A (Polleux et al., 2000) modulen positiva o negativament la formació de l'eix axó/dendrita. En alguns casos, com és el cas del BDNF, l'efecte es dona mitjançant l'activació de vies de transducció de senyal que convergeixen en la reestructuració del citoesquelet d'actina i el microtúbuls així com en la modulació de l'estat d'activació i dels nivells de certes proteïnes. En canvi, altres factors com la semaforina3a, actuarien com a quimiomoduladors, atraient les dendrites apicalment cap a la placa cortical i regulant negativament l'atracció dels axons, confinant-los a la part ventral (Polleux et al., 1998; Chen et al., 2008). En tots els casos, s'acaba produint una senyalització asimètrica que participa en el procés de l'especificació axó-dendrita així com en la organització, distribució i orientació dels tipus cel·lulars en l'entorn tissular.

○ Factors intracel·lulars

Dins la neurona diverses vies de transducció de senyal s'integren i actuen conjuntament per tal d'assolir el fenotip neuronal. Entre elles trobem vies com la anteriorment exposada LKB1-BRSKs, la via de PI3K amb alguns dels seus efectors i moduladors, la regulació dels complexos Par6/Par3/PKC ζ o l'actuació de molècules com E3 ubiquitina lligases i GTPases petites. La regulació dels nivells de proteïnes, la intensitat d'activació/inhibició de les vies i l'acumulació asimètrica d'algunes d'aquestes molècules derivaran en la correcta especificació axó-dendrita.

Via PI3K-Akt

L'activació de la PI3K en resposta a factors extracel·lulars genera l'acumulació localitzada del PIP3 en regions específiques de la membrana. En cultius de neurones hipocampals s'ha observat que durant els primers estadis de polarització es produeix un augment d'activitat PI3K i una acumulació de PIP3 en una de les neurites immadures, la que posteriorment esdevindrà l'axó (Shi et al., 2003). En aquest sentit, la sobreexpressió de PI3K provoca la formació de múltiples axons (Yoshimura et al., 2006), mentre que la inhibició farmacològica de la via impedeix la formació axònica (Shi et al., 2003; Menager et al., 2004). Així mateix, la sobreexpressió de PTEN, l'enzim que defosforila PIP3, resulta en un fenotip de manca d'axons, mentre que la seva inhibició provoca l'aparició de nombrosos axons (Jiang et al., 2005). Recentment s'ha demostrat que el silenciament de l'enzim *proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase* (PIPP), que també degrada PIP3, genera diversos axons hiperallargats (Astle et al., 2011), reforçant la hipòtesis que l'acumulació de PIP3 és un esdeveniment clau en el procés.

L'estimulació de la via aniria lligada a l'activació de la quinasa Akt (també coneguda com PKB), que promouria l'especificació axònica en una sola neurita (Yoshimura et al., 2006). Es va proposar la fosforilació i inactivació de GSK3 a la S9 per part de PKB com a responsable d'aquest fenotip, ja que la inhibició de l'activitat GSK3 β és indispensable pel creixement neurític (Jiang et al., 2005). Malgrat tot, ratolins knock-in amb una forma de GSK3 no fosforilable per PKB no presenten defectes en la polaritat tant *in vitro* com *in vivo* (Gartner et al., 2006; Hur and Zhou, 2010), suggerint mecanismes alternatius d'inhibició de GSK3.

GTPases petites

Durant la polarització neuronal és necessària una correcta dinàmica en l'organització de les membranes i el citoesquelet. Les GTPases tenen un paper important en regular aquest procés, especialment les GTPases de les famílies Ras i Rho. (Hall and Lalli, 2010). Ras actuaria promovent la formació d'axons a través de l'activació de la PI3K (Schwamborn and Püschel, 2004; Oinuma et al., 2007; Fivaz et al., 2008). Pel que fa a les GTPases de la família Rho, mentre que Cdc42 i Rac1 promouen el creixement axonal, RhoA està implicada en la inhibició d'aquest creixement (Bito et al., 2000; Schwamborn and Puschel, 2004; Nishimura et al., 2005). Sembla clar que GTPases d'ambdues famílies actuaren conjuntament en la regulació de la polaritat neuronal. Per exemple, Rap1B (família Ras) i cdc42 (família Rho), participen *downstream* de la via PI3K en la reorganització del citoesquelet i el tràfic intracel·lular per permetre l'extensió de l'axó, modulant el complex Par3/Par6/aPKC (Schwamborn and Püschel, 2004).

Complexes Par3-Par6-aPKC

El complex PAR3-PAR6-aPKC juga un paper fonamental en l'establiment de la polaritat neuronal. Descrit per primera vegada en *C. elegans* dins d'un conjunt de gens implicats en la divisió asimètrica dels primers blastòmers, s'ha vist que estan conservats des de *Drosophila* a vertebrats (Cowan and Hyman, 2004). Aquest complex està localitzat al cos cel·lular de la neurona i és transportat al futur axó durant la transició entre els estadis 2 i 3 de polarització. L'activitat de la aPKC resulta crítica per a l'especificació de l'axó ja que la seva inhibició en bloqueja la formació. La localització, així com l'activació d'aquest complex, està regulada per la PI3K i la inhibició d'aquest enzim resulta en una localització anòmala del complex i en una manca de polarització (Shi et al., 2003).

Les proteïnes PAR3 i PAR6 actuen com a *scaffolds* i s'han identificat una sèrie de proteïnes amb les que interacciona. Entre aquestes destaquen la forma activa de cdc42 (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000), el *GTPase activating protein* (GAP) de Rho p190RhoGAP (Zhang and Macara, 2008), Tiam/STEF un *guanine exchange factor* (GEF) per Rac1 (Chen and Macara, 2005) o les ubiquitina lligases Smurf1 (Ozdamar et al., 2005) i Smurf2 (Schwamborn et al., 2007). La unió de cdc42 al complex PAR3/6-aPKC indueix la seva interacció amb TIAM/STEF. Això condueix finalment a l'activació de Rac1 i la formació de lamel·lipodis (Lin et al., 2000; Johansson et al., 2000; Nishimura et al., 2005).

Aquest complex també està regulat per RhoA, que actuaria d'una manera antagònica, bloquejant la formació de l'axó. En aquest cas, la inhibició del complex PAR3/6 estaria mitjançada a través de la fosforilació per la quinasa ROCK, la qual és activada per la forma de Rho unida a GTP (Nakayama et al., 2008).

Les E3 ubiquitina lligases Smurf1 i Smurf2 també regulen el complex PAR3-PAR6-aPKC durant la polaritat neuronal.

En neurones no polaritzades, Smurf1 ubiquitina i promou la degradació de Par6 fins que les neurones entren a l'estadi 3, on Smurf1 promou el creixement neurític mitjançant la degradació específica de RhoA a la neurita que esdevindrà axó (Wang et al., 2003; Bryan et al., 2005), acompanyat d'una estabilització de Par6. Aquest procés es dona en resposta a l'estimulació de la via cAMP/PKA, que fosforila Smurf1 a la Thr306, promovent el canvi en l'especificitat de substrat de Par6 a RhoA (Cheng et al., 2011) (**Fig. I10**).

Per la seva banda, Smurf2 localitza al con de creixement axònic per mitjà de la interacció amb Par3. Allí, Smurf2 degrada la Ras-GTPasa Rap1B en la seva forma inactiva, amb la conseqüent acumulació de la forma activa, que promouria el creixement axònic (Schwamborn et al., 2007).

Totes aquestes dades semblen indicar que existeix una complexa regulació dels nivells de Par3/Par6/aPKC durant la polarització neuronal.

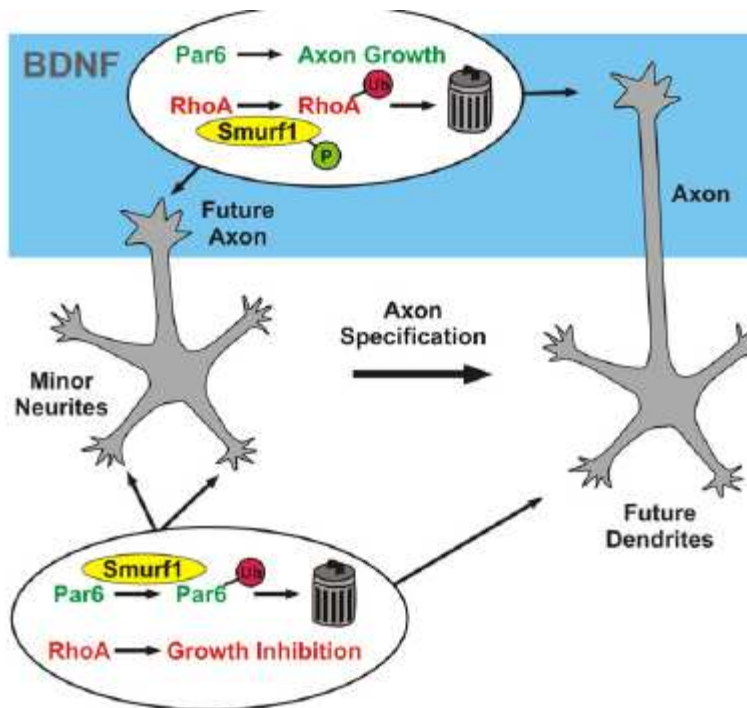


Fig. I10: Model d'especificació axonal controlada per Smurf1. En neurones immadures, la proteïna RhoA impediria el creixement neurític i la ubiquitina lligasa Smurf1 ubiquitinaria i promouria la degradació a la proteïna scaffolding Par6. Al rebre estímuls com el BDNF, la proteïna quinasa A (PKA), fosforilaria a Smurf1 a la Thr306 canviant la especificitat de substrat de Par6 a RhoA a la neurita que esdevindrà l'axó, establint Par6 i promovent la degradació de RhoA.

BRSKs i polarització neuronal

La BRSK es va caracteritzar per primera vegada en *C. elegans* en un *screening* per identificar mutacions que afectessin els *clusters* de vesícules presinàptiques en neurones. Les neurones deficientes en SAD-1, l'homòleg de BRSK1 en *C. elegans*, a més de presentar defectes en la organització sinàptica i la dinàmica vesicular, també manifestaven una clara afectació del procés de polarització neuronal. Per altra banda

la sobreexpressió de la SAD1 provocava una terminació prematura dels axons, així com diversos defectes en la seva ramificació i direccionalitat (Crump et al., 2001).

En ratolí es van detectar dos gens ortòlegs de SAD1, que es van anomenar Sada (BRSK1) i Sadb (BRSK2). Els ratolins *knock out* individuals per a cadascun d'aquest gens eren normals i fèrtils, mentre que els ratolins doble *knock out* presentaven pocs moviments espontanis, baixa resposta a l'estimulació tàctil i morien a les dues hores després de néixer (Kishi et al., 2005). Les principals divisions del sistema nerviós d'aquests ratolins estaven ben formades, però presentaven un còrtex significativament més prim, amb els diferents tipus neuronals desorganitzats dins de les capes cerebrals. *In vitro*, les neurones del ratolí doble KO no eren capaces de diferenciar axons de dendrites, presentant neurites de llargada i ramificacions de mides similars, i positives tant per marcadors axonals (Tau-1) com per marcadors dendrítics (MAP2). Els efectes de les BRSKs en la polarització neuronal podrien ser deguts en part als canvis en la fosforilació de la Ser262 de Tau, una proteïna implicada en la organització dels microtúbuls. Així, mentre els animals normals presenten alts nivells de fosfo-Tau a les dendrites de la placa cortical, en els doble KO els nivells de fosfo-Tau són baixos en aquesta regió.

Com hem comentat, des del punt de vista morfològic aquest fenotip és similar al que presenta el ratolí KO condicional de còrtex d'LKB1 (Barnes et al., 2007). No obstant, el fet que els ratolins condicionals de còrtex LKB1^{-/-} presentin uns nivells de la forma activa de les BRSKs -fosforilades al *T-loop*- significativament reduïts als axons, estaria en contradicció amb la disminució de la forma fosforilada de Tau a les dendrites en ratolins doble KO de les BRSKs (Kishi et al., 2005).

La situació és diferent en el cas de la medulla espinal i el tronc de l'encèfal, on s'ha demostrat que les BRSKs són dispensables per a la formació de l'axó. En aquest tipus de neurones sensorials les BRSKs participarien en el procés d'arborització dels axons durant els estadis avançats de l'especificació axònica d'una manera independent d'LKB1 (Lilley et al., 2013). Aquest procés vindria governat per la senyalització amb la neurotrofina NT-3 i el seu receptor TrKC, via regulació de l'activitat de les quinases.

Com s'ha mencionat anteriorment, en *C. elegans* existeixen dues isoformes de SAD-1 amb funcions diferents. Així, mentre que la sobreexpressió de la isoforma SAD-1 (L) rescata tant els defectes en la polaritat com en la organització sinàptica observat en animals sense la quinasa, la isoforma SAD-1 (S), recupera exclusivament els defectes en la organització sinàptica. Això s'atribueix a la interacció específica de cadascuna d'aquestes formes amb diferents proteïnes. Per exemple SAD-1 (L) però no SAD-1 (S), interacciona amb la Neurabina (NAB-1), una proteïna *scaffolding* que també s'uneix a la F-actina (Hung et al., 2007). La interacció entre SAD-1(L) i NAB-1 només és necessària en el procés de polarització neuronal, no participant en la formació de les sinapsis ni en la dinàmica vesicular.

Una altra proteïna que interacciona amb SAD-1 (L) és STRD-1, l'ortòleg de STRAD α en *C. elegans*. STRAD α és una pseudoquinasa requerida per a la localització, estabilització i activació de LKB1 (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003; Hawley et al., 2003), així com en la fosforilació i activació de molts dels seus substrats (Lizcano et al., 2004). En *C. elegans*, el complex SAD-1/STRD-1 constitueix una via independent d'LKB1 que juga un paper important tant en el control de la polarització neuronal com en la organització sinàptica (Kim et al., 2010a). A diferència del paper de STRAD α en la

regulació d'LKB1, en *C. elegans* STRD-1 localitza SAD-1 a les sinapsis, sense afectar la seva activitat o estabilitat.

A banda d'interaccionar amb aquestes dues proteïnes, SAD-1 (L) també interacciona amb SAD-1 (S) mitjançant contactes entre els dominis UBA de les dues isoformes (Kim et al., 2010b). Els autors proposen un model de funcionament de les BRSKs en la funció neuronal basat en les esmentades observacions (Hung et al., 2007; Kim et al., 2010a; Kim et al., 2010b). En aquest model, diferents molècules de SAD-1 (L) formen agregats que interaccionen amb STRD-1 i posteriorment amb NAB-1 per establir la polaritat neuronal al llarg de l'axó (Fig. I11).

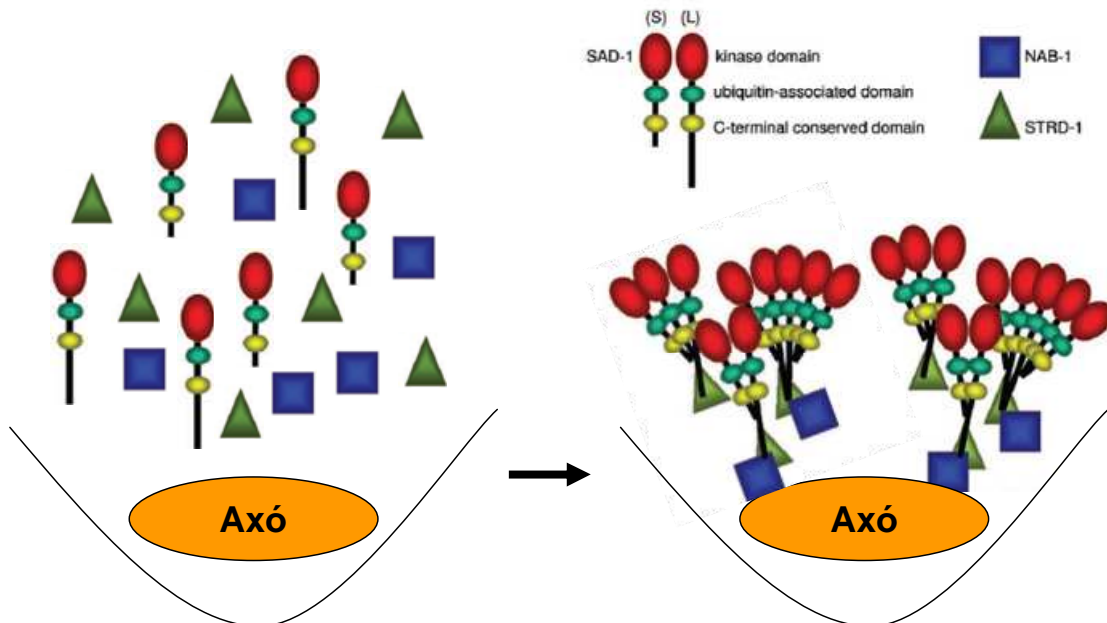


Fig. I11: Model de funcionament de les BRSKs en la organització sinàptica i la polaritat neuronal proposat per Kim et al. En aquest model, SAD-1 (L) interaccionaria amb SAD-1 (S), que s'unirien a STRD-1 i NAB-1 a través de la cua C-terminal de SAD-1 (L). La unió a STRD-1 faria que el complex proteic localitzés a l'axó. Figura modificada de Kim S.M. *The long and the short of SAD-1 kinase. Communicative & Integrative Biology* 2010

En *C. elegans* també s'ha estudiat en quines fases de la diferenciació neuronal és requerit SAD-1. Utilitzant una elegant estratègia químic-genètica que permet la inhibició específica d'aquest enzim en diferents punts del cicle vital d'aquest nematode, s'ha demostrat que SAD-1 és necessària tant per establir la polaritat axonal com la organització sinàptica, però que no pel manteniment d'aquests processos. Els defectes produïts per la manca de SAD-1 durant els primers estadis de la polarització són irreversibles mentre que els produïts en la organització sinàptica es poden corregir en la fase de manteniment (Kim et al., 2008).

En altres organismes les BRSKs també controlen la distribució polaritzada de diversos components cel·lulars. Així en l'ascidi *Halocynthia roretzi* el silenciament de POPK-1, l'ortòleg de BRSK1 en aquest organisme, altera la localització dels mRNAs materns als oòcits originant larves mancades de múscul i mesènquima (Nakamura et al., 2005).

Tot plegat demostra que les BRSKs tenen un paper essencial en la regulació de la polaritat cel·lular que s'ha conservat al llarg de l'evolució.

3.4.1.2. BRSK1 i la transmissió sinàptica

En *C. elegans* SAD-1 (BRSK1) també juga un paper important en el manteniment i regulació de la sinapsis. Els mutants deficientes en activitat SAD-1 presenten defectes en el desenvolupament presinàptic que afecten a la mida, forma i posició de les vesícules en neurones sensorials (Crump et al., 2001). Aquests defectes es detecten tant en les sinapsis neurona-neurona com en les sinapsis neuromusculars.

Aquesta funció s'ha conservat al llarg de l'evolució ja que en neurones hipocàmpals, l'homòleg de mamífer SAD-B (BRSK1) també és concentra en les vesícules de la zona activa presinàptica, mostrant un patró puntuat similar al del marcador de vesícules presinàptiques sinaptofisina (Inoue et al., 2006). En aquestes neurones, BRSK1 també participa en el mecanisme d'alliberament dels neurotransmissors (Inoue et al., 2006) i la presència del domini conservat SCR2 a l'extrem C-terminal és necessària tant per a localització característica de SAD-B a la sinapsis com per l'alliberament de neurotransmissors. Encara no es coneix quines son les dianes de BRSK1 a les terminals sinàptiques. No obstant, algunes de les proteïnes implicades en l'adhesió de vesícules sinàptiques i alliberació de neurotransmissors s'han identificat *in vitro* com a substrats de la BRSK1. Fins ara els substrats identificats són RIM-1, Bassoon i Piccolo (Betz et al., 2001; Calakos et al., 2004), (Higa et al., 2007).

Pel que fa a la funció de les BRSKs al sistema nerviós perifèric, a través d'un *screening* en *C. elegans* destinat a identificar gens implicats en l'estructura i funció de les sinapsis neuromusculars, es va identificar BRSK1 com un dels candidats a realitzar alguna d'aquestes funcions (Sieburth et al., 2005). De fet, BRSK1 està present a les sinapsis neuromusculars amb una distribució difusa associada a les vesícules sinàptiques i a la zona activa de les terminal presinàptiques (Hagiwara et al., 2011). Malgrat que les sinapsis neuromusculars es formen correctament en els ratolins doble KO per les BRSKs (Lilley et al., 2013), un dèficit en la transmissió sinàptica en les unions neuromusculars podria ser la causa de la manca de moviments espontanis que presenten aquests ratolins al moment de néixer. Així, el paper de les BRSKs en les sinapsis neuromusculars s'ha d'estudiar més en detall, fent èmfasi en l'estudi de les diferents isoformes de BRSKs i en el seu paper en la neurotransmissió en aquest tipus neuronal.

3.4.2. BRSKs en el cicle cel·lular

Les BRSKs també tenen funcions rellevants en dos punts del cicle cel·lular: la duplicació dels centrosomes i la transició G2/M.

Els centrosomes son els orgànuls que formen els pols del fus mitòtic i que promouen l'assemblatge dels microtúbuls. Estan formats per dos centríols i una matriu pericentriolar que conté γ -tubulina i altres proteïnes associades. En el centrosoma la γ -tubulina regula la nucleació dels dímers d' α/β tubulina, la duplicació del centrosoma i la formació del fus. Malgrat que la formació del nou centríol és iniciada per l'activació de la *Polo-like* kinasa 4 durant la transició G1/S, també s'ha observat que la BRSK2 té un paper important en aquest procés, ja que l'alteració dels seus nivells provoca defectes en la divisió cel·lular així com canvis en el nombre de centrosomes. La BRSK2 està associada al centrosoma, on fosforila a la γ -tubulina a la Ser 131. Aquest fosforilació sembla tenir una gran importància en aquest procés ja que l'expressió del

mutant fosfomimètic (Asp 131) indueix l'amplificació del centrosoma mentre que la del mutant no fosforilable (Ala 131) inhibeix la seva duplicació. La fosforilació de la Ser 131 estabilitzaria una conformació de la γ -tubulina que estimularia la formació del nou centríol, però no està clar si és la responsable del inici de la síntesi d'aquest nou centríol. El fet de que els nivells de la BRSK2 fluctuïn durant el cicle cel·lular i que coincideixin amb els de γ -tubulina fosforilada a la Ser 131 donaria suport a aquesta idea (Alvarado-Kristensson et al., 2009).

L'efecte sobre la transició G2/M també està mitjançat per la BRSK2, la qual s'activa i experimenta una translocació citosol/nucli en resposta a determinats tipus d'estrès genotòxics (radiació UV o metilmetà sulfonat). L'aturada del cicle cel·lular provocada per la radiació UV en la transició G2/M es veu parcialment anul·lada després del silenciament de BRSK2. Les proteïnes a través de les quals BRSK2 provocaria l'arrest cel·lular serien la quinasa *wee1* i la fosfatasa *cdc25*. BRSK2 fosforila *in vitro* *wee1*, *Cdc25B* i *Cdc25C* a les serines 642, 631 i 316 respectivament. En el cas de *wee1* la fosforilació en la Ser 642 és necessària per a la unió de la proteïna 14-3-3 i així assolir la màxima activitat enzimàtica, mentre que les fosforilacions en les *cdc25* resulten en la inhibició de l'activitat fosfatasa. Un mecanisme semblant opera a *S. pombe* on *Crd2*, l'homòleg de BRSK2, controla l'entrada a la mitosi a través de la regulació *Wee1* (Breeding et al., 1998; Kanoh and Russell, 1998).

La fosforilació de *wee1* en la serina 642 per la BRSK2 també és important durant l'establiment de la polaritat neuronal. Al inici d'aquest procés, *Wee1* no és necessària per a l'extensió de l'axó però sí per a la formació de neurites. No obstant, a l'estadi de diferenciació 3 és necessària la inactivació de *Wee1* per tal de prevenir la disrupció de la polaritat. Aquesta inactivació s'iniciaria amb la fosforilació de la serina 642 per BRSK2 (Muller et al., 2010). A diferència del que succeeix en el cicle cel·lular, on aquesta fosforilació resulta en l'activació i estabilització de *wee1*, en la polarització neuronal es produiria una desestabilització de l'enzim. Això suggereix que hi ha factors específics de neurones o d'un determinat estadi en la diferenciació que determinarien la estabilitat de *wee1* després de la fosforilació per BRSK2. D'aquests estudis se'n desprèn que les BRSKs participarien a diversos nivells durant la polarització neuronal.

Com s'ha mencionat anteriorment és necessària una estreta regulació dels nivells de les BRSKs per dur a terme correctament les seves funcions. Tant increments com disminucions dels nivells de BRSK1 afecten funcions diverses com el cicle cel·lular (Alvarado-Kristensson et al., 2009) o la polaritat neuronal (Choi et al., 2008). Durant el cicle cel·lular els nivells de BRSK2 estan regulats a través de la seva degradació al proteosoma. Un dels components responsables de la degradació d'aquesta quinasa és el complex promotor de l'anafase/ciclosoma-*Cdh1* (*APC/C^{Cdh1}*) (Li et al., 2012). *APC/C* és una E3 ubiquitina lligasa formada per diverses subunitats que juga un paper important en la regulació de l'entrada i progressió en la mitosi, així com en la replicació del DNA (King et al., 1995; Hagting et al., 2002). L'activitat d'aquesta E3 lligasa està regulada per dues proteïnes: *Cdc20* (*cell division cycle*), que s'hi uneix i l'activa al principi de l'anafase, i *Cdh1*, que substitueix a *Cdc20* al final de la mitosi i es manté fins al final de G1 (Fang et al., 1998). BRSK2 és ubiquitinada pel complex *APC/C*, de manera dependent del co-activador *Cdh1* i els seus nivells oscil·len durant el cicle cel·lular seguint un patró similar a la degradació d'altres substrats del complex *APC/C* en aquest procés com *Aurora B* (Stewart and Fang, 2005) i *ciclina B* (Fang et al., 1998).

Aquesta ubiquitinació és determinant per a la progressió del cycle cel·lular ja que una forma no ubiquitinable de BRSK2 arresta el cycle cel·lular a la transició G2/M, degut presumiblement a la fosforilació inhibidora sobre la S216 de la fosfatasa Cdc25C.

Una altra proteïna que interacciona amb BRSK2 és Jab1 (*c-Jun activation domain binding protein1*). Aquesta proteïna, que té activitat Nedd8 isopeptidasa, és el component més ben caracteritzat del complex COP9 *signalosome*. COP9 està implicada en diversos processos cel·lulars com ara la regulació de l'expressió gènica, la reparació del DNA o la regulació de l'entrada i progressió del cycle cel·lular. En aquest sentit es coneix que Jab1 promou la degradació d'algunes proteïnes com p27, p53 o ciclina E, totes elles importants per a la progressió del cycle cel·lular (Tomoda et al., 1999; (Becht-Otschir et al., 2001) (Cope and Deshaies, 2006)). BRSK2 també s'ha identificat com una de les proteïnes que interacciona amb Jab1. La sobreexpressió de Jab1 provoca la poliubiquitinació de la BRSK2 així com una disminució dels seus nivells via degradació proteosomal. Així mateix, l'aturada en la transició G2/M del cycle cel·lular provocada per BRSK2 també és contrarestada per la sobreexpressió de Jab1 (Zhou et al., 2012).

3.4.3. BRSK2 i control del metabolisme de la glucosa

A més del paper àmpliament estudiat de les BRSKs en la regulació de la fisiologia neuronal i el control de cycle cel·lular, últimament s'ha relacionat BRSK2 amb el control del metabolisme de la glucosa al pàncrees. Diferents publicacions indiquen que, encara que en menor mesura que al sistema nerviós, les BRSKs també s'expressen en testicles i pàncrees (Lu et al., 2004; Kishi et al., 2005; Inoue et al., 2006; Chen et al., 2012).

Les primeres evidències del possible paper de les BRSKs en aquest òrgan es deriven de l'estudi del ratolí *knock-out* condicional de LKB1 al pàncrees, que presenta insuficiència pancreàtica a més de l'aparició de tumors similars al produïts pels pacients del síndrome de *Peutz-Jeghers* (Hezel et al., 2008). Aquests animals presenten baixos nivells i disminució de la fosforilació al *T-loop* de diferents AMPK-related kinases, entre elles les BRSKs.

D'estudis amb ratolins *knock out* condicionals de BRSK2 al pàncrees es conclou que BRSK2 participaria en el procés d'alliberació d'insulina en resposta als nivells de glucosa (GSIS) en aquest òrgan (Nie et al., 2013). L'alliberament d'insulina és un procés complex regulat a diferents nivells (**Caixa 2**). El mecanisme molecular inclou GLP-1 com a senyalitzador *upstream* de BRSK2 durant la GSIS. Al pàncrees, GLP-1 interaccionaria amb el receptor d'incetines acoblat a l'adenilat ciclase, amb el conseqüent augment de l'AMPc (MacDonald et al., 2002; Drucker, 2006). Això activaria la PKA, que per mitjà de la fosforilació de BRSK2 a la T260 augmentaria la GSIS. En resposta a increments de glucosa al medi, BRSK2 també augmenta la seva traducció i activitat en illots pancreàtics i cèl·lules β -pancreàtiques MIN6. BRSK2 activa, interacciona i fosforila a la quinasa PAK1 (*p21-activated kinase 1*) a la Thr423 (Nie et al., 2012). PAK1 actuaria remodelant el citoesquelet d'actina, així com estimulants el tràfic vesicular per promoure l'alliberament d'insulina (**Fig. I12B**).

D'aquests estudis també es desprèn que BRSK2 té un lloc de fosforilació a la Thr 443 que regula el procés de GSIS (Nie et al., 2013). Aquesta fosforilació inhibiria la quinasa, de manera que seria necessària la desfosforilació d'aquest residu mitjançada

per increments de cAMP (en resposta a GLP-1) per aconseguir l'efecte de BRSK2 en l'estimulació del GSIS en cèl·lules β -pancreàtiques MIN6.

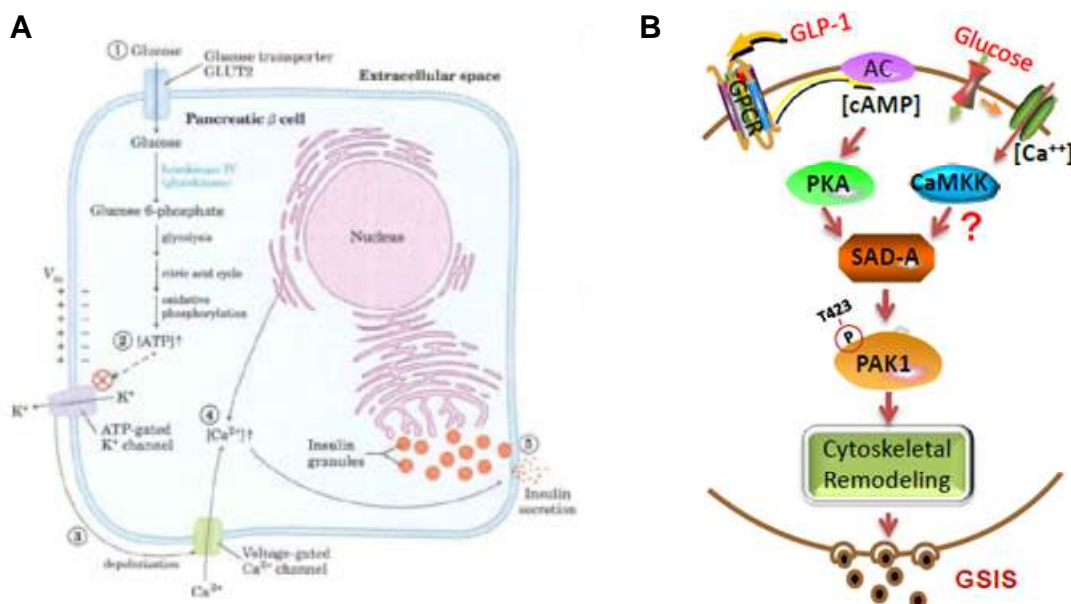


Fig. 112: Regulació per BRSK2 de la secreció d'insulina en resposta als nivells de glucèmia.

A) Regulació del metabolisme de la glucosa en cèl·lules β -pancreàtiques. Extret de Principles of Biochemistry, Lehninger, Capítol 23. **B)** En el model de Nie i col·laboradors, la fosforilació per PKA de BRSK2 faria que fosforilés a PAK1 en resposta a increments de glucosa al medi. PAK1, al seu torn, remodelaria el citoesquelet d'actina per promoure l'alliberació vesicular d'insulina.

CAIXA 2: Procés d'alliberament d'insulina al pàncrees i diabetis

Després de la ingesta, la glucosa s'incorpora al torrent sanguini des de l'intestí. Al augmentar els nivells de glucosa en sang, aquesta entra via els transportadors GLUT2 a les cèl·lules β del pàncrees. Això provoca un increment en el catabolisme de la glucosa -amb un conseqüent augment de la formació d'ATP- que acabarà bloquejant els canals de potassi dependents d'ATP, impedit així la sortida de K^+ de l'interior de la cèl·lula. Això provoca una despolarització que obrirà els canals de Ca^{2+} -dependents de voltatge, amb el conseqüent increment dels nivells de Ca^{2+} intracel·lular, provocant l'alliberament d'insulina per exocitosis.

La diabetis és una malaltia en la que el cos no pot regular els nivells de glucosa en sang. Els dos tipus principals de diabetis són la de tipus I (DMTI), en la que les cèl·lules del pàncrees no produeixen insulina o en produeixen molt poca quantitat, i la de tipus II (DMTII), en la que el greix, el fetge i les cèl·lules musculars no responen a la insulina, acompanyat d'una deficient secreció d'insulina per part del pàncrees, amb la conseqüent acumulació de glucosa en sang.

La DMTII és la més freqüent i un dels tractaments utilitzats és l'administració de GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) o anàlegs d'aquest compost (Fehse et al., 2005). GLP-1 és una incretina (hormona) que es secreta a l'intestí en resposta a l'ingesta de nutrients, estimulant la secreció d'insulina al pàncrees i inhibint la secreció de glucagó, aconseguint disminuir els nivells de glucosa en sang.

Aquest nou paper de BRSK2 en la via de les incretines i el creixent coneixement de la regulació de les BRSKs *in vivo*, suggereix la possibilitat d'utilitzar-la com a diana en pacients de diabetis tipus II.

A més, aquests treballs presenten una nova regulació de les BRSKs en resposta a increments en la concentració intracel·lular d'AMPc. Així, la l'augment de la senyalització per PKA no només seria important en polaritat neuronal (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007) a través de la via LKB1-BRSKs, sinó que també estaria implicada en altres processos com la regulació del metabolisme de la glucosa al pàncrees (Nie et al., 2012; Nie et al., 2013).

3.4.4. BRSK2 i estrès reticular

L'estrès reticular (ER) és un fenomen que es dona quan hi ha una acumulació de proteïnes mal plegades al lumen del reticle endoplasmàtic. En resposta a aquest fenomen, s'activen diverses vies anomenades de resposta a proteïnes mal plegades (en anglès UPR, *unfolded protein response*). L'activació d'aquestes vies resulta en un augment de la transcripció de xaperones i en l'aturada en la síntesi de proteïnes. Si aquesta resposta no restaura la homeòstasi cel·lular finalment s'indueix l'apoptosi (Kaufman, 1999). S'ha observat que BRSK2 hi juga un paper bloquejant l'apoptosi en un mecanisme independent de la seva activitat quinasa. Així, la presència de nivells alts d'aquest enzim impedeixen la transcripció d'alguns gens entre els que es troba CHOP, un mediador clau en la cascada d'apoptosi induïda per estrès reticular. Això està d'acord amb el fet que la concentració de BRSK2 disminueix després de tractaments perllongats amb inductors d'estrès reticular (Wang et al., 2012).

Una altra funció de la BRSK2, que en aquest cas sí que depèn de la seva activitat, és la modulació de l'activitat de VCP/p97 (*valosin-containing protein/p97*). Aquesta és una proteïna de la família de les AAA ATPases implicada en la degradació de proteïnes mal plegades del reticle endoplasmàtic (ERAD, *ER-associated protein degradation*). BRSK2, a través de la interacció amb VCP/p97, regula la degradació de CD3δ, un dels substrats de VCP/p97 en l'ERAD.

Malgrat aquestes evidències, en cap cas s'ha demostrat el mecanisme concret a través del qual opera la BRSK2 en aquest procés.

3.4.5. BRSKs i malalties

El fet que les BRSKs regulin el cicle cel·lular en diferents punts, especialment als anomenats *checkpoints*, les fa atractives com a dianes terapèutiques per al tractament de la proliferació cel·lular anòmla típica dels tumors. No obstant són poques les evidències directes que relacionen les BRSKs amb diferents malalties. En un dels pocs estudis clínics realitzats es descriu la BRSK2 com un antigen reconegut pel sèrum de pacients amb encefalitis límbica i càncer de cèl·lules petites de pulmó (Sabater et al., 2005). Malgrat tot, aquest no és un tret remarcable d'aquest tipus de patologies.

En un altre estudi s'identifica la BRSK2 com una de les proteïnes sobreexpressades en adenocarcinomes ductals de pàncrees i no en les cèl·lules circumdants al tumor o en teixits pancreàtics normals (Niu et al., 2010). A més, els nivells de BRSK2 en aquest tipus de tumors correlaciona amb la prognòsis dels pacients.

Les alteracions en els nivells de BRSKs també s'han associat a la malaltia d'Alzheimer. Aquesta malaltia es caracteritza per la pèrdua de sinapsis i neurones, deficiències en la neurotransmissió i el metabolisme, agregació del pèptid β amiloide ($A\beta$) en plaques extracel·lulars i acumulacions intracel·lulars de Tau (Selkoe, 2004; Binder et al., 2005; Ballatore et al., 2007). Es tracta d'una malaltia complexa pel fet de ser multifactorial. Estudis en neurones hipocampals en cultiu demostren que un dels primers efectes en resposta a l'exposició de les neurones a oligòmers $A\beta$, són els increments de Ca^{2+} , la deslocalització de Tau dels axons a les dendrites, la fosforilació de Tau i la destrucció de microtúbuls i espines dendrítiques (Zempel et al., 2010). En aquests processos s'ha descrit que hi ha un augment en l'activitat de diverses quinases - entre elles les BRSKs -, així com en la fosforilació dels llocs específics de Tau descrits en la malaltia d'Alzheimer. Les BRSKs fosforilen a Tau a la S262 *in vivo* (Kishi et al., 2005) i aquesta fosforilació regula negativament la unió de Tau als microtúbuls, desenganxant-la dels mateixos. Així, les BRSKs podrien participar en els canvis de localització de Tau característics de la malaltia. Malgrat tot, com es discuteix més endavant, encara hi ha controvèrsia respecte al paper de les BRSKs en la fosforilació de Tau i el seu paper en la regulació de l'associació als microtúbuls.

OBJECTIUS

Les *Brain Specific Kinases* (BRSK1 i BRSK2) són Ser/Thr quinases que s'expressen majoritàriament al cervell i són activades per fosforilació directa per la quinasa supressora de tumors LKB1. La via LKB1-BRSKs juga un paper fonamental en l'establiment de la polaritat neuronal, i les neurones corticals de ratolí KO BRSK1/2 o del ratolí KO condicional per LKB1 al còrtex els manca l'axó. A més, un *pool* de BRSK1 (però no de BRSK2) localitza en les vesícules de la terminal presinàptica, on controlaria l'alliberament de neurotransmissors.

Malgrat tot, no s'han descrit els mecanismes de localització i modulació de l'activitat de les BRSKs *in vivo*. Com que LKB1 és una quinasa constitutivament activa, han d'existir mecanismes alternatius de regulació de les BRSKs que controlin les seves activitats i localització a la cèl·lula. És per això motiu que es proposen els següents objectius:

- **Caracterització de la localització subcel·lular i modificacions post-traducionals de la BRSK1 neuronal.**
- **Identificació i caracterització dels lípids que uneixen BRSK1 i estudi de la modulació de l'activitat quinasa per l'entorn lipídic.**
- **Estudi dels mecanismes implicats en el control de la expressió de BRSK1 durant la diferenciació neuronal. Paper de les E3 ubiquitina lligases Smurf1/2.**

RESULTATS

**RESULTATS-PART 1:
LOCALITZACIÓ I PALMITOILACIÓ DE LES BRSKs**

PART1: LOCALITZACIÓ I PALMITOILACIÓ DE LES BRSKs

1.1. Localització subcel·lular de BRSK1

En la majoria de processos cel·lulars és de vital rellevància la localització i la compartimentalització de certes proteïnes per aconseguir dur a terme la seva funció. En el cas de les BRSKs, aquest fet guanya importància ja que la seva quinasa activadora (LKB1) és constitutivament activa, obligant a una estreta regulació d'aquestes proteïnes per aconseguir co-localitzar en l'espai i el temps les proteïnes substrat en indrets específics.

Cada vegada més es van coneixent els mecanismes de regulació de les BRSKs, especialment en referència a la modulació de la seva activitat quinasa. En aquest treball ens hem plantejat estudiar els mecanismes associats als canvis en la localització subcel·lular de les BRSKs. Per fer-ho, es van fraccionar diferents tipus cel·lulars, seguint el protocol detallat a *Material i mètodes* (**Fig. M7**). En tots els casos, es van utilitzar marcadors de les diferents fraccions cel·lulars per avaluar la puresa de cada una d'elles: GAPDH per la fracció citosòlica, receptor de transferrina (TfR) per a les fraccions de membrana solubles en Triton X-100 i Thy1 com a proteïna marcador de membranes insolubles en Triton X-100 (solubles en SDS). Tant en cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y com en cultius primaris de neurones corticals de rata i ratolí, BRSK1 localitza al citosol i en la fracció particulada resistent a l'extracció per Tritó X-100 (**Fig. R1**). També es pot observar que LKB1 té una localització exclusivament citosòlica. Com s'ha esmentat anteriorment, quan LKB1 forma un complex amb la pseudoquinasa STRAD i MO25, té una localització citosòlica (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003).

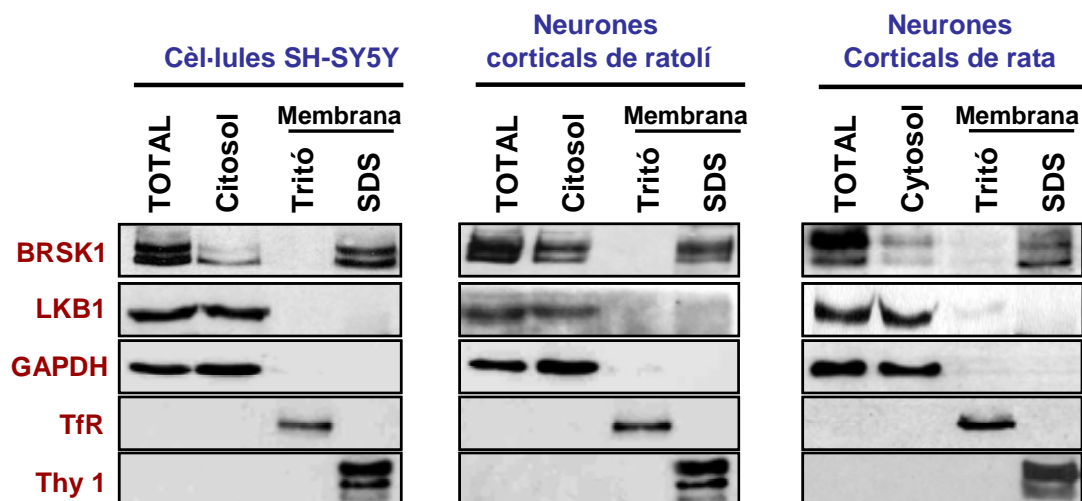


Fig. R1: BRSK1 localitza al citosol i a la membrana cel·lular, de manera resistent a la solubilització pel detergent Triton X-100. Extractes de cèl·lules SH-SY5Y i neurones corticals de ratolí i rata cultivades 5 DIV es van fraccionar seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. Les diferents fraccions van ser analitzades per immunoblot amb els anticossos indicats. La puresa de les fraccions va ser evaluada utilitzant els marcadors: GAPDH (Citosol), receptor de transferrina (TfR, membranes solubles en Tritó X-100) i Thy1 (membranes solubilitzades amb SDS). Resultats representatius de 3 experiments independents.

Inoue et al. van descriure un *pool* de BRSK1 a la fracció particulada associada fortament a la regió presinàptica (Inoue et al., 2006). Mitjançant immunocitoquímiques en cultius primaris de rata i ratolí vam corroborar l'observació que la BRSK1 co-localitza amb el marcador presinàptic sinaptofisina (**Fig. R2, control**). BRSK1 presenta una forta associació a les membranes, ja que manté el patró puntuat característic d'aquesta quinasa fins i tot després d'un tractament breu amb el detergent no iònic Triton X-100. En canvi, el senyal de la sinaptofisina (també proteïna de membrana) queda eliminat després del tractament (**Fig. R2, Triton wash**).

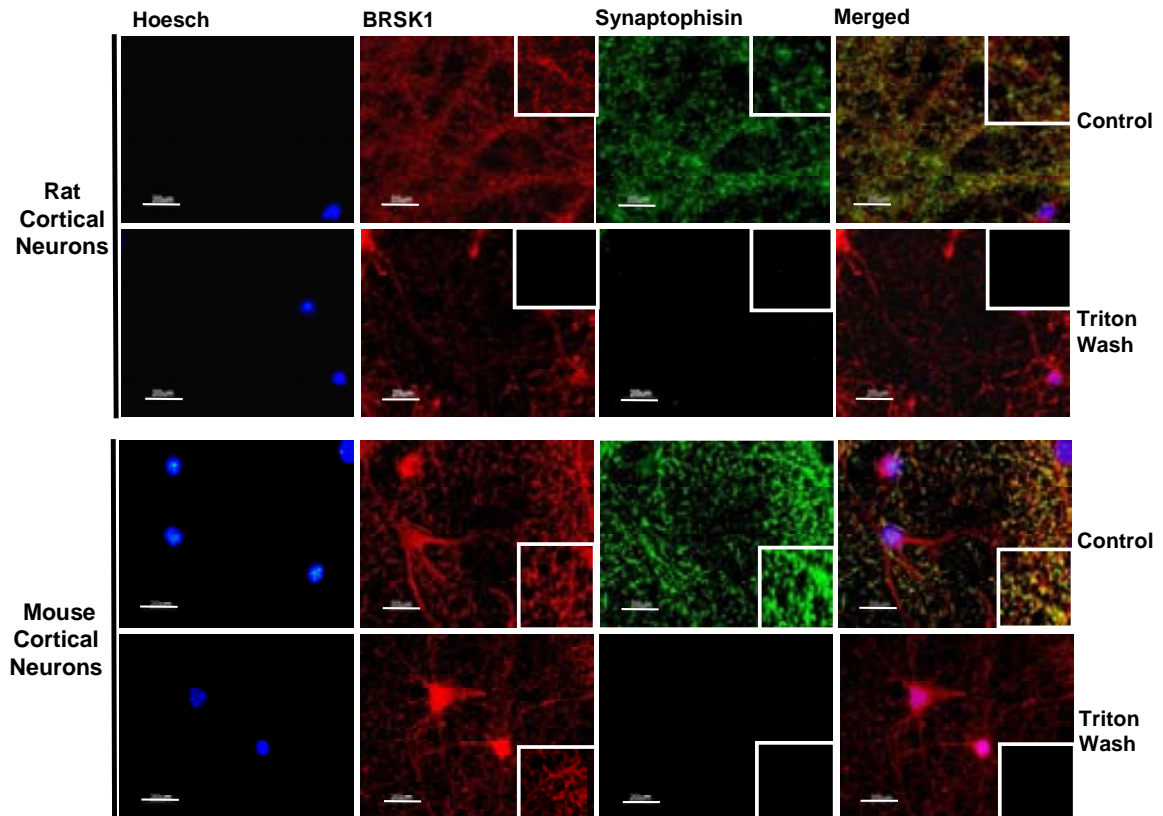


Fig. R2: Efecte del detergent Triton X-100 en la tinció immunocitoquímics de BRSK1 en cultius de neurones corticals de rata i ratolí. Neurones corticals de rata i ratolí cultivades 10 DIV, fixades amb paraformaldehid i van ser tenyides amb anticossos específics per BRSK1 (vermell) i sinaptofisina (verd). En blau es mostra la tinció nuclear (Hoestch, panells de l'esquerra). En els casos indicats (Triton wash), es van tractar la mostra amb 0,1% Triton X-100 durant 90 seg just abans de fixar amb paraformaldehid. L'escala representa 20 μ m. Resultats representatius de 2 cultius independents.

Aquests resultats suggerien l'associació de BRSK1 a dominis rígids de membrana, com ho són els anomenats *lipid rafts*. Per comprovar aquesta hipòtesis es van obtenir *lipid rafts* de sinaptosomes de rata mitjançant gradients de sacarosa seguint el procediment descrit a *Material i Mètodes*. Es van recollir 10 fraccions i es van analitzar per immunoblot utilitzant la proteïna Thy1 com a marcador de fraccions "rafts" i el receptor de transferrina com a "no raft". A la **figura R3**, es pot observar com una part de BRSK1, però no BRSK2, localitza als *lipid rafts* de sinaptosomes de rata.

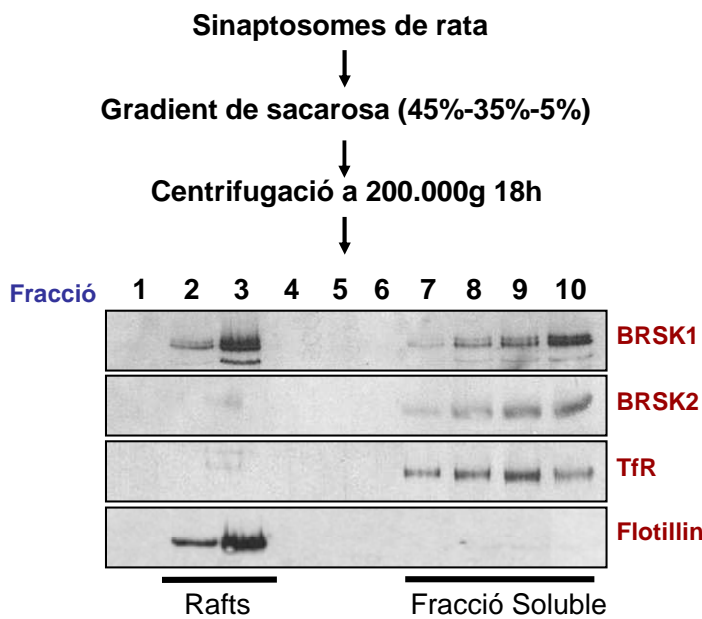


Fig. R3: BRSK1, però no BRSK2, localitza als *lipid rafts* de sinaptosomes de rata. Es van obtenir fraccions de *lipid rafts* de sinaptosomes de rata mitjançant solubilització amb Triton X-100 i centrifugació en gradient de sacarosa, seguint el protocol descrit a *Material i Mètodes*. Es mostra l'anàlisi d'immuoblot per a BRSK1, BRSK2, Transferrina (TfR, marcador de fracció soluble) i Flotillina (marcador de fraccions rafts). Resultats representatius de 4 experiments independents.

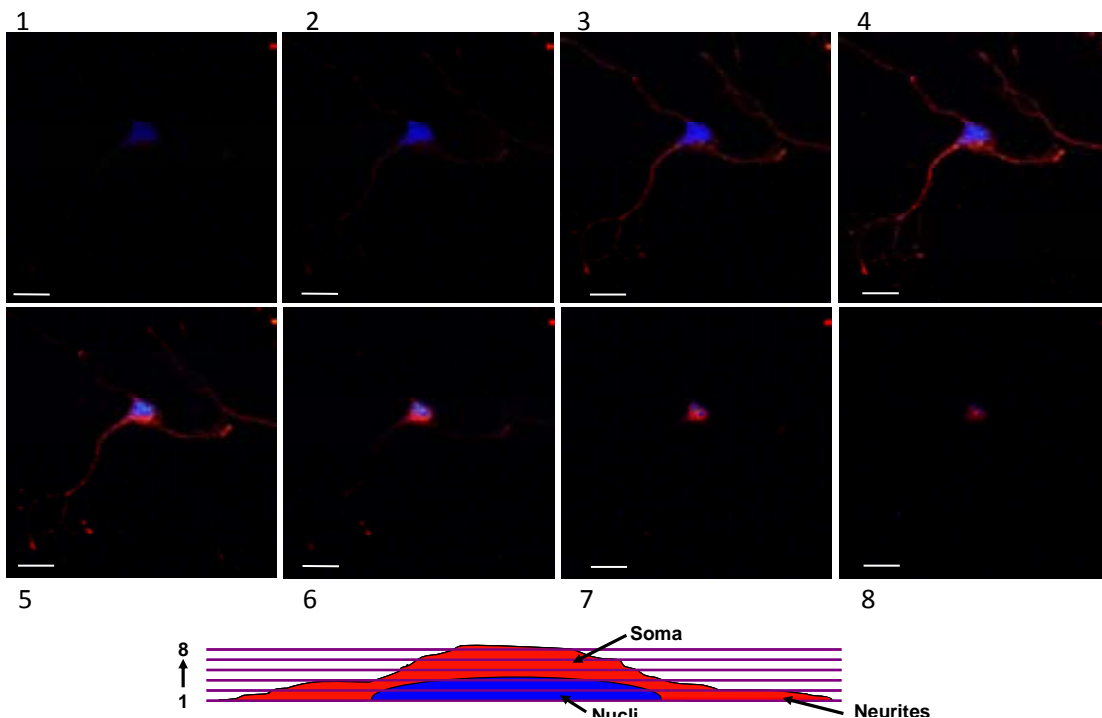


Fig. R4: BRSK1 es troba a les neurites i al soma, però no al nucli, en cultius de neurones hipocàmpals de rata a 3 DIV. Es van cultivar neurones hipocàmpals de rata i a 3 DIV van ser fixades i tenyides amb anticòs específic per BRSK1 (vermell). Els nuclis es van marcar amb Hoechst. Es mostren les imatges de 8 plans horitzontals successius obtinguts amb microscopi confocal invertit. Nikon A1R Eclipse Ti (KULeuven). L'escala representa 20 µm. Resultats representatius de 3 cultius independents.

Per a un estudi més detallat de la localització de BRSK1 es van tenir neurones corticals amb un anticòs específic i es van observar per microscopia confocal. La presència de BRSK1 als diferents plans horitzontals està detallada a la **figura R4**. Als plans més inferiors només es pot detectar la tinció de Hoechst corresponent al nucli, mentre que a mesura que observem els plans més superiors veiem com apareix la tinció de BRSK1 envoltant el nucli i a les neurites. Aquests resultats indiquen que BRSK1 està exclosa del nucli en aquest tipus cel·lular, mentre que està present en membrana i citosol, com havíem comprovat anteriorment.

Donada la importància de l'entorn i la localització de les quinases per exercir la seva funció, es van dedicar esforços en caracteritzar la unió de BRSK1 a la fracció particulada. Per fer-ho, ens vam valdre del fraccionament subcel·lular per determinar l'associació o no de BRSK1 a la membrana utilitzant diversos mutants cedits pel Dr. Dario Alessi de l'*MRC Protein Phosphorylation Unit* (Dundee, UK) i constructes generats al laboratori (**Annex 1**).

En primer lloc, es va sobreexpressar BRSK1 en cèl·lules humanes de ronyó HEK293T i en cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de cèrvix HeLa i es va analitzar la localització de la quinasa després de realitzar el fraccionament subcel·lular. La proteïna sobreexpressada presenta un patró similar a la endògena, localitzant al citosol i amb un *pool* associat fortament a la membrana (**Fig. R5**).

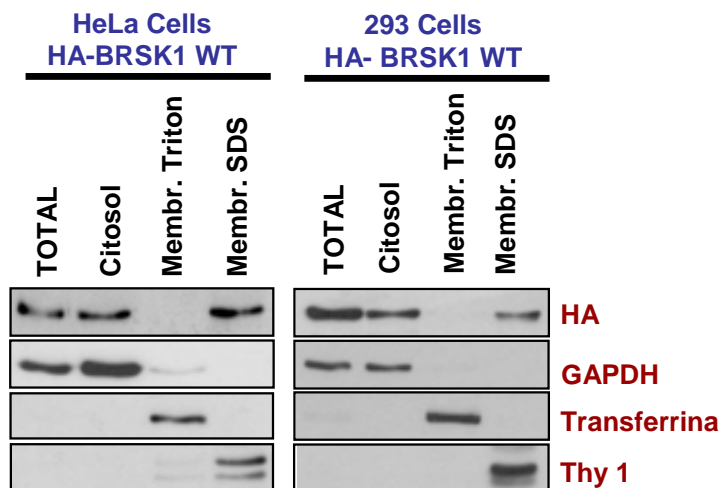


Fig. R5: BRSK1 sobreexpressada en cèl·lules 293T i HeLa presenta el mateix patró de localització subcel·lular que la proteïna endògena. Cèl·lules HEK293T i HeLa que sobreexpressen HA-BRSK1 van ser fraccionades seguint el protocol descrit a Material i Mètodes, i la presència de les proteïnes indicades va ser analitzada mitjançant immunoblot. La puresa de les fraccions va ser evaluada amb marcadors específics: GAPDH (Citosol), receptor de transferrina (TfR, membranes solubles en Tritó X-100) i Thy1 (membranes solubilitzades amb SDS). Resultats representatius de 4 experiments independents.

Posteriorment, ens vam preguntar si l'estat d'activació de la quinasa podia afectar a la seva localització. Per això es va utilitzar una forma inactiva de BRSK1 no fosforilable (BRSK1 T/A), en que la treonina del *T-loop* és substituïda per una alanina. En paral·lel, es va fer el fraccionament subcel·lular transfectat BRSK1 T/E, una variant de la proteïna en la que la treonina esmentada anteriorment és substituïda per un àcid glutàmic, mimetitzant la càrrega negativa aportada pel fosfat i generant una quinasa constitutivament activa.

La **figura R6** mostra com tant el mutant inactiu com el constitutivament actiu presenten la mateixa localització que la proteïna salvatge. El fet que la localització subcel·lular del mutant inactiu de BRSK1 no es veïés afectada era esperable ja que, quan BRSK1 és transfectada en cèl·lules HeLa, la quinasa també presenta aquesta distribució. (**Fig. R5, primer panell**). La peculiaritat de les cèl·lules HeLa és que els hi manca la quinasa supressora de tumors LKB1 (Tiainen et al., 1999), així com BRSK1. Així, la transfecció de BRSK1 resulta en una quinasa inactiva. Amb tot, podem afirmar que l'estat d'activació de BRSK1 no influeix en la localització subcel·lular de l'enzim.

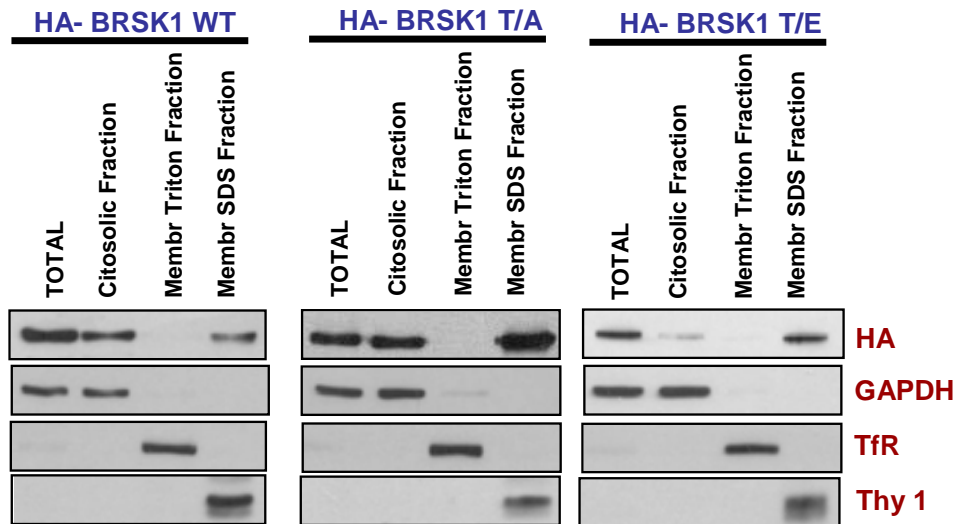


Fig. R6: Tant BRSK1 activa com inactiva presenten el mateix patró de localització subcel·lular. Cèl·lules HEK293T que sobreexpressen HA-BRSK1 salvatge (WT), constitutivament inactiva (T/A) i constitutivament activa (T/E) van ser fraccionades seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. La presència de les proteïnes indicades va ser analitzada mitjançant immunoblot i la puresa de les fraccions va ser evaluada amb marcadors específics: GAPDH (Citosol), receptor de transferrina (TfR, membranes solubles en Tritó X-100) i Thy1 (membranes solubilitzades amb SDS). Resultats representatius de 3 experiments independents

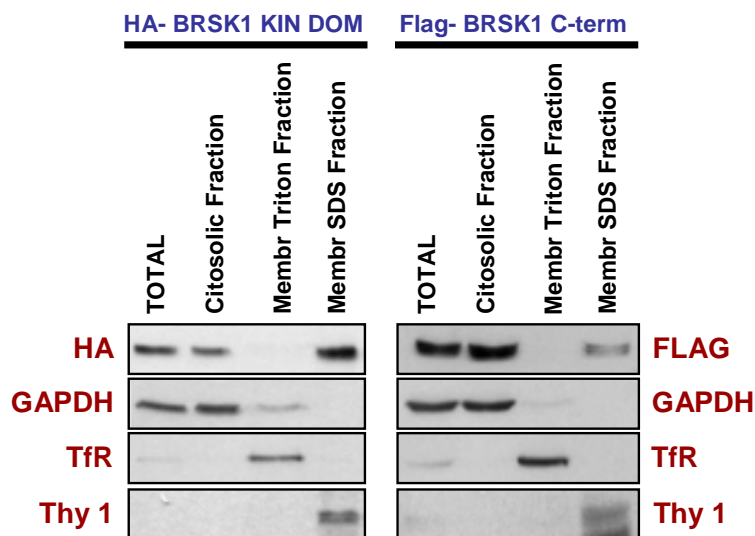


Fig. R7: El domini quinasa i la cua C-terminal de BRSK1 localitzen a la fracció particulada. Cèl·lules HEK293T que sobreexpressen el domini quinasa de BRSK1 (Kin Dom) i la cua C-terminal (C-term) van ser fraccionades seguint el protocol descrit a Material i Mètodes, i la presència de les proteïnes indicades va ser analitzada mitjançant immunoblot. La puresa de les fraccions va ser evaluada amb marcadors específics: GAPDH (Citosol), receptor de transferrina (TfR, membranes solubles en Tritó X-100) i Thy1 (membranes solubilitzades amb SDS). Resultats representatius de 3 experiments independents

Per determinar quina era la regió de BRSK1 implicada en l'associació a la fracció particulada, es van generar constructes que expressaven les regions N i C-terminal de la quinasa per separat. Els productes finals són dues proteïnes de 35 kDa i 52 kDa de pes molecular, respectivament.

El fraccionaments subcel·lular en cèl·lules 293T transfectades amb aquest vectors demostren que cadascuna d'aquestes regions es poden unir a la membrana (**Fig. R7**).

1.2. Modulació de la localització subcel·lular de BRSK1 en resposta a l'agent despolaritzant KCl

L'augment de l'activitat sinàptica promou la mobilització i reclutament de diverses proteïnes a les sinapsis. Ja que BRSK1 està implicada en l'activitat sinàptica, ens vam plantejar si canvis en l'activitat neuronal podrien afectar la localització de la quinasa. L'estimulació aguda de cultius cel·lulars amb KCl s'ha usat àmpliament com a model de despolarització neuronal (Liley, 1956). Així, es van tractar cultius primaris de neurones corticals de ratolí amb KCl 50 mM durant 20 min i a continuació es va realitzar el fraccionament subcel·lular i l'anàlisi de la localització de la BRSK1.

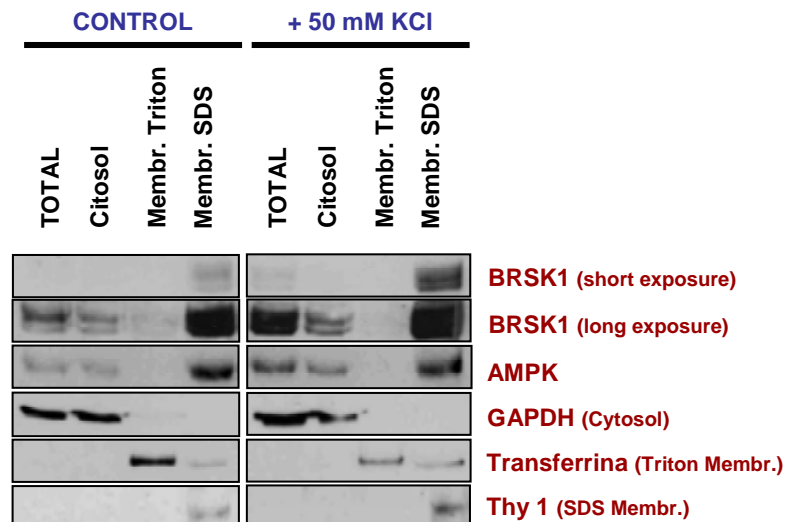


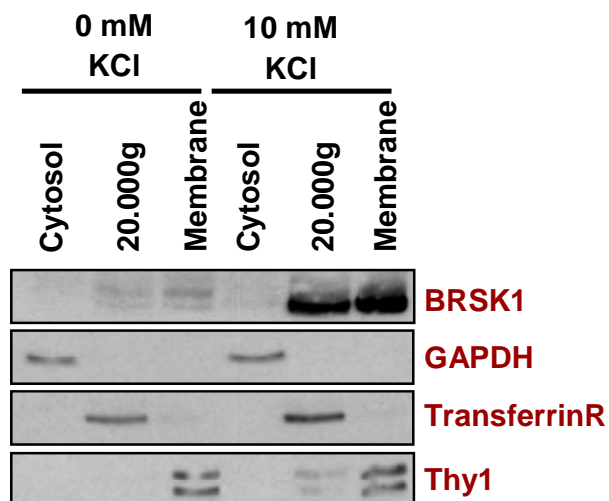
Fig. R8: La despolarització de neurones corticals de ratolí amb KCl provoca un augment en la localització particulada de BRSK1. Cultius de neurones corticals de ratolí de 12 DIV no estimulats (control) o estimulats amb 50 mM KCl durant 20 min, van ser fraccionats i es va analitzar la presència de les proteïnes indicades mitjançant immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents

La **figura R8** mostra com després de l'estimulació amb KCl hi ha una acumulació de BRSK1 a la fracció particulada, que no s'observa en el cas d'AMPK, una proteïna de la mateixa família. De igual manera, es van despolaritzar cèl·lules SH-SY5Y amb 50 mM KCl durant 20 min i es va fer el fraccionament subcel·lular descrit a Material i Mètodes amb unes petites variacions. En aquest cas es va obtenir un *pellet* a 20.000 g (**Mitochondria a l'esquema de la fig M7**), que inclou orgànuls intactes de mida gran, com ara mitòcondries, lisosomes, peroxisomes o Golgi. El sobrenadant resultant es va centrifugar a 100.000g i el *pellet* obtingut es va resuspendre en la seva totalitat en un tampó que contenia SDS (en aquest cas no es va diferenciar membranes solubles de insoluble en Triton X-100). El sobrenadant obtingut després d'aquesta centrifugació correspon al citosol.

A l'analitzar les diferents fraccions tornem a trobar com, després d'una estimulació aguda amb KCl, la BRSK1 s'acumula a les fraccions particulades (**Fig. R9**).

Aquests resultats confirmen una regulació dinàmica del tràfic de BRSK1 a la membrana en tipus cel·lulars neuronals en resposta a l'activitat sinàptica. En aquest sentit, aquest fenomen s'havia descrit anteriorment en altres proteïnes com PSD-95, que en resposta a KCl canvia la seva localització, mecanisme regulat per l'estat de palmitoilació (Fukata et al., 2013).

Fig. R9: La despolarització de cèl·lules SH-SY5Y amb KCl provoca un augment en la localització particulada de BRSK1. Cèl·lules SH-SY5Y no estimulades (control) o estimulats amb 10 mM KCl durant 20 min, van ser fraccionades i es va analitzar la presència de les proteïnes indicades mitjançant immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents



1.3. Palmitoilació de BRSK1

Dels diferents anàlisis *in silico* realitzats al laboratori, es desprèn que BRSK1 no posseeix dominis transmembrana o dominis d'unió a lípids, ni modificacions post-traduccionals com ara prenilacions (farnesilacions o geranilgeranilacions), glicosilfosfatidilinositolacions (GPI) o miristilacions que poguessin explicar la seva associació a membrana. En canvi, utilitzant el software *Css-Palm 3.0*. (Ren et al., 2008), es van detectar diversos llocs putatius de palmitoilació.

La palmitoilació és una modificació post-traduccionals reversible consistent en la addició de palmitat mitjançant un enllaç tioèster en residus de cisteïna, permetent, entre d'altres funcions, la translocació a la membrana de proteïnes diana (Prescott et al., 2009). Donada la participació de BRSK1 en la transmissió sinàptica i el desconeixement dels mecanismes que dirigeixen la quinasa a la sinapsis ens vam plantejar si la palmitoilació podria participar en aquest procés.

- Assaig ABE de BRSK1

Sumant la predicció *in silico*, la bibliografia i les observacions fetes al laboratori, vam investigar si les BRSKs estaven palmitoilades *in vivo*. Per fer-ho, vam utilitzar l'assaig per a l'estudi de proteïnes palmitoilades ABE (*Acyl-biotin exchange*). En aquest assaig s'immunoprecipita la proteïna d'interès seguit d'un bloqueig amb l'agent alquilant NEM de les cisteïnes no modificades per palmitoilació. A continuació, amb un tractament amb hidroxilamina (HAM) es trenca l'enllaç tioèster entre el palmitoil i la cisteïna modificada. Finalment aquesta cisteïna es marca amb BMCC-biotina, la qual cosa permet l'immunoprecipitació amb estreptavidina de les proteïnes palmitoilades. El protocol detallat de l'assaig es troba a l'apartat *Material i Mètodes* (**Fig. M8**).

Mitjançant l'assaig ABE a partir de mostres de cervell de rata de 6 setmanes es va concloure que BRSK1, però no BRSK2, estan palmitoilades *in vivo* (Fig. R10). Els panells superiors mostren la proteïna total (carril *Input*) i les mostres immunoprecipitades amb estreptavidina. Només en el cas de BRSK1 es detecta l'espècie palmitoilada (+ HAM). Els panells inferiors mostren els controls amb la proteïna immunoprecipitada amb els anticossos específics de BRSK1 o BRSK2.

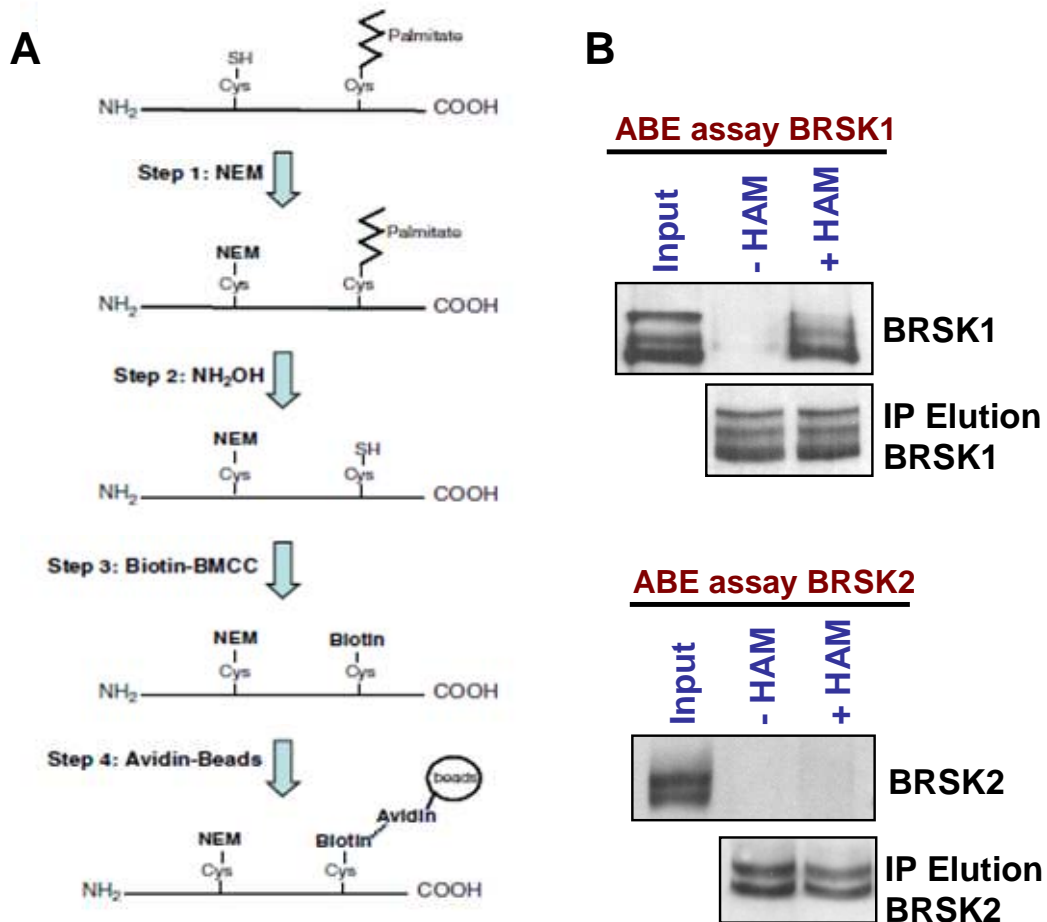


Fig. R10: BRSK1, però no BRSK2, està palmitoilada en extractes de cervell de rata. A) Representació esquemàtica de l'assaig ABE (*Acyl-biotin exchange*). **B)** Assaig ABE de palmitoilació de BRSK1 seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. Les proteïnes BRSK1 i BRSK2 van ser visualitzades per immunoblot. La obtenció de tinció per BRSK1 després del tractament amb hidroxilamina (HAM) és indicativa de palmitoilació de BRSK1. Com a control, els panells inferiors mostren els inumnoblots de les proteïnes abans de ser immunoprecipitades amb la resina d'estreptavidina.

Un cop determinat que la BRSK1 està palmitoilada *in vivo*, es van dissenyar experiments per determinar quin era l'efecte del 2-bromopalmitat, un inhibidor de la palmitoilació, en la localització de la BRSK1. El 2-BP és un anàleg no metabolitzable del palmitat que actua com a inhibidor de les palmiotil transferases (PATs, enzims que catalitzen la reacció palmitoilació), evitant la palmitoilació de proteïnes substrat. Aquest compost inhibeix l'associació a membrana així com la localització als *lipid rafts* de proteïnes com la quinasa Fyn (Webb et al., 2000).

A la **figura R11**, es mostra com al tractar cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y amb KCl 10 mM durant 20 min i separar el citosol de les membranes, es produeix un desplaçament de BRSK1 a la fracció particulada (**Fig. R11**; membranes KCl respecte membranes control). En canvi, un pretractament de les cèl·lules amb 2-BP durant 4 hores, disminueix aproximadament un 25% aquest augment (**Fig. R11**, membranes KCl + 2-BP respecte membranes KCl).

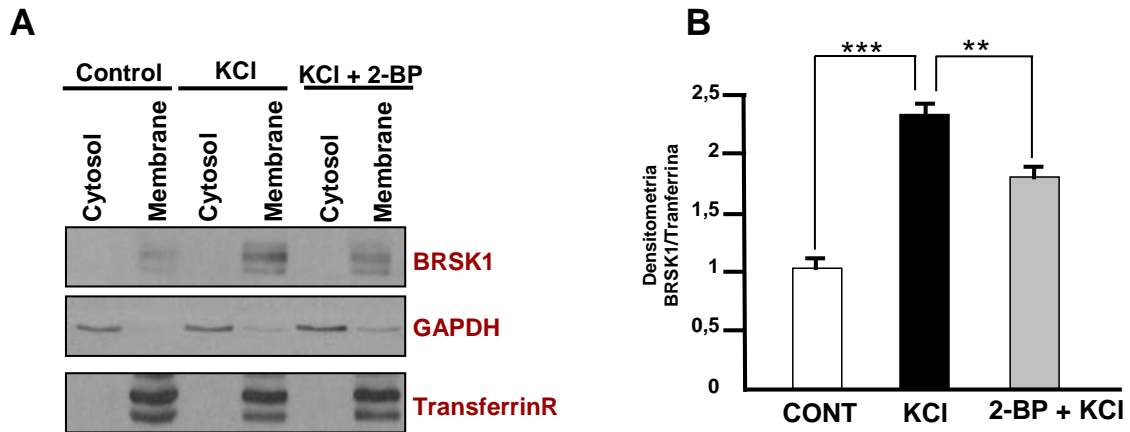


Fig. R11: L'inhibidor de la palmitoilació 2-bromopalmitat (2-BP) redueix parcialment l'augment en la localització particula de BRSK1 induït per despolarització amb KCl. **A)** Cèl·lules SH-SY5Y no estimulades (control), estimulades amb 10 mM KCl durant 20 min (KCl), o tractades durant 4 hores amb 0.1 mM de 2-BP previament a l'estimulació amb KCl (KCl + 2-BP), van ser fraccionades. La presència de les proteïnes indicades va analitzada mitjançant immunoblot. **B)** Densitometria de la tinció de BRSK1 de les fraccions de membrana de A, normalitzades per la tinció de Transferrina. Valors mitjans +/- SD de 3 experiments independents. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

- Estudi del lloc de palmitoilació de BRSK1

La palmitoilació, com s'ha esmentat anteriorment, és una modificació específica de cisteïnes. En el nostre afany per determinar si la palmitoilació podria estar implicada en l'associació de BRSK1 a la membrana es van generar mutants de la BRSK1 en què una o diverses cisteïnes van ser mutades a serina. Aquest canvi és conservatiu, essent la cisteïna i la serina aminoàcids amb cadena lateral polar, no carregada i amb una mida similar. La diferència la trobem en que la serina no posseeix el grup sulfidril, impossibilitant la unió de molècules de palmitoil a la proteïna.

A partir d'un model tridimensional de BRSK1 obtingut amb el programa I-TASSER (Roy et al., 2010), es va determinar la posició i orientació de les cisteïnes dins de BRSK1 (**Fig. R12**). BRSK1 conté 10 cisteïnes (blaves al model), 8 al domini quinasa (vermell al model) i 2 a la regió corresponent al domini d'unió a ubiquitines UBA (morat al model), no trobant-se'n cap a l'extrem més C-terminal de la proteïna (verd al model).

Basant-nos en la predicció realitzada amb el programa CSS-Palm 3.0., els residus amb una probabilitat més elevada de ser palmitoilats eren les cisteïnes en posició 54, 217 i 328. Com que el domini quinasa de BRSK1 *per se* ja presenta una localització particulada (**Fig. R7**), es van fer les mutacions puntuals de la cisteïna 54 i la 217 respectivament (al domini quinasa li manca la cisteïna 328). Malauradament, ens ha estat impossible realitzar l'assaig de palmitoilació ABE en mostres de proteïna

sobreexpressada en cèl·lules 293T, per tant, com a model alternatiu per avaluar l'efecte dels mutants deficientes en palmitoilació, es va determinar l'associació a membrana. Com es mostra a la **figura R13 (primer i segon panell)**, les mutacions simples d'aquests residus no afecten la localització de BRSK1 a la fracció particulada.

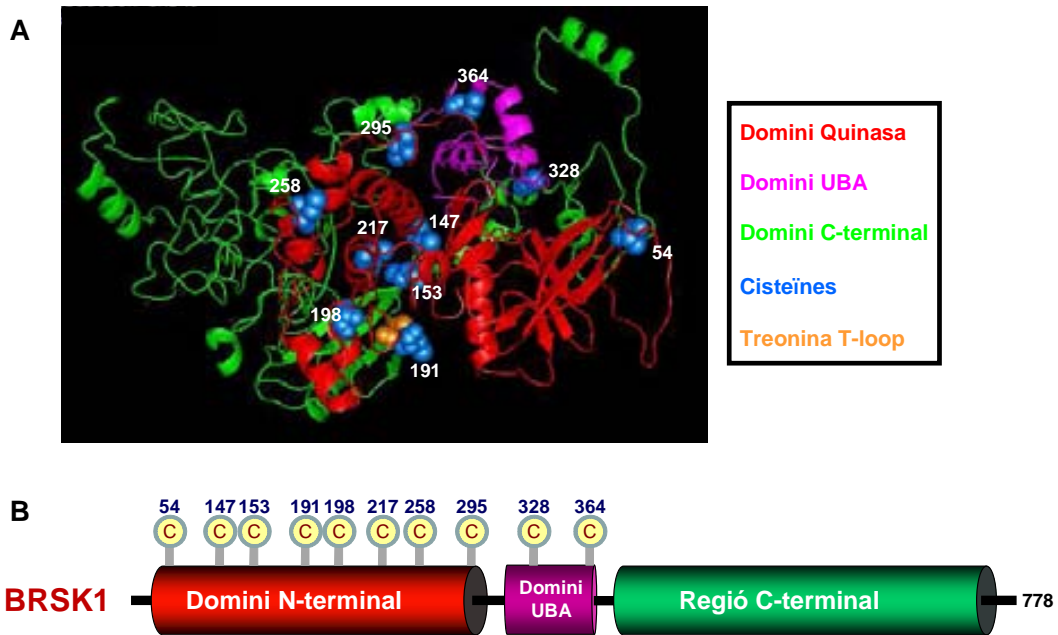


Fig. R12: Localització dels residus de cisteïnes de BRSK1. A) Model d'estructura tridimensional de BRSK1 generada amb l'algorisme I-TASSER. B) Esquema lineal de BRSK1 amb la localització de les cisteïnes.

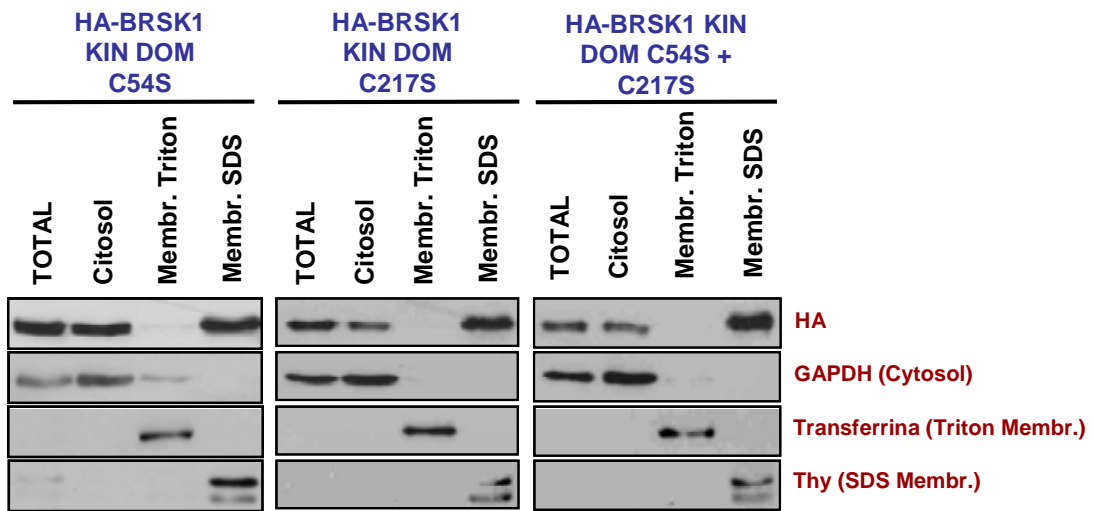


Fig. R13: La localització particulada del domini quinasa de BRSK1 no es veu afectada pels mutants de cisteïnes en posició 54 i 217. Cèl·lules HEK293T que sobreexpressen el domini quinasa de BRSK1 (Kin Dom) mutat en les cisteïnes 54, 217 o 54 i 217 van ser fraccionades seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. La presència de les proteïnes indicades va ser analitzada mitjançant immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents

Gran diversitat de proteïnes com receptors (Zuckerman et al., 2011), proteïnes G (Go and Mitchell, 2003) o quinases (Barylko et al., 2009) són palmitoilades simultàniament en més d'una cisteïna. Això provoca canvis en el transport, activitat i localització subcel·lular que no s'observen quan es donen palmitoilacions simples. Per avaluar si aquest era el cas de la BRSK1, es van mutar les dues cisteïnes amb la puntuació més alta en l'anàlisi amb l'algoritme Css-Palm 3.0. (mutant Cys54-217Ser) i es va estudiar la seva distribució. En aquests cas tampoc s'observa cap canvi en la localització respecte a la forma no mutada. (**Fig. R13, tercer panell**).

Per últim, es va generar el mutant no palmitoilable, on totes les cisteïnes van ser mutades a serina (BRSK1 10 C→S). Tampoc en aquest cas va canviar el patró de localització de la quinasa (**Fig. R14**).

D'aquests resultats es pot concloure que la palmitoilació de BRSK1 no és necessària per a la seva localització particulada. Experiments futurs aniran encaminats a avaluar si la palmitoilació de BRSK1 té efectes en l'activitat sinàptica i a estudiar si els mutants generats tenen algun efecte en aquest procés o d'altres en què les BRSKs han estat involucrades.

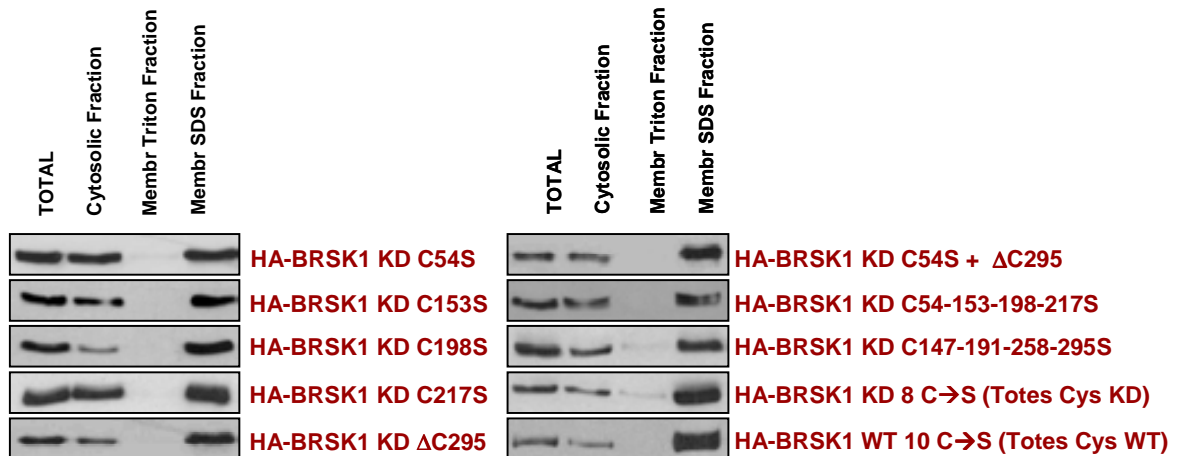


Fig. R14: La localització particulada del domini quinasa o de la proteïna BRSK1 salvatge no es veu afectada pels mutants de cisteïnes. Cèl·lules HEK293T que sobreexpressen el domini quinasa de BRSK1 (Kin Dom) o la proteïna salvatge (WT) amb les mutacions de les cisteïnes indicades van ser fraccionades seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. La presència de les proteïnes indicades va ser analitzada mitjançant immunoblot. KD 8 C→S, mutant del domini quinasa en què les 8 cisteïnes han estat reemplaçades per serina; WT 10 C→S, mutant de la proteïna salvatge en què les 10 cisteïnes han estat reemplaçades per serina. Resultats representatius de 2 experiments independents

**RESULTATS-PART 2:
UNIÓ AL SULFÀTID DE LES BRSKs**

PART 2: Estudi de la unió a lípids de les BRSKs

Com s'ha vist al capítol anterior una fracció de la BRSK1 cel·lular s'associa a *lipid rafts* i la unió a aquests microdominis de membrana modula la seva activitat. La incubació de BRSK1 amb vesícules generades amb els lípids provinents de *lipid rafts* augmenta fins a 3 vegades l'activitat d'aquesta quinasa mesurada utilitzant dos substrats diferents (Rodríguez-Asiain et al., 2011). Amb la finalitat de caracteritzar els lípids implicats en aquesta activació es van generar vesícules artificials formades amb els lípids predominants als *lipid rafts*: colesterol, esfingomièlina i fosfatidilcolina (resultats de la Dra. Arantza Rodríguez). Amb aquestes vesícules només s'aconsegueix augmentar dues vegades l'activitat de la BRSK1, en front de les 3 vegades obtingudes amb els lípids extrets de les fraccions *rafts* (**article annex 5, Fig 7B**). Això indicava que era necessària la presència d'algun altre lípid de l'entorn *raft* per aconseguir una activació completa de BRSK1.

2.1. Unió de BRSK1 a la sulfogalactosilceramida sulfàtid

Per a identificar els lípids que interaccionen amb BRSK1 es va utilitzar l'anomenat *protein-lipid overlay assay*. Aquest assaig consisteix en incubar la proteïna a estudiar amb una membrana que conté diversos lípids immobilitzats. Per determinar a quins lípids s'ha unit la proteïna, la membrana s'incuba amb un anticòs específic contra la proteïna i es detecta de manera anàloga a un *western blot*.

Les *Sphingostrips* són membranes hidrofòbiques de nitrocel·lulosa amb 15 lípids incorporats (100 pmols per lípid). Entre ells hi trobem els lípids principals de *lipid rafts*, com el colesterol, esfingomièlina i gangliòsids, principals candidats a unir BRSK1.

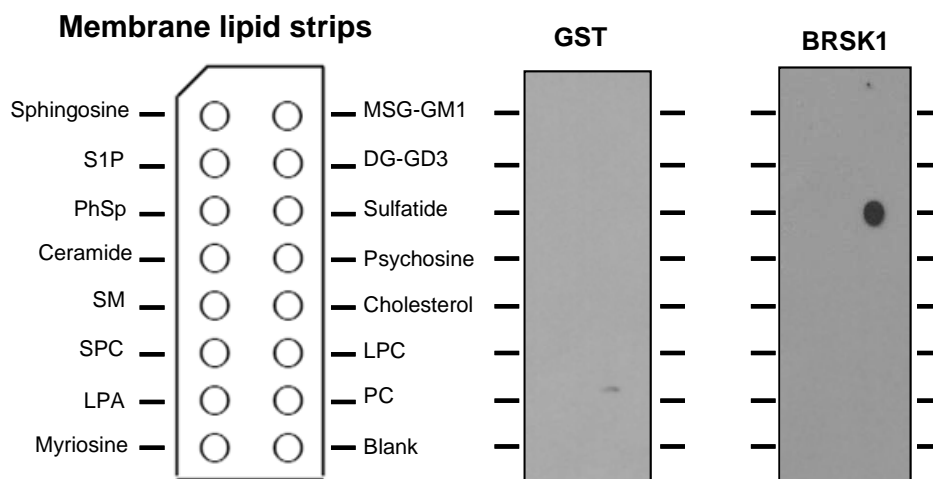


Fig. R15: BRSK1 uneix la sulfogalactosilceramida sulfàtid en assajos de *lipid-protein overlay assay*. Es va incubar 1 µg de GST-BRSK1 purificada de bacteri amb membranes *Sphingostrip* comercials que contenen els lípids indicats, i la unió als lípids immobilitzats es va visualitzar utilitzant anticòs contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Com a control negatiu es va utilitzar GST purificada de bacteri. S1P, esfingosina 1-fosfat; PhSp, fitoesfingosina; SM, esfingomièlina; SPC, esfingosilfosforilcolina; LPA, àcid lisofosfatídic; MSG-GM1, monosialogangliòsid-GM1; DG-GD3, disiagangliòsid-GD3; LPC, lisofosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina. Resultats representatius de 2 experiments independents.

Per a la identificació de lípids que interaccionen amb BRSK1, es va utilitzar GST-BRSK1 expressada en *E. Coli* i es va incubar amb les membranes *Sphingostrips*, i la fixació de la proteïna a lípids es va detectar amb un anticòs específic per a GST. Com a control negatiu es va utilitzar GST pura, que com es mostra a la **figura R15 (GST)**, no uneix cap dels lípids presents a la membrana. En canvi, al incubar en paral·lel GST-BRSK1, cap dels lípids esperats (colesterol, esfingolípid o gangliòsids) va unir la quinasa. En canvi, BRSK1 uneix sulfàtid (3-O-sulfogalactosilceramida), **Fig. R15 (BRSK1)**.

Per valorar l'especificitat d'aquesta unió es va determinar el rang de concentracions de sulfàtid en que es produïa la interacció amb BRSK1 i es va comprovar si s'obtenien resultats similars amb altres proteïnes de la mateixa família, com BRSK2 o MARK4, i altres proteïnes quinases evolutivament més allunyades, com PKB α o ERK5.

Es van aplicar diferents quantitats de fosfatidilcolina (control negatiu) i sulfàtid sobre membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C i es van incubar amb la proteïna recombinant corresponent. A la **figura R16** mostra com BRSK1 i BRSK2 uneixen sulfàtid, mentre que les altres quinases assajades ho fan pobrament (MARK4) o bé no l'uneixen (PKB α i ERK5).

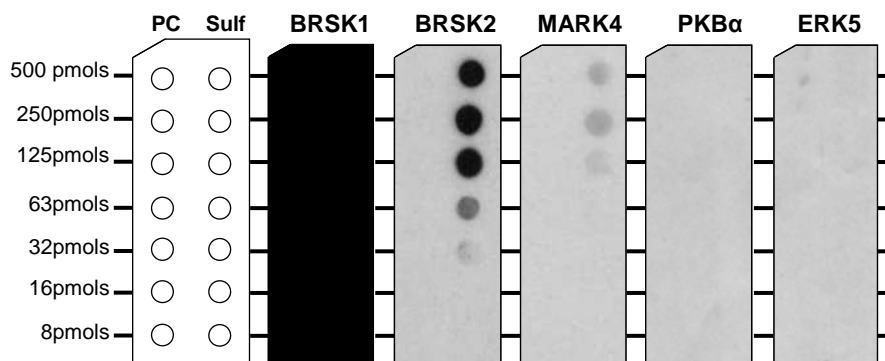


Fig. R16: BRSK1 i BRSK2 uneixen sulfàtid específicament. Es van immobilitzar diferents quantitats de fosfatidilcolina (PC) i sulfàtid (Sulf) en membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C i es van incubar amb les proteïnes quinases indicades (fusionades a GST). La unió de la proteïna al lípid immobilitzat es va visualitzar mitjançant anticòs contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Resultats representatius de 3 experiments independents.

Sandhoff et al. han definit les seqüències consens d'unió al sulfàtid com a XB α BXB α o XB α BXB α (B, aa bàsic; X, qualsevol aa; (Sandhoff et al., 2005)). Mentre BRSK1 i BRSK2 tenen diverses seqüències consens d'unió al sulfàtid en la seva regió C-terminal, en MARK4 aquestes seqüències es troben dins del domini quinasa, la qual cosa suggereix que en aquest enzim la seva funció no estigui relacionada amb la unió al sulfàtid.

Donat el paper de BRSK1 en la regulació de la transmissió sinàptica (Inoue et al., 2006), també es va estudiar si altres proteïnes implicades en aquesta funció uneixen sulfàtid. De les tres proteïnes assajades, sinaptobrevina-2 i Munc-18 uneixen sulfàtid, encara que aquesta última amb una afinitat més baixa. Per altra banda, la Sintaxina-1a (proteïna que s'ha vist al laboratori que és fosforilada per BRSK1) no uneix el lípid (**Fig. R17**). El fet que algunes proteïnes de la sinapsis uneixen sulfàtid, suggereix que aquest

lípid pot tenir un paper en l'anclatge d'alguns dels components de la maquinària sinàptica en regions concretes de la membrana.

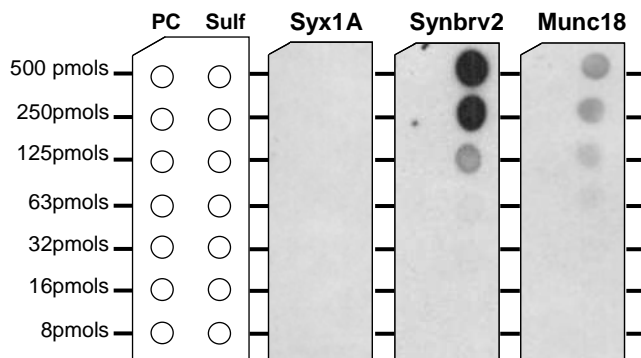


Fig. R17: Sinaptobrevina2 i, en menor mesura Munc18, uneixen sulfàtid. Es van immobilitzar diferents quantitats de fosfatidilcolina (PC) i sulfàtid (Sulf) en membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C i es van incubar amb les proteïnes implicades en la sinàpsis neuronal indicades (fusionades a GST). La unió de la proteïna al lípid immobilitzat es va visualitzar mitjançant anticòs contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Resultats representatius de 3 experiments independents.

El sulfàtid és un lípid amb càrrega negativa. Aquest fet va fer plantejar-nos si la BRSK1 podria unir altres lípids amb càrregues negatives, com són els fosfoinositids. Per comprovar-ho, es van utilitzar les membranes *PIP strips*, que contenen diferents fosfatidilinositols a més d'altres lípids biològicament rellevants. Com a control positiu es va utilitzar la proteïna PLC δ 1, la qual s'uneix específicament al PI(4,5)P2. Com mostra la **figura R18** cap dels lípids presents en les *PIP strips* uneix BRSK1. Aquest resultat suggereix que la unió BRSK1-sulfàtid és específica.

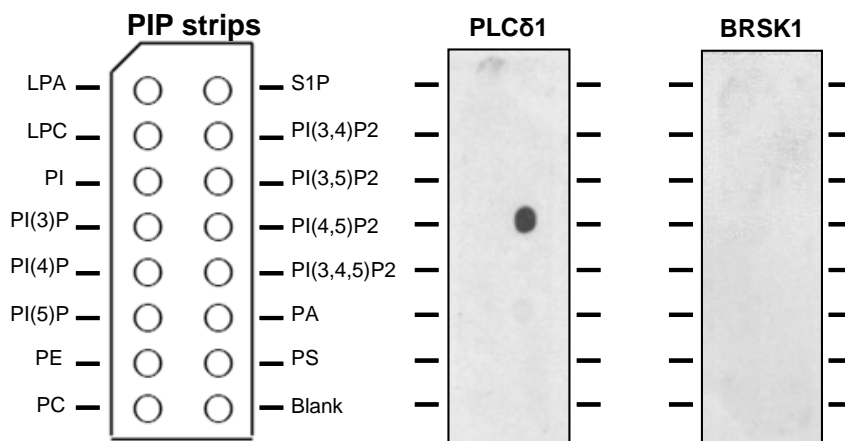


Fig. R18: BRSK1 no uneix fosfatidilinositols. Es va incubar 1 μ g de GST-BRSK1 purificada de bacteri amb membranes *PIP strips* comercials que contenen els lípids indicats, i la unió als lípids immobilitzats es va visualitzar utilitzant anticòs contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Com a control positiu es va utilitzar PLC δ 1, que uneix PI(4,5)P2 específicament. S1P, esfingosina 1-fosfat; LPA, àcid lisofosfatídic; LPC, lisofosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidileetanolamina; PI, fosfatidilinositol; PA, àcid fosfatídic; PS, fosfatidilserina. Resultats representatius de 2 experiments independents.

2.2. Caracterització de la regió d'unió al sulfàtid de BRSK1

Seguidament es va caracteritzar la regió de BRSK1 implicada en la unió al sulfàtid. Per això es van generar diferents mutants de delecció de la quinasa i posteriorment es va analitzar la seva unió al sulfàtid. Es van clonar com a proteïnes de fusió a GST el domini quinasa i la regió C-terminal. Dins d'aquesta última regió també es van generar tres fragments, corresponents al domini d'unió a ubiquitina (UBA) (Jaleel et al., 2006) i les regions conservades SCR1 i SCR2 (*short conserved regions 1 i 2*) (Crump et al., 2001) (**Fig R19A**). Els diferents fragments es van expressar en bacteris i un cop purificats es va analitzar la seva puresa en gels d'acrilamida (**Fig. R19B**).

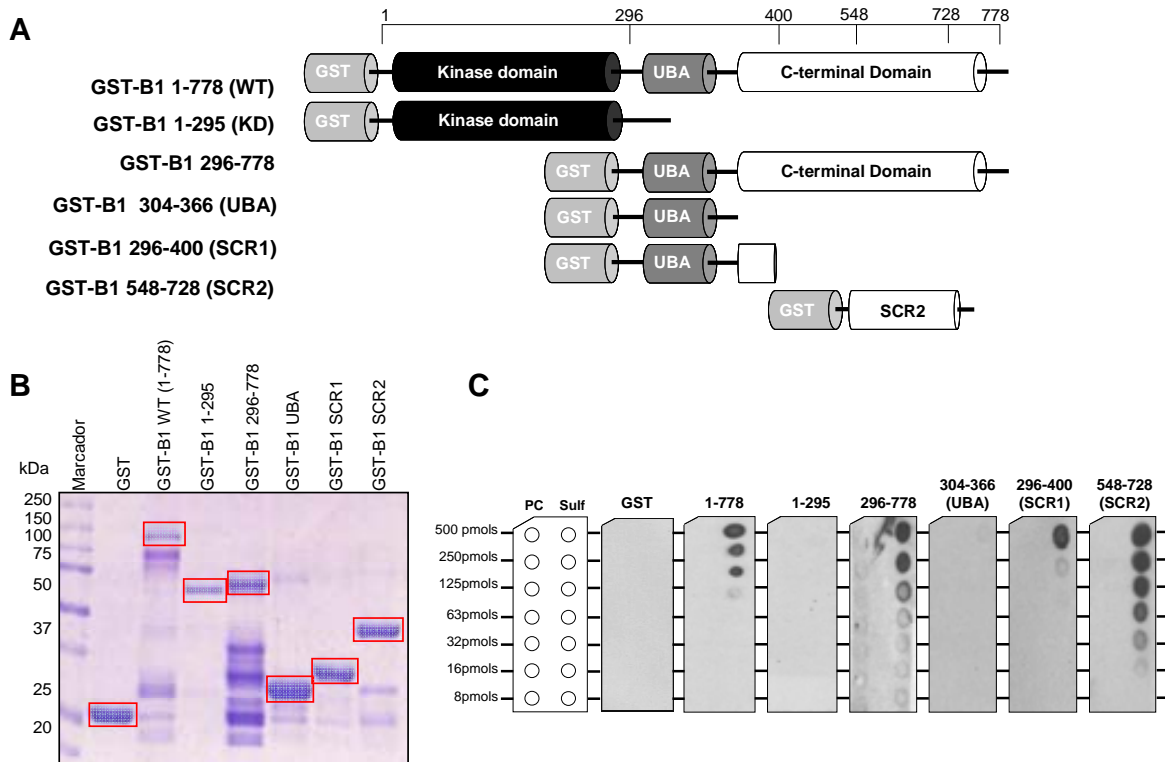


Fig. R19: Anàlisi d'unió al sulfàtid de diferents mutants de delecció de BRSK1. **A)** Representació esquemàtica dels mutants de delecció de BRSK1 generats. **B)** Anàlisi electroforètic dels mutants de delecció generats. Cèl·lules d'E.coli BL21 van ser transformades amb els vectors que codifiquen pels mutants de delecció indicats fusionats a GST, les proteïnes expressades van ser purificades amb resina glutatió sefarosa i la seva puresa va ser avaluada mitjançant electroforesi en SDS-PAGE i tinció de Coomassie. El recuadre indica la proteïna de fusió que presenta el pes molecular esperat. **C)** Anàlisi mitjançant *lipid-protein overlay assay* de la unió al sulfàtid dels diferents mutants de delecció obtinguts, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Resultats representatius de 5 experiments independents.

Els productes obtinguts es van incubar amb membranes que contenien diferents quantitats de fosfatidilcolina i sulfàtid. La **figura R19C** mostra que el domini quinasa (aa 1-295) no uneix sulfàtid mentre la cua C-terminal (aa 296-778) si ho fa. Dins d'aquesta regió C-terminal, les dues zones d'unió són la regió SCR2 (aa 548-728) i en menor

mesura la regió SCR1 (aa 296-400). En canvi, el domini UBA (aa 304-366) no uneix sulfàtid.

Per corroborar aquests resultats es va utilitzar l'assaig d'unió a liposomes (Drahos et al., 2009). Es van generar liposomes amb els lípids fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina i colesterol (cap d'aquests lípids uneix BRSK1, **Fig R15**) amb i sense sulfàtid. Aquests liposomes es van incubar amb els diferents fragments de BRSK1 generats i després d'una centrifugació es va analitzar la seva presència al *pellet* i al sobrenedant. En els casos en que hi ha interacció entre proteïna i lípid, es detecta la proteïna al *pellet*, mentre que quan no interaccionen, aquesta es manté al sobrenedant (**esquematzat a Fig. R20A**).

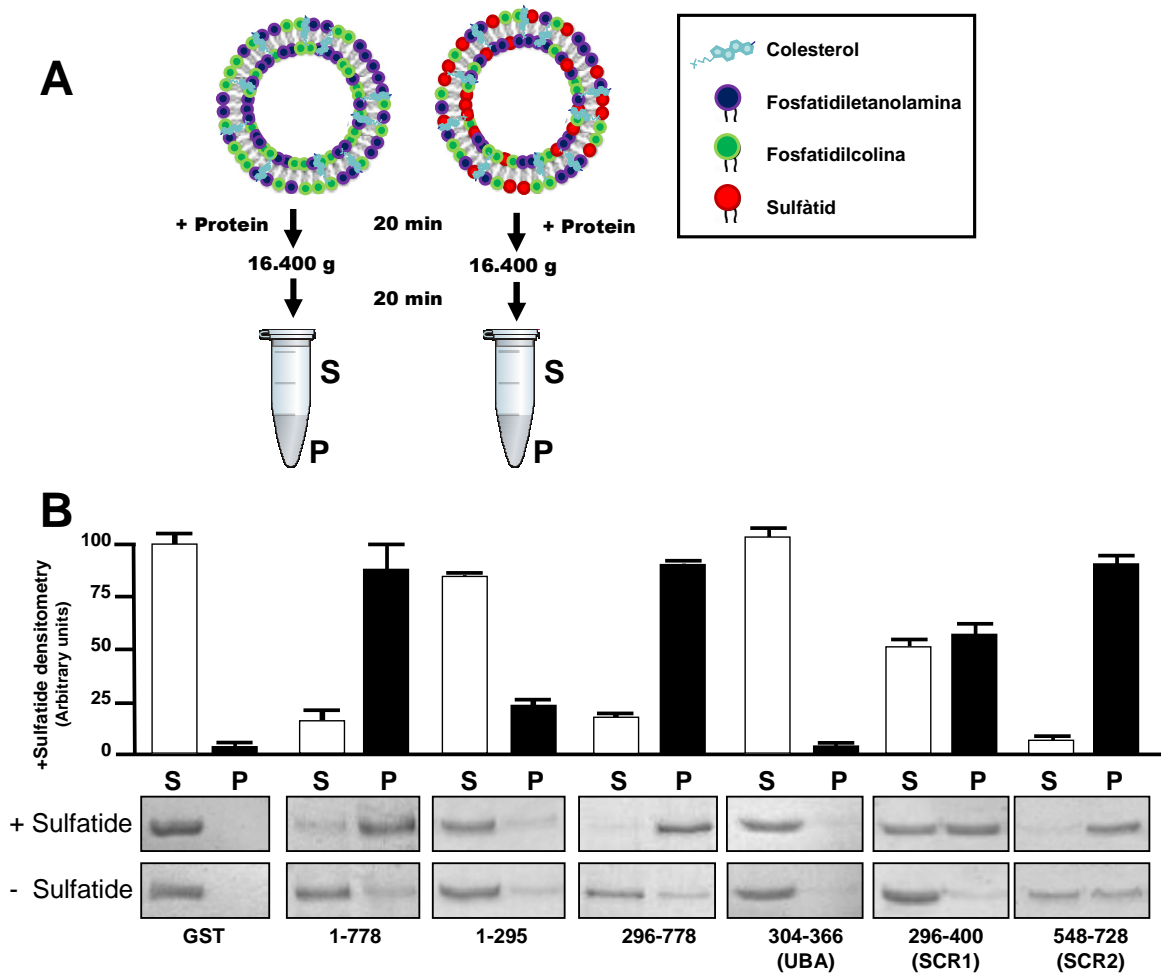


Fig. R20: Anàlisi d'unió al sulfàtid de diferents mutants de delecció de BRSK1 en assajos d'unió a liposomes. **A)** Representació esquemàtica de l'assaig d'unió a liposomes. Els liposomes generats amb i sense sulfàtid s'incuben amb la proteïna i després d'una centrifugació s'analiza la presència de la proteïna al *pellet* (que conté els liposomes precipitats) i al sobrenedant. **B)** Anàlisi de la unió al sulfàtid en assajos d'unió a liposomes. Els mutants de delecció de BRSK1 indicats van ser incubats amb liposomes amb sulfàtid (+ sulfàtid) o sense (- sulfàtid) i la presència de proteïna al sobrenedant (S) i pellet (P) va ser analitzada mitjançant electroforesis SDS-PAGE i tinció de Coomassie. La gràfica superior mostra la densitometria relativa de l'experiment realitzat amb liposomes que contenen sulfàtid. Resultats representatius de 3 experiments independents.

Amb el l'assaig d'unió a liposomes es van obtenir els mateixos resultats que els observats amb el *protein-lipid overlay assay* (Fig. R19B). Aquest assaig confirma que els dominis quinasa i UBA no uneixen sulfàtid i per altra banda, que la cua C-terminal de BRSK1 uneix sulfàtid a través de la regió SCR2 i en menor mesura de la regió SCR1.

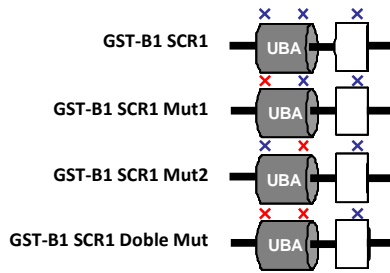
A

GST-B1 SCR1 WT

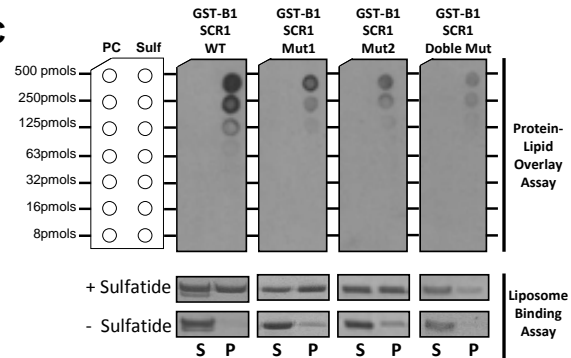
PAPGRRVAMRSLPSNGELDPDVLESMSALGCF**XBXBXBXBBX**FRDRERLHRELRSEENQEKMIYYLLLD**XBBXB**XPKERYPSCEDQDLPPRNDVDP
 PAPGRRVAMRSLPSNGELDPDVLESMSALGCF**QDQEQQLHRE**LRSEENQEKMIYYLLLD**QDQEQ**YPSCEDQDLPPRNDVDP
 PAPGRRVAMRSLPSNGELDPDVLESMSALGCF**QDQEQQLHRE**LRSEENQEKMIYYLLLD**QDQEQ**YPSCEDQDLPPRNDVDP

GST-B1 SCR1 Doble Mut

B



C



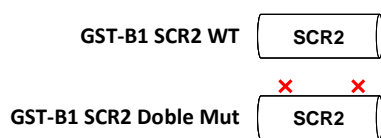
D GST-B1 SCR2 WT

WRSLNSIRNSFLGSP**XBXBXBBX**PRFHRKMQVPTAEEMSSLTPESSPELAKRSWFGNFI
 WRSLNSIRNSFLGSP**QDFHQQQM**QVPTAEEMSSLTPESSPELAKRSWFGNFI
 WRSLNSIRNSFLGSP**QDFHQQQM**QVPTAEEMSSLTPESSPELAKRSWFGNFI

HSVLSQTSFRAEYKASGGPSVFQKPVRFQVDISSSEGPEPSPRRDGSGGGGIYSVTFTLISGP**SRRFKRV**VETIQALLSTHDQPS
 HSVLSQTSFRAEYKASGGPSVFQKPVRFQVDISSSEGPEPSPRRDGSGGGGIYSVTFTLISGP**SOQFQOV**VETIQALLSTHDQPS
 HSVLSQTSFRAEYKASGGPSVFQKPVRFQVDISSSEGPEPSPRRDGSGGGGIYSVTFTLISGP**XBBXB**X

GST-B1 SCR2 Doble Mut

E



F

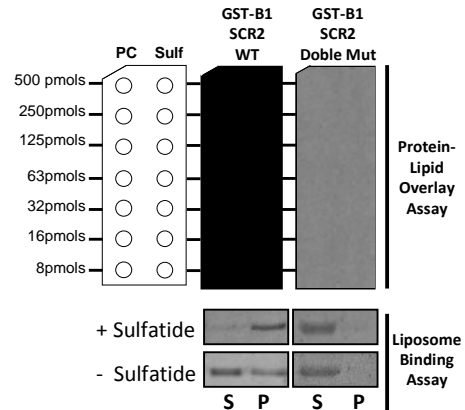


Fig. R21: Anàlisi de la unió al sulfàtid de les regions SCR1 i SCR2 de BRSK1. A i D) Seqüència dels dominis SCR1 (A) i SCR2 (D) on es mostra els *clusters* d'aminòacids bàsics que presenten les seqüències consens d'unió al sulfàtid (requadre taronja). També es mostra *clusters* d'aminòacids bàsics que no presenten seqüències consens d'unió al sulfàtid (requadre blau). **B i E)** Representació esquemàtica de la posició dels *clusters* d'aminòacids bàsics. El punt vermell indica el *cluster* d'aminòacids bàsics mutat (on els residus bàsics han estat mutats a glutamina). **C i F)** Assajos de *protein-lipid overlay assay* (panells superiors) i d'unió a liposomes (panells inferiors) dels mutants generats. S, sobrenedant; P, *pellet*. Resultats representatius de 3 experiments independents.

L'anàlisi de les seqüències aminoacídiques dels dominis SCR1 i SCR2 mostren diverses regions fortament bàsiques. Per avaluar la implicació d'aquestes regions en la

unió al sulfàtid, es van generar diferents mutants on els aminoàcids bàsics lisina i arginina es van canviar a glutamina. Amb aquest canvi les cadenes laterals amb càrrega positiva són substituïdes per una cadena lateral llarga, però en aquest cas no està carregada.

El domini SCR1 conté 3 regions bàsiques, dues de les quals es troben dins del domini UBA (**Fig. R21A**). Es van generar el doble mutant juntament amb els mutants individuals d'aquestes regions (**Fig. R21B**) i es va analitzar la seva capacitat d'unió al sulfàtid mitjançant l'assaig d'unió a liposomes i el *protein-lipid overlay assay*. Com es mostra a la **figura R21C**, les proteïnes que tenen mutada una d'aquestes dues regions presenten una lleugera disminució en l'afinitat pel sulfàtid, que es veu augmentada amb la mutació d'ambdues regions.

Per altra banda també es va estudiar la regió SCR2 de BRSK1, que presenta dos *clusters* d'aminoàcids bàsics. El canvi dels aminoàcids bàsics d'ambdós *clusters* per glutamina aboleix la unió d'aquest fragment al sulfàtid (**Fig. R21F**).

Aquests resultats demostren que BRSK1 té diverses regions que uneixen sulfàtid que coincideixen amb zones riques en residus bàsics.

A continuació, es va intentar obtenir pèptids curts per tal de ser utilitzats com a sondes que permetessin la detecció i quantificació del sulfàtid en mostres biològiques. Donat que anteriorment havíem comprovat que les regions amb *clusters* de residus bàsics són indispensables per a la unió al sulfàtid, es van dissenyar dos pèptids corresponents a cada un dels *clusters* bàsics de la regió SCR2 (**Fig. R22A**). Aquestes dues regions presenten estructura secundària segons la predicció de l'algoritme I-TASSER (**Fig. R22B**). Al realitzar els assajos amb liposomes i d'unió lípid-proteïna observem com a diferència del domini SCR2, cap de les dues sondes obtingudes uneix sulfàtid (**Fig. R22C**).

En resum, els resultats obtinguts suggereixen la importància de l'estructura a més de les càrregues positives per a una correcta unió al sulfàtid.

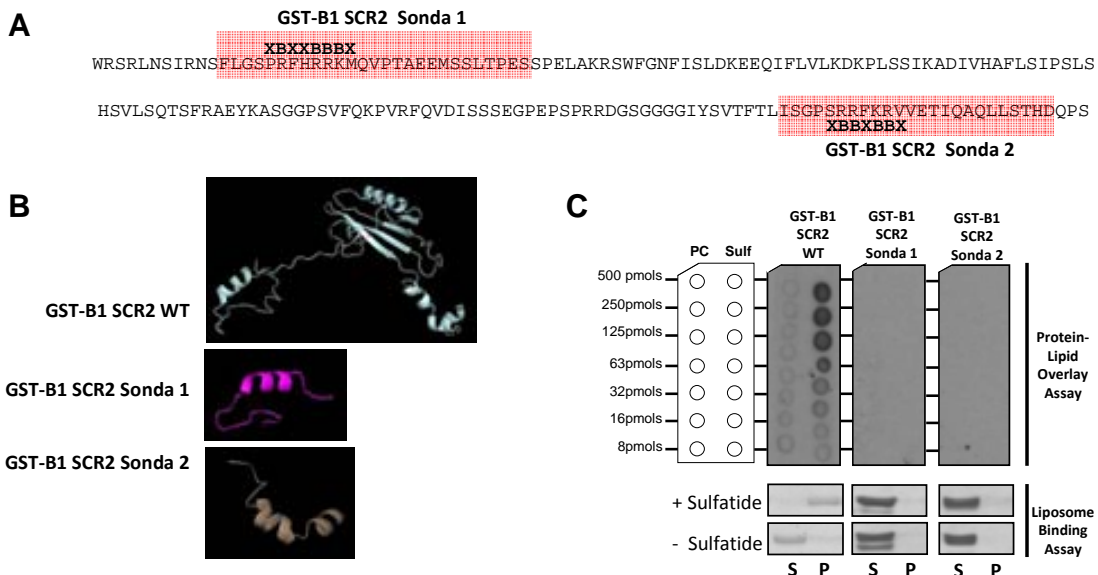


Fig. R22: Anàlisi de la unió al sulfàtid de sondes peptídiques derivades del fragment SCR2 de BRSK1. A) Es mostra amb requadre vermell la seqüències de les dues sondes que contenen els clusters d'aminoàcids bàsics que uneixen sulfàtid. **B)** Predicció de l'estructura de la regió SCR2 i de les dues sondes proteïques generades. **C)** Assajos de *protein-lipid overlay assay* (panells superiors) i d'unió a liposomes (panells inferiors) dels mutants generats. S, sobrenedant; P, *pellet*. Resultats representatius de 3 experiments independents.

2.3. Estudi de la modulació del sulfàtid sobre BRSK1

Un cop determinat que BRSK1 uneix sulfàtid ens vam preguntar si aquesta unió afectava l'activitat de l'enzim. Per comprovar aquesta hipòtesi es va realitzar un assaig *in vitro* d'activitat quinasa en presència dels liposomes utilitzats en l'assaig d'unió a liposomes.

En primer lloc es va avaluar l'autofosforilació de BRSK1. Per fer-ho, després pre-incubar una preparació activa de BRSK1 amb tampó o amb liposomes control o amb sulfàtid, s'hi va afegir $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i Mg^{2+} . Un cop aturada la reacció, la mescla es va separar per electroforesi i es va quantificar la radioactivitat incorporada a BRSK1.

La incubació de liposomes amb sulfàtid augmenta aproximadament 3,5 vegades l'autofosforilació de BRSK1 *in vitro* (Fig. R23A). El fet que els liposomes control (sense sulfàtid) no presentin efecte en l'activitat BRSK1, demostra l'especificitat del sulfàtid com a activador d'aquesta quinasa.

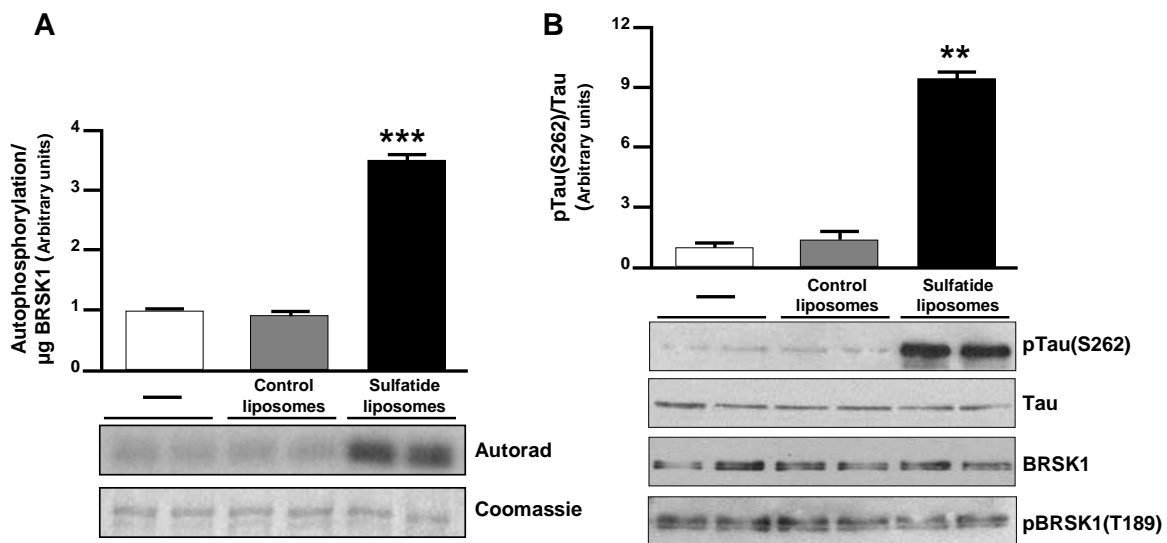


Fig. R23: El sulfàtid augmenta l'activitat quinasa de BRSK1 *in vitro*. **A)** Assaig d'autofosforilació de BRSK1. 2 μg de BRSK1 activa i pura es van incubar amb tampó o amb liposomes control (sense sulfàtid) o liposomes amb sulfàtid. La reacció es va iniciar amb $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i Mg^{2+} , i després de separar en gel d' SDS-PAGE i tinció amb Coomassie (panell inferior), l'activitat autofosforilant de BRSK1 va ser monitoritzada mitjançant autoradiografia (panell superior). Cada una de les bandes va ser retallada i la incorporació de ^{32}P va ser quantificada mitjançant conteig de centelleig. La gràfica superior mostra els resultats normalitzats respecte el control (incubació amb tampó). **B)** Assaig d'activitat quinasa de BRSK1 utilitzant Tau com a substrat. 100 ng de BRSK1 activa i pura i 100 ng de Tau es van incubar amb tampó o amb liposomes control (sense sulfàtid) o liposomes amb sulfàtid. La reacció es va iniciar amb ATP i Mg^{2+} , i després de separar en gel d' SDS-PAGE, els nivells proteïcs i de fosforilació de Tau i BRSK1 van ser analitzats amb els anticossos indicats. La gràfica superior mostra la densitometria de les bandes normalitzades respecte el control (incubació amb tampó). Resultats representatius de 3 (A) i 4 (B) experiments independents.

A continuació es va procedir a realitzar assajos quinasa utilitzant la proteïna Tau. Aquesta s'ha descrit com a substrat de BRSK1 *in vivo*, per mitjà de la seva fosforilació a la Ser262 (Kishi et al., 2005). Després de pre-incubar BRSK1 i Tau en presència de liposomes, es va afegir a la reacció ATP i Mg^{2+} i es va analitzar la fosforilació de Tau

amb anticossos específics que reconeixen la Ser262. La **figura R23B** mostra que la incubació de liposomes amb sulfàtid amb BRSK1 resulta en un augment d'aproximadament 10 vegades en la fosforilació de la Ser262 de Tau. Aquest augment en la fosforilació podria ser causat per un efecte de proximitat entre Tau i BRSK1, per això es va estudiar si Tau també unia sulfàtid. Per fer-ho, es van realitzar el *lipid-protein overlay assay* i l'assaig d'unió a liposomes amb BRSK1 i Tau. La **figura R24** mostra com Tau uneix el sulfàtid pobrament, amb molta menys afinitat que BRSK1.

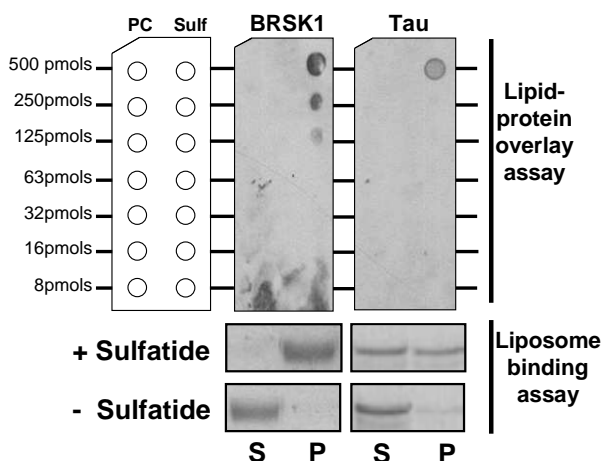


Fig. R24: Tau interacciona feblement amb sulfàtid. Es van immobilitzar diferents quantitats de fosfatidilcolina (PC) i sulfàtid (Sulf) en membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C i es van incubar amb les proteïnes indicades (fusionades a GST). La unió de la proteïna al lípid immobilitzat es va visualitzar mitjançant anticòs contra GST (panells superiors). Els panells inferiors mostren els resultats dels assajos d'unió a liposomes. S, sobrenedant; P, *pellet*. Resultats representatius de 3 experiments independents.

El complex LKB1/STRAD/MO25, fosforila i activa BRSK1 (Lizcano et al., 2004). Dels resultats obtinguts podem afirmar que l'activitat de BRSK1 *per se* està modulada pel sulfàtid, però no podem descartar que el sulfàtid pugui també modular la fosforilació de BRSK1 pel complex trimèric LKB1. Per comprovar aquesta hipòtesi, es va purificar el complex LKB1-STRAD α -MO25 α a partir de cèl·lules 293T que sobreexpressaven totes tres proteïnes (**Fig. R25A i B**).

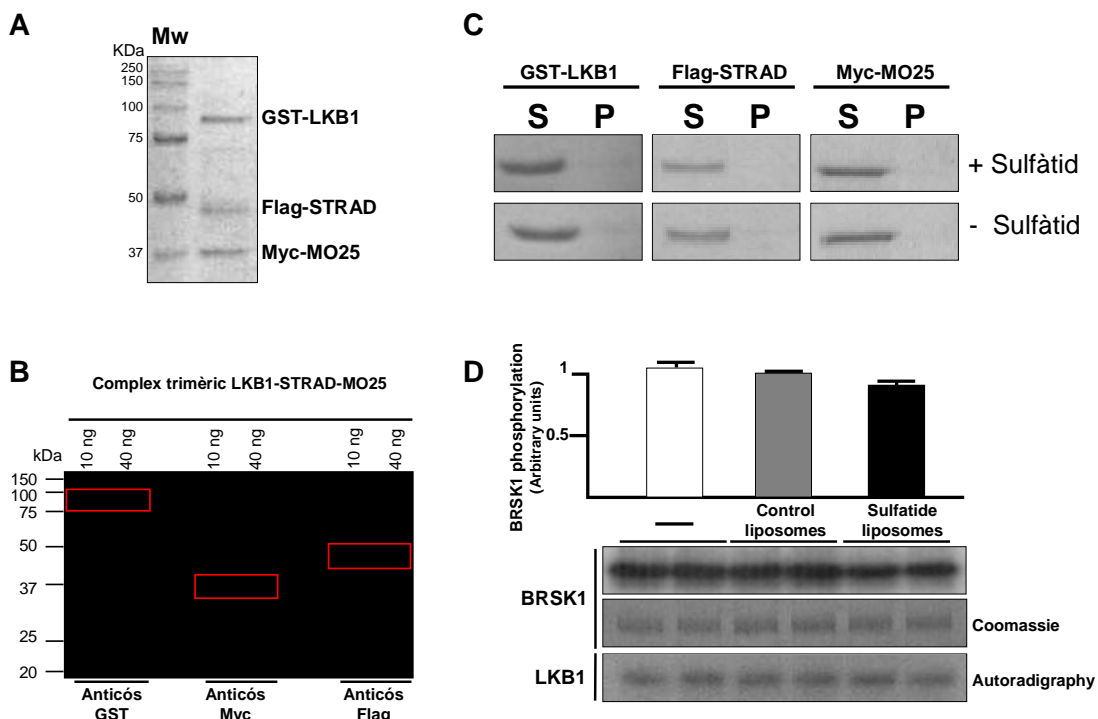


Fig. R25: El sulfàtid no modula l'activació de BRSK1 per LKB1. **A)** Anàlisi electròforetic i tinció de Coomassie del complex trimèric LKB1-STRAD-MO25. **B)** Immunoblot del complex trimèric LKB1-STRAD-MO25 utilitzant els anticossos contra GST (LKB1), Myc (MO25) i Flag (STRAD). **C)** Assaig d'unió a liposomes d'LKB1, STRAD i MO25. S, sobrenedant; P, *pellet*. **D)** Assaig radiomètric de fosforilació de BRSK1 per LKB1. 2 µg de BRSK1 no fosforilada (purificada de bacteris) es van incubar amb 1 µg del complex LKB1-STRAD-MO25 juntament amb tampó o amb liposomes control (sense sulfàtid) o liposomes amb sulfàtid. La reacció es va iniciar amb [γ -³²P]-ATP i Mg²⁺, i després de separar en gel d' SDS-PAGE i tinció amb Coomassie (panell central), l'activitat autofosforilant de LKB1 (panell inferior) i la fosforilació de BRSK1 per LKB1 (panell superior) van ser monitoritzades mitjançant autoradiografia. Cada una de les bandes de BRSK1 va ser retallada i la incorporació de ³²P va ser quantificada mitjançant conteig de centelleig. La gràfica superior mostra els resultats normalitzats respecte el control (incubació amb tampó). Resultats representatius de 2 (C) i 3 (D) **experiments independents**.

En primer lloc es va estudiar si el sulfàtid unia LKB1, STRAD α i MO25 α , mitjançant l'assaig d'unió a liposomes. Com mostra la **figura R25C**, cap de les tres proteïnes uneix sulfàtid.

Seguidament es va determinar si la presència de sulfàtid afavoria la fosforilació de BRSK1 per LKB1. Per això es va realitzar un assaig de fosforilació de BRSK1 pel complex LKB1 utilitzant BRSK1 inactiva purificada a partir de bacteris seguint el procediment descrit a *Material i Mètodes*. Al contrari dels resultats obtinguts amb els experiments de modulació de l'activitat de BRSK1 per sulfàtid, no s'observen diferències significatives en la fosforilació de BRSK1 pel complex LKB1-STRAD α -MO25 α en presència de sulfàtid (**Fig. 25D**). Això permet concloure que el sulfàtid no modula l'activació de BRSK1 per LKB1.

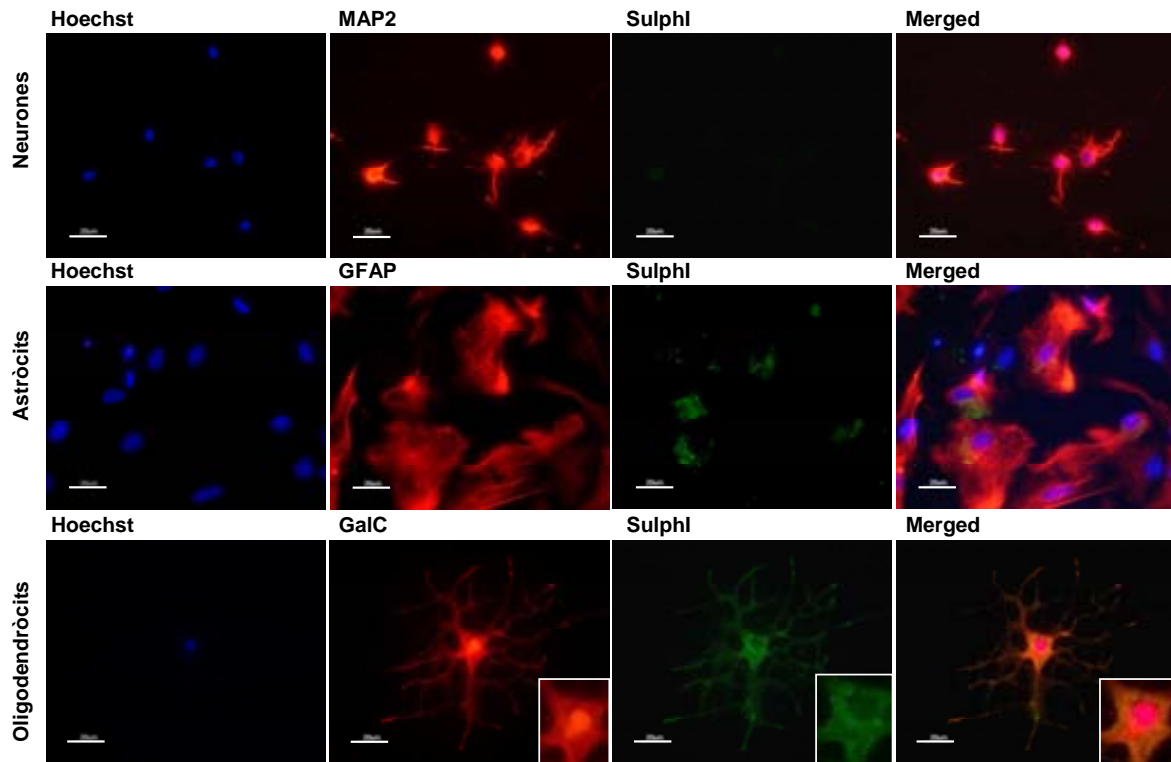
2.4. Distribució de sulfàtid en cultius

El sulfàtid és el lípid majoritari de la mielina, però també ha estat descrit a neurones i astròcits (Berntson et al., 1998; Pernber et al., 2002; Molander-Melin et al., 2004; Isaac et al., 2006; Velasco et al., 2013).

El nostre objectiu inicial va ser estudiar la distribució del sulfàtid en neurones i comprovar si existia una co-localització amb BRSK1 en aquest tipus cel·lular. Per analitzar-ho, es van utilitzar cultius primaris de neurones corticals i un anticòs monoclonal específic contra el sulfàtid, *Sulphi*. L'avaluació de la unió de l'anticòs *Sulphi* a diferents lípids similars estructuralment al sulfàtid suggereix que reconeix la galactosa 3-O-sulfat, així com una regió de la ceramida del sulfàtid (Fredman et al., 1988).

La **figura R26A** (panell superior) mostra l'absència de tinció per sulfàtid en neurones corticals diferenciades a 7 DIV. Amb la finalitat de validar l'ús de l'anticòs *Sulphi* en cèl·lules en cultiu es van realitzar anàlisis immunocitoquímics d'astròcits corticals i oligodendròcits de rata, cèl·lules en les que s'ha descrit la presència del sulfàtid. Tant en astròcits GFAP-positius (**Fig. R26A, panell central**) com per oligodendròcits GalC positius (**Fig. R26A, panell inferior**) s'observa un patró de tinció pel sulfàtid similar al descrit per altres autors (Berntson et al., 1998).

A



B

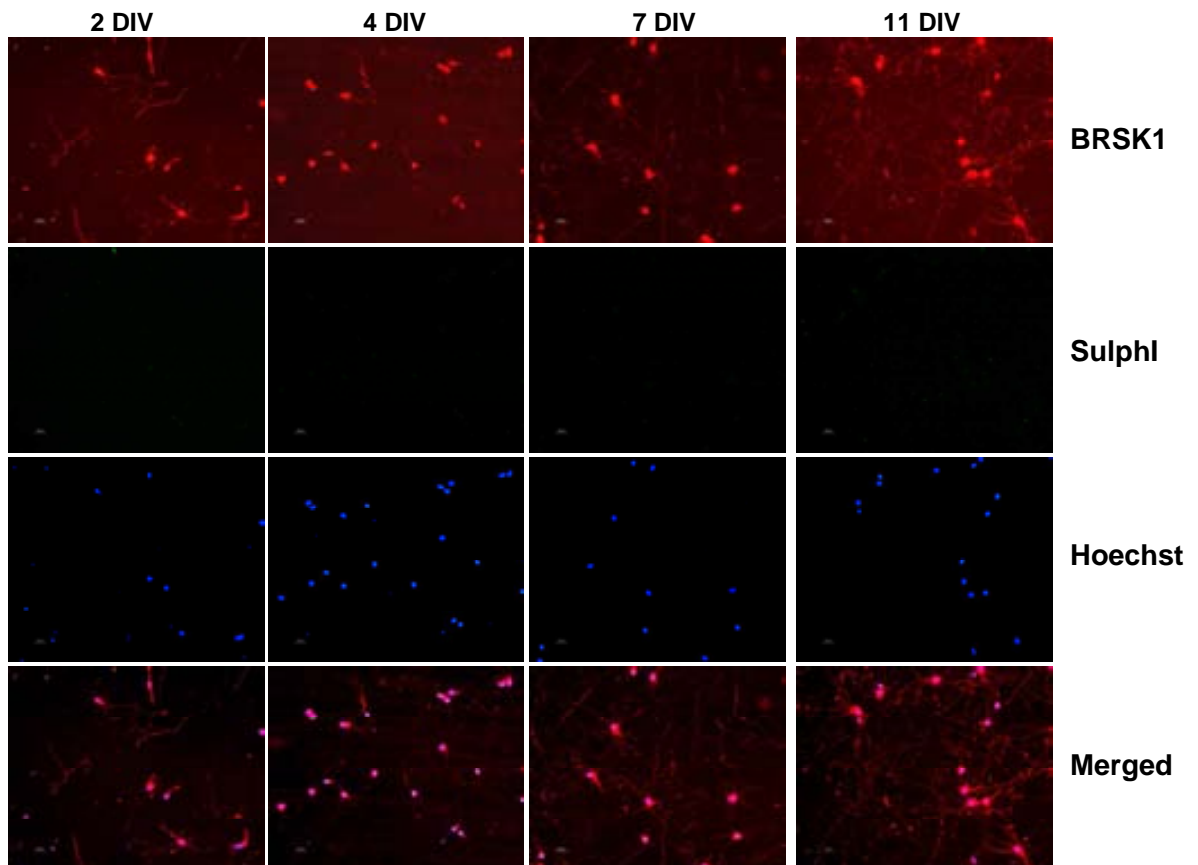


Fig. R26: Estudi de la distribució del sulfàtid en diferents tipus cel·lulars neuronals mitjançant assajos immunocitoquímics utilitzant anticòs contra el sulfàtid Sulphi. A) Distribució del sulfàtid en cultius de neurones corticals (7 dies de diferenciació), astròcits primaris i cultius enriquits en oligodendròcits de rata. Les cèl·lules es van fixar i es va analitzar la distribució del sulfàtid (verd) i els marcadors específics de neurona (MAP2), d'astròcits (GFAP) i oligodendròcits (GalC) en vermell. Els panells de l'esquerra mostren la tinció de nuclis (Hoechst ,blau). **B)** Distribució del sulfàtid (verd) i BRSK1 (vermell) en diferents dies de diferenciació *in vitro* (DIV) de neurones corticals de rata. Els nuclis es mostren en blau (Hoechst) i els panells inferiors mostren la superposició de les tincions (merged). L'escala representa 20 µm. Resultats representatius de 3 (A) i 2 (B) cultius.

Davant la impossibilitat de detectar sulfàtid en neurones corticals diferenciades durant 7 DIV amb l'anticòs *Sulphi*, ens vam plantejar estudiar si en aquest tipus cel·lular els nivells de sulfàtid variaven durant els diferents estadis de desenvolupament. Així, es van fixar cultius de neurones corticals a diferents DIV i el contingut de sulfàtid es va analitzar amb l'anticòs *Sulphi*. La doble tinció de les neurones a 2, 4, 7 i 11 DIV amb els anticòs contra BRSK1 (vermell) i *Sulphi* (verd), mostra com BRSK1 està distribuïda bàsicament al soma als estadis inicials, mentre que després de 7-11 DIV, també és detectada als compartiments axo-dendrítics seguint un patró puntuat, com ha estat descrit (Inoue et al., 2006; Rodríguez-Asiain et al., 2011). En canvi, no s'observa tinció per sulfàtid en cap dels estadis analitzats (**Fig. R26B**).

Ja que la presència de sulfàtid havia estat descrita en neurones (Berntson et al., 1998; Pernber et al., 2002; Molander-Melin et al., 2004; Isaac et al., 2006; Velasco et al., 2013), es va considerar si els nivells en neurones en cultiu estaven per sota del límit de detecció de l'anticòs. Per tal de quantificar els nivells de sulfàtid en els diferents tipus cel·lulars, es van extreure els lípids amb metanol:cloroform i es van aplicar sobre membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C, que contenien com a patró quantitats conegudes de sulfàtid. Posteriorment les membranes es van incubar en presència de l'anticòs contra sulfàtid i un anticòs secundari acoblat a peroxidasa. Aquesta tècnica, posada a punt al laboratori, permet una quantificació acurada dels nivells de sulfàtid (**Fig. R27A**). Els extractes de cultius enriquits en oligodendròcits contenen més sulfàtid que els astròcits, mentre que no es va detectar senyal en els lípids obtinguts de cultius neuronals (**Fig. R27B**). L'anàlisi densitomètric del senyal obtingut amb concentracions de sulfàtid conegudes permet la realització d'una recta patró i la quantificació en les mostres problema (**Fig. R27C**). Així, la concentració de sulfàtid present als cultius d'astròcits és de 22,01 pmols/µl, mentre que pels oligodendròcits és de 47,71 pmols/µl.

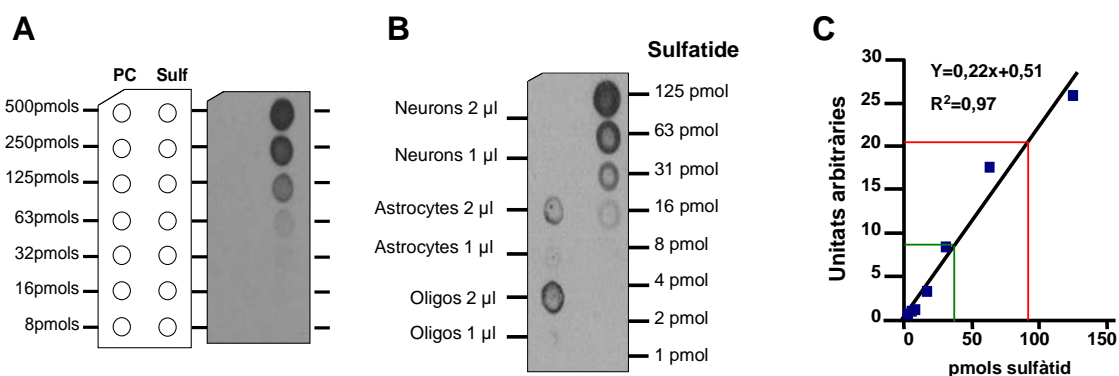


Fig. R27: Quantificació dels nivells de sulfàtid d'extractes cel·lulars utilitzant l'anticòs Sulphi. **A)** L'anticòs Sulphi reconeix sulfàtid immobilitzat en membrana. Membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C on es va immobilitzar les quantitats indicades de fosfatidilcolina o sulfàtid van ser incubades amb l'anticòs anti-Sulphi i després d'incubar amb anticòs secundari i la unió del Sulphi al sulfàtid es va detectar per quimioluminiscència segons la metodologia descrita a Material i Mètodes. **B)** Les quantitats d'extractes lipídics de cultius de neurones, astròcits i oligodendrocits de rata es van immobilitzar en membrana de nitrocel·lulosa Hybond-C que contenia les quantitats indicades de sulfàtid. La detecció del sulfàtid es va realitzar amb l'anticòs Sulphi segons el protocol descrit a A. **C)** Quantificació dels nivells de sulfàtid d'extracte cel·lulars. El senyal obtingut amb diferents concentracions de sulfàtid en B) van ser utilitzades per generar una recta patró, i els valors obtinguts pels diferents extractes cel·lulars van ser interpolats per tal d'obtenir les quantitats de sulfàtid cel·lulars. En verd es mostra la interpolació per les mostres d'astròcits i en vermell la d'oligodendròcits. Resultats representatius de 2 experiments independents.

En conjunt, aquests resultats demostren que els nivells de sulfàtid presents en neurones estan per sota del límit de detecció de l'anticòs *Sulphi*.

2.5. Estudi de la distribució de BRSK1 en diferents tipus neuronals

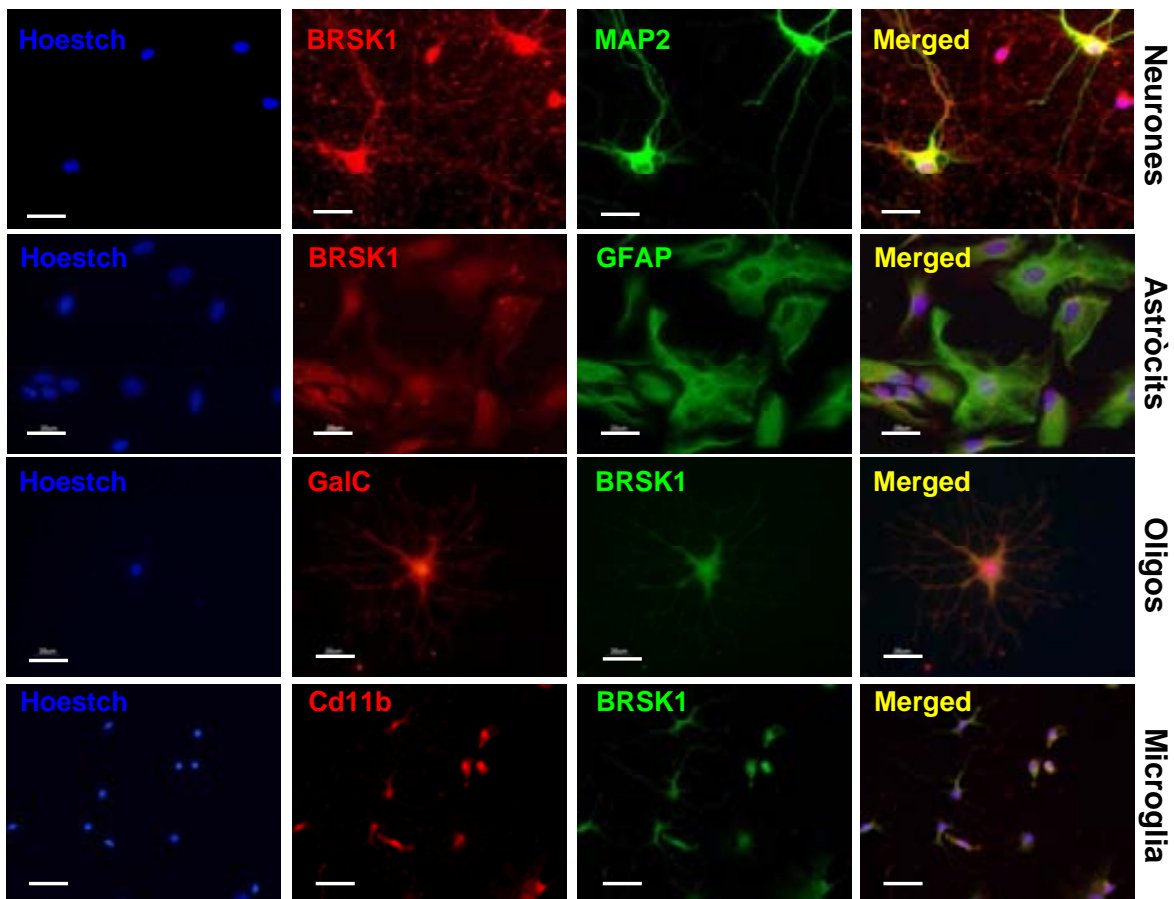


Fig. R28: Distribució de BRSK1 en diferents tipus cel·lulars. Microscopia de fluorescència de cultius de les cèl·lules indicades utilitzant l'anticòs contra BRSK1 i els marcadors específics: MAP2 (neurones), GFAP (astròcits), GalC (oligodendròcits) i Cd11b (microglia). En blau es mostra els nuclis (Hoestch). L'escala representa 20 μm . Resultats representatius de 8 (neurones), 5 (astròcits), 3 (oligodendròcits i microglia) cultius independents.

Com s'ha mostrat a la **figura R26 i R27**, el astròcits i els oligodendròcits presenten nivells elevats de sulfàtid, cèl·lules en les que no s'ha descrit la presència de les BRSKs. És per aquest motiu que ens vam plantejar si les cèl·lules gials expressen BRSK1. La **figura R28** demostra la presència de BRSK1 en cultius purs de astròcits (cèl·lules GFAP positives) i cultius enriquits en oligodendròcits (cèl·lules GalC positives) i microglia (cèl·lules Cd11b positives). Aquesta observació demostra que la BRSK1 es troba en cèl·lules gials. Serà de gran interès estudiar si la interacció amb sulfàtid juga un paper rellevant en l'anclatge i modulació de l'activitat de BRSK1 en aquests tipus cel·lulars.

2.6. BRSK1, sulfàtid i *lipid rafts*.

Al començament d'aquest capítol s'exposava la possibilitat que l'activitat BRSK1 fos modulada per algun lípid contingut als *lipid rafts*. Els resultat obtinguts apuntarien al sulfàtid per realitzar aquesta funció. Ohta i col·laboradors van determinar la composició lipídica dels *lipid rafts* d'esperma d'eriç de mar. Entre els gangliòsids i els sulfàtids sumen més del 50% dels glicoesfingolípid dels *lipid rafts*, descrivint per primera vegada la presència d'aquest lípid en aquests microdominis de membrana (Ohta et al., 1999).

En aquest treball, s'ha corroborat la presència de sulfàtid als *lipid rafts* en mostres de *rafts* de sinaptosomes de rata per mitjà de l'anticòs *Sulphi*. Aquest anticòs només detecta el lípid en les fraccions *raft* però no en la fracció soluble (Fracció no raft, **Fig. 29A**). Per altra banda, utilitzant el *lipid-protein overlay assay* i els mutants de delecció de la BRSK1 obtinguts vam analitzar l'associació a *lipid raft* dels diferents fragments de la quinasa. Com es mostra a la **figura 29B**, la proteïna sencera uneix únicament a la fracció *raft*, essent el fragment SCR2 la principal regió implicada en aquesta associació.

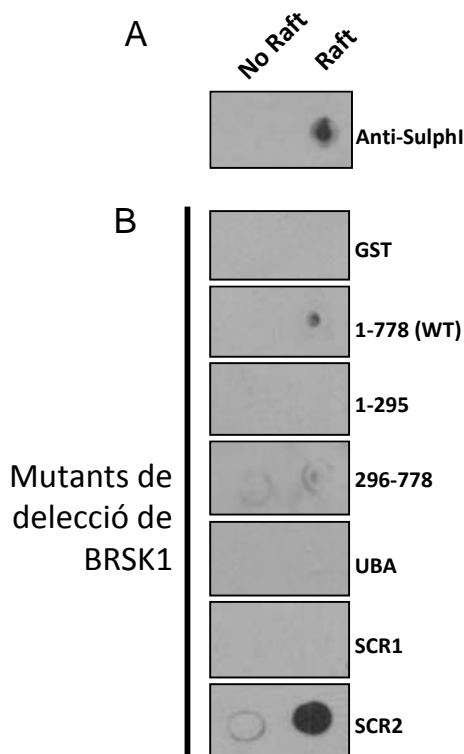


Fig. R29: BRSK1 uneix lípids extrets de lipid rafts. **A)** Els lipid rafts contenen sulfàtid. Els lípids de la fracció de membrana "raft" i "no raft" van ser extrets, immobilitzats en membranes Hybond-C i la presència de sulfàtid va ser detectada amb l'anticòs Sulphi segons el protocol descrit a Material i Mètodes. **B)** Assaig de lipid-protein overlay assay amb lípids extrets de lipid rafts immobilitzats en membranes Hybond-C i els mutants de delecció de BRSK1 indicats fusionats a GST. Resultats representatius de 3 (A) i 4 (B) experiments independents.

2.7. Estudis de cristal·lització del domini SCR2 de BRSK1

Com s'ha mostrat, el principal domini d'unió de BRSK1 al sulfàtid és l'SCR2. A més, és la regió identificada com a principal responsable de la localització puntuada de BRSK1 en neurones hipocampals en cultiu (Inoue et al., 2006). És per aquest motiu que ens vam plantejar resoldre l'estructura d'aquesta regió per tècniques de cristal·lització de proteïnes.

Per a la cristal·lització, és necessària una gran quantitat de proteïna i una alta concentració de la mostra inicial. En col·laboració amb el grup del Dr. David Reverter (Unitat de Proteòmica Aplicada i Enginyeria de Proteïnes de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB), es va dissenyar una estratègia per a l'obtenció de grans quantitats del domini SCR2 de BRSK1.

- Obtenció de la proteïna His-SUMO-SCR2

Per això s'utilitza un sistema de expressió en bacteris del fragment SCR2 fusionat a l'extrem C-terminal de la proteïna 6His-SUMO. Pel clonatge del fragment SCR2 s'utilitza el vector pET28b-SUMO que porta incorporada la seqüència de SUMO amb les sis histidines a l'extrem N-terminal. La presència d'aquestes histidines permet la purificació de la proteïna en una resina de Ni²⁺-Agarosa. Un cop purificada, la proteïna és tallada per la proteasa específica de SUMO SENP2. Aquesta proteasa reconeix l'extrem C-terminal de SUMO, deixant exposat un motiu di-glicina. Amb això es separa el fragment SCR2 del fragment His-SUMO.

Per tal d'optimitzar el procediment es van realitzar proves a petita escala. La **figura R30** mostra com després de passar l'extracte bacterià per la resina, desapareix la banda corresponent a His-SUMO-SCR2 (carril 2 respecte carril 1). Després de eluir amb imidazol s'obté una banda principal corresponent al pes molecular d'His-SUMO-SCR2 (aprox 37 kDa) i unes bandes de pes molecular mes baix (carril 3). El carril 4 mostra els dos fragments d'aproximadament 17 i 20 kDa obtinguts després del tall amb la proteasa SENP2.

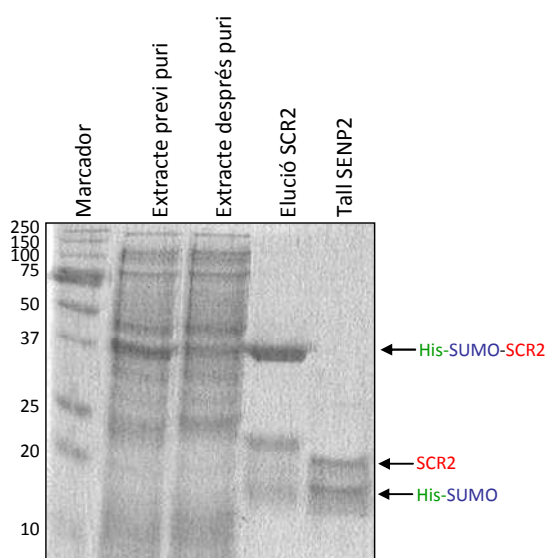


Fig. R30: Purificació de la regió SCR2 de BRSK1. Tinció de Coomassie de l'anàlisi de l'electroforesis SDS-PAGE de les diferents etapes de la purificació de SCR2. La proteïna His-SUMO-SCR2 es va expressar en cèl·lules *E. coli* BL21 i es va purificar en resina de Ni²⁺-agarosa. La proteïna eluida amb imidazol (carril 3) es va tallar amb la proteasa SENP2 per obtenir el fragment SCR2 i el fragment His-SUMO (carril 4).

- Separació dels fragments His-SUMO del fragment SCR2

En un principi, a l'hora de separar SCR2 de His-SUMO es va optar per realitzar una cromatografia d'intercanvi iònic, donada la gran diferència entre els punts isoelèctrics d'aquestes dues proteïnes (5,97 per His-SUMO i 9,74 per l'SCR2). No obstant, durant el procés de diàlisi per separar aquestes proteïnes de les sals i l'imidazol es va apreciar l'aparició d'un precipitat, pel que es va determinar la solubilitat d'aquestes proteïnes a diferents concentracions de sal. Per fer-ho, les proteïnes eluïdes de la columna de Ni²⁺-agarosa es van dialitzar en front de dues concentracions de sal i després de centrifugar es va analitzar mitjançant electroforesis la distribució d'ambdues proteïnes al *pellet* i al sobrenedant. A 100 mM de NaCl, gran part del fragment SCR2 precipita (carril 2, banda superior), mentre que His-SUMO és completament soluble (carril 1, banda inferior). En canvi, al treure la sal del tampó, el fragment SCR2 precipita (carril 4 banda superior) (Fig. R31A).

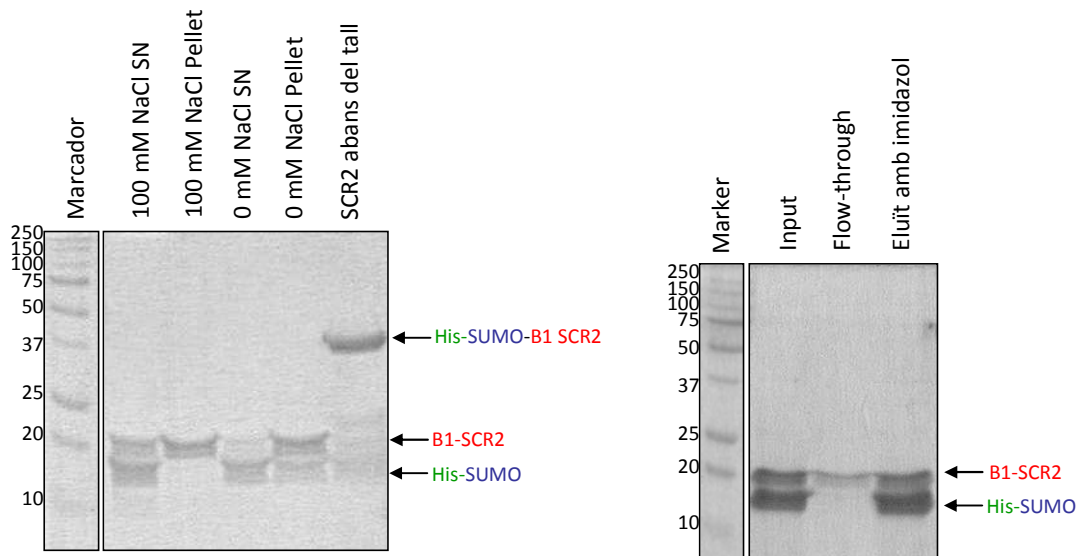


Fig. R31: Efecte de NaCl en la solubilitat de la regió SCR2 de BRSK1 i His-SUMO. A) La regió SCR2 purificada segons el protocol descrit a la figura 30 es va dialitzar amb tampó amb/sense 100 mM NaCl, i després de centrifugar 5 min a 10.000 g es va analitzar la presència de les proteïnes indicades es va monitoritzar mitjançant anàlisi electroforètic SDS-PAGE i tinció de Coomassie. **B)** Separació de la proteïna His-SUMO del fragment SCR2 mitjançant una cromatografia d'afinitat Ni²⁺-agarosa. La mescla de His-SUMO i de SCR2 obtinguda després de tallar amb la proteasa SENP2 es aplica a una columna d'afinitat Ni²⁺-agarosa. El carril 2 mostra la proteïna no retinuda (*Flow-through*) i el carril 3 mostra la proteïna eluïda amb 200 mM d'imidazol, segons el protocol descrit a Material i Mètodes.

La baixa solubilitat del fragment SCR2 a concentracions baixes de sal va fer impracticable la realització d'una cromatografia d'intercanvi iònic. Per això es va decidir utilitzar una columna de Ni²⁺-Agarosa per atrapar el fragment His-SUMO i eluir el fragment SCR2. Així, un cop obtinguda la proteïna His-SUMO-SCR2, es va dialitzar en presència de sal i es va tallar amb SENP2, abans d'apicar-la a la columna de Ni²⁺-agarosa. A l'analitzar les diferents fraccions eluïdes es va observar que malauradament, el fragment SCR2 s'unia inespecíficament a la columna (Fig. R31B). La

major part del fragment SCR2 queda unit a la columna i només és eluït amb imidazol (carril 3), mentre que la fracció que no s'uneix a la columna (carril 2) és molt petita respecte al total (carril 1).

Amb aquesta estratègia només es podien obtenir petites quantitats de proteïna pura, així que també es va descartar per obtenir la mostra per a la cristal·lització. Tot i així, aquesta mostra es va utilitzar per fer una petita prova de dicroïsm circular.

- Dicroïsm circular del fragment SCR2 de *BRSK1*

El dicroïsm circular és una tècnica que es basa en l'absorció diferencial de la llum polaritzada per part de molècules asimètriques. Aquesta tècnica dona informació sobre els percentatges dels diferents tipus d'estructura secundària presents a les proteïnes.

Per a fer l'espectre es va utilitzar una preparació pura del fragment SCR2 a una concentració de 0.1 mg/ml en presència de 250 mM NaCl i β -mercaptoetanol (**Fig. R32A**). Les dades de l'espectre obtingut es van analitzar amb el programa K2D2 (Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro, 2008). Els resultats indiquen que aproximadament un 80% del fragment està estructurat en forma d'hèlix α i que el percentatge d'estructura β és inferior al 2% (**Fig. R32B**) (experiments realitzats amb Pablo Gallego, de la Unitat de Proteòmica Aplicada i Enginyeria de Proteïnes de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB).

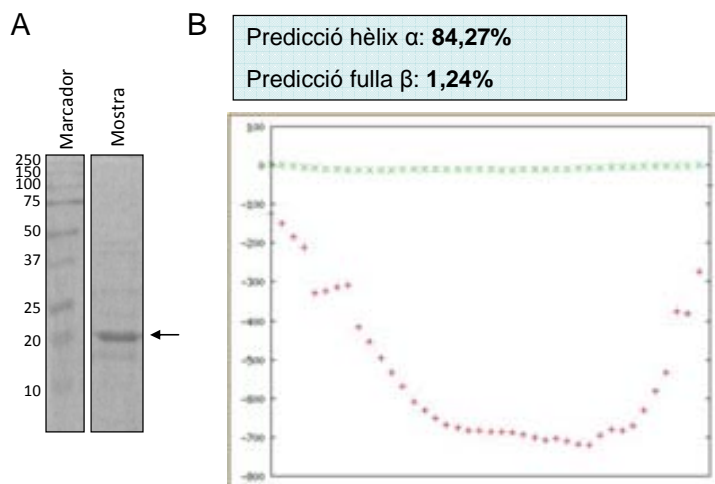


Fig. R32: Anàlisi de l'estructura secundària per dicroïsm circular de la regió SCR2. A) Anàlisi electroforètic en gel d' SDS-PAGE i tinció de Coomassie del fragment SCR2 de *BRSK1* purificat segons la metodologia descrita a la figura 31B, B) Anàlisi per dicroïsm circular del fragment SCR2 (veure Material i Mètodes), utilitzant l'algoritme K2D2.

Finalment, davant la impossibilitat d'obtenir el fragment SCR2 pur es va optar per obtenir cristalls de His-SUMO-SCR2. Així, a partir d'un cultiu de bacteris *E. coli* BL21 transformats amb el vector pET28b-SUMO-SCR2, es va purificar la proteïna en una columna de Ni^{2+} -Agarosa i a continuació, es va realitzar una gel filtració en *Sephadex G200* per tal d'eliminar els fragments de pes molecular inferior a 25 kDa. El perfil d'elució de la columna es mostra a la **figura R33A** i l'anàlisi de les diferents fraccions mitjançant electroforesi i tinció de Coomassie a la **figura R33B**. Les fraccions 37 a 41 es van ajuntar i concentrar fins aproximadament 10 mg/ml seguint el protocol descrit en Material i Mètodes. La puresa de la mostra va ser visualitzada per gel desnaturalitzant PAGE i tinció de Coomassie (**Fig. R33C**).

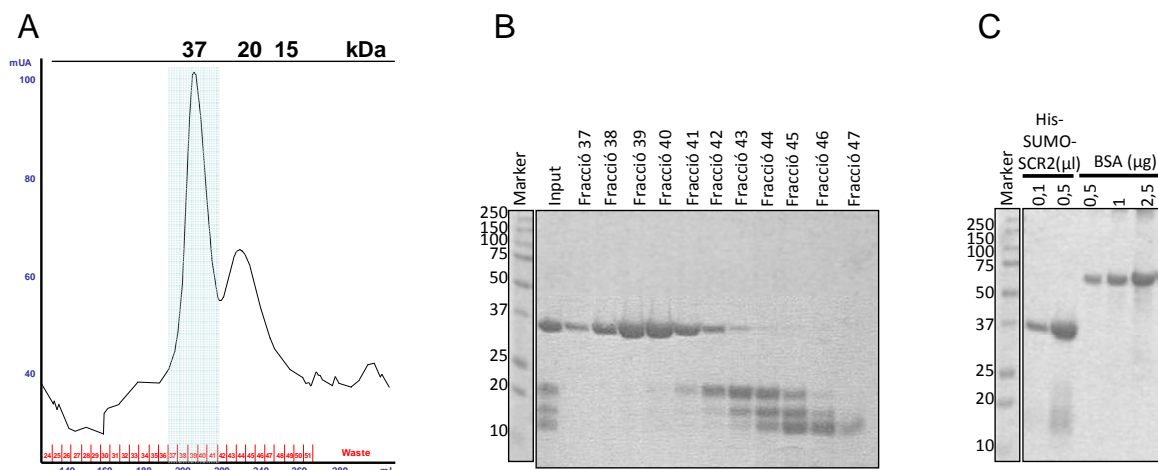


Fig. R33: Purificació per filtració en gel de la proteïna His-SUMO-SCR2. A) Perfil d'elució cromatogràfic. 12 mg de la proteïna His-SUMO-SCR2 (input) van ser aplicats en una columna de gel filtració Sephadex 200 (HR) i es van recollir fraccions de 5 ml. **B)** Anàlisi electroforètic en gel SDS-PAGE i tinció de Coomassie de les fraccions indicades. **C)** Anàlisi de la puresa de la proteïna His-SUMO-SCR2 purificada. Electroforesis de SDS-PAGE i tinció de Coomassie de les quantitats indicades de His-SUMO-SCR2 purificada. Es mostra com a patró la tinció de diferents quantitats de la proteïna BSA.

La proteïna pura obtinguda amb aquest procediment es va utilitzar per assajar diferents condicions de cristallització (sals, pH's, precipitants i altres condicions descrites a la secció de Materials i Mètodes). Fins al moment no s'ha observat la formació de cristalls, fet que obligarà a canviar la estratègia o assajar noves condicions.

**RESULTATS-PART 3:
UBIQUITINACIÓ I POLARITZACIÓ DE LES BRKS**

PART 3: UBIQUITINACIÓ I POLARITZACIÓ DE LES BRSKs

3.1. Ubiquitinació de les AMPK-related kinases

La distribució asimètrica de certes molècules dins la cèl·lula així com la seva compartimentalització és una característica de diferents processos fisiològics, com la migració i la polarització neuronal. En aquest últim participen centenars de proteïnes i la quantitat de molècules disponibles i la localització concreta durant el procés pot engegar la maquinària necessària perquè, per exemple, una neurita esdevingui axó. En aquest sentit, el sistema ubiquitina-proteasoma (*ubiquitin-proteasome system*, UPS) juga un paper important, marcant i senyalitzant a certes proteïnes per a la seva degradació al proteasoma, regulant així els nivells d'aquestes. Entre elles, trobem les GTPases RhoA o Rap1B (Wang et al., 2003; Bryan et al., 2005; Schwamborn et al., 2007), la proteïna *scaffolding* Par6 (Cheng et al., 2011) o la quinasa Akt (Yan et al., 2006). Les BRSKs, com a molècules reguladores del procés d'especificació de l'axó, resulten bones candidates a estar subjectes per ubiquitinació.

Al 2008, *Al-Hakim et al.* van demostrar que varies proteïnes de la família de les AMPK estaven ubiquitinades *in vivo* (Al-hakim et al., 2008), entre elles les BRSKs. Per altra banda, la ubiquitinació degradativa de BRSK2 s'ha vist que juga un paper en la regulació del cicle cel·lular, procés controlat per E3 ubiquitina lligases com APC/C^{cdh1} (Li et al., 2012) i Jab1 (Zhou et al., 2012).

Amb tot, ens vam proposar estudiar el paper de la ubiquitinació de les BRSKs.

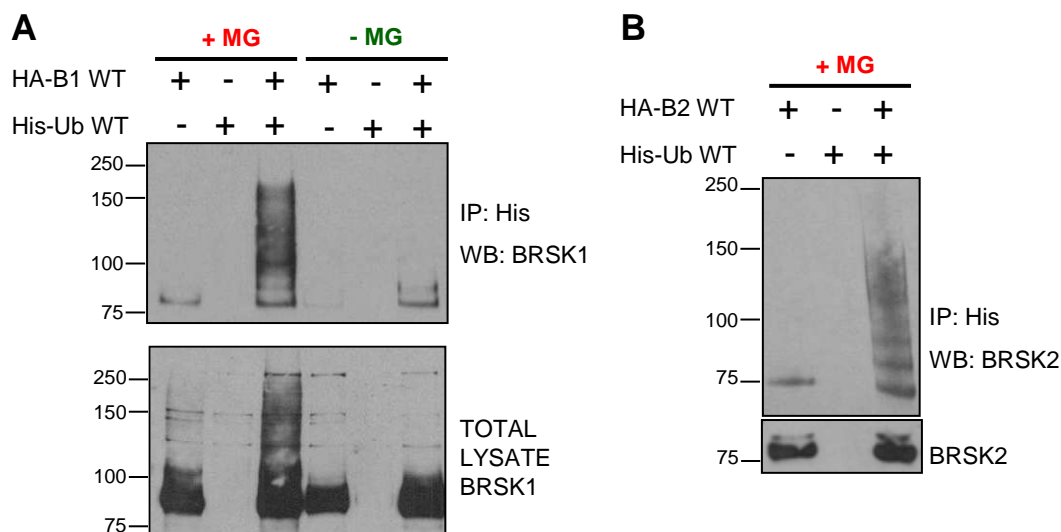


Fig. R34: La inhibició del proteasoma resulta en un augment de les espècies ubiquitinades de la BRSK1 i BRSK2 sobreexpressades. A) Ubiquitinació de BRSK1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 amb o sense His-Ubiquitina, van ser tractades o no amb l'inhibidor del proteasoma MG-132 (10 μ M 16 hores), van ser llisades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot de BRSK1 dels purificats, i el panell inferior mostra el nivells de BRSK1 als llisats. B) Ubiquitinació de BRSK2. Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK2 i/o His-Ubiquitina, tractades amb MG-132, van ser processades com en A. Resultats representatius de 3 experiments independents.

En primer lloc es va voler avaluar la ubiquitinació de les BRSKs en la línia cel·lular 293T, on es va sobreexpressar BRSK1 juntament amb un vector codificant per la ubiquitina fusionada a una cua d'histidines (His-Ub). L'assaig consisteix en fer un *pull-down* amb resina Ni²⁺-agarosa, el que ens permet concentrar totes les proteïnes ubiquitinades per posteriorment detectar la BRSK1 amb anticossos específics. En els casos indicats, es va afegir l'inhibidor del proteasoma MG-132, per evitar que la proteïna modificada per ubiquitinació es degradés. Com es mostra a la **figura R34A**, BRSK1 és ubiquitinada, malgrat que només es pot visualitzar quan es tracten les cèl·lules amb l'inhibidor del proteasoma MG-132. També ens vam proposar veure si la ubiquitinació era un fenomen compartit entre BRSK1 i BRSK2. Es va realitzar l'assaig amb MG-132 i canviant BRSK1 per BRSK2, obtenint idèntics resultats (**Fig. R34B**)

La ubiquitinació també s'observa al sobreexpressar el domini quinasa sense la cua C-terminal (**Fig. R35A**), presentant bandes discretes corresponents a la proteïna conjugada a un o diversos mòn timers d'ubiquitina.

Per altra banda, fa temps que es coneix una interconnexió entre els sistemes de fosforilació i ubiquitinació, entre els quals s'exerceix una regulació mútua (Zhimin and Tony, 2009; Xia et al., 2009; Yang et al., 2010). En aquest sentit, vam estudiar si l'estat d'activació de BRSK1 podria afectar la seva ubiquitinació. Per això es va co-transfectar el mutant inactiu de BRSK1 (T/A) junt amb His-Ubiquitina i es va realitzar l'assaig d'ubiquitinació. La BRSK1 sense activitat quinasa, com la seva homòloga WT, és ubiquitinada en cèl·lules 293T en presència d'MG-132 (**Fig. R35B**).

Tot junt demostra que BRSK1 i BRSK2 estan ubiquitinades en cèl·lules HEK293T.

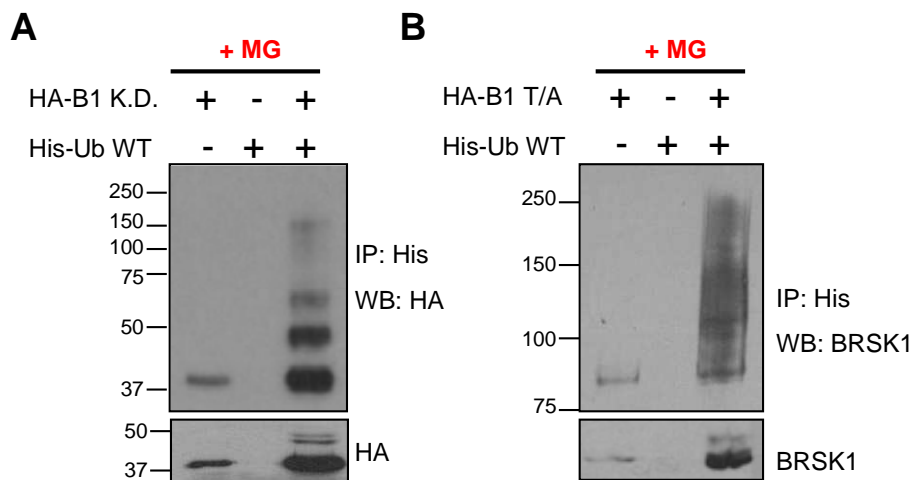


Fig. R35: Anàlisi d'ubiquitinació de BRSK1. A) Ubiquitinació del domini quinasa de BRSK1. B) Ubiquitinació de una forma de BRSK1 constitutivament inactiva (Thr189Ala, T/A). Cèl·lules 293T que sobreexpressen el domini quinasa de BRSK1 (A) o BRSK1 constitutivament inactiva (B) amb o sense His-Ubiquitina, van ser tractades o no amb l'inhibidor del proteasoma MG-132 (10 μM 16 hores), van ser lliades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot de BRSK1 dels purificats, i el panell inferior mostra els nivells de BRSK1 als llisats. Resultats representatius de 3 experiments independents.

3.2. Identificació de E3 ubiquitina lligases de les BRSKs

Durant el procés d'ubiquitinació, l'especificitat de substrat ve donada per les E3 ubiquitina lligases. Donada la gran varietat de E3 lligases presents a la cèl·lula i el paper de les BRSKs durant la polaritat neuronal, ens vam centrar en tres E3 ubiquitina lligases implicades en aquest procés: Smurf1 (Wang et al., 2003; Bryan et al., 2005; Cheng et al., 2011), Smurf2 (Narimatsu et al., 2009) i Trim2 (Khazaei et al., 2011).

Es van co-transfectar BRSK1 amb His-Ub soles o amb les lligases Smurf1, Smurf2 o Trim2. A la **figura R36A**, es mostra com BRSK1 està modificada per ubiquitinació quan s'expressa Smurf1 o Smurf2 però no amb Trim2. Aquests experiments han estat realitzats sense l'inhibidor del proteasoma MG-132, indicant que és una ubiquitinació derivada de la presència d'aquestes lligases i no efecte d'una acumulació inespecífica de proteïnes ubiquitinades. L'assaig també es va realitzar incubant BRSK2 amb les mateixes lligases. En aquest cas, BRSK2 és ubiquitinada per Smurf1 i no per Smurf2 o Trim2 (**Fig. R36B**).

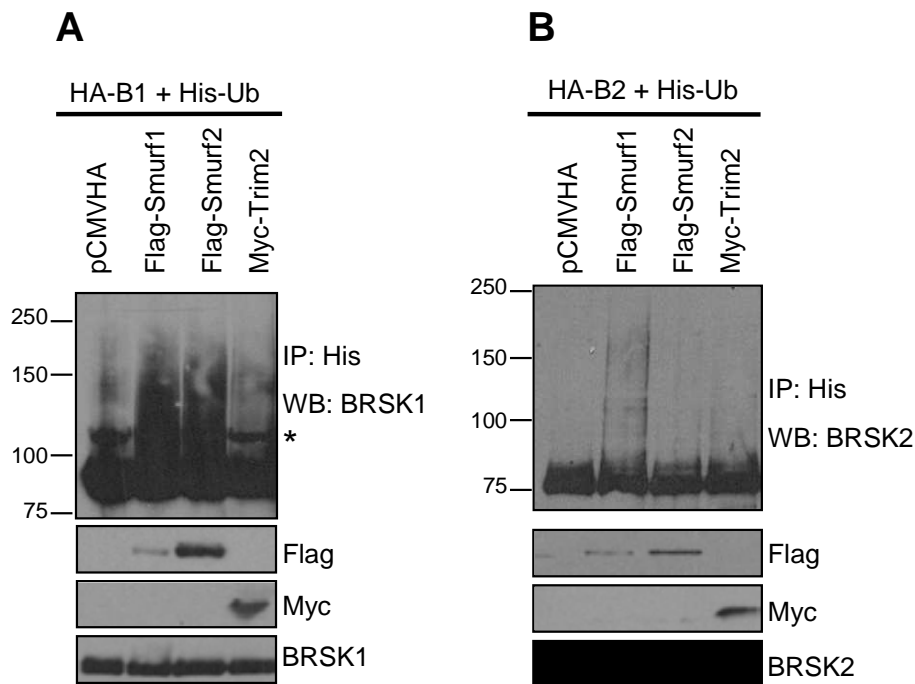


Fig. R36: Estudi de la ubiquitinació de BRSK1 i BRSK2 per les E3 ubiquitina lligases reguladores de la polaritat neuronal. Ubiquitinació de BRSK1 (A) i BRSK2 (B) per E3 ubiquitina lligases reguladores de la polaritat neuronal. Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 (A) o HA-BRSK2 (B) i His-Ubiquitina juntament amb les E3 ubiquitina lligases indicades, van ser lligades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot de BRSK1 dels purificats, i el panell inferior mostra el nivells de BRSK1 als lligats.*Banda inespecífica. Resultats representatius de 3 experiments independents.

Aquests resultats suggereixen que la regulació dels nivells de les BRSKs per ubiquitinació durant el procés de polaritat neuronal podria estar orquestrat per les E3 lligases Smurfs.

En aquests assajos observem una ubiquitinació de les BRSKs però no una disminució dels seus nivells totals. Això s'explicaria per la importància de la relació entre l'expressió de les lligases i el substrat, essent aquest un punt crític a l'hora de dissenyar els assajos de degradació. Poca quantitat de lligasa o excés de proteïna substrat poden portar a menysprear l'efecte de la via. Així veiem que la quantitat d'Smurf1 sobreexpressada no seria suficient per degradar totes les BRSKs (relació BRSK1:Smurf1, 1:1), però si seria suficient per detectar les BRSKs ubiquitinades. És per aquest motiu que es va augmentar la relació entre la lligasa i el substrat. A la **figura R37A**, es mostra com al augmentar la quantitat de DNA transfectat d'Smurf1, i mantenint les quantitats de DNA de la BRSK1 constants, obtenim una disminució dels nivells de BRSK1 cada vegada més marcat (relació BRSK1:Smurf1, 1:15), sense modificar els nivells d'altres proteïnes com pot ser la quinasa ERK1/2.

En aquest sentit, al sobreexpressar en cèl·lules 293T BRSK1 o BRSK2, en presència o no de les lligases Smurf1 o Smurf2, es pot observar la reducció dels nivells d'ambdues quinases en presència d'Smurf1, i només de BRSK1 al sobreexpressar Smurf2 (**Fig. R37B**). Aquests resultats són consistents amb la **figura R36**, on es mostra que BRSK2 només és ubiquitinada per Smurf1 i no per Smurf2.

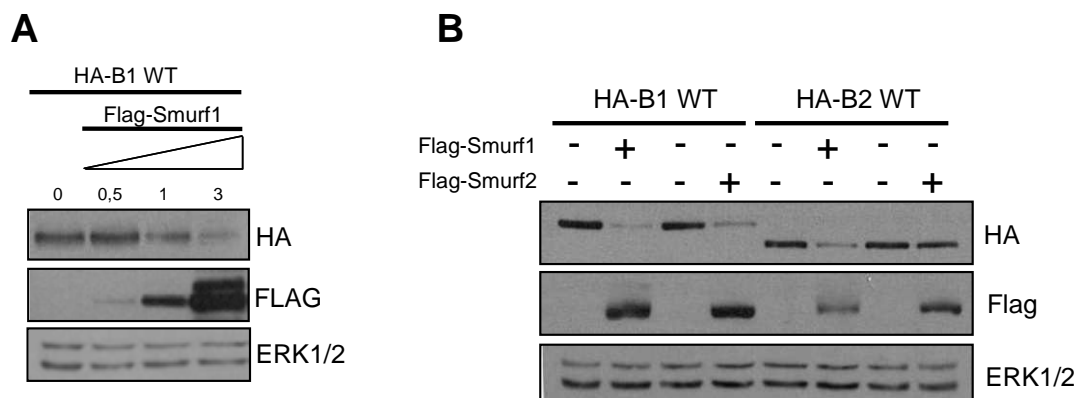


Fig. R37: La sobreexpressió d'Smurf1 induïx la degradació de BRSK1 i BRSK2, mentre que la sobreexpressió d'Smurf2 no afecta els nivells de BRSK2. A) Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 i quantitats creixents d'Smurf1 (0-3 µg), van ser llisades i els nivells d'Smurf1 (Flag), BRSK1 (HA) i ERK1/2 van ser analitzats per immunoblot. B) Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 o HA-BRSK2 i amb o sense Flag-Smurf1 o Flag-Smurf2 van ser llisades i els nivells d'Smurf1 (Flag), BRSK1 (HA) i ERK1/2 van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents.

També es va comprovar si la sobreexpressió de Smurf resultava en la desaparició de la BRSK1 endògena. Amb aquest objectiu, es van transfectar cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y amb els vectors d'expressió per a Smurf1. A la **figura R38** es pot apreciar una reducció en els nivells de BRSK1 com a conseqüència de la sobreexpressió d'Smurf1 en aquest tipus cel·lular. Malgrat tot, aquests resultats són preliminars, donada la dificultat que tenim per transfectar aquest tipus cel·lular.

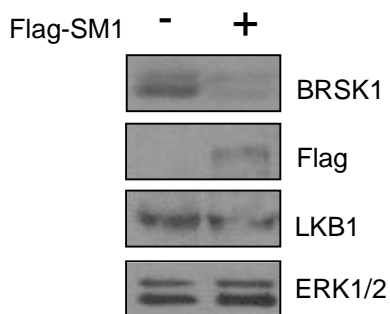


Fig. R38: La sobreexpressió d'Smurf1 promou la degradació de la BRSK1 endògena. Cèl·lules SH-SY5Y que sobreexpressen Flag-Smurf1 van ser llisades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius

3.3. Estudi de la ubiquitinació de BRSK1 per la lligasa Smurf1

Per tal de determinar que l'efecte d'Smurf1 sobre BRSK1 és específic i depèn de l'activitat d'aquesta lligasa es va utilitzar un mutant catalíticament inactiu d'Smurf1..

Les lligases Smurf1 i Smurf2 pertanyen a la família de les lligases amb dominis HECT. La peculiaritat d'aquesta família d'enzims és que dins d'aquest domini contenen una cisteïna conservada que accepta la molècula d'ubiquitina provinent de la E2 i per posteriorment ser transferida a la proteïna substrat. Així es forma un intermediari covalent on la E3 lligasa està unida a la ubiquitina mitjançant un enllaç tioèster. En el cas d'Smurf1 humana aquesta cisteïna es troba en posició 699 i a Smurf2 correspon a la Cys716. En el mutant inactiu aquesta cisteïna es substituïda per alanina, impedit d'aquesta manera la correcta transferència de la ubiquitina de la E2 lligasa al substrat. La **figura R39A** mostra com després de l'assaig d'ubiquitinació a partir d'extractes co-transfectats amb BRSK1 i Smurf1 WT s'obté el patró característic d'ubiquitinació, mentre que al co-transfectar BRSK1 amb el mutant inactiu es perd.

D'igual manera, al augmentar la relació Smurf1:BRSK1 (1:15), com calia esperar, observem una disminució dels nivells d'aquesta última, efecte inexistent al

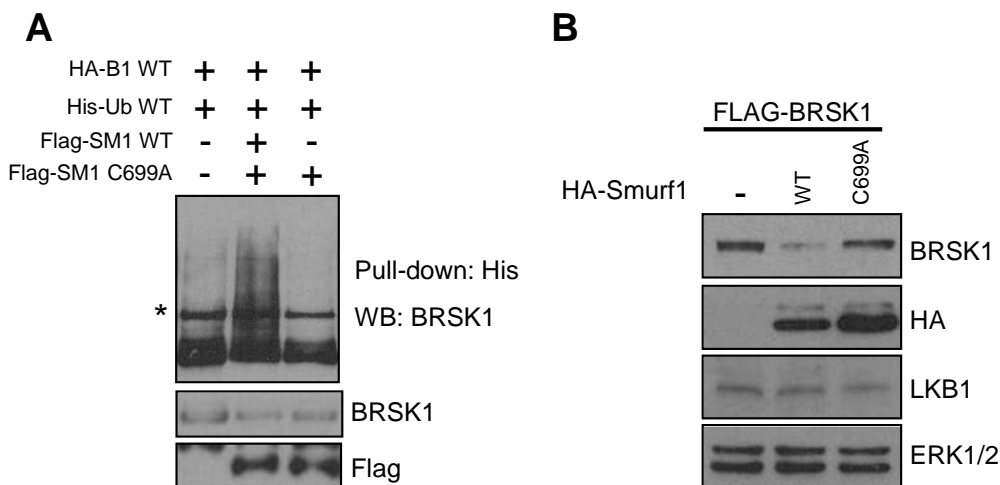


Fig. R39: La sobreexpressió del mutant d'Smurf1 sense activitat E3 lligasa (C699A) no promou la ubiquitinació i degradació de BRSK1. A) Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1, His-Ubiquitina i el Flag-Smurf1 WT o el mutant catalíticament inactiu (Flag-Smurf1 C699A), van ser llisades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot de BRSK1 dels purificats, i el panell inferior mostra el nivells de BRSK1 als llisats. B) Cèl·lules 293T que sobreexpressen Flag-BRSK1 amb o sense HA-Smurf1 WT o C699A van ser llisades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents.

sobreexpressar la variant inactiva d'Smurf1 C699A (**Fig. R39B**).

Els resultats obtinguts suggereixen que l'activitat lligasa d'Smurf1 modula la ubiquitinació de BRSK1.

Un altre criteri per a definir una proteïna com a substrat d'una lligasa és la interacció entre ambdues molècules. Per determinar si Smurf1 i BRSK1 interaccionen es van realitzar assajos d'immunoprecipitació. Per això es van co-transfectar cèl·lules HEK293T amb BRSK1 i les formes salvatge i catalíticament inactiva de Flag-Smurf1. Els llisats obtinguts es van immunoprecipitar amb resina Flag-Agarosa i es van detectar amb anticossos contra BRSK1. Com es mostra a la **figura R40A** no es va poder detectar la interacció entre BRSK1 i Smurf1 WT, però si amb el mutant inactiu Smurf1 C699A (**Fig. R40B**).

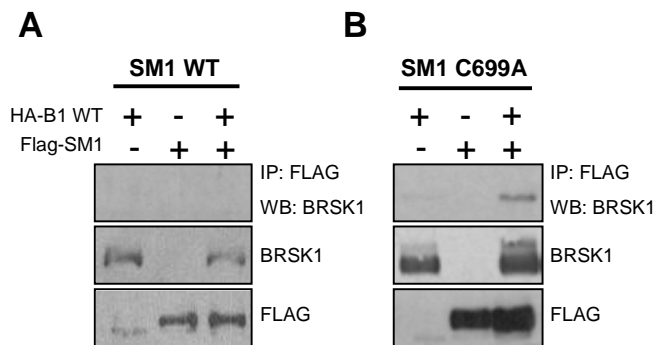


Fig. R40: BRSK1 interacciona amb el mutant inactiu d'Smurf1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 amb o sense Flag-Smurf1 WT (A) o C699A (B) van ser llisades i es va immunoprecipitar Smurf1 amb anticossos específics per Flag. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot de BRSK1 dels purificats, i el panell inferior mostra el nivells de BRSK1 i Smurf1 als llisats. Resultats representatius de 3 experiments independents.

Es coneix que la interacció entre les E3 lligases i els seus substrats és ràpida i transient, fet que fa difícil veure interaccions entre els dos. Així ens aprofitem de les propietats de les HECT lligases catalíticament inactives, ja que al unir-se als seus substrats, però no ser capaces d'ubiquitinar-los, es manté la interacció entre ambdós més temps.

Aquest resultat dona evidències que BRSK1 interacciona amb Smurf1 en cèl·lules 293T.

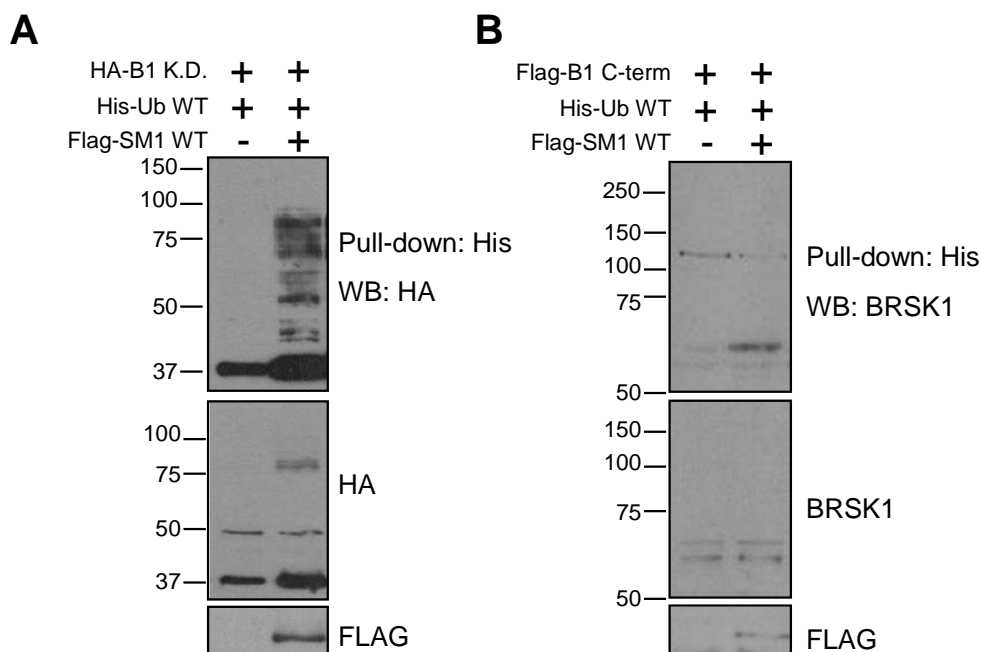


Fig. R41: Smurf1 promou l'ubiquitinació del domini quinasa, però no la cua C-terminal de BRSK1. A) Ubiquitinació del domini quinasa de BRSK1 per Smurf1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen HA-BRSK1 domini quinasa (K.D) amb o sense Flag-Smurf1 van ser llisades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot del domini quinasa (HA) dels purificats i el panell inferior mostra el nivells dels llisats. B) Ubiquitinació de la regió C-terminal de BRSK1 per Smurf1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen la regió C-terminal (Flag-BRSK1 C-term) amb o sense Flag-Smurf1 van ser llisades i les espècies ubiquitinades van ser purificades amb la resina Ni²⁺-agarosa. Els panells superiors mostren la tinció per immunoblot del la regió C-terminal (Flag) dels purificats i el panell inferior mostra el nivells dels llisats. Resultats representatius de 3 experiments independents.

Posteriorment ens vam plantejar estudiar la regió en la qual Smurf1 ubiquitina BRSK1. Per fer-ho, es van transfectar en cèl·lules 293T, el domini quinasa i el domini C-terminal juntament amb His-Ubiquitina i en presència o absència de la lligasa Smurf1. Com es mostra a la **figura R41**, Smurf1 ubiquitina a BRSK1 al domini N-terminal, corresponent al domini quinasa, mentre que no ho fa a la part C-terminal. El domini quinasa de BRSK1 té 25 lisines, així no es pot descartar que hi hagi una poliubiquitinació de diferents residus dins la proteïna.

S'ha descrit que les E2 ubiquitines lligases implicades en la cascada d'ubiquitinació d'Smurf1 són la Ubch5 (Wang et al., 2003) i la Ubch7 (Andrews et al., 2010). En aquest sentit ens vam estudiar el paper d'aquestes lligases en la regulació de la ubiquitinació de Smurf1 sobre BRSK1. Així es van sobreexpressar diferents combinacions de les E2 lligases Ubch5, Ubch7, la E3 lligasa Smurf1 i el substrat BRSK1 en cèl·lules 293T i els nivells de BRSK1 es van determinar per immunoblot. Com es mostra a la **figura R42**, al sobreexpressar Smurf1 observem una disminució dels nivells de BRSK1 (carril 2 respecte carril 1) Aquest efecte és potenciat per l'addició de la E2 lligasa Ubch5, però no per Ubch7 (carril 3 i 4, respecte carril 2). Aquest és un efecte mitjançat per Smurf1, ja que al co-expressar BRSK1 juntament amb les E2 lligases no s'observen disminució dels nivells de BRSK1 (carrils 5 i 6 respecte carril 1). És interessant observar com els nivells de Smurf1 es veuen modulats per la presència de la E2 lligasa Ubch5, suggerint una possible regulació recíproca d'ambdues lligases. Fins al moment no s'ha descrit que les E2 lligases d'Smurf1 puguin ser substrats de la mateixa, però la diferència de

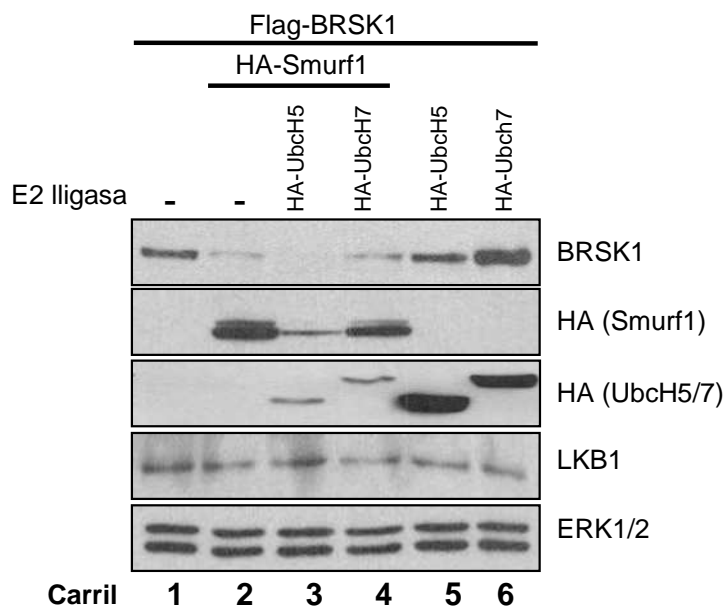


Fig. R42: Smurf1 utilitza la E2 lligasa Ubch5, però no la Ubch7, per induir la degradació de BRSK1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen Flag-BRSK1 amb combinacions de HA-Smurf1 i/o HA-Ubch5 o HA-Ubch7 van ser llisades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents.

nivells d'Ubch5 i Ubch7 quan es co-expressen amb Smurf1 respecte quan la E3 lligasa no està present (carrils 3 i 4 comparats amb carrils 5 i 6), podria suggerir aquest escenari. Amb tot, la E2 lligasa Ubch5 actua coordinadament amb Smurf1 en la degradació de BRSK1 en cèl·lules HEK293T.

3.4. Ubiquitinació *in vitro* de BRSK1 per Smurf1

A partir dels resultats obtinguts ens vam preguntar si la ubiquitinació de BRSK1 induïda per la E3 lligasa Smurf1 era un fenomen directe o bé un efecte indirecte. En aquest sentit ens vam proposar estudiar la reacció d'ubiquitinació *in vitro*. Per tal de realitzar l'assaig, una part del reactius necessaris es van clonar i purificar en bacteris (**Material i Mètodes, apartat Ubiquitinació *in vitro***). Es van obtenir les E2 lligases, diferents formes d'ubiquitina, Smurf1 i el seu mutant catalíticament inactiu així com Par6, un substrat d'Smurf1 que s'utilitzarà com a control positiu. La **figura R43**, mostra la tinció amb Coomassie blue d'un gel amb les proteïnes obtingudes al laboratori. Malgrat que està descrit que la Smurf1 sencera i purificada de bacteri és funcional (Wang et al., 2006), no es va aconseguir l'enzim actiu. És per aquest motiu que es va comprar la E3 lligasa Smurf1 activa comercial (Sigma). A l'Smurf1 comercial li manquen els 150 primers aminoàcids i està purificat a partir de cèl·lules d'insecte Sf9 infectades amb *Baculovirus*.

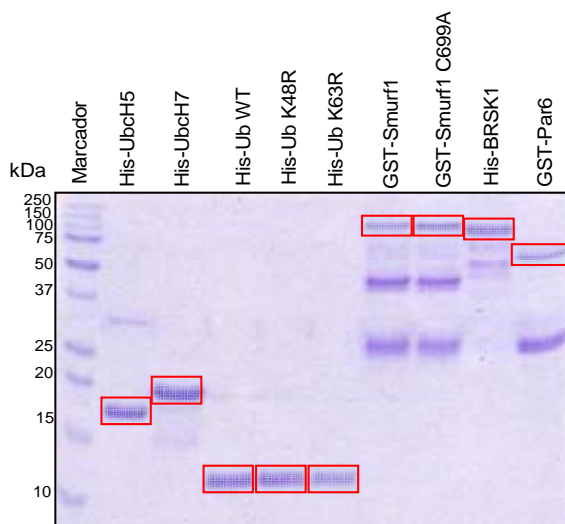


Fig. R43: Expressió i purificació dels components necessaris per a realitzar l'assaig d'ubiquitinació *in vitro*. Cèl·lules d'*E.coli* BL21 van ser transformades amb els vectors que codifiquen per les proteïnes indicades. Les proteïnes expressades van ser purificades amb resines específiques (Ni²⁺-Agarosa i Glutatió sefarosa) i la seva puresa va ser avaluada mitjançant electroforesi en SDS-PAGE i tinció de Coomassie. His-BRSK1 va ser obtinguda mitjançant cèl·lules d'insecte Sf9 seguint el protocol descrit a Material i Mètodes. El recuadre indica la proteïna de fusió que presenta el pes molecular esperat.

Per a estandaritzar l'assaig d'ubiquitinació de la BRSK1, es va utilitzar un substrat conegut de Smurf1, la proteïna Par6 (Cheng et al., 2011). Es pot comprovar com només al afegir tots els components de la reacció s'obté el "laddering" característic de la ubiquitinació de Par6 (**Fig. R44B**, carril 3).

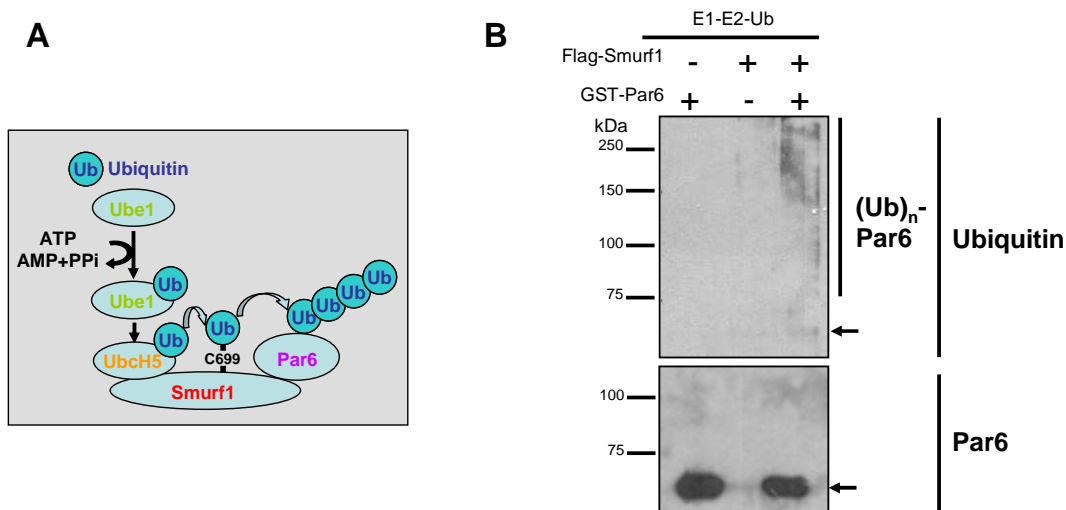


Fig. R44: Ubiquitinació de Par6 per Smurf1 *in vitro*. A) Esquema de la ubiquitinació *in vitro* de Par6 per Smurf1. B) Assaig *in vitro* de Par6. Es van incubar durant 1 hora a 30°C 10 µg de His-Ub, 0,35 µg de Ube1 (E1), 0,5 µg d'UbcH5 (E2) i 0,5 µg de Flag-Smurf1 (E3) amb 2 µg de GST-Par6 purificada de E.coli BL21. Al finalitzar la reacció es va immunoprecipitar Par6 amb resina de glutatió sefarosa i la proteïna eluida es va detectar per immunoblot. Les espècies ubiquitinades es mostren al panell superior (Ubiquitin) i la proteïna immunoprecipitada al panell inferior (Par6). Resultats representatius de 2 experiments.

Un cop posat a punt l'assaig es va determinar si la BRSK1 està ubiquitinada *in vitro* per Smurf1. A la **figura R45B**, es mostra com al afegir tots els components de la reacció, però no en absència d'algun d'ells, BRSK1 es modifica per ubiquitinació (carril 5). Aquest resultat confirma que la ubiquitinació de BRSK1 per Smurf1 és directe.

Com s'ha comentat a la introducció, normalment el tipus d'ubiquitinació degradativa ve donat per la ramificació de les cadenes d'ubiquitina a partir de la lisina 48. Així, dels mutants de la ubiquitina en els que la lisina 48 és mutada a arginina (K48R), s'espera que no puguin ramificar. Per altra banda, el segon patró de ramificació més comú de la ubiquitina és a la lisina 63, amb altres funcions no degradatives. Mitjançant l'assaig *in vitro* es va analitzar el patró d'ubiquitinació de BRSK1 amb els mutants d'ubiquitina K48R i K63R. Aparentment cap dels dos mutants evita la poliubiquitinació de BRSK1 (**Fig. R45B**, carrils 6 i 7), indicant que la ramificació de la ubiquitina no ocorre per mitjà d'aquestes lisines. Això contrasta amb els resultats obtinguts amb altres assajos dels quals es desprèn que la ubiquitinació de BRSK1 per Smurf1 és del tipus degradatiu, donat que al sobreexpressar la lligasa disminueixen els nivells de BRSK1 (**Fig. R37, R38, R39 i R42**). Anteriorment havia estat descrit que varies proteïnes de la família de les AMPK podrien estar regulades per ubiquitinació via les lisines K29 i K33, entre elles les BRSKs (Al-hakim et al., 2008). Actualment s'estan clonant i purificant els mutants no ramificables en aquestes dues lisines, el que ens permetrà determinar si aquest residus són els responsables del patró d'ubiquitinació de les BRSKs.

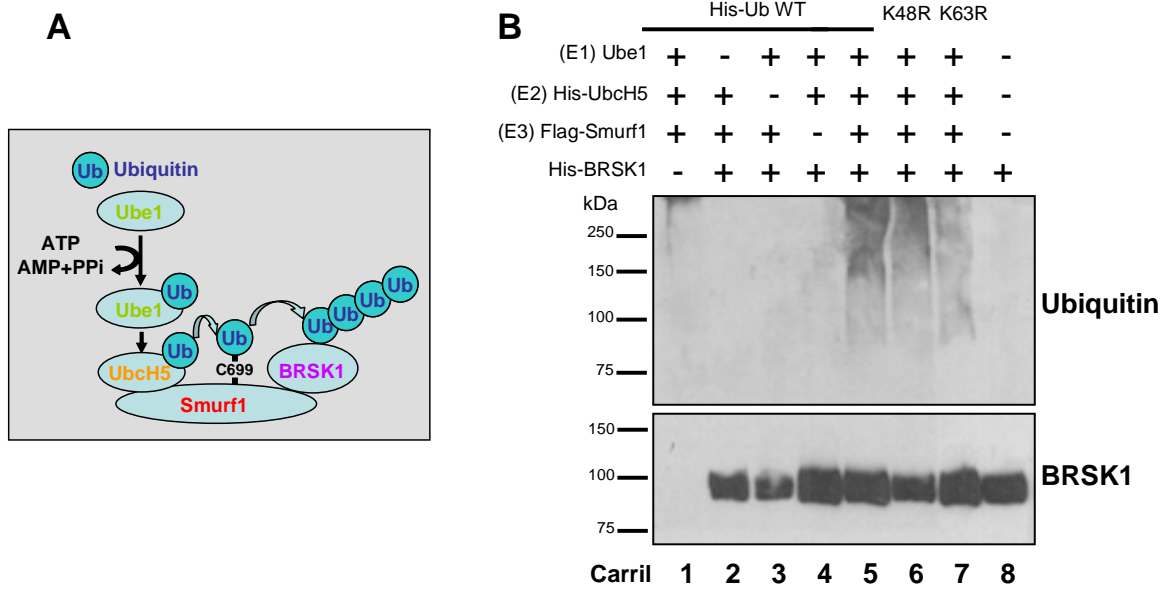


Fig. R45: La E3 lligasa Smurf1 ubiquitina BRSK1 *in vitro*. A) Esquema de la ubiquitinació *in vitro* de BRSK1 per Smurf1. B) Assaig *in vitro* de BRSK1. Es van incubar durant 1 hora a 30°C 10 µg de His-Ub (WT, K48R o K63R), 0,35 µg de Ube1 (E1), 0,5 µg d'UbcH5 (E2) i 0,5 µg de Flag-Smurf1 (E3) amb 2 µg de His-BRSK1 purificada de cèl·lules d'insecte Sf9. Al finalitzar la reacció es va immunoprecipitar BRSK1 amb resina de sefarosa i anticossos específics i la proteïna eluida es va detectar per immunoblot. Les espècies ubiquitinades es mostren al panell superior (Ubiquitin) i la proteïna immunoprecipitada al panell inferior (BRSK1). Resultats representatius de 3 experiments.

3.5. Estudi funcional de la ubiquitinació de les BRSKs durant la polaritat neuronal

La E3 lligasa Smurf1 està estretament regulada per exercir l'efecte desitjat en el moment necessari. Així, la seva activitat per degradar substrats es veu afectada per la via de senyalització cAMP/PKA en diferents processos. Les primeres evidències d'aquesta regulació van ser donades pel laboratori de Mu-ming Poo, en veure que Smurf1 es fosforilava per PKA a la Thr306. Això canviava l'especificitat de substrat de Par6 a RhoA permetent així la elongació de l'axó durant el procés de polarització neuronal (Cheng et al., 2011). Més endavant, s'ha vist que aquesta regulació d'Smurf1 per PKA també ocorre en altres funcions cel·lulars, com el control de la proteïna proapoptòtica Nur77 (Lin et al., 2013).

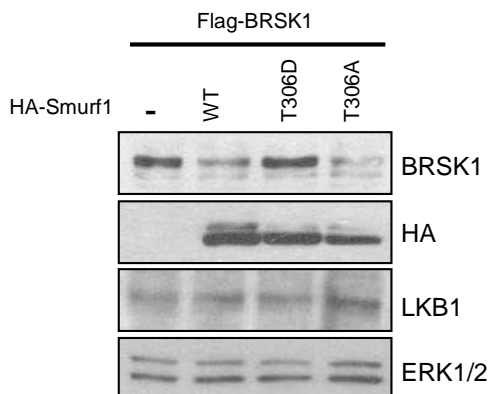


Fig. R46: La fosforilació de la Thr306 d'Smurf1 regula els nivells d'expressió de BRSK1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen Flag-BRSK1 amb o sense HA-Smurf1 WT, T306D o T306A van ser lligades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents.

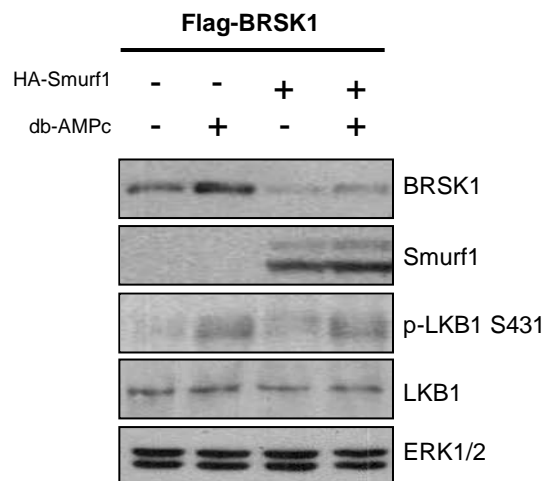
Per aquest motiu ens vam plantejar si la fosforilació de Smurf1 a la Thr306 podia afectar la degradació de BRSK1. Per avaluar aquesta hipòtesi es van generar mutants puntuals d'Smurf1 en la Thr306 a alanina (mutant no fosforilable) i a àcid aspàrtic (mutant mimètic de la fosforilació continuada d'Smurf1).

Es van transfectar aquests dos mutants juntament amb BRSK1 en cèl·lules 293T i es va observar l'efecte sobre la degradació de la quinasa. Com es pot veure a la **figura R46**, el mutant mimètic de la fosforilació per PKA (Smurf1 T306D) és incapaç de degradar a BRSK1, mentre que la Smurf1 WT i el mutant no fosforilable (T306A), disminueixen els nivells de BRSK1 notablement.

Per corroborar aquest fenomen, es van tractar cèl·lules 293T amb l'anàleg de l'AMPc no degradable dibutiril-AMPc (db-AMPc). Com es mostra a la **figura R47**, l'activació de PKA es tradueix en un augment de l'expressió de BRSK1, a més de recuperar parcialment la reducció dels nivells de la quinasa induïts per Smurf1. Cal tenir en compte que Smurf1 està present en les cèl·lules 293T endògenament, la qual cosa explicaria l'augment de BRSK1 observat al activar la via cAMP/PKA en cèl·lules no transfectades amb la lligasa.

Aquests resultats suggereixen una regulació de la via cAMP/PKA en el control dels nivells de BRSK1 en aquest model cel·lular.

Fig. R47: La proteïna quinasa A (PKA) regula l'estabilitat de BRSK1 per mitjà de la lligasa Smurf1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen Flag-BRSK1 amb o sense HA-Smurf1 WT van ser tractades amb 100 µM db-AMPc durant 24 hores, van ser llisades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Db-AMPc, dibutiril AMP cíclic. Resultats representatius de 3 experiments independents.



La via cAMP/PKA actua a diversos nivells durant l'especificació axònica. Un dels efectes produïts és l'acumulació de la quinasa LKB1 en la seva forma fosforilada a la S431 a l'axó (Barnes et al., 2007). A més, mitjançant immunohistoquímiques de còrtex de rata i amb un anticòs específic contra fosfo-BRSKs, els autors descriuen una acumulació de les BRSKs fosforilades al *T-loop* al llarg de l'axó.

Aquests resultats van ser corroborats en neurones hipocampals en cultiu utilitzant un anticòs que reconeix BRSK1 i BRSK2 fosforilades en el *T-loop* (Thr189 per BRSK1 i Thr172 per BRSK2). Com es mostra a la figura **Fig. R48A** les BRSKs fosforilades al *T-loop* (vermell) localitzen majoritàriament a l'axó, identificat per la presència del marcador axonal Tau1 (verd). Prèviament es va validar el reconeixement de l'axó per l'anticòs Tau-1 (**Fig. R48B**)

Una de les funcions Smurf1 és la del control de la ubiquitinació i degradació de proteïnes localment durant el procés de polarització neuronal (Wang et al., 2003; Bryan et al., 2005; Cheng et al., 2011). Els resultats obtinguts amb BRSK1 suggereixen

un patró de degradació similar al de la proteïna Par6. Així ens vam plantejar estudiar la localització de Par6 i les BRSKs en cultius neuronals.

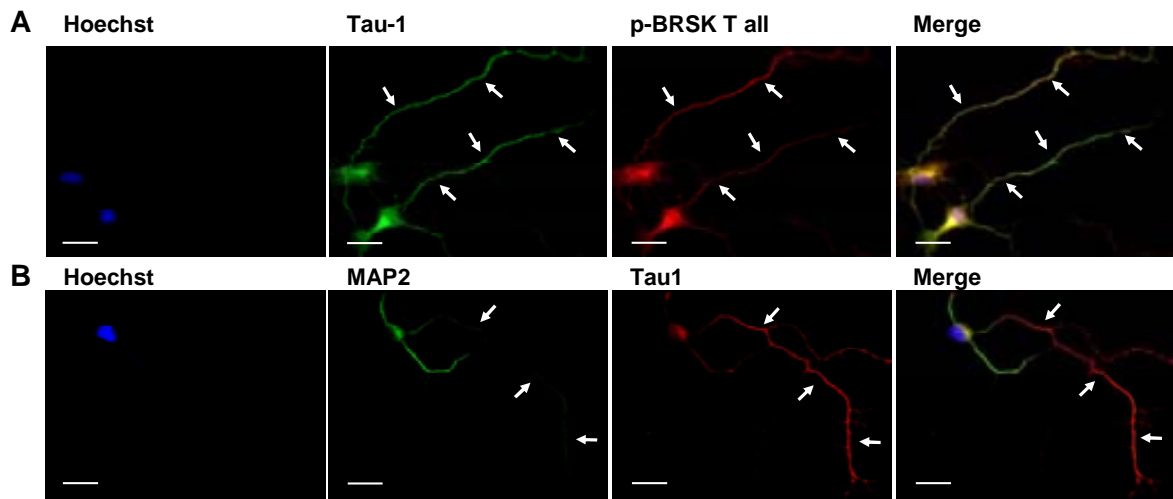


Fig. R48: Les BRSKs actives localitzen a l'axó en neurones hipocàmpals de rata. Neurones hipocàmpals de rata van ser cultivades 3 DIV i fixades amb 4% PFA. A) Anàlisi de la distribució de la forma fosforilada al T-loop de les BRSKs (p-BRSK T all, vermell) i el marcador d'axons Tau-1 (verd). B) Validació dels anticossos específics de dendrites (MAP2, verd) i axons (Tau-1, vermell). Els panells de l'esquerra mostren la tinció de nuclis (Hoechst ,blau). L'escala representa 20 µm. Resultats representatius de 3 cultius independents.

El procés de polarització en neurones hipocàmpals en cultiu ocorre durant els primers 2-3 DIV. En aquest punt es van fixar i tenyir cultius amb anticossos contra BRSK1 o BRSK2 (verd), Par6 (vermell) i el marcador axonal Tau-1 (morat). Les immunocitoquímiques mostren com tant les BRSKs com Par6 estan presents a l'axó en aquest estadi (**Fig. R49**).

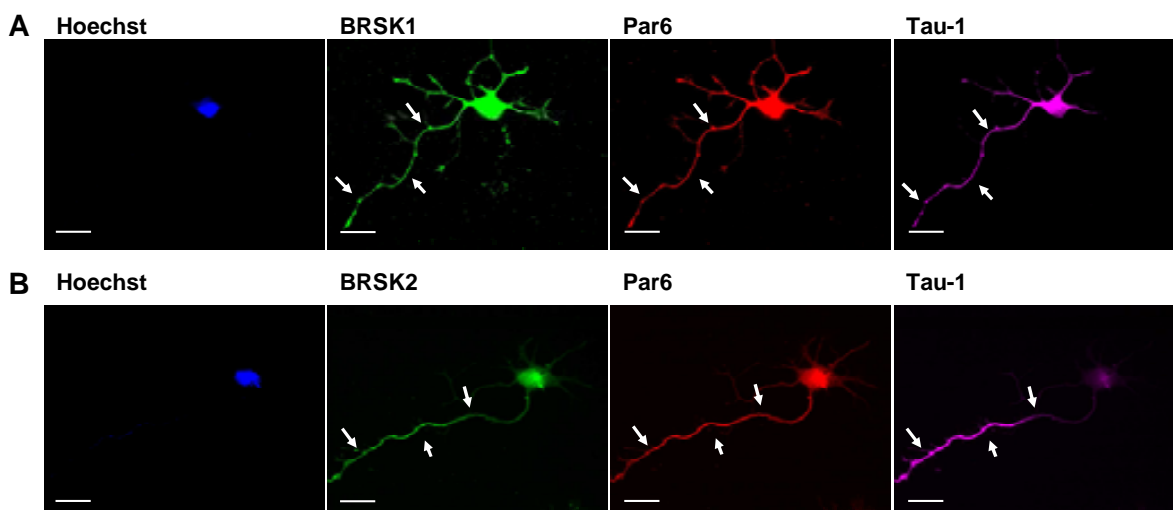


Fig. R49: BRSK1 i BRSK2 colocalitzen amb Par6 a l'axó en neurones hipocàmpals de rata. Neurones hipocàmpals de rata van ser cultivades 2 DIV i fixades amb 4% PFA. A) Anàlisi de la distribució de BRSK1 (verd), Par6 (vermell) i el marcador axònic Tau-1 (lila). B) Anàlisi de la distribució de BRSK2 (verd), Par6 (vermell) i el marcador axònic Tau-1 (lila). Els panells de l'esquerra mostren la tinció de nuclis (Hoechst ,blau). L'escala representa 20 µm. Resultats representatius de 3 cultius independents.

La participació de BRSK1 durant la polaritat neuronal és obvia, però els mecanismes mitjançant els quals fa els seus efectes encara és un incògnita. En aquest sentit ens vam plantejar si BRSK1 podria fosforilar RhoA i Par6, dos substrats que participen en el procés i que són regulats per Smurf1. Assajos d'activitat quinasa demostren que BRSK1 no fosforila *in vitro* a cap d'aquestes dues proteïnes (**Fig. 50**).

Donada la gran quantitat de proteïnes implicades en la polarització neuronal, és probable que les BRSKs regulin la fosforilació d'altres substrats diferents de Par6 o RhoA durant el procés.

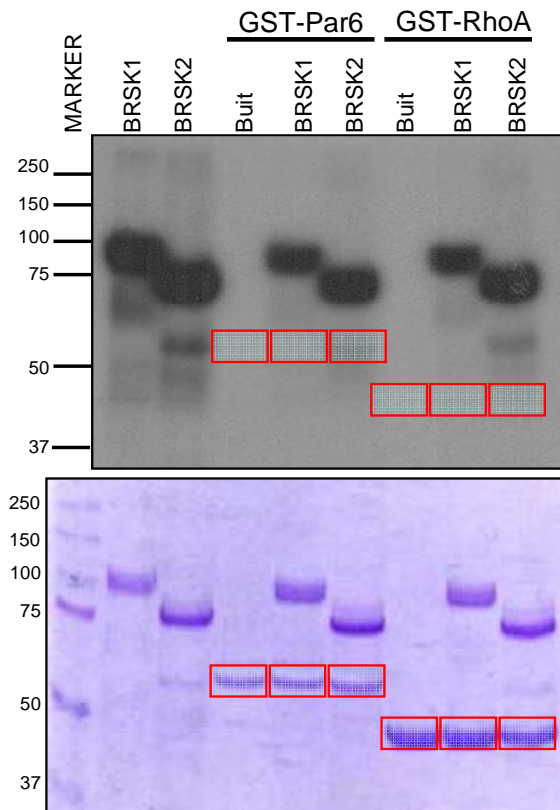


Fig. R50: BRSK1 i BRSK2 no fosforilen Par6 o RhoA *in vitro*. Assaig radiomètric de fosforilació de Par6 i RhoA per BRSK1 i BRSK2. 2 µg de Par6 o RhoA (purificades de bacteris) es van incubar amb o sense 2 µg de BRSK1 o BRSK2. La reacció es va iniciar amb $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ i Mg^{2+} , i després de separar en gel d' SDS-PAGE i tinció amb Coomassie (panell inferior), la fosforilació de Par6 i RhoA així com l'autofosforilació de BRSK1 i BRSK2 van ser monitoritzades mitjançant autoradiografia. Resultats representatius de 3 experiments independents. El recuadre indica la posició de RhoA i Par6 en el gel (panell inferior) i a l'autoradiografia (panell superior).

3.6. Smurf1, associació a la membrana i sulfàtid

A banda del domini catalític HECT, Smurf1 conté dos dominis WW d'unió a pY i un domini d'unió a fosfolípids C2.

Una fracció d'Smurf1 localitza a la membrana plasmàtica per mitjà del seu domini C2 (Suzuki et al., 2002). Aquest domini també estaria implicat en la regulació de la migració, activitat lligasa i especificitat de substrat (Lu et al., 2011). En Smurf2 aquest domini té propietats autoinhibitòries i per tant juga un paper diferent (Wiesner et al., 2007). A l'hora de cristal·litzar aquest domini per a dur a terme els estudis estructurals, es va fer en presència de sulfat i així es van identificar dos residus crítics per a la unió a aquest ió, les lisines 28 i 85. Els autors remarquen l'especial interès d'aquests dos residus com a potencials llocs d'unió a càrregues negatives de lípids de membrana (com per exemple fosfolípids). Així, ens vam proposar estudiar si la lligasa Smurf1 unia algun lípid.

Utilitzant experiments similars al realitzats en el capítol anterior amb BRSK1, es va utilitzar la GST-Smurf1 purificada de bacteri per realitzar assajos de *protein-lipid overlay assay*. Sorprenentment, la lligasa Smurf1, de igual manera que BRSK1, uneix el sulfogalactolípid sulfàtid (**Fig. R51**). A més del sulfàtid també uneix amb gran afinitat el fosfatidilinositol-5-P (PI(5)P), i en menor mesura esfingosina-1-fosfat i els fosfatidilinositols fosforilats en posició 3 i 4, tots ells carregats negativament.

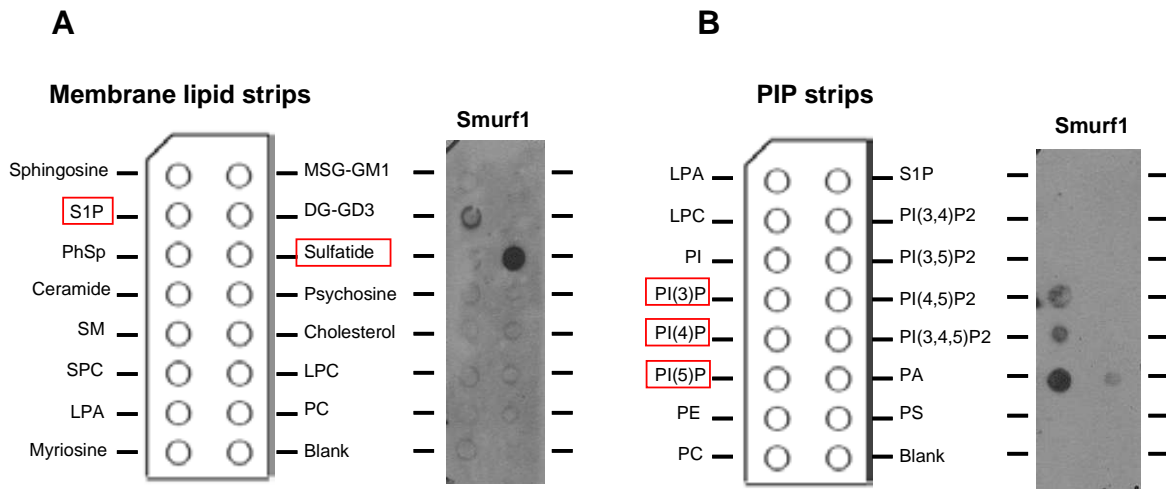


Fig. R51: Smurf1 uneix sulfàtid i els fosfoinositids PI(3)P, PI(4)P i PI(5)P. Es va incubar 1 µg de GST-Smurf1 purificada de bacteri amb membranes *Sphingostrip* (A) i *PIP strips* (B) comercials que contenen els lípids indicats, i la unió als lípids immobilitzats es va visualitzar utilitzant anticossos contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Resultats representatius de 2 experiments independents.

Aquests resultats van ser corroborats amb membranes de nitrocel·lulosa amb sèries de diferents quantitats dels lípids fosfatidilcolina i sulfàtid immobilitzats. Es va afegir el domini SCR2 (control positiu), així com la versió inactiva de la lligasa (Smurf1 C699A) i les proteïnes substrat de Smurf1, RhoA i Par6. La **figura R52** confirma la forta unió d'Smurf1 al sulfàtid, tant en la seva versió activa com catalíticament inactiva, de manera anàloga al domini SCR2 de BRSK1. Per altra banda, ni RhoA ni Par6 uneixen el sulfàtid.

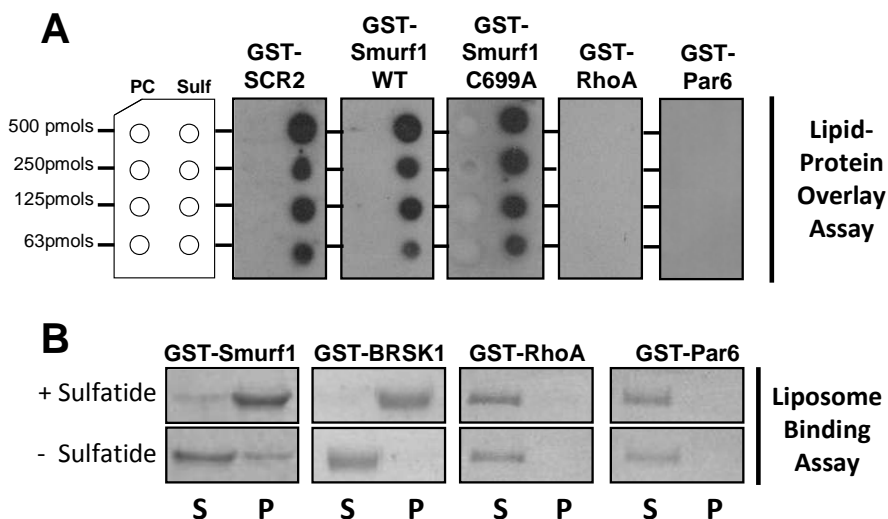
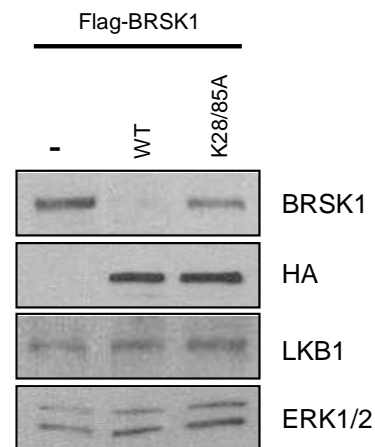


Fig. R52: Estudi de la unió d'Smurf1 i els seus substrats Par6 i RhoA al sulfàtid. A) Es van immobilitzar diferents quantitats de fosfatidilcolina (PC) i sulfàtid (Sulf) en membranes de nitrocel·lulosa Hybond-C i es van incubar amb les proteïnes quinases indicades (fusionades a GST). La unió de la proteïna al lípid immobilitzat es va visualitzar mitjançant anticòs contra GST, segons el protocol descrit a Materials i Mètodes. Resultats representatius de 3 experiments independents. B) Anàlisi d'unió al sulfàtid en assajos d'un a liposomes de Smurf1 i els seus substrats. Les proteïnes indicades van ser incubades amb liposomes amb sulfàtid (+ sulfàtid) o sense (- sulfàtid) i la presència de proteïna al sobrenedant (S) i pellet (P) va ser analitzada mitjançant electroforesis SDS-PAGE i tinció de Coomassie. Resultats representatius de 3 (A) i 3 (B) experiments independents.

La unió de Smurf1 a lípids carregats negativament podria explicar el mecanisme d'unió a la membrana via el seu domini C2, on localitzen alguns dels seus substrats coneguts, com RhoA (Wang et al., 2003), el receptor de TGF- β (Ebisawa et al., 2001) i com hem estudiat en aquest treball, BRSK1.

Donada la importància del domini C2 en la selecció dels substrats d'Smurf1, vam decidir estudiar l'efecte de les mutacions puntuals en les lisines 28 i 85. Aquests residus és van canviar a alanina i es va utilitzar el mutant resultant (Smurf1 K28/85A) per estudiar el seu efecte sobre la degradació de BRSK1. A diferència de la lligasa salvatge, que disminueix notablement els nivells de BRSK1, el mutant K28/85A és incapaç de fer-ho (**Fig. R53**), corroborant la importància d'aquests dos residus en la selecció de substrat d'Smurf1. Experiments futurs aniran adreçats a investigar la importància de la co-localització a la membrana d'Smurf1 i BRSK1 i el possible paper que pugui tenir durant el procés de polarització neuronal.

Fig. R53: El mutant del domini C2 de Smurf1, que no localitza a la membrana, no indueix la degradació de BRSK1. Cèl·lules 293T que sobreexpressen Flag-BRSK1 amb o sense HA-Smurf1 WT o el mutant deficient en unió a membrana K28/85A van ser llisades i els nivells de les proteïnes indicades van ser analitzats per immunoblot. Resultats representatius de 3 experiments independents.



DISCUSSIÓ

Localització particulada de les BRSKs

Les *Brain Specific Kinases* 1 i 2 són dues quinases que participen en molts processos, a diferents òrgans i sota una fina regulació de la seva activitat, conformació i localització. Les BRSKs estan fosforilades i activades per la quinasa màster LKB1 (Lizcano et al., 2004), proteïna constitutivament activa. Aquest fet comporta que es necessiten mecanismes alternatius per a regular la seva activitat. Un d'ells és el canvi en la localització de les quinases dins la cèl·lula.

Les observacions fetes al nostre laboratori mostren la presència de BRSK1 -però no LKB1- a la membrana, d'una manera resistent a la solubilització amb el detergent Triton X-100 (**Fig. R1**), suggerint l'estreta relació de BRSK1 amb la fracció de membrana particulada. A partir de càlculs estimatius tenint en compte la quantitat de proteïna observada en les fraccions de membrana respecte a la fracció citosòlica, es dedueix que la quantitat a la fracció de membrana és aproximadament d'un 3-5%. Malgrat ser poca quantitat respecte la proteïna total, s'ha vist que aquest *pool* de BRSK1 és necessari en diferents processos. Entre ells, el més important és en la regulació de l'alliberació de neurotransmissors (Inoue et al., 2006), on BRSK1 fosforila substrats com RIM1. Recentment s'ha involucrat les BRSKs en la regulació del tràfic vesicular en membranes de Golgi a *Drosophila*. Mitjançant un *screening* genètic, s'ha determinat que els mutants *sff* (*sugar-free frosting*), que són deficientes en l'ortòleg de les BRSKs en *Drosophila*, tenen defectes en la dinàmica de glicosilació en el sistema nerviós embrionari de les mosques (Baas et al., 2011). A més, de manera similar a la localització de BRSK en vesícules sinàptiques en *C. elegans* i mamífers, l'activitat de les quinases en *Drosophila* modularia les interaccions de les vesícules amb l'aparell de Golgi. Aquesta localització específica, permetria la regulació de la glicosilació, fosforilant substrats encara per estudiar. Tot junt dóna evidències de la importància de la BRSK1 en compartiments de membrana.

BRSKs i *lipid rafts*

Mitjançant la obtenció de *lipid rafts* de sinaptosomes de rata, hem pogut determinar que BRSK1, però no BRSK2, localitza en aquests microdominis de la membrana (**Fig. R3**). Els *lipid rafts* són regions de membrana riques en colesterol i esfingolípid, caracteritzades per la seva resistència a la solubilització per detergents no iònics. Els *lipid rafts* actuen com a plataformes de senyalització, ajuden al tràfic de molècules i tenen funcions estructurals, a més d'estar implicats en diversos aspectes de la fisiologia cel·lular (Simons and Ikonen, 1997).

La presència de BRSK1 a *lipid rafts* també es va estudiar utilitzant la metil- β -ciclodextrina (M β CD), un agent desestabilitzador de *lipid rafts*. Aquesta molècula té una anell cíclic que forma complexos amb el colesterol, segrestant-lo i disminuint-ne la quantitat a les membranes. Ja que després d'un tractament previ amb M β CD no s'observa l'associació de BRSK1 a *lipid rafts* de sinaptosomes de rata, podem concloure que una part de la BRSK1 cel·lular es troba associada a aquests microdominis (Rodríguez-Asiain et al., 2011).

La presència de BRSK1 als *lipid rafts* ve acompanyada d'una modulació de la seva activitat per l'entorn lipídic. Així, hem demostrat que la proteïna present en aquesta regió presenta uns nivells de fosforilació del *T-loop* més elevats que els

observats en les zones “no raft” (Rodríguez-Asiain et al., 2011). Com que LKB1 no està present als *lipid rafts*, això suggereix diverses hipòtesis: podria ser que l’ambient lípidic “protegís” a la BRSK1 de la defosforilació, d’una manera similar al descrit per la quinasa Fyn (Young et al., 2003), o bé que la fosfatasa de BRSK1 no estigués present en aquests microdominis de membrana, impossibilitant la defosforilació de la quinasa. Una altra possibilitat és que l’augment en la fosforilació del *T-loop* vingués donat per alguna de les altres quinases descrites en aquesta funció que, en aquest cas, sí que localitzés a *lipid raft*. A més, la incubació de BRSK1 amb vesícules de lípids extrets de les fraccions *raft* i reconstituïts en vesícules lipídiques, augmenta l’activitat *in vitro* de la quinasa, visualitzat per un augment en la incorporació de fosfat al pèptid CHKtide i al seu substrat Tau (Rodríguez-Asiain et al., 2011) (**Annex 5**).

Per altra banda, Inoue i col·laboradors van demostrar que la BRSK1 en neurones hipocampals en cultiu presenta un patró puntuat al llarg dels processos neurítics (Inoue et al., 2006), mentre que BRSK2 està distribuïda més uniformement (Rodríguez-Asiain et al., 2011). Seria interessant estudiar si el fet que BRSK1, però no BRSK2, localitzi als *lipid rafts* podria correlacionar amb el seu patró puntuat.

BRSKs i palmitoilació

Amb l’objectiu de determinar els mecanismes d’unió de BRSK1 a la membrana es va analitzar la presència de seqüències consens per a possibles modificacions post-traduccionals de la quinasa. Després d’un l’anàlisi *in silico*, només és van poder detectar putatius llocs de palmitoilació. Utilitzant l’assaig ABE vam comprovar que en cervell de rata BRSK1, però no BRSK2, està palmitoilada (**Fig. R10**). La palmitoilació és una modificació post-traducciona dinàmica i s’han descrit diversos exemples en què la palmitoilació d’algunes proteïnes canvia la seva interacció amb la membrana, així com l’estabilitat o la localització intracel·lular (Salaun et al., 2010).

Com hem comentat, una de les funcions de les BRSKs a la sinapsis madura és el control de l’alliberament de neurotransmissors (Inoue et al., 2006). Durant aquest procés, es necessita un tràfic de proteïnes a la membrana i cap a les zones actives de control de la neurotransmissió, on es produeix l’exocitosi de les vesícules sinàptiques. BRSK1 és una d’aquestes proteïnes, però el mecanisme pel qual es regula el seu transport i anclatge a les sinapsis és desconegut. Amb els resultats obtinguts, la palmitoilació de BRSK1 podria ser un candidat a realitzar aquesta funció.

En aquest sentit, fa temps que es coneix que algunes de les proteïnes essencials en el procés d’alliberament de neurotransmissors com SNAP-25 (Hess et al., 1992), sinaptobrevina-2 (Veit et al., 2000) o sinaptotagmina-1 (Kang et al., 2004) estan palmitoilades. Actualment gràcies a aproximacions proteòmiques es coneix que un gran nombre de proteïnes sinàptiques estan subjectes a aquesta modificació (Kang et al., 2008). També s’ha relacionat la palmitoilació amb els processos de desenvolupament neuronal i plasticitat sinàptica (revisat a (Fukata and Fukata, 2010), en els que es coneix què les BRSKs també hi juguen un paper important (Barnes et al., 2007; Lilley et al., 2013).

En alguns casos, com en la *postsynaptic scaffolding protein 95* (PSD95), l’activitat sinàptica és la reguladora del cicle palmitoilació/despalmitoilació (El-Husseini et al., 2002; Iwanaga et al., 2009; Fukata et al., 2013).

La despolarització mitjançant KCl de cèl·lules en cultiu s'ha usat com a model d'activitat sinàptica. Les cèl·lules en repòs tenen un potencial de membrana negatiu, amb altes concentracions de K^+ intracel·lular i de Na^{2+} i Cl^- extracel·lular. Al augmentar la concentració de K^+ extracel·lular amb KCl es provoca una obertura dels canals de Na^{2+} (permetent l'entrada del ió), que genera la despolarització de la cèl·lula, seguida de l'obertura de canals de Ca^{2+} dependents de voltatge. En cèl·lules excitables neuronals això provoca diversos efectes, entre els quals hi ha l'alliberació de neurotransmissors (Lindgren, 1986; Smyth et al., 2005), l'activació de vies de transducció de senyals (Moulder et al., 2003), la dinàmica i localització de proteïnes (Tiruchinapalli et al., 2003) o la regulació de la seva activitat (Lee et al., 2005). Per exemple, en cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y s'ha observat que després de la despolarització amb KCl s'alteren els nivells de fosforilació de la serina 262 de la proteïna Tau. Presumiblement aquest efecte estaria mitjançat per la quinasa MARK1 (Jeon et al., 2005).

En aquest treball es demostra que la despolarització amb KCl provoca un desplaçament de la BRSK1 a la fracció de membrana particulada (**Fig. R8 i R9**). Aquest resultat, juntament amb els de la palmitoilació de la quinasa, podrien suggerir que en resposta a la despolarització es produiria un ràpid reclutament de BRSK1 a les terminals sinàptiques on podria contribuir a la maquinària d'alliberament de neurotransmissor. En aquest sentit, en el nostre laboratori s'ha identificat com a substrat de BRSK1 la proteïna syntaxina-1A (tesi doctoral de la Dra. Arantza Rodríguez). Aquesta proteïna és fosforilada per BRSK1 a la Ser 188, un residu que també és fosforilat per la quinasa DAP (*death-associated protein kinase*) i que podria regular l'estabilitat del complex SNARE mitjançant un mecanisme dependent de Ca^{2+} i l'activitat sinàptica (Tian et al., 2003). Així, la syntaxina-1A juntament amb RIM-1, Bassoon i Piccolo seria un dels substrats de BRSK1 present a les terminals sinàptiques (Inoue et al., 2006; Higa et al., 2007).

El reclutament de BRSK1 a la membrana observat després de l'estimulació aguda amb KCl només és parcialment inhibit per l'inhibidor de la palmitoilació 2-bromo-palmitat (2-BP) (**Fig. R11**). Això planteja diferents hipòtesis: la primera és que no s'aconsegueixi la inhibició total dels enzims palmitoil-transferases (PATs), fent així que en resposta al tractament, els enzims no inhibits fossin suficients per modificar les molècules de BRSK1 presents a la zona propera a la membrana. També podria ocórrer que addicionalment a la palmitoilació, BRSK1 estigués regulada per altres modificacions post-traduccionals, com la N-miristoilació o prenilació. Malgrat que en l'anàlisi *in silico* no es van detectar llocs putatius per aquestes modificacions, no podem descartar la seva presència. Aquestes modificacions només permeten una associació transitòria a la membrana (Shahinian and Silviu, 1995), però seria suficient per translocar la BRSK1 a la membrana on posteriorment podria ser palmitoilada i mantenir una localització particulada estable (**Caixa D1**).

Caixa D1: Palmitoilació, modificacions post-traduccionals i la membrana

L'àcid palmític és el principal àcid gras incorporat a cisteïnes, tot i que altres lípids com l'estearat (C18, saturat), palmitoleat (C16, insaturat) o l'oleat (C18, insaturat) també s'hi poden unir mitjançant enllaços tio-ester similars, (Liang et al., 2004).

Els enzims responsables de la palmitoilació són les anomenades palmitoil transferases (PATs), caracteritzades per diversos dominis transmembrana i un domini citoplasmàtic DHHC enriquit en cisteïnes. Les PATs localitzen a la membrana plasmàtica, reticle endoplasmàtic, Golgi, endosomes i vacuoles (Ohno et al., 2006). La presència de les PAT en membranes implica que els seus substrats també hi han de localitzar abans de ser palmitoilats. Així, moltes proteïnes abans de palmitoilar-se són modificades per altres tipus de prenilacions. Aquestes formes presenten una associació feble amb la membrana que un cop palmitoilades, es fa estable. Altres estudis suggereixen que la mateixa hidrofobicitat de les cisteïnes i leucines de les proteïnes augmenta la seva afinitat per la membrana, on les PATs les palmitoilarien (Greaves et al., 2008).

A més de l'associació a membrana, la palmitoilació s'ha relacionat amb altres modificacions post-traduccionals, com la ubiquitinació. Així, el reconeixement de certes proteïnes per E3 ubiquitina lligases només es realitza després de ser modificades per palmitoilació.

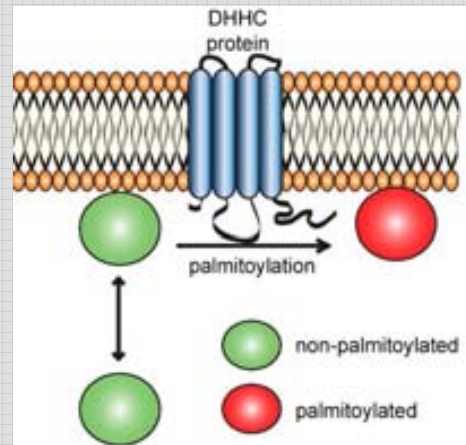


Figura extreta de: Salaun et al. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. JCB (2010)

Estudis del lloc de palmitoilació de BRSK1

Les evidències que BRSK1 està palmitoilada *in vivo* ens van portar a estudiar en quina de les 10 cisteïnes de la BRSK1 es produeix aquesta modificació. A l'hora de mutar les cisteïnes ens vam basar tant en la seva localització dins d'una seqüència consens (dades obtingudes amb el programa Css-Palm 3.0), com en la orientació de la cadena lateral dins l'estructura terciària de l'enzim obtinguda amb el programa I-TASSER. Així, es va començar amb les dues cisteïnes amb el millor compromís entre probabilitat i posició dins l'estructura terciària. La cisteïna 54 es troba en un *loop* totalment exposat al solvent, mentre que la cisteïna 217 era la que tenia millor *score* amb el programa Css-Palm 3.0. Mitjançant experiments de fraccionament subcel·lular es va observar que la proteïna mutada en aquestes dues cisteïnes també localitzava a membrana (**Fig. R13**).

La regulació per palmitoilació és complexa, en el sentit que en molts casos les molècules de palmitat es poden incorporar en més d'un residu de la proteïna diana, essent necessària la modificació de tots ells pel desplaçament a la membrana. És per aquest motiu que vam decidir aconseguir un mutant no palmitoilable, en el qual les 10 cisteïnes de BRSK1 van ser mutades a serina (**Fig. R14**). D'aquesta manera ens

asseguràvem que, en cas de que BRSK1 estigués palmitoilada en múltiples residus, no pogués ser modificada.

Per avaluar la importància de la palmitoilació de BRSK1 en la seva localització es va utilitzar l'assaig d'associació a membrana amb els diferents mutants de cisteïnes, mentre s'intentava posar a punt l'assaig ABE amb la proteïna sobreexpressada en cèl·lules 293T. Malauradament no es va aconseguir, fet que ens ha limitat en la determinació de l'efecte d'aquesta modificació en la fisiologia cel·lular. Una de les possibles causes que l'assaig no funcionés és la quantitat de proteïna sobreexpressada. Com hem comentat, la proteïna associada a la membrana és un 3-5% del total. Si això hi sumem que probablement només una petita part de BRSK1 en membranes està palmitoilada, potser els alts nivells de sobreexpressió emmascaren la fracció de quinasa modificada. Una de les variants que es va assajar, va ser realitzar l'assaig ABE a partir de preparacions de membranes pures, però no es va aconseguir immunoprecipitar gran quantitat de proteïna (requisit necessari per l'assaig), ja que per extreure-la es necessitava el detergent aniónic SDS.

Experiments futurs podrien anar dedicats a posar a punt l'assaig ABE en cèl·lules transfectades i prèviament estimulades amb agents despolaritzants, per mirar d'enriquir la fracció de BRSK1 palmitoilada. També mirar si es pot reproduir el reclutament a la membrana observat en la proteïna endògena en resposta a una despolarització en experiments anàlegs en proteïna sobreexpressada. En cas que sigui així, es podrien provar els mutants de cisteïna en aquest model. L'objectiu final seria trobar un mutant deficient en palmitoilació, per avaluar-ne la seva funcionalitat en la fisiologia de la neurona en diferents processos. Si s'aconseguís, es podrien generar constructes fusionats a la GFP i mesurar l'efecte en la modulació de l'activitat sinàptica en cultius primaris de neurones hipocampals, realitzant experiments similars als proposats per Inoue i col·laboradors (Inoue et al., 2006).

Palmitoilació i associació al lipid rafts

En molts casos, la palmitoilació de proteïnes correlaciona amb la localització d'aquestes en regions concretes dins la membrana. Així, molts treballs suggereixen la palmitoilació com una senyalització d'unió a *lipid rafts* (Brown, 2006). La peculiaritat dels *lipid rafts*, on s'acumulen molècules de colesterol i fosfolípids saturats que donen una rigidesa a la membrana, afavoreix la incorporació de lípids saturats com el palmitoil (**Fig. D1**).

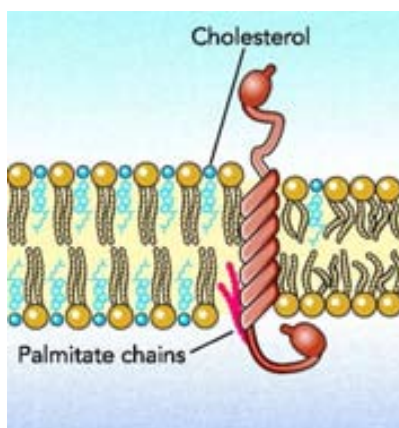


Fig. D1: Orientació de les cadenes de palmitoil als lipid raft. La palmitoilació és una modificació implicada en la localització de proteïnes al *lipid rafts*, que permetran l'acomodament de les cadenes saturades de palmitoil en l'ambient de compactació lípida d'aquests microdominis. Figura extreta de: Brown D. *Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals Physiology* (2006)

Els resultats exposat en el primer capítol d'aquest treball indiquen que BRSK1 està associada fortament a membrana, en dominis *lipid rafts*, i que aquest entorn lipídic modula positivament l'activitat de la quinasa (Rodríguez-Asiain et al., 2011). Per altra banda, BRSK1 està modificada per palmitoilació i l'activitat sinàptica promou el seu reclutament a membrana. Donades les evidències que els *lipid rafts* estan presents en vesícules sinàptiques (Martin, 2000; He et al., 2006), proposem un model en el que l'activitat sinàptica en neurones madures promouria la ràpida palmitoilació i reclutament de BRSK1 als *lipid rafts* de vesícules sinàptiques, on coincidiria en l'espai i el temps amb tota la maquinària necessària per a l'alliberament de neurotransmissors. L'ambient lipídic dels *rafts* modularia positivament l'activitat de la quinasa, permetent fosforilar eficientment diversos substrats (Fig D2).

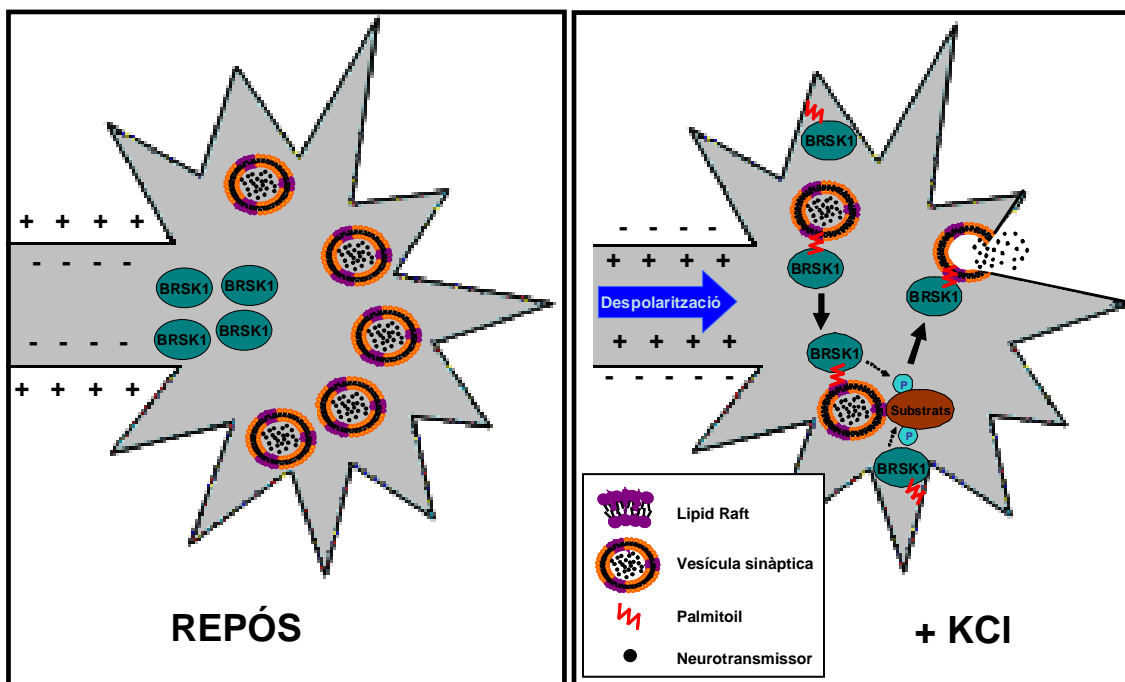


Fig. D2: Model de palmitoilació de BRSK1 en resposta a la despolarització induïda per KCl. En neurones en repòs, les BRSKs localitzarien al citoplasma de les terminals sinàptiques. Amb l'estímul despolaritzant, les BRSKs es palmitoilarien ràpidament i translocarien a les regions membranoses de les sinapsis o les vesícules sinàptiques, presumiblement als *lipid rafts*. Allí, podrien fosforilar i modular diferents substrats com RIM-1, Bassoon, Piccolo o

Unió de BRSK1 al sulfàtid

Estudis *in silico* amb algorismes de predicció utilitzant l'estructura primària indiquen que la BRSK1 no conté dominis transmembrana. La localització particulada de proteïnes a les que els manquen aquests dominis pot venir donada per diversos mecanismes. Algunes d'elles experimenten modificacions lipídiques com per exemple prenilacions, miristoilacions o palmitoilacions. Altres proteïnes, com és el cas de la PKB i la PDK1, tenen dominis d'associació a fosfolípids específics, que permeten l'anclatge a membrana i com a conseqüència l'accessibilitat d'enzims i substrats presents en ella. En la cerca de possibles lípids que interaccionessin amb les BRSKs, hem observat que tant BRSK1 com BRSK2 uneixen sulfàtid (**Fig. R16**). Conseqüentment amb aquesta observació, un estudi proteòmic dirigit a identificar proteïnes que uneixen lípids àcids va detectar BRSK1 com a candidat (Tsuji et al., 2010)

El glucoesfingolípid sulfàtid és una 3-O-sulfogalactosilceramida consistent en una molècula de galactosa amb un grup sulfat que li confereix càrrega negativa. La galactosa sulfatada en posició 3 està connectada a través d'un enllaç β glucosídic al grup hidroxil d'una esfingosina de 18 C (**Fig D3**). Al grup amino de la esfingosina s'hi poden unir cadenes d'àcid gras de diferents llargades, grau de saturació o hidroxilació, generant una varietat estructural específica de cada tipus cel·lular (Fredman et al., 2000; Isaac et al., 2006). També s'ha vist que la llargada de la cadena d'àcid gras determina la localització i orientació intracel·lular o extracel·lular de la molècula, amb la conseqüent variació en la seva funció (Isaac et al., 2006). Es coneix molt sobre el procés de síntesi del sulfàtid i ha estat relacionat amb diversos processos fisiològics i fisiopatològics (**Caixa D2**).

Fig. D3: Diversitat d'estructures del sulfàtid en funció de la cadena d'àcid gras. Estructura del sulfàtid, amb la galactosa sulfatada en posició 3, la esfingosina i possibles cadenes d'àcid gras acilades al grup amino de l'esfingosina.

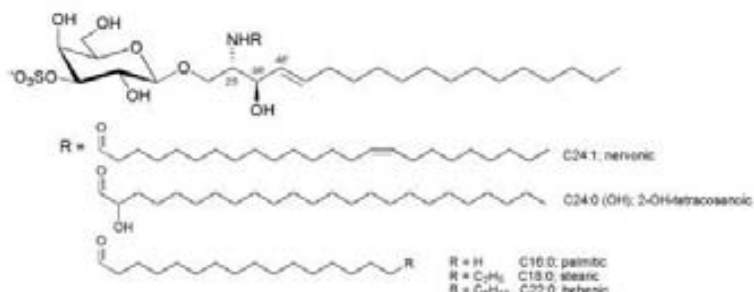


Figura extreta de: The mammalian sulfated glycolipid sulfatide: Synthesis and biological implications Compostella et al. CRC (2011)

D'especial rellevància és que BRSK1 només uneix el sulfàtid entre 26 lípids assajats, donant força a la hipòtesis que és una unió específica. L'abundància de residus bàsics en BRSK1 (pI 9,39) sumat a la càrrega negativa del cap sulfatat del lípid suggereix la importància de les propietats físico-químiques d'ambdues molècules per a la interacció. Malgrat tot, la BRSK1 no uneix altres lípids carregats negativament, com ho són els fosfoinositols (**Fig. R18**). Per determinar la importància de la càrrega, seria interessant veure si molècules de sulfàtid en les que els manca el grup sulfat uneixen a BRSK1 o si la posició del grup sulfat dins la molècula de galactosa és important en aquest procés. Així, l'estudi de lípids com la lactosilceramida 3-sulfat, el seminolipid o el lisoseminolipid, molècules molt semblants al sulfàtid però amb petites diferències en el cap glucídic o les cadenes d'àcid gras, ajudarien a caracteritzar els diferents determinants estructurals de l'unió entre la BRSK1 i el sulfàtid. En aquest sentit s'ha

descriu que els tres lípids esmentats són reconeguts per l'anticòs contra sulfàtid (*Sulphi*), però no la galactosilceramida o lactosilceramida, els equivalents no sulfatats del sulfàtid i la sulfolactosilceramida (Fredman et al., 1988).

Per últim, també seria interessant determinar l'afinitat de la BRSK1 per molècules de sulfàtid amb diferències en la composició de l'àcid gras, ja que els experiments exposats en aquest treball han estat realitzats a partir de barreja de sulfàtids purificats de cervell boví.

Amb tot, caldran més estudis per identificar els grups del sulfàtid amb els que interacciona BRSK1 i si té afinitat per un tipus concret de molècules d'aquest lípid.

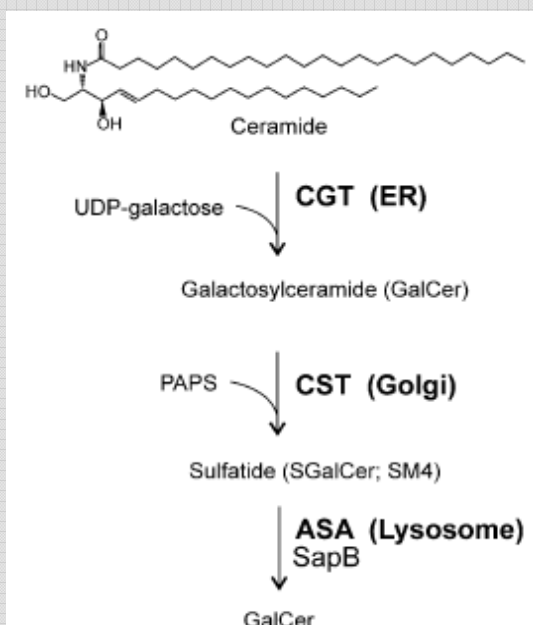
Caixa D2: Síntesi i funcions del sulfàtid

El sulfàtid es sintetitza al reticle endoplasmàtic per l'enzim CGT (UDP-galactosa:ceramida galactosiltransferasa) i posteriorment a l'aparell de Golgi per l'enzim CST (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfat:cerebròsid sulfotransferasa) (Benjamins et al., 1982), i que és degradat per l'enzim ASA (Arilsulfatasa A) als lisosomes. Les deficiències d'ASA provoquen acumulacions de sulfàtid a neurones i cèl·lules glials al sistema nerviós (Molander-Melin et al., 2004), a més de degeneració axonal i hiperexcitabilitat cortical en la malaltia d'emmagatzemament lisosomal leucodistrofia metacromàtica (Eckhardt et al., 2007). Recentment s'ha descrit que ratolins que sobreexpressen l'enzim CGT, moren per convulsions derivades de l'exposició a sons d'alta freqüència, degut a l'acumulació de sulfàtid en les membranes plasmàtiques de neurones (Van Zyl et al., 2010).

Al sistema nerviós, el sulfàtid està enriquit a la baina de mielina del sistema nerviós central i perifèric, on representa entre el 4 i el 6 % del lípids de la mielina (Norton et al., 1975), encara que també s'ha descrit en astròcits i en neurones (Berntson et al., 1998; Pernber et al., 2002; Isaac et al., 2006).

El sulfàtid actua com una molècula multifuncional, en processos biològics tant diversos com la secreció d'insulina, hemostàsies i trombosis, infeccions bacterianes i víriques i participant també al sistema immunitari i nerviós (Takahashi and Suzuki, 2012).

Les funcions del sulfàtid al sistema nerviós són varies tant en neurones com en cèl·lules glials, on actuaria com a regulador negatiu de la diferenciació i nombre d'oligodendròcits (Hirahara et al., 2004; Shroff et al., 2009) i participaria en el manteniment de la baina de mielina (Marcus et al., 2006).



Sandhoff i col·laboradors van establir les seqüències consens d'unió al sulfàtid com a XB₂XB₂X o XB₂XB₂X (B, aa bàsic; X, qualsevol aa) (Sandhoff et al., 2005). Les BRSKs presenten 5 *clusters* d'aminoàcids bàsics a la regió C-terminal, tres dels quals

corresponen a les seqüències consens descrites per a la fixació de sulfàtid. L'alineament de les seqüències de les dues quinases mostra que la posició d'aquests *clusters* està conservada, la qual cosa suggereix un patró de plegament similar. La regió SCR1 presenta 3 d'aquestes regions, dos de les quals són seqüències consens per a la fixació de sulfàtid, mentre que a la regió SCR2 n'hi ha dos, essent només una d'elles una seqüència consens (**Fig. R21**). Cal destacar que aquestes regions no estan conservades a la resta de membres de la família de les *AMPK-related kinases*.

Proteïna	Genbank	aa	pI	Regions amb seqüències consens	Regions amb seqüències bàsiques	Total regions bàsiques	Unió al sulfàtid
BRSK1	NM_032430	778	9,39	4	6	10	Forta
BRSK2	AAP97725.1	674	9,04	4	5	9	Forta
Sinaptobrevina 2	AAF15551.1	116	7,84	1	0	1	Forta
Munc18	NP_003156.1	603	6,32	3	4	7	Feble
MARK4	NP_001186796.1	752	9,70	4	4	8	Feble
Sintaxina 1A	AAA53519.1	288	5,14	3	1	4	No
PKB	AAL55732.1	480	5,74	1	1	2	No
ERK5	AAA81381.1	815	5,78	2	0	2	No

Taula D1: Propietats fisicoquímiques de les proteïnes assajades per a la unió al sulfàtid. La taula mostra el nombre d'aminoàcids (aa), el punt isoelèctric (pI) i el nombre de regions consens (XBXBXB o XBBXB) basant-nos en la definició donada per Sandhoff et al. (2005) de les proteïnes assajades per unió al sulfàtid. També es mostra el nombre d'altres regions fortament bàsiques però que no segueixen la seqüència consens i la suma de totes les regions bàsiques. A la segona columna es mostren els codis de les seqüències extretes del Genbank i al a última s'indica el grau d'unió al sulfàtid de les proteïnes assajades.

La **taula D1** mostra una correlació entre la presència de seqüències d'unió al sulfàtid i la capacitat d'unir el lípid en les diverses proteïnes assajades en aquest treball. Així veiem com sintaxina-1A, PKB o ERK5, que tenen poques seqüències consens d'unió al sulfàtid, no uneixen el lípid. Com a excepcions trobem la sinaptobrevina-2, que tot i només presentar una regió consens d'unió al sulfàtid, l'uneix amb molta afinitat (**Fig. R17**). Aquest fet pot ser explicat ja que sinaptobrevina-2 és una proteïna petita (116 aa), essent una regió bàsica suficient per unir al lípid. A l'extrem oposat trobem MARK4, que tot i tenir moltes regions bàsiques presenta una unió al sulfàtid baixa (**Fig. R16**). En aquest cas es pot veure que, a diferència de BRSK1/2, que contenen les regions bàsiques al domini C-terminal, MARK4 les conté al domini quinasa. L'estructuració d'aquest domini és vital per a la funcionalitat de la quinasa, essent poc probable que aquestes seqüències estiguin exposades i participin en la unió a lípids de membrana.

La unió de les BRSKs al sulfàtid no és sorprenent des del punt de vista fisicoquímic, ja que ambdues proteïnes són molt bàsiques, amb pI molt alts (9,39 per BRSK1 i 9,04 per BRSK2), el que suggereix que a pH fisiològic estaran fortament carregades positivament. En aquest sentit l'anàlisi de la unió al sulfàtid en funció de les propietats fisico-químiques de les diverses proteïnes assajades en aquest treball indica que totes les que no uneixen sulfàtid tenen un punt isoelèctric baix (per sota de 6), mentre que les que l'uneixen amb diferent afinitat comparteixen un pI elevat (**Taula D1**)

Al avaluar la interacció del sulfàtid amb els fragments N i C terminal de BRSK1 s'observa que la unió al lípid es dona només al domini C-terminal (aa 296-778) (**Fig. R19 i R20**). Dins d'aquest domini trobem les dues zones conservades SCR (*short conserved regions*), per la qual cosa vam decidir generar constructes que únicament expressessin aquestes regions i testar la seva habilitat per unir sulfàtid. SCR2 és el domini que uneix sulfàtid amb més afinitat, mentre que l'SCR1 ho fa feblement (**Fig. R19 i R20**). Com que la regió SCR1 conté el domini d'unió a ubiquitina UBA, es va generar un constructe que només codifiqués per aquest domini. En els assajos realitzats no es va observar fixació del sulfàtid al domini UBA. Aleshores, per identificar els residus responsables de la fixació del sulfàtid dins de SCR1 i 2, es van generar mutants d'algunes regions bàsiques, on els aminoàcids lisina i arginina es van canviar a glutamina per tal de neutralitzar les càrregues positives (**Fig. R21**). En el cas de l'SCR2 la mutació de les dues regions bàsiques resulta en una pèrdua total de la fixació al lípid. Ja que només una de les regions correspon a la seqüència consens, seria interessant fer el mutant individual d'aquesta regió per tal de determinar si és la única responsable de la fixació del sulfàtid. Pel que fa l'SCR1, de les tres seqüències bàsiques presents en aquesta regió, es van mutagenitzar les dues corresponents a les seqüències consens d'unió al sulfàtid. Malgrat que aquestes dues seqüències estan localitzades dins del domini UBA i aquest no uneix a sulfàtid, es va considerar la possibilitat que la manca d'unió fos deguda a un mal plegament quan aquest domini s'expressa sense la resta de la regió SCR1. Els resultats mostren que la mutació d'aquest dos *clusters* de residus bàsics és suficient per a eliminar la fixació al sulfàtid del domini SCR1. Els resultats posen de manifest que la principal regió d'unió a sulfàtid és el domini SCR2 i suggereixen que en la proteïna plegada aquests residus formarien una butxaca amb càrrega positiva on s'uniria el cap negatiu del sulfàtid

Els primers experiments en la caracterització de la unió BRSK1-sulfàtid es van realitzar utilitzant el *lipid-protein overlay assay*. Aquesta tècnica permet una caracterització qualitativa i quantitativa de la unió de proteïnes a lípids. Malgrat tot, els lípids immobilitzats en les membranes de nitrocel·lulosa són homogenis, és a dir, no es troben associats a altres lípids com ocorre a les bicapes lipídiques. Amb l'objectiu de fer un assaig més proper a les condicions fisiològiques es va realitzar l'assaig d'unió a liposomes, on les proteïnes recombinants s'incuben amb liposomes constituïts per diferents combinacions de lípids. Aquesta tècnica va donar idèntics resultats per totes les proteïnes assajades (**Fig. R20**), la qual cosa confirma que BRSK1 interacciona amb el sulfàtid present a bicapes lipídiques, un entorn més similar al que pugui tenir dins la cèl·lula. La reproductibilitat observada entre ambdues tècniques permet afirmar que la cua C-terminal de BRSK1 és la principal responsable de la unió al sulfàtid, possiblement a través de la regió SCR2 i en menor mesura, SCR1.

Estudis de modulació de l'activitat de BRSK1 per sulfàtid *in vitro*

Anteriorment al nostre laboratori hem demostrat que l'entorn lipídic dels *lipid rafts* incrementa l'activitat de BRSK1 en assajos d'activitat quinasa *in vitro* (Rodríguez-Asiain et al., 2011). No obstant, l'activació amb vesícules extrems de *lipid rafts* és superior a l'observada amb vesícules artificials generades amb els principals components dels *lipid rafts*: esfingomièlina, fosfatidilcolina i colesterol. La presència de sulfàtid en *lipid rafts* s'havia descrit anteriorment (Ohta et al., 1999), i nosaltres em

corroborat aquesta observació utilitzant un anticòs contra sulfàtid en extractes lípidics extrets de fraccions *raft* i fraccions *no raft* (**Fig. R29**). Per altra banda el sulfàtid modula l'activitat *in vitro* d'altres quinases amb seqüències consens d'unió al lípid, com és el cas de la GSK3 β (Kawakami et al., 2008b), la CK1 (Kawakami et al., 2008a) o nPKC ϵ (Suzuki et al., 2009). En aquests treballs, l'addició de molècules de sulfàtid lliure a l'assaig quinasa modula la seva activitat. Tot això junt amb el fet que la BRSK1 interacciona específicament amb el sulfàtid ens va portar a considerar que la presència de sulfàtid en vesícules lipídiques artificials podria augmentar l'activitat BRSK1 fins als nivells assolits amb les vesícules formades a partir d'extractes de *lipid rafts*.

En efecte, la incubació de BRSK1 amb liposomes que contenen sulfàtid resulta en un augment tant la seva autofosforilació com la fosforilació del seu substrat Tau *in vitro* (**Fig. R23**). Això suggereix que el sulfàtid, a més de fixar la BRSK1 a una regió específica de la membrana, podria actuar com a modulador positiu al·lostèric de l'activitat quinasa, probablement induint un canvi conformacional que resulta en una quinasa més activa. Experiments realitzats al laboratori demostren que les molècules de BRSK1 es fosforilen en trans (trans-fosforilació). Per tant, una altra possibilitat seria que els efectes observats fossin deguts a l'apropament de les molècules de BRSK1 com a conseqüència de la seva unió al lípid. Ja que tau també s'uneix feblement al sulfàtid (**Fig. R24**), això explicaria tant l'augment de l'autofosforilació de BRSK1 com l'augment de la fosforilació de Tau a la S262.

És interessant remarcar que el sulfàtid regula l'activitat quinasa de BRSK1 però no la seva activació per LKB1 (**Fig. R25**). Aquest resultat era esperable ja que LKB1 no uneix sulfàtid ni presenta localització particulada, ni en membrana ni en orgànuls intracel·lulars. Tot i que s'ha trobat que LKB1 està farnesilada a la Cys433 cua C-terminal (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001), això no sembla estar relacionat amb una possible localització a la membrana, ja que variants *d'splicing* de la quinasa en les que no es conserva el lloc de farnesilació localitza de forma similar a la variant sencera (Denison et al., 2009).

Implicacions de la unió BRSK1 al sulfàtid

Quin paper fisiològic té la unió de BRSK1 al sulfàtid? Com hem comentat, les funcions d'ancatge a membrana i de modulació de l'activitat són les hipòtesis més factibles.

Les BRSKs són proteïnes que es troben majoritàriament expressades al cervell i en menor mesura en pàncrees (Kishi et al., 2005; Inoue et al., 2006; Chen et al., 2012). En aquest treball també demostrem que dins del cervell, no només es troben en neurones, on són molt abundants, sinó també en menor mesura a gran varietat de tipus gials, com oligodendròcits, astròcits i microglia (**Fig. R28**). Malgrat tot, no es coneix res del paper que les BRSKs puguin tenir a la glia. Com que el sulfàtid localitza majoritàriament a la mielina, seria interessant avaluar la funcionalitat que pugui tenir el tàndem BRSKs-sulfàtid en cèl·lules gials productores de mielina.

Tampoc es pot descartar la hipòtesis que les BRSKs uneixin i siguin modulades pel sulfàtid en altres tipus cel·lulars. Recentment BRSK2 s'ha relacionat amb la funció de secreció d'insulina en resposta a increments de glucosa en sang (GSIS) (Nie et al., 2012; Nie et al., 2013). Tot i això, es coneix poc de la regulació i localització de BRSK2 al pàncrees. El sulfàtid està present en les cèl·lules pancreàtiques productores d'insulina i augmentos i disminucions del contingut d'aquest lípid afecten a la capacitat secretora

de la hormona en aquestes cèl·lules (**Caixa D3**) (Buschard et al., 2002). Donat que BRSK2, de igual manera que BRSK1, uneix fortament al sulfàtid, seria interessant estudiar la relació entre BRSK2 i aquest lípid en models pancreàtics.

Caixa D3: Sulfàtid i control de l'alliberació d'insulina al pàncrees

El procés d'alliberament d'insulina promogut pels nivells de glucosa en sang (GSIS) està determinat pel balanç de ions dins i fora de les cèl·lules β -pancreàtiques, essent necessària una estreta regulació dels canals que regulen aquest equilibri. El sulfàtid participa en la regulació de la GSIS a dos nivells i de manera oposada: per una banda promou la obertura dels canals de K^+ depenents d'ATP, amb la conseqüent inhibició del procés (Buschard et al., 2006). Per possibilitar la secreció d'insulina és necessari que aquests canals quedin bloquejats, per aconseguir despolaritzar la cèl·lula. Això permetrà la obertura dels canals de Ca^{2+} dependents de voltatge, que portarà a la secreció d'insulina. En canvi, un cop la cèl·lula s'ha despolaritzat i els canals de Ca^{2+} dependents de voltatge s'han obert, el sulfàtid ajudaria a l'alliberament de vesícules, promovent la fusió dels grànuls secretors amb la membrana plasmàtica (Buschard et al., 2002)

La implicació del sulfàtid en aquest procés queda palesa en la clínica, ja que s'han trobat anticossos contra el sulfàtid en molts pacients amb diabetis tipus I, on actuaria com a autoantigen (Buschard et al., 1993) i el tractament amb sulfàtids o els seu precursor galactosilceramida, prevé significativament la diabetis en ratolins (Buschard, 2001; Blomqvist et al., 2003a; Subramanian et al., 2012). La quantitat, distribució i composició dels sulfàtids dins les cèl·lules pancreàtiques està relacionat amb la diabetis tipus I i II (Blomqvist et al., 2003b; Buschard et al., 2005)

Per altra banda, s'hauria de corroborar *in vivo* la regulació de l'activitat BRSK1 per sulfàtid observada *in vitro*. Per fer-ho, seria interessant mirar l'associació a membrana i l'activitat de la quinasa en ratolins amb alts i baixos nivells de sulfàtid. Fins al moment s'han descrit diferents models murins amb nivells de sulfàtid alterats, deleccionant o sobreexpressant els enzims productors (CGT i CST) o l'enzim degradador del sulfàtid (ASA). Aquests animals presenten defectes tant en neurones com en cèl·lules gials. Per exemple, el ratolí *knock-out* de CST, que pot produir el precursor del sulfàtid GalC, però no sulfàtid, presenta degeneració de la mielina com defectes en l'estructura axonal en ratolins adults (Marcus et al., 2006). En oligodendròcits en cultius, l'addició de liposomes amb sulfàtid sembla modular el citoesquelet, causant la despolimerització de microfilaments d'actina i microtúbuls (Boggs and Wang, 2001) així com participar en la regulació vies de transducció de senyal amb proteïnes com MAPK, Rho GTPases i GSK3 β (Boggs et al., 2008). La inhibició de la síntesi del sulfàtid també s'ha demostrat que evita la correcta ubicació de molècules promotores del creixement axonal, com NCAM L1 (Velasco et al., 2013). Amb tot, es demostra que el sulfàtid actua com a molècula senyalitzadora de diversos processos, alguns d'ells en què l'activitat de les BRSKs s'ha vist que hi juga un paper, com en la formació de l'axó i en el seu manteniment, per mitjà de la regulació dels microtúbuls.

En resum, el sulfàtid pot ser un bon candidat per a la regulació de la localització i de la modulació de l'activitat quinasa de les BRSKs en els diferents tipus neuronals i gials.

Estudis de cristal·lització del domini SCR2 de BRSK1

A dia d'avui es desconeix l'estructura tridimensional de les BRSKs. Donada l'alta homologia del domini quinasa amb altres *AMPK-related kinases* es pot tenir una idea de com està estructurat aquest domini. Es coneixen la estructura tridimensional de la subunitat catalítica d'AMPK (Xiao et al., 2011) i del domini quinasa i UBA de les MARK1/2 (Panneerselvam et al., 2006; Marx et al., 2006) com a úniques estructures de quinases de la mateixa família de les BRSKs. Malgrat tot, l'interès principal d'aquesta família són les seves regions C-terminal, ja que gràcies a elles aquestes quinases participen en gran diversitat de processos i tenen diferents localitzacions i associacions amb altres proteïnes. Al nostre laboratori ens vam plantejar resoldre l'estructura tridimensional de la regió SCR2 de BRSK1 mitjançant el seu estudi cristal·logràfic. Els motius pels quals vam estudiar aquesta regió van ser:

1) Ha estat descrit com la regió responsable pel patró puntuat de BRSK1 en neurones hipocampals en cultiu, així com a regió important en la funció d'alliberament de neurotransmissors (Inoue et al., 2006).

2) Dels resultats obtinguts al laboratori, l'SCR2 és la regió que uneix sulfàtid amb més afinitat, suggerint funcions importants en l'associació de BRSK1 amb aquest lípid.

3) Al expressar en cèl·lules bacterianes fragments de BRSK1 que contenen la cua C-terminal o aquesta regió (aa 296-778), es generen molts fragments de degradació (**Fig. R19**). En canvi, al expressar el fragment SCR2 – que es troba dins d'aquesta regió – s'obté sencer, suggerint que pot actuar com a domini dins BRSK1.

La primera intenció va ser cristal·litzar l'SCR2 sense cap "tag" proteic adherit, però al resultar impossible per les diverses dificultats metodològiques exposades als resultats, es va decidir purificar-ho fusionat a His-SUMO. Tot i la òbvia desavantatge de no tenir el fragment sol, aquesta estratègia presenta certes avantatges com: 1) Aconseguim obtenir el domini His-SUMO-SCR2 pur i amb altres quantitats; 2) Millorem substancialment la solubilitat del fragment en diferents tampons; 3) SUMO forma cristalls i l'estructura tridimensional és coneguda i 4) En cas d'obtenir un cristall, es facilitaria la obtenció de l'estructura cristal·logràfica del domini SCR2, ja que es solventaria el problema de la fase, per determinar la posició dels àtoms i les distàncies dins la molècula, ja que es coneixen aquests paràmetres per la molècula de SUMO.

Fins al moment s'han utilitzat diferents aproximacions metodològiques i s'han assajat diferents condicions amb rangs de pH des de 4 a 10, diferents percentatges i tipus del precipitant polietilenglicol (PEGs) i diferents sals i tampons a diferents concentracions (Veure **taula M12** a l'apartat Material i Mètodes). Al no observar cristalls, s'haurà de canviar l'estratègia. En aquest sentit, caldria realitzar aquests estudis en presència del lligant. Ja que la regió SCR2 uneix sulfàtid, seria interessant realitzar els assajos de cristal·lització de l'SCR2 en presència de sulfat, 3-sulfo-galactosa o de sulfàtid.

Amb tot, la resolució de l'estructura permetrà definir un nou domini proteic d'unió a lípids.

Ubiquitinació de les BRSKs

La ubiquitinació és un dels principals mecanismes que regulen els nivells de proteïna en cèl·lules eucariotes. En molts casos aquests nivells oscil·len en regions cel·lulars concretes amb l'objectiu de respondre a requeriments espacio-temporals específics. Això s'ha observat en processos regulats per les BRSKs, com són la polarització neuronal o el cicle cel·lular. La ubiquitinació de proteïnes de la família de les BRSKs modula la seva activitat i la capacitat d'LKB1 per fosforilar-les (Al-hakim et al., 2008). Així també s'ha observat que la ubiquitinació de les BRSKs en regularia la seva estabilitat i disponibilitat en diversos processos (Zhou et al., 2012; Li et al., 2012).

Donat el paper de la via LKB1/BRSKs en la polarització neuronal, en el present estudi s'ha estudiat la regulació dels nivells de les BRSKs per tres E3 ubiquitina lligases implicades en aquest procés: Trim2, Smurf1 i Smurf2.

La majoria dels estudis s'han realitzat en cèl·lules HEK293 donada la dificultat de fer experiments de sobreexpressió en neurones. Es va constatar que en aquest tipus cel·lular tant la BRSK1 com la BRSK2 són degradades pel sistema ubiquitina proteasoma, com ho demostra l'acumulació d'espècies ubiquitinades d'alt pes molecular que s'acumulen en presència del inhibidor del proteosoma MG 132 (**Fig. R34**).

Trim2 pertany a la família de ubiquitina lligases TRIM (*tripartite motif*), que participen en una gran varietat de funcions cel·lulars, com és el cas de la neurodegeneració (Balastik et al., 2008), neuroprotecció en resposta a isquèmia (Thompson et al., 2011) i la polarització neuronal (Khazaei et al., 2011). En aquesta última funció, TRIM2 controlaria la maquinària de regulació del citoesquelet necessària per a l'especificació axonal, fent-la una bona candidata de regular els nivells de BRSK1. No obstant, en experiments on s'ha sobreexpressat aquesta lligasa no s'ha observat ubiquitinació de les BRSKs (**Fig. R36**).

Pel que fa a Smurf2, és una lligasa que participa en la polaritat neuronal ubiquitinant la GTPasa Rap1B, promovent així l'extensió d'un sol axó (Schwamborn et al., 2007b; Schwamborn et al., 2007a). A més, Smurf2 té altres funcions, com el control dels nivells d'alguns components de la via TGF β -Smads (Inoue and Imamura, 2008) o la regulació de l'adhesió, migració i invasió cel·lular (Jin et al., 2009). Aquesta lligasa té la capacitat d'ubiquitinar a BRSK1 però no a BRSK2 (**Fig. R36**).

La influència de la lligasa Smurf1 en el procés de polarització neuronal s'observa a dos nivells: en neurones indiferenciades Smurf1 desestabilitzaria els complexos Par6/Par3/aPKC via ubiquitinació i la posterior degradació de Par6. En aquestes condicions, la GTPasa RhoA es troba en forma activa i estabilitza els filaments d'actina impeding així la neuritogènesis. En resposta a increments localitzats d'AMPc les neurones inicien la transició de l'estadi 2 a 3, moment en el que especifiquen l'axó. L'increment d'AMPc intracel·lular es tradueix en un augment en l'activitat de la PKA. Un cop activada, la PKA fosforila a Smurf1 a la Thr306 provocant un canvi en la seva especificitat de substrat. En aquestes condicions Smurf1 deixa d'ubiquitinar Par6 i passa a ubiquitinar RhoA. Amb això s'aconsegueix l'acumulació de Par6 així com la degradació de RhoA a la neurita que esdevindrà axó (Cheng et al., 2011). En aquesta neurita es donarà una acumulació dels complexos Par6/Par3/aPKC que actuaran com a plataforma d'unió de tots els mediadors de l'especificació de l'axó. Així veiem com

Smurf1, en funció de l'estadi de desenvolupament neuronal, actua inhibint o promovent el creixement neurític (**Fig. I10**).

Els resultats obtinguts al laboratori demostren que Smurf1 és capaç d'ubiquitinar tant BRSK1 com BRSK2 (**Fig. R36**).

Per tal de demostrar que BRSK1 és un substrat de Smurf1 es van utilitzar diferents aproximacions experimentals. Les evidències que donen suport a aquesta hipòtesis són les següents:

1. La sobreexpressió de Smurf1 en cèl·lules HEK293 indueix la ubiquitinació de BRSK1 (**Fig. R36**).
2. La sobreexpressió de Smurf1 provoca la degradació tant de la forma endògena de BRSK1 com de formes sobreexpressades (**Fig. R37 i R38**).
3. El mutant d'Smurf1 C699A deficient en activitat lligasa és incapaç d'ubiquitinar BRSK1 i d'induir la seva degradació (**Fig. R39**).
4. BRSK1 co-precipita amb la forma inactiva de Smurf1 C699A (**Fig. R40**).
5. La degradació de BRSK1 per Smurf1 es veu potenciada per la co-expressió d'Ubch5, una E2 lligasa específica d'Smurf1 (**Fig. R42**).
6. En assajos d'ubiquitinació *in vitro*, Smurf1 ubiquitina a BRSK1 (**Fig. R45**).

És interessant observar que, com passa en el cas de les BRSKs, els ratolins doble *knock-out* per a les lligases Smurf1 i Smurf2 són letals, mentre que la delecció de només una d'elles resulta en ratolins viables, fèrtils i que neixen seguint les freqüències mendelianes esperades. Això suggereix que una proteïna podria suplir la funció de l'altre en cas de ser absent, adquirint un paper que en condicions normals no jugaria.

Els ratolins *knock-out* Smurf1^{-/-}/Smurf2^{-/-} presenten defectes en la polaritat de cèl·lules de la còclea i són incapaçs de tancar el tub neural, morint entre el dia embrionari E10.5 i E12.5 (Narimatsu et al., 2009). Això, conjuntament amb les deficiències en polaritat dels ratolins doble KO de les BRSKs, suggereix que els dos tipus de proteïnes són vitals en l'especificació de la morfologia cel·lular. Amb les nostres dades, seria interessant estudiar si el control dels nivells de les BRSKs en diferents estadis del desenvolupament vindrien regulats per les lligases Smurfs, actuant coordinadament per permetre la polarització de diferents tipus cel·lulars durant l'embriogènesi.

Control de la polaritat neuronal: Smurf1 i BRSKs

Com s'ha mencionat anteriorment la fosforilació de Smurf1 a la treonina 306 per la PKA provoca un canvi en l'especificitat de substrat d'aquesta E3 ubiquitina lligasa. Així quan es sobreexpressen diverses formes de Smurf1 mutades en aquest residu en models de neurones tant *in vitro* com *in utero* s'observen diferents fenotips. Mentre que la forma salvatge indueix la polarització i l'orientació correcta de les neurones dins les capes del cervell, el mutant BRSK1 (T306D) on la treonina ha estat substituïda per un àcid aspàrtic que mimetitzava la fosforilació per la PKA resulta en un fenotip en el que les neurones s'orienten correctament dins del còrtex cerebral, però són "multipolars", és a dir amb més arborització de neurites llargues. Conseqüentment, en cultius de neurones hipocampals electroporades amb aquest mutant, augmenta considerablement el nombre de neurones multiaxòniques. Pel

contrari, al sobreexpressar el mutant de Smurf1 deficient en la fosforilació per PKA (T306A), les neurones presenten un fenotip amb neurones incapaces de polaritzar i defectes en la migració a través de les diverses capes corticals. Aquest últim fenotip, és molts similar al observat amb el mutant de Smurf1 deficient en la seva activitat lligasa (Smurf1 C699A) (Cheng et al., 2011).

La modulació de la lligasa Smurf1 per PKA no és exclusiva del control de la polaritat neuronal. Per exemple, en el cas del receptor nuclear Nur77, on la fosforilació per la JNK regula la translocació a mitocòndria (Moll et al., 2006) així com promou la seva inestabilitat, la forma fosforilada de Smurf1 bloqueja la degradació de Nur77 a través de mecanismes d'ubiquitinació no convencionals. Alguns tractaments antitumorals com per exemple la cisplatina, utilitzen entre d'altres aquest mecanisme per desencadenar la resposta apoptòtica (Lin et al., 2013).

En aquest treball es demostra que l'especificitat de Smurf1 per la BRSK1 depèn de l'estat de fosforilació de Smurf1 a la Thr306. Així, mentre la sobreexpressió del mutant no fosforilable de Smurf1 T306A promou la degradació de la BRSK1, la sobreexpressió del mutant fosfomimètic T306D no altera els nivells de BRSK1 (**Fig. R46**). Per altra banda, el tractament amb un l'anàleg no hidrolitzable del AMPc (db-AMPc) en cèl·lules en les que s'ha expressat la forma salvatge de Smurf1, restaura els nivells de la BRSK1 (**Fig. R47**).

Com hem comentat anteriorment, durant el procés de polarització neuronal la PKA fosforila a LKB1 en la S431, la qual s'acumula a l'axó (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). Això permetria la co-localització a l'axó de la forma fosforilada de LKB1 i BRSK1. De fet, la tinció de neurones hipocampals en cultiu amb l'anticòs contra les BRSKs fosforilades al *T-loop* revela que aquestes quinases co-localitzen amb el marcador axònic Tau1 (**Fig. R48**).

És interessant remarcar que durant la polarització neuronal RhoA també és fosforilat per PKA (Lang et al., 1996). Aquesta fosforilació promou la unió de RhoA al GDI (veure **caixa D5**), fent que quedi segregada al citosol i per tant inactivada, requisit necessari pel creixement axònic (Jeon et al., 2012). A més, la senyalització per PKA també fosforila i inactiva a Lfc, un Rho-GEF activador de RhoA (Meiri et al., 2009).

L'activació localitzada de la via AMPc-PKA només ocorreria a l'axó i no a les dendrites. Així, estudis amb semaforina 3A (Sema3A), un factor que guia i orienta les neurones durant la migració, s'ha vist que promou el creixement dendrític a l'hora que inhibeix el creixement axònic. Per fer-ho, s'ha vist que disminueix els nivells de cAMP a les dendrites -disminuint l'activitat PKA- amb la consegüent reducció de la fosforilació sobre determinants axonals com LKB1 (Shelly et al., 2011).

Els nostres resultats suggereixen que la via AMPc-PKA regula els nivells de BRSK1 a l'axó a través de la ubiquitinació per Smurf1. Així, proposem un model en el que les BRSKs serien degradades per Smurf1 en neurones no polaritzades, mentre que en el moment de la transició de l'estadi 2 al 3, l'augment localitzat d'AMPc en una neurita determinada permetria l'activació de PKA, que al seu torn fosforilaria els següents substrats:

1. RhoA a la S188, inactivant la GTPasa i inhibint-ne la funció (Jeon et al., 2012).
2. Smurf1 a la T306, canviant l'especificitat de Par6 i BRSK1 a RhoA (Cheng et al., 2011).
3. LKB1 a la S431, acumulant-la a l'axó (Shelly et al., 2007; Barnes et al., 2007).

Tot junt faria que BRSK1 co-localitzés amb LKB1 a l'axó, on seria activada per fosforilació (**Figura D4**).

L'objectiu futur consistirà en comprovar que les dades obtingudes en cèl·lules 293T també es poden reproduir en models neuronals, tot i que això suposi diverses dificultats metodològiques, com la baixa transfecció de cultius neuronals, la difícil expressió de proteïnes en estadis primerencs de diferenciació i temps/cost d'aquests models.

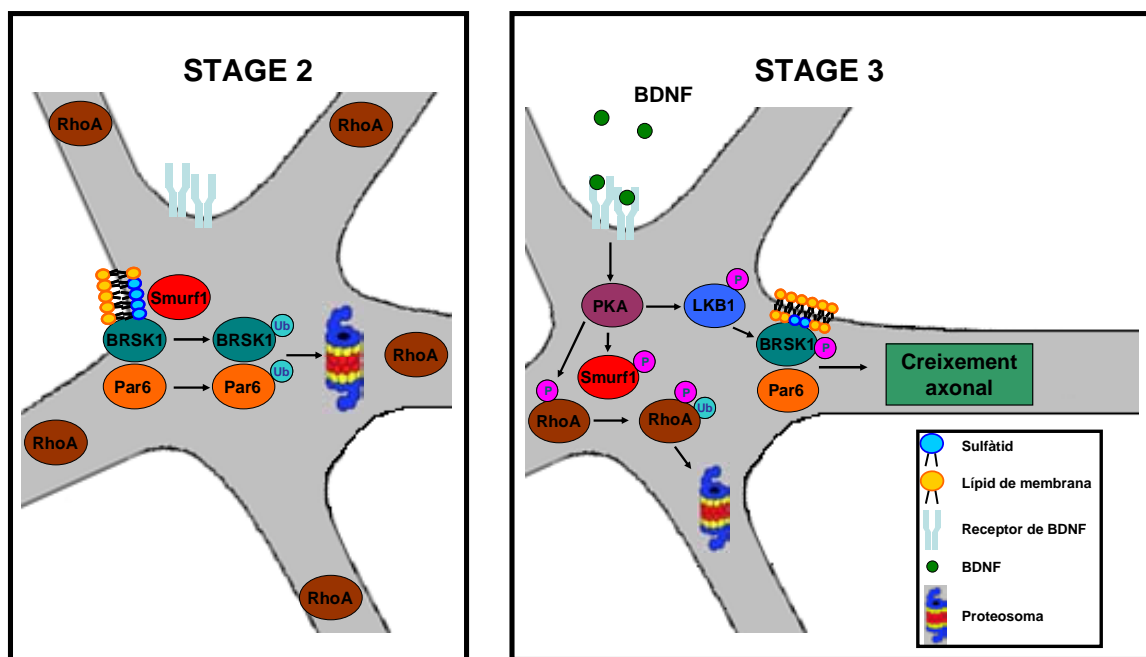


Fig. D4: Model de polarització neuronal induït per l'activació de la PKA. En neurones en estadi 2, l'activitat RhoA impediria la formació de l'axó, a l'hora que les BRSKs i Par6 serien ubiquitinades per Smurf1 i posteriorment degradades. En resposta a l'activació de receptors de neurotrofines, els nivells d'AMPC s'incrementarien localment actuant a diversos nivells: RhoA seria fosforilada, inactivada i retinguda al citosol, a l'hora que Smurf1 fosforilada per PKA, deixaria d'ubiquitar i promouria la degradació local de les BRSKs i Par6 i promouria la degradació de RhoA. La senyalització per PKA també afectaria la fosforilació a la S431 d'LKB1 que co-localitzaria i fosforilaria a les BRSKs al T-loop a la regió axònica.

BRSKs i la dinàmica del citoesquelet

Durant molts anys s'ha estudiat el fenomen de polarització neuronal utilitzant models *in vitro* i *in vivo*. Gràcies a aquests models, s'han identificat gran quantitat de molècules que participen en l'establiment d'axons i dendrites, com quinases, fosfatases, GTPases petites o proteïnes *scaffold*. Habitualment defectes en la polarització correlacionen amb canvis característics en la organització i dinàmica del citoesquelet (**Caixa D4**). Una grup de proteïnes que controla la organització de microtúbuls són les anomenades MAP (*microtubule-associated proteins*). Les famílies de proteïnes MAP2 i Tau són conegudes per la seva habilitat d'interaccionar i establir els microtúbuls (Hirokawa et al., 1988; Al-Bassam et al., 2002). Tau promou la polimerització de la tubulina (Weingarten et al., 1975), a més de prevenir la seva inestabilitat dinàmica al unir-se als microtúbuls (Drechsel et al., 1992). Tau és una proteïna de 441 aminoàcids que consta de 79 residus de serina o treonina susceptibles de ser fosforilats. En neurones s'ha vist que gran varietat de quinases fosforilen Tau, en

residus concrets i en regions específiques de la neurona. Algunes d'elles són GSK3, CDK5, p38, JNK, PKA, PKC, CAMKII o MARKs (Ávila et al., 2004).

Caixa D4: Organització i dinàmica del citoesquelet en axons i dendrites

Per assolir l'eix axó dendrita és necessari que diversos factors actuïn conjuntament en el remodelament del citoesquelet. Els microtúbuls i els filaments d'actina són els principals responsables de la citoestructura cel·lular.

Els **microtúbuls** són heterodímers de α i β -tubulina agrupats en protofilaments lineals. Cada microtúbul consta d'agrupacions de 10-15 protofilaments formant cilindres de 24 nm de diàmetre. Els microtúbuls són estructures polars i dinàmiques. Així, en un extrem la γ -tubulina serveix com a motlle per formar el microtúbul i a l'extrem oposat es produeixen cicles de polimerització/despolimerització constants amb intercanvis de GTP/GDP.

És interessant observar com existeixen diferències entre els microtúbuls d'axons i dendrites. Els microtúbuls en axons estan tots orientats amb la zona activa de polimerització encarada a la punta de l'axó, mentre que en les dendrites aquestes zones estan orientades tant cap a l'exterior, com cap al cos cel·lular. A més, ambdós processos difereixen amb les seves MAP (*microtubule-associated proteins*), essent principalment MAP2 en dendrites i Tau a l'axó.

L'altre responsable de l'especificació axònica són els **filaments d'actina**, que es troben a la punta de les neurites i al con de creixement axònic, i són els responsables de la formació de fil·lopodis i lamel·lipodis.

Com participen els microtúbuls i els filaments d'actina en el reordenament el citoesquelet necessari per a l'especificació axonal? L'assemblatge i estabilització dels microtúbuls en una neurita és un senyal fisiològic per iniciar el procés (Witte et al., 2008). En una primera etapa, hi ha una polimerització de l'actina amb l'elongació de fil·lopodis i formació de lamel·lipodis, processos que ocupen gran part del con axònic. Posteriorment els filaments d'actina es desassemblen, formant una cavitat per on els microtúbuls polimeritzaran i creixeran direccionalment (Schaefer et al., 2008). La mateixa estructura del microtúbul servirà posteriorment com a canal pel transport de diverses molècules, entre elles de nova tubulina, a la punta del futur axó.

En canvi, a les neurites que esdevindran dendrites, la dinàmica del citoesquelet és més estàtica i el citoesquelet d'actina més rígid i compacte (Bradke and Dotti, 1999).

Així, els filaments d'actina regularien la forma i la direcció del creixement mentre que els microtúbuls participarien en l'estructura i l'extensió de l'axó.

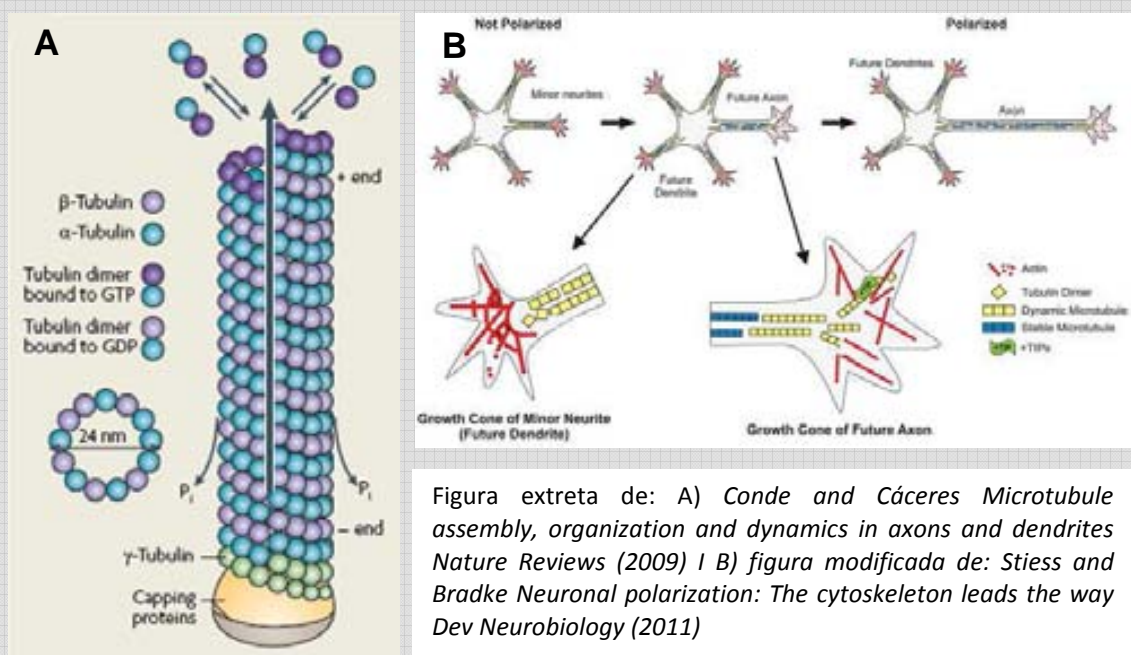


Figura extreta de: A) Conde and Cáceres *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites Nature Reviews* (2009) I B) figura modificada de: Stiens and Bradke *Neuronal polarization: The cytoskeleton leads the way Dev Neurobiology* (2011)

- 2) La fosforilació de Tau a la S262 i la capacitat d'induir la polimerització de la tubulina *in vitro* per part de les BRSKs és molt menor que la produïda per altres quinases de la mateixa família, com MARK1 o SIK (Yoshida and Goedert, 2011).
- 3) Altres quinases de la família de les BRSKs, com MARK2, fosforilen a Tau a la S262 *in vivo* i són inhibides durant el procés de polarització neuronal (Chen et al., 2006).
- 4) En immunocitoquímiques de neurones hipocampals en cultiu la forma fosforilada de Tau a la S262 es detecta en dendrites (Kishi et al., 2005), mentre que les BRSKs actives localitzen a l'axó (Barnes et al., 2007).
- 5) La fosforilació de Tau a la S262 promou la seva separació dels microtúbuls, amb el conseqüent augment de la seva inestabilitat d'aquests (Drewes et al., 1995). Durant el procés de polarització neuronal es busca l'efecte contrari, amb un augment de l'estabilitat dels microtúbuls a la neurita que esdevindrà axó.

Amb tot, la fosforilació de la S262 de Tau per part de les BRSKs en el procés de l'especificació de l'axó sembla poc probable. Malgrat tot, no es pot descartar que aquesta fosforilació pugui ser important en altres estadis del desenvolupament de la neurona, com en la neuritogènesis observada en els estadis 1 i 2 de diferenciació, on és necessària una desestabilització dels microtúbuls per elongar i retreure petits processos neurítics. Aquesta hipòtesis quadraria amb els resultats obtinguts durant una estada al laboratori de polaritat neuronal del Dr. Dotti a Bèlgica, que demostren que en neurones no diferenciades amb les BRSKs actives sobreexpressades, els nivells de fosforilació de Tau a la S262 es veuen augmentats, mentre que la transfecció dels mutants inactius no té efecte (**Fig. D5A**). Així, observem que BRSK1 endògena i Tau fosforilada a la S262 co-localitzen en neurones hipocampals en cultiu durant l'estadi 1. En canvi, un cop les neurones han elongat l'axó (estadi 3), la Tau fosforilada a la S262 localitza únicament al cos neuronal i a les dendrites, mentre que BRSK1 ho fa homogèniament en tota la neurona (**Fig. D5B**). Així, proposem que la fosforilació de BRSK1 a la S262 de Tau podria tenir un paper als estadis inicials del desenvolupament neuronal, i que serien altres quinases, com MARK2 (Chen et al., 2006), les responsables d'aquesta fosforilació a les dendrites un cop la neurona ha polaritzat. Aquest fet explicaria que els ratolins doble KO de les BRSKs presentin baixos nivells de pTauS262 i la presència de neurones no polaritzades.

Les BRSKs també podrien tenir un paper en la regulació de la dinàmica de microtúbuls en estadis posteriors. En estudis en *Drosophila* s'ha observat la formació d'un *loop* de microtúbuls a la terminal sinàptica (Roos et al., 2000). Diverses molècules participen en la organització dels microtúbuls sinàptics, com els complexos Par3-Par6-aPKC. Una de les proteïnes importants en aquest procés és aPKC, ja que mutants d'aquesta produeixen alteracions en l'eficiència de les sinapsis i la localització a la sinapsis de proteïnes com Bazooka i Par6 (Ruiz-Canada et al., 2004). Els possible paper de BRSKs fosforilant Tau i les evidències que BRSK1 podria fosforilar proteïnes sinàptiques (Inoue et al., 2006) suggereix la possibilitat d'estudiar el paper de les BRSKs en aquest procés.

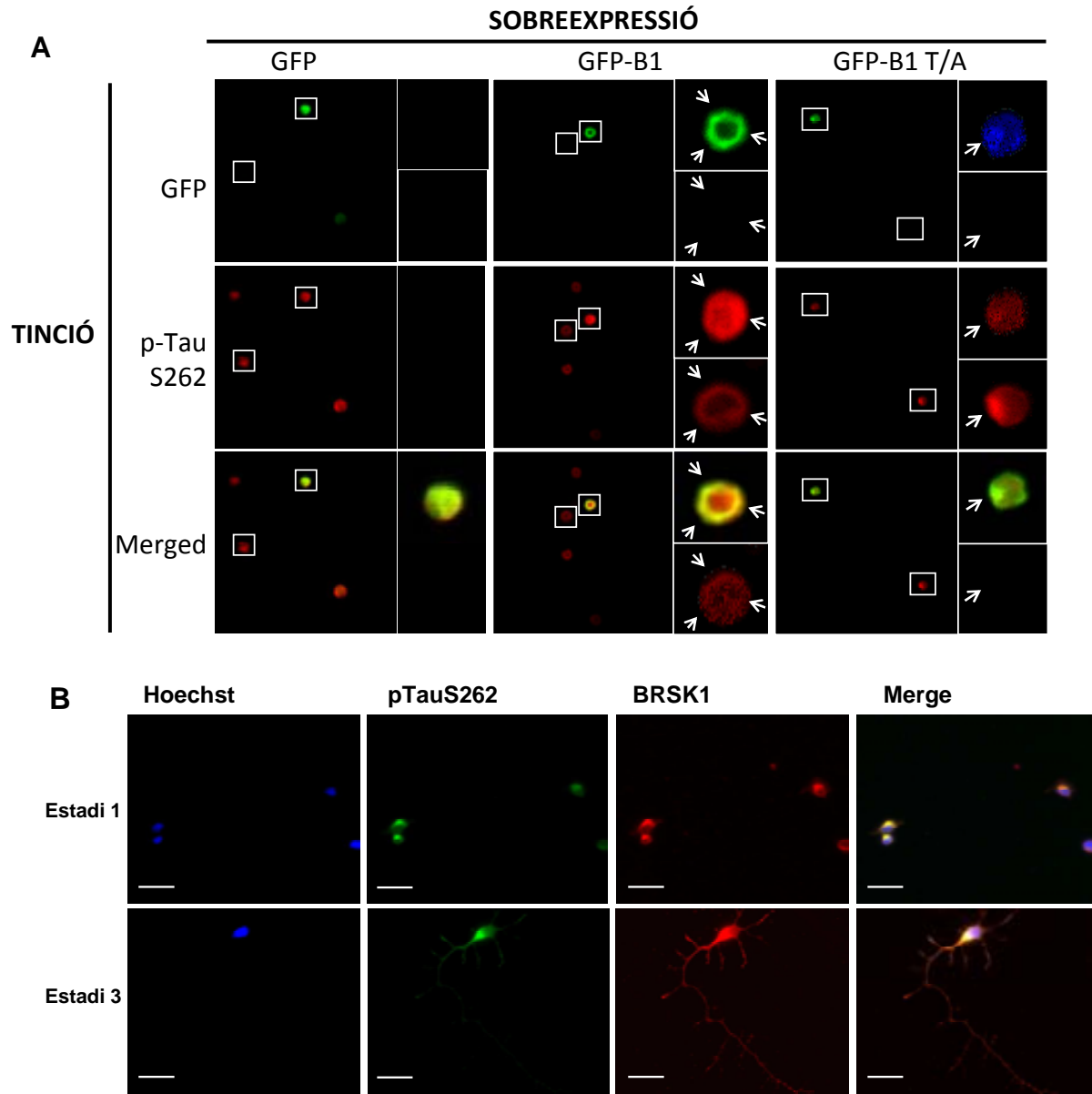


Fig. D5: Estudi de la fosforilació de la Ser262 de Tau per BRSK1 en diferents estadis de la polarització neuronal. A) Es van electroporar neurones hipocampals de rata amb els constructes indicats a la part superior i es van fixar després de 3 hores en cultiu. Posteriorment es van tenyir les neurones amb l'anticòs específic per a la S262 de Tau (vermell). Els panells inferiors mostren la superposició de les tincions (merged). **B)** Es van fixar neurones hipocampals de rata en cultiu a les 3 hores (estadi 1) i a 2 DIV (estadi 3) i es van tenyir amb anticossos específics contra BRSK1 (vermell) i pTauS262 (verd). El nucli es va tenyir amb tinció de Hoechst. L'escala representa 20 µm. Resultats representatius de 3 (A) i 2 (B) cultius.

Funció de les BRSKs a la zona activa de polarització neuronal

Com hem vist a la introducció, pel desenvolupament i manteniment de la forma característica de les neurones es necessiten una sèrie d'aconteixements complexos que comencen amb una asimetria dels components dels progenitors neurals, que gradualment aniran adoptant una morfologia polaritzada.

Les GTPases, així com efectors i reguladors d'aquestes, esdevenen indispensables en el control del procés (**Caixa D5**). Un grup important amb aquesta funció són les GTPases de la família Rho i com a membres més destacats trobem RhoA, Rac1 i Cdc42.

En termes generals RhoA regularia la formació de fibres d'estrès i la contracció cel·lular mentre que Rac1 i Cdc42 promourien la formació de lamel·lipodis i fil·lipodis, respectivament (Nobes and Hall, 1995). Més concretament, RhoA actuaria com a regulador negatiu de la neuritogènesis (Da Silva et al., 2003), formació de l'eix axò-dendrita (Bradke and Dotti, 1999), arborització i formació d'espines dendrítiques (Van Aelst and Cline, 2004). Molts d'aquests efectes els realitza via el seu efector principal, la quinasa ROCK. Mitjançant el tàndem RhoA-ROCK s'augmentaria l'estabilitat de l'actina, inhibint el creixement neurític i evitant així la formació de l'axó (Gonzalez-Billault et al., 2012). En la mateixa línia, inhibidors del creixement axonal activen a RhoA mentre que la sobreexpressió de Rho-GEFs, com p190RhoGEF, inhibeixen el creixement de neurites (van Horck et al., 2001).

Caixa D5: Mecanisme d'acció i regulació de les GTPases

Les GTPases són un conjunt de proteïnes d'entre 20 i 30 kDa expressades des de llevats fins a humans. El mecanisme molecular d'aquest tipus de proteïnes es basa en un cicle d'activació/inactivació, on la unió de GTP activa la GTPasa mentre que la unió a GDP la manté en un estat inactiu. Les GTPases estan associades a compartiments membranosos a partir de seqüències polibàsiques o de modificacions per prenilacions de la cua C-terminal (Michaelson et al., 2001). L'estat d'activació de les GTPases està finament controlat per un conjunt de proteïnes reguladores: 1) Les GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) catalitzen el canvi de GDP per GTP, promovent l'estat actiu. 2) Les GAPs (*GTPase activating proteins*) incrementen més de 100 vegades la hidròlisi de GTP de la molècula, aconseguint així inactivar-la. 3) Per últim, els GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*), s'uneixen a la GTPasa segrestant-la al citosol.

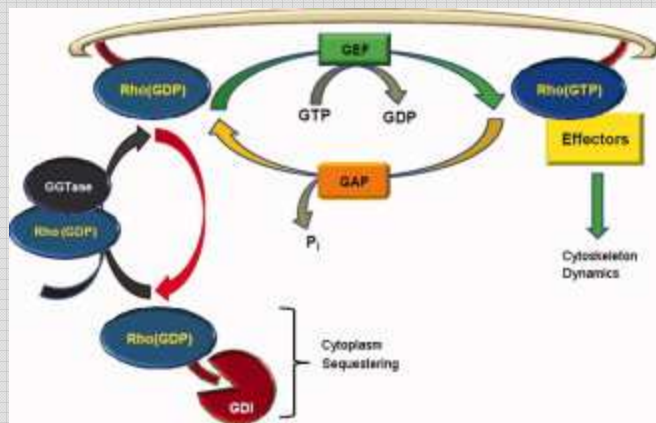


Figura extreta de: Gonzalez-Billault C. et al. *The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity Cytoskeleton* (2012)

Per la seva banda, Rac1 s'ha implicat en l'elongació i arborització de l'axó, migració neuronal i formació d'espines dendrítiques (Hall and Lalli, 2010), essent necessària la seva activació per portar a terme aquests processos. Vàries GEFs de Rac1, com Tiam/STEF, en potencien el seu efecte (Matsuo et al., 2003; Nishimura et al., 2005). Rac1 regula la dinàmica dels filaments d'actina positivament per mitjà de les quinases PAK1 (Jacobs et al., 2007) i negativament al associar-se amb Cdk5/p35 (Nikolic et al., 1998).

Per últim, Cdc42 participa en la formació de fil·lopodis i en la polaritat cel·lular en diferents organismes (Etienne-Manneville, 2004). En neurones la unió de GTP-Cdc42 amb el complex Par3/Par6 promou el creixement axònic, conjuntament amb una activació de Rac1 (Nishimura et al., 2005).

És necessària una estreta regulació de l'activitat de totes tres GTPases, ja que actuen de manera coordinada en l'espai i el temps. Així veiem com RhoA-ROCK, pot fosforilar i desfer el complex Cdc42-Tiam-Par3-Par6, inhibint així l'activació de Rac1 (Nakayama et al., 2008) (**Fig. D6**).

Podrien les BRSKs participar de la cascada de senyalització de GTPases per acabar regulant el citoesquelet d'actina? Fins el moment mai s'ha relacionat les BRSKs amb la modulació de l'actina, però amb les dades actuals es podria postular la quinasa PAK1 com a un substrat de BRSK2 durant aquest procés donades les evidències següents:

- 1) BRSK2 fosforila a PAK1 a la Thr423 al pàncrees, on regula l'alliberament d'insulina en resposta als nivells de glucosa en sang (Nie et al., 2012).
- 2) PAK1, de igual manera que les BRSKs, és essencial per a l'especificació d'axons i dendrites (Jacobs et al., 2007).
- 3) CDK5, juntament amb el seu co-activador p35, s'uneix a GTP-Rac1 i hiperfosforila PAK1 inhibint la seva activitat necessària pel remodelament del citoesquelet d'actina i microtúbuls (Nikolic et al., 1998).

Com hem vist a la introducció, el tàndem CDK5/p35 també regula la hiperfosforilació de la cua C-terminal de BRSK2, fet que disminueix la capacitat de quinases *upstream* de fosforilar-ne el *T-loop*, amb la conseqüent reducció de l'activitat BRSK2. Així, a la neurita que esdevindrà axó, PAK1 s'activaria via Rac1 i una putativa fosforilació per BRSK2, mentre que a la resta de neurites, CDK5/p35 actuaria com a regulador negatiu de PAK1 i BRSKs com a quinases reguladores de la dinàmica del citoesquelet (**Fig D6**).

Per altra banda, els complexos Par3-Par6-aPKC actuen com a *scaffolds* aglutinant moltes proteïnes relacionades amb el control de la dinàmica del citoesquelet i l'elongació de l'axó entre els estadis 2 i 3 de polarització. Durant aquest període, a la punta de l'axó s'acumulen les anomenades proteïnes TIP (*microtubule plus end tracking proteins*), que s'encarreguen del control de la dinàmica de microtúbuls, el creixement i la direccionalitat de l'axó (Conde and Caceres, 2009) (**Caixa D4**). Entre elles, la E3 ubiquitina lligasa APC localitza a la punta de l'axó (Votin et al., 2005), on recluta a Par3 i conseqüentment el complex Par3-Par6-aPKC. Allà APC promouria la polimerització i disminuiria la velocitat de despolimerització dels microtúbuls via efectors com EB1 (Nakamura et al., 2001) i KIF17 (Jaulin and Kreitzer, 2010). La lligasa

APC regula els nivells de BRSK2 durant el cicle cel·lular (Li et al., 2012), així que no es pot descartar que també actui sobre la quinasa durant la polarització neuronal.

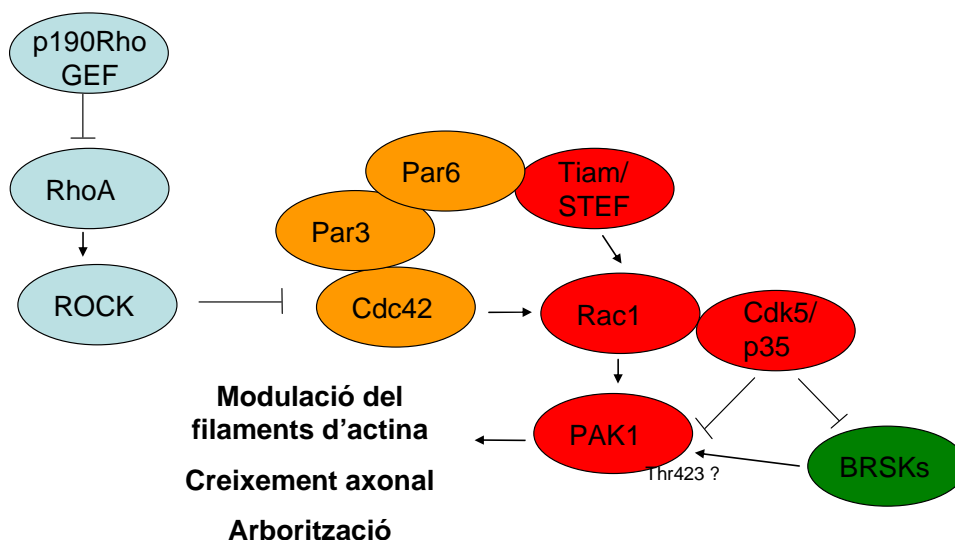


Fig. D6: Senyalització orquestrada per GTPases de la família Rho en neurones. Les GTPases de la família Rho, RhoA, Cdc42 i Rac1 actuen conjuntament per modular els filaments d'actina, el creixement axonal i l'arborització. Fins al moment les BRSKs s'han relacionat amb el creixement axonal i l'arborització. Amb les dades bibliogràfiques proposem que BRSKs també podrien participar en la modulació dels filaments d'actina via la quinasa PAK1.

Experiments d'interacció de les BRSKs amb membres dels complexos Par seran interessants per determinar si tenen la capacitat d'anclar les quinases en les zones actives de polarització on serien accessibles a substrats reguladors positius i negatius del procés. En el futur s'intentarà avaluar possibles fosforilacions de BRSKs sobre aquests substrats. De moment, sabem que BRSK1 o BRSK2 no fosforilen a RhoA o Par6 mitjançant experiments *in vitro* (Fig. R50), però no podem descartar que fosforilïn altres proteïnes, com Par3 o aPKC o proteïnes relacionades amb la senyalització per GTPases com ROCK o proteïnes GEF, GAP, GDI o altres GTPases (p.e. Rac o Cdc42).

Paper dels lípids de membrana en la localització de BRSKs i Smurf1

Durant la formació i manteniment de la polaritat cel·lular, alguns lípids de la membrana cel·lular actuen en el procés com a molècules senyalitzadores o d'anclatge de proteïnes. Concretament a neurones, diverses molècules proteiques i lipídiques s'acumulen local i asimètricament al compartiment somatodendrític o a l'axó. D'entre els lípids, el més estudiat és el fosfatidil inositol 3-fosfat (PIP3), que s'acumula a una sola de les neurites immadures on, mitjançant l'activació de la via PI3K/Akt orquestrarà l'especificació axònica (Shi et al., 2003; Menager et al., 2004).

Un altre exemple són el gangliòsids, glicoesfingolípid modificats implicats en axiogènesis (Harel and Futerman, 1993). El gangliòsid GM1, així com el seu enzim productor, la plasma *membrane ganglioside sialidase* (PMGS), estan implicats en el creixement axonal. Així, disminució de l'activitat PMGS resulta en el bloqueig de

l'elongació axonal, mentre que augments de la seva activitat augmenten el creixement axonal així com acceleren la polarització de proteïnes del citoesquelet (Rodriguez et al., 2001). És més, l'enzim PMGS localitza específicament a la neurita que esdevindrà l'axó, participant en el procés a dos nivells: induint l'ineestabilitat de l'actina i promovent la inhibició de RhoA (Da Silva et al., 2005).

També el colesterol podria regular negativament el creixement neurític i l'especificació de l'axó en neurones hipocampals en cultiu, però no en neurones corticals, via modulació de l'activitat de la quinasa Fyn (Ko et al., 2005). D'aquesta manera la distribució i quantitat de certs lípids en diferents zones i tipus cel·lulars podria afectar diferentment la seva morfologia.

En els últims anys ha aparegut un paper creixent del galactolípid sulfàtid en la regulació del creixement neurític i la gènesis neuronal (Winzeler et al., 2011; Karus et al., 2012; Velasco et al., 2013). Estudis *in vitro* en neurones ganglionars de la retina (RGCs, *retinal ganglion cells*), demostren que el sulfàtid present a la mielina té la capacitat d'inhibir el creixement neurític (Winzeler et al., 2011). Un altre treball conclou que els lípids sulfatats actuarien com a reguladors de la proliferació dels precursors neurals així com la seva maduració al sistema nerviós perifèric (Karus et al., 2012). Per últim, recentment s'ha descrit el paper del sulfàtid en la localització i organització de la Galectina-4 (Gal-4) en el procés de creixement axonal (Velasco et al., 2013). La reducció dels nivells de Gal-4, així com la inhibició de la síntesi de sulfàtid en neurones hipocampals en cultiu, disminueixen la unió de NCAM L1, una glicoproteïna amb funció promotora del creixement axonal. Així, la unió Gal-4-sulfàtid permetria una correcta distribució de glicoproteïnes implicades en el procés d'especificació de l'axó. Malgrat tot, moltes de les dades conegudes fins al moment provenen d'experimentació *in vitro*. Caldrien més estudis per definir el paper del sulfàtid *in vivo*, com a molècula senyalitzadora i/o d'anclatge a proteïnes neuronals.

Com hem vist en aquest treball, les BRSKs uneixen sulfàtid específicament (**Fig. R16**). Malgrat no haver pogut detectar sulfàtid en cultius neuronals per tècniques d'immunocitoquímica, diversos autors demostren la presència del lípid en neurones (Pernber et al., 2002; Molander-Melin et al., 2004; Isaac et al., 2006; Velasco et al., 2013). No es pot descartar la possibilitat que *in vivo* els nivells de sulfàtid en neurones siguin més elevats que en neurones en cultiu o que la interacció del sulfàtid de les cèl·lules gials moduli molècules a la neurona. En aquest sentit, s'han observat interaccions entre GalC i sulfàtid entre membranes de la mielina d'oligodendròcits en el què es coneix com a glicosinapsis, fenomen que resulta en senyalització transmembrana, modulació del citoesquelet i agrupació de dominis de membrana (Boggs et al., 2010). Així seria interessant observar el possible paper del sulfàtid de cèl·lules gials a la neurona, així com un hipotètic intercanvi de lípids de membrana entre oligodendròcits i neurones.

Tot i que els nivells de sulfàtid en neurones són significativament més baixos que en cèl·lules gials, *microclusters* de sulfàtid podrien servir d'anclatge de les BRSKs en la funció neuronal on es facilitaria l'apropament a substrats o a enzims que la poguessin modificar post-traduccionament. Així veiem que la E3 lligasa Smurf1 també uneix fortament sulfàtid (**Fig. R51**). L'associació a membrana d'Smurf1 sembla ser important per la seva activitat lligasa, ja que un mutant del seu domini C2 amb dues lisines mutades (Smurf1 K29/K85A) que no pot associar-se a la fracció particulada és incapaç d'ubiquitinar i promoure la degradació de substrats, com s'ha vist per RhoA (Lu

et al., 2011) i nosaltres amb BRSK1 (**Fig. R53**). Experiments futurs aniran encaminats a estudiar si aquest mutant també és incapaç d'unir al sulfàtid. A favor d'aquesta hipòtesis tenim que a pH fisiològic Smurf1 tindria una càrrega neta positiva (pI 6,56), mentre que el seu domini C2 aïllat (aa 13-150), on es troben les lisines mutades és fortament bàsic (pI 9,59). També seria interessant estudiar si la fosforilació de la lligasa per PKA modula la seva associació a membrana.

Així, en el model proposat d'acció de Smurf1 i les BRSKs durant la polarització neuronal podríem hipotetitzar que el sulfàtid actuaria com molècula d'anclatge de BRSK1 i Smurf1 a la membrana (**Fig. D4**). En els primers estadis de polarització, Smurf1 degradaria la BRSK1 i en resposta a l'activació de la via cAMP/PKA, la BRSK1 s'estabilitzaria i el sulfàtid podria tenir efecte en l'activitat de la quinasa, augmentant-li l'activitat, facilitant-ne així la fosforilació de substrats.

CONCLUSIONS

1. Mitjançant estudis immunocitoquímics i de fraccionament subcel·lular de cultius cel·lulars s'ha determinat que una fracció de BRSK1 localitza a la membrana, de manera resistent a la solubilització amb el detergent Triton X-100 i independentment del seu estat d'activació. A més, un *pool* de la fracció particulada de BRSK1 localitza als microdominis de membrana *lipid rafts*. Per primera vegada es descriu la presència de BRSK1 en les cèl·lules no neuronals astròcits, oligodendròcits i microglia.
2. En cèl·lules neuronals, la despolarització induïda per KCl provoca la translocació d'una fracció de BRSK1 a la membrana, que és bloquejada parcialment per l'inhibidor de palmitoilació 2-bromopalmitat. Mitjançant assajos d'intercanvi de grups acil i biotina amb extractes de cervell de rata es mostra per primera vegada que BRSK1, però no BRSK2, està palmitoilada *in vivo*. Malgrat la generació de diferents mutants no s'ha aconseguit la identificació del/s lloc/s de palmitoilació en BRSK1.
3. BRSK1 i BRSK2 uneixen específicament sulfàtid. Mitjançant assajos d'unió a liposomes i *protein-lipid overlay assays* amb diferents mutants de delecció es mostra que la regió SCR2 de BRSK1 (*short conserved region 2*, localitzada a la cua C-terminal) uneix específicament sulfàtid a través de 2 *clusters* d'aminoàcids bàsics, i que els dominis quinasa i UBA de BRSK1 no uneixen aquest lípid. A més, liposomes que contenen sulfàtid activen específicament l'activitat quinasa de BRSK1, el que representa un nou mecanisme d'activació d'aquesta quinasa, possiblement al·lostèric.
4. Amb la finalitat de resoldre l'estructura de la regió SCR2 s'han realitzat diverses proves de cristal·lització d'aquesta regió amb resultats negatius. Es proposa repetir aquests assajos en presència del lligand (sulfàtid) per tal de resoldre aquesta estructura. L'assoliment d'aquesta fita podria suposar la definició d'un nou domini proteic d'unió a lípids.
5. Utilitzant un anticòs específic (*Sulphi*), s'ha posat a punt una tècnica que permet la detecció i quantificació del sulfàtid d'extractes lipídics de cèl·lules. Aquesta tècnica, tot i que permet la quantificació del sulfàtid d'astròcits i oligodendròcits, no detecta el sulfàtid intracel·lular de cultius de neurones corticals.
6. BRSK1 és ubiquitinada pel parell E2/E3 ubiquitina lligases, Ubch5 i Smurf1, el que promou la seva degradació proteosomal.
7. L'ubiquitinació de BRSK1 per Smurf1 està controlada per la proteïna quinasa A (PKA). Ja que hem descrit un augment en els nivells de BRSK1 als primers estadis de la diferenciació neuronal, i que PKA controla l'especificació de l'axó regulant Smurf1 entre altres, els nostres resultats suggereixen que la modulació de l'activitat E3 lligasa Smurf1 podria ser, en part, responsable de l'augment dels nivells de BRSK1 observats durant la polarització neuronal.
8. Tant Smurf1 com BRSK1 uneixen sulfàtid, suggerint un mecanisme de co-localització específic d'ambdues proteïnes a la membrana per mitjà de l'unió al lípid. En canvi, altres substrats de Smurf1 com RhoA i Par6 no interaccionen amb el sulfàtid.
9. Els estudis immunocitoquímics realitzats en neurones hipocampals en cultiu indiquen que la fosforilació de Tau a la Ser262 observat per altres autors podria ocórrer durant l'estadi 1 de la diferenciació neuronal, coincidint amb la dinàmica neurítica.

MATERIAL I MÈTODES

1. Caracterització dels anticossos contra BRSK1 i BRSK2

Per realitzar aquest treball s'ha disposat d'anticossos contra BRSK1 i BRSK2 produïts en ovella al *MRC Protein Phosphorylation Unit* (Dundee, UK) i cedits pel Dr. Dario Alessi. Aquests anticossos van ser generats contra epítops de l'extrem C-terminal de cada proteïna (aa 774-794 de BRSK1 i aa 655-674 de BRSK2). La regió escollida de BRSK1 no està present a BRSK2 i la regió de BRSK2 té baixa homologia per a BRSK1 (**Fig. M1**), presentant alta especificitat per a cada quinasa. En el moment de generar-los es van realitzar diferents sagnats de les ovelles i purificacions dels anticossos, seguits d'un cribatge pels anticossos més potents, donant com a millors candidats el tercer sangrat per a BRSK1 i segon sangrat per a BRSK2. Aquests anticossos s'han utilitzat per la detecció de les BRSKs per *western blot* (WB), per immunoprecipitació (IP) i per a fer estudis immunocitoquímics (IC).

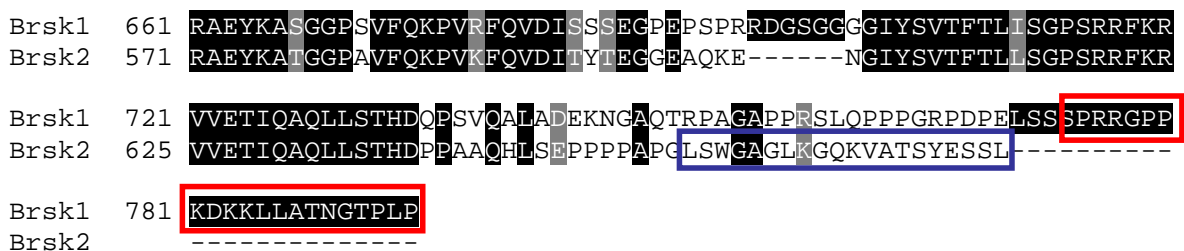


Fig. M1: Alineament de les regions C-terminal de BRSK1 i BRSK2. La figura mostra els epítops reconeguts pels anticossos BRSK1 (recuadre vermell) i BRSK2 (recuadre blau) produïts en ovella.

Per corroborar la seva especificitat i eficiència, es van comparar amb anticossos comercials (Sigma) contrastats per al seu ús en WB, IP i IC amb BRSK1 i WB i IC amb BRSK2.

La **taula M1** mostra resumidament les característiques de cada anticòs.

Proteïna reconeguda	Origen	Obtingut de	Epítop	Aplicacions	Referència
BRSK1	In house	Ovella	C-term	WB, IP i IC	
BRSK2	In house	Ovella	C-term	WB, IP i IC	
BRSK1	Sigma	Conill	C-term	WB, IP i IC	SAB4200393
BRSK2	Sigma	Conill	N-term	WB i IC	SAB4200431

Taula M1: Anticossos contra BRSK1 i BRSK2 utilitzats.

1.1. Anàlisi de les BRSKs per *western blot*

BRSK1 i BRSK2 són dues quinases amb pesos moleculars estimats de 85 i 75 kDa, respectivament. Per l'avaluació dels anticossos per *western blot*, es van carregar en un gel desnaturitzant de poliacrilamida idèntiques quantitats d'extracte proteic provinent de neurones corticals de rata cultivades 3 DIV i després de realitzar l'immunoblot corresponent es van detectar les BRSKs amb els anticossos d'ovella (*in house*) i de conill (Sigma). En tots els casos es va utilitzar la mateixa concentració d'anticòs primari (2 µg/ml) i secundari (1:2.500).

A la **figura M2**, es mostra el patró de bandes obtinguts amb ambdós anticossos per a cada proteïna. Amb els dos anticossos contra BRSK1, es pot observar un doblet a 85-86 kDa, a més d'una banda no esperada d'aproximadament 120 kDa (indicada amb un asterisc). A més, amb l'anticòs de conill, a part d'obtenir un senyal més tènue, apareix una banda inespecífica sobre els 60 kDa.

Per altra banda, l'anticòs de BRSK2 d'ovella sembla ser més potent i específic que el de conill, detectant principalment la banda esperada sobre 75 kDa.

Tot junt, ens indica que els anticossos d'ovella són millors per l'anàlisi de les BRSKs mitjançant *western blot*.

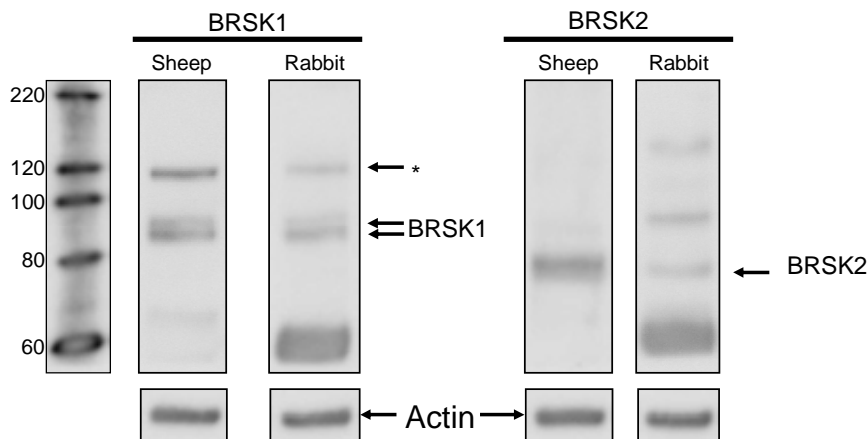


Fig. M2: Caracterització dels anticossos per BRSK1 i BRSK2 per immunoblot. 20 µg de llisat de neurones corticals a 3 DIV es van resoldre mitjançant gels d' SDS-PAGE i immunoblot i es van detectar amb 2 µg/ml d'anticòs contra BRSK1 d'ovella (1st Bl. C-term) o de conill (Sigma, SAB4200393) i contra BRSK2 d'ovella (2nd Bl. C-term) o conill (Sigma, SAB4200431), respectivament. Es va utilitzar l'actina com a control de càrrega.

1.2. Determinació de l'eficiència d'immunoprecipitació dels anticossos de les BRSKs.

Per a la realització d'alguns assajos, l'eficiència en la immunoprecipitació de les BRSKs utilitzant anticossos específics és de vital importància, de manera que ens vam proposar la optimització d'aquest assaig amb els diferents anticossos disponibles. Amb aquest objectiu es van incubar 100 µg d'extracte proteic de neurones corticals de rata cultivades 3 DIV amb proteïna G sefarosa (control negatiu) i amb la resina amb 1 µg dels diversos anticossos de les BRSKs units. Després de rentar la resina i eluir la proteïna es visualitza l'immunoprecipitat per electroforesi SDS-PAGE i *western blot*.

Com es mostra a la **figura M3A**, els dos anticossos de BRSK1 immunoprecipiten proteïna, tot i que és l'anticòs d'ovella el que aconsegueix fer-ho amb una major eficiència. És més, després de l'anàlisi densitomètric de les bandes, es pot afirmar que aquest anticòs immunoprecipita el total de la BRSK1 present a l'extracte en aquestes condicions, ja que el senyal obtingut per BRSK1 de 40 µg d'extracte (carril total) és 2,5 vegades inferior a l'obtingut després d'immunoprecipitar-ne 100 µg (2,5 vegades més). En el cas de BRSK2, observem uns resultats similars, on l'anticòs d'ovella immunoprecipita gran part de la proteïna de l'extracte mentre que el de conill no

funciona per aquesta tècnica (**Fig. M3B**). En ambdós casos el primer carril (No Ab)

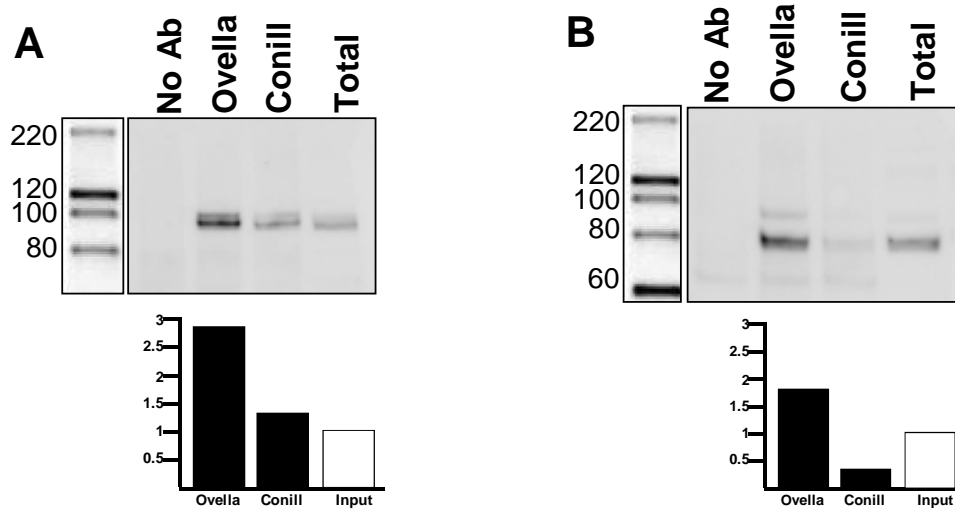


Fig. M3: Caracterització dels anticossos per BRSK1 i BRSK2 per immunoprecipitació. A) Es va incubar 1 µg d'anticòs contra BRSK1 d'ovella (1st Bl. C-term) o de conill (Sigma, SAB4200393) amb 10 µl de resina Proteina G-*Sepharose Fast Flow*. Seguidament es va incubar la resina amb 100 µg de llisat de neurones corticals de rata a 3 DIV i es va visualitzar la proteïna immunoprecipitada per gel SDS-PAGE i immunoblot. Es va afegir un carril amb 40 µg de llisat i un altre amb la resina sense anticòs. B) Es va realitzar el mateix protocol amb els anticossos contra BRSK2 d'ovella (2nd Bl. C-term) o conill (Sigma, SAB4200431). La detecció es va realitzar amb els anticossos d'ovella BRSK1 (a) i BRSK2 (b) a 0,5 µg/ml i es va densitometrar les bandes per calcular l'eficiència de la immunoprecipitació de cada anticòs.

descarta la unió inespecífica a la resina.

Així podem afirmar que els anticossos d'ovella són més útils també per immunoprecipitació.

1.3. Determinació de la distribució de BRSK1 i BRSK2 utilitzant els anticossos d'ovella i conill.

Per últim es va estudiar la distribució de les BRSKs en immunocitoquímica de cultius de neurones hipocampals utilitzant els anticossos anteriorment mencionats.

Es va utilitzar la co-tinció dels cultius per comparar el patró de distribució de les BRSKs. A la **figura M4**, es mostra com tant en el cas de BRSK1 com BRSK2 s'observa una distribució similar tant amb els anticossos d'ovella com de conill, validant-se mútuament com a bons anticossos per a immunocitoquímica.

D'altra banda, aprofitant la presència d'astròcits en alguns cultius de neurones hipocampals, es va determinar la presència i distribució de les BRSKs en aquest tipus cel·lular amb els dos anticossos (**Fig. M5A per BRSK1** i **Fig. M5B per BRSK2**).

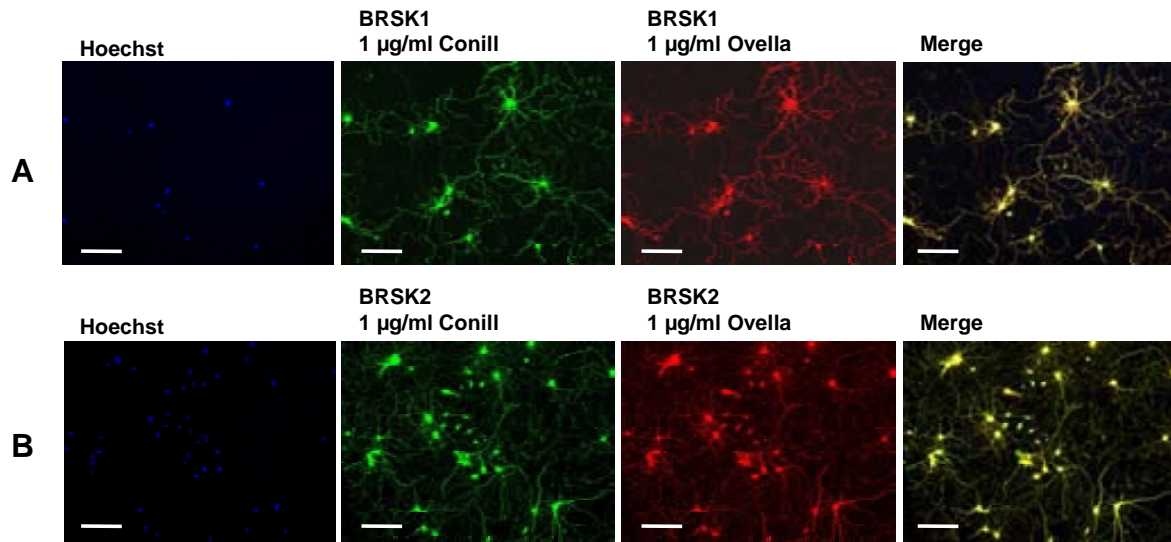


Fig. M4: Immunofluorescència de BRSK1 i BRSK2 en neurones hipocampals. Es van fixar amb PFA neurones hipocampals de rata a 7 DIV i es van tenyir amb els anticossos de BRSK1 (A) i BRSK2 (B) d'ovella (vermell) o de conill (verd). En ambdós casos es va tenyir els nuclis amb Hoechst i es van obtenir les imatges amb una magnificació de 20 augments. Resultats representatius de 2 cultius independents.

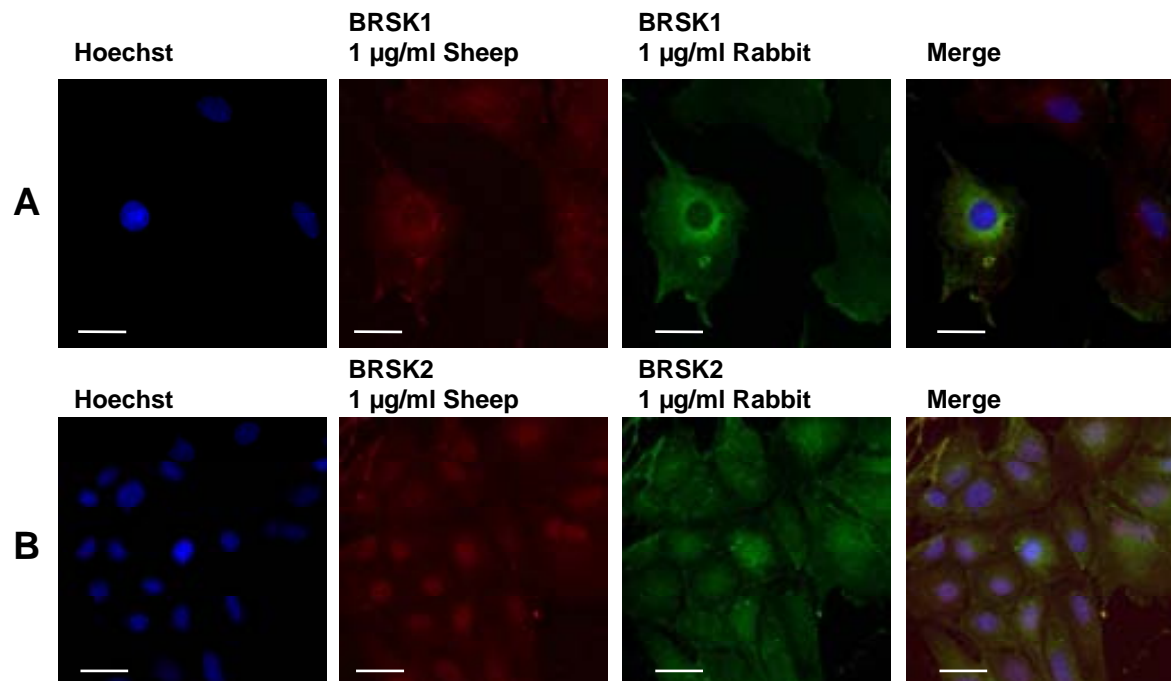


Fig. M5: Immunofluorescència de BRSK1 i BRSK2 astròcits de rata. Es van fixar amb PFA cultius mixtes de neurones i astròcits hipocampals de rata a 7 DIV i es van tenyir amb els anticossos de BRSK1 (A) i BRSK2 (B) d'ovella (vermell) o de conill (verd). En ambdós casos es va tenyir els nuclis amb Hoechst i es van obtenir les imatges amb una magnificació de 60 augments. Resultats representatius de 2 cultius independents

1.4. Anàlisi de la reacció creuada dels anticossos secundaris contra *sheep* i *goat*.

Durant el transcurs d'aquest treball s'han afrontat diversos problemes metodològics. Un d'ells ha estat la cross-reacció dels anticossos secundaris fets en *goat* amb anticossos fets en *sheep* en estudis de co-tinció immunocitoquímica. Per comprovar aquest fenomen, es van tenir cultius primaris de neurones hipocampals a 3 DIV amb el marcador de dendrites MAP2, anticòs produït en *mouse*. Com a anticossos secundaris es va afegir una barreja de *Alexa goat anti-mouse 488* amb *Alexa donkey anti-sheep 594* (aquest últim és utilitzat normalment per detectar les BRSKs al canal vermell). Com es mostra a la **figura M6A**, l'anticòs secundari que reconeix *sheep* (594), també té afinitat per a l'Fc de la IgG de l'anticòs que reconeix *mouse* (488), resultant en un patró solapant als canals verd (específic) i vermell (inespecífic).

Pel mateix principi, els anticossos secundaris contra *sheep* o *goat* poden ser utilitzats indistintament per reconèixer anticossos primaris fets en *sheep* (com és el cas dels de les BRSKs) tant per *western blot* (**Fig. M6B**) o per immunocitoquímica (**Fig. M6C**). Com a curiositat, sembla que l'anticòs secundari unit a la peroxidasa de rave que reconeix *goat*, és més eficient que el que reconeix *sheep*, al exposar-los a igual concentració de primari i secundari, en mostres blotejades amb una anticòs produït en *sheep* (**Fig. M6B**).

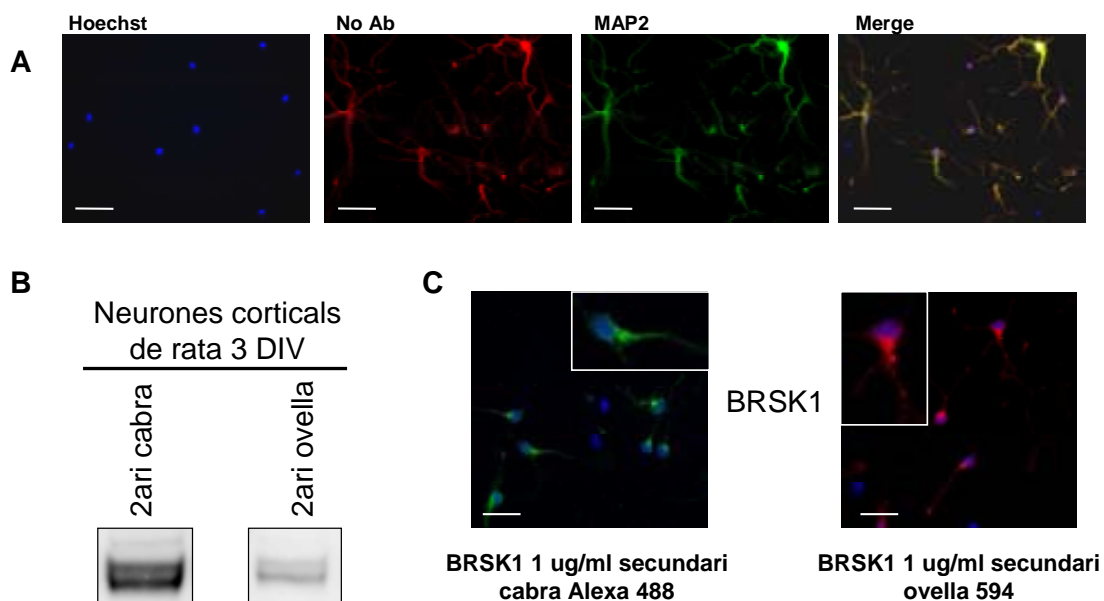


Fig. M6: Patró de reconeixement dels anticossos secundaris d'ovella i cabra. A) Es van fixar neurones hipocampals de rata a 3 DIV i es van incubar amb anticòs primari contra MAP2 (fet en *mouse*) seguit de la incubació amb els anticossos secundaris *goat anti-mouse 488 nm* i *donkey anti-goat 594 nm*. B) Western blot de 20 µg de llisat de neurones corticals a 3 DIV. Es va incubar amb 2 µg/ml d'anticòs contra BRSK1 d'ovella (1st Bl. C-term) i amb els secundaris de cabra (dreta) o ovella (equerra) a una dilució 1:2000. C) Distribució de BRSK1 en neurones hipocampals de rata detectades amb anticossos secundaris contra cabra (verd) i ovella (vermell). En a) i c) els nuclis es van marcar amb la tinció específica de Hoechst.

2. Cultius cel·lulars

2.1. Línies

Durant aquest treball s'ha treballat amb diferents línies cel·lulars:

- **Cèl·lules HEK293T:** Línia cel·lular embrionària de ronyó humà. Es va utilitzar la variant T, que conté l'antigen T llarg del virus SV40, que permet una més eficient replicació episomal (Alwine, 1985). Són cèl·lules fàcilment cultivables i amb uns nivells de transfecció i expressió episomal elevats.
- **Cèl·lules SH-SY5Y:** Línia cel·lular derivada de neuroblastoma de rata. Aquesta línia ens ha permès estudiar la distribució i caracterització de les BRSKs endògenes.
- **Cèl·lules HeLa:** Línia cel·lular procedent de carcinoma epitelial de cèrvix humà. Li manca la quinasa supressora de tumors LKB1 (Tiainen et al., 1999) i al no ser d'origen neuronal també les BRSKs. S'ha utilitzat per monitoritzar necessitat de l'activitat de les BRSKs en la seva localització.

Les línies cel·lular utilitzades van ser obtingudes de l'*European Collection of Cell Culture* (ECACC). Els vials es van descongelar, expandir i tornar a congelar en diversos *stocks*. Per la congelació dels vials es va utilitzar medi de congelació, amb el medi i el doble de sèrum de cada subtipus cel·lular i un 10% de DMSO, compost que travessa la membrana i actua com a crioprotector, evitant la formació de cristalls de gel intracel·lulars. Un cop tripsinitzades les cèl·lules, es centrifuguen 5 min a 1.000g i el *pellet* es resuspèn en el medi de congelació, en el qual es mantenen un període de 15-30 min per equilibrar el medi cel·lular amb el crioprotector. Les cèl·lules es distribueixen en diversos criotubs i es mantenen dins d'un contenidor *CryoFreezing* (Nalgen) que conté isopropanol, per aconseguir una congelació lenta i gradual. Després de 24-48 hores a -80°C, es transfereixen els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

Pel manteniment de les línies cel·lulars, un cop descartades contaminacions per fongs o bacteris, es mantenen en incubadors a una temperatura fixa de 37°C i una atmosfera humida amb el 5% de CO₂. Pel subcultius, les cèl·lules eren expandides en diversos suports. Quan arribaven a un 90% de confluència, es rentaven dos vegades en *phosphate buffered saline* (PBS), es tripsinitzaven (2-3 min a 37°C), es resuspenien en medi complert i es distribuïen als suports a la densitat desitjada mitjançant un recompte amb una càmera de Neubauer.

2.2. Cultius primaris

Els cultius primaris utilitzats durant aquesta tesi han estat realitzats per Cristina Gutierrez (Servei de Cultius Cel·lulars de l'INC, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)) i Tinatin Zurashvili (PhD, UAB).

Els animals van ser proporcionats pel Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i pel procediment experimental es van seguir les directrius aprovades

pel comitè Ètic de la UAB, en conformitat amb el decret de la Generalitat de Catalunya (Decret 214/1997, DOG 2450).

2.2.1. Cultius neuronals

Els cultius primaris de neurones corticals i hipocampals van ser obtinguts a partir de fetus de rates Sprague-Dawley al 17é dia de gestació o de fetus de ratolins al 15é dia de gestació. El còrtex o l'hipocamp es van dissecionar, dissociar enzimàticament i diluir en DMEM (Sigma) complementat amb 10% FBS i penicil·lina/estreptomicina. Es van sembrar 30.000 cèl·lules/cm² en portaobjectes pre-tractats amb poli-D-lisina en plaques de 24 pous. Dues hores després de sembrar es va canviar el medi per medi Neurobasal (Invitrogen) sense sèrum complementat amb 2% B27 (Gibco), 2 mM L-glutamina (Invitrogen), penicil·lina/estreptomicina i 0,6% (w/v) glucosa i es van cultivar en incubadors en una atmosfera humida amb el 5% de CO₂ a 37°C durant els temps indicats en cada experiment (*days in vitro*, DIV). La meditat del medi de cultiu va ser canviat cada 3 dies per medi nou.

2.2.2. Cultius d'astròcits

Els astròcits van ser obtinguts a partir de cervell de rata a dia 1 post-natal. Es va extreure el cervell, es va netejar de meninges i vasos sanguinis i es va homogeneïtzar en tampó Krebs (120 mM NaCl; 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃ i 14,3 mM glucosa) amb 0,025% tripsina. Posteriorment les cèl·lules van ser triturades mecànicament i filtrades per una malla de 40 µm en presència de 0,52 mg/ml d'inhibidor de la tripsina i 170 IU/ml de DNasa. Després de centrifugar (5 min a 500g) i resuspendre en DMEM (Sigma) complementat amb 10% FBS i penicil·lina/estreptomicina, es van sembrar 300.000 cèl·lules/ml en plaques de 24 pous amb portaobjectes recoberts de poli-D-lisina. Els astròcits es van mantenir en cultiu durant 10 DIV en una atmosfera humida amb el 5% de CO₂ a 37°C abans de ser fixades. Es va canviar el medi als 5 DIV.

2.2.3. Oligodendròcits

Els cultius enriquits en oligodendròcits van ser obtinguts a partir de cultius d'astròcits primaris sembrats a 600.000 cèl·lules/ml. Després de 7 DIV, es va sacsejar 2 hores a 250 rpm i tripsinitzar 5 min. Les cèl·lules desenganxades es van sembrar en plaques de 24 pous a una densitat de 40.000 cèl·lules/ml. Els cultius es van fixar després de 5 DIV per immunofluorescència.

2.3. Material pels cultius

- **Medis de cultiu:**

- **Cèl·lules 293T i HeLa:** DMEM (Sigma, D-5796), 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco), 1% penicil·lina/estreptomicina (Gibco).

Cèl·lules SH-SY5Y: DMEM F-12 HAM (Sigma, D-8437), 15% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco), 1% aminoàcids no essencials (Invitrogen, 11140-050) 4% penicil·lina/estreptomicina (Gibco).

- **Medi de transfecció de cultius primaris:** OPTIMEM (Invitrogen, 11058-021)

- **Altres materials**

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Invitrogen, 10010-015).
- Tripsina-EDTA (Gibco): 0,05% tripsina i 0,53 mM EDTA.

3. Transfeccions i l·lisis cel·lular

Els constructes utilitzats en aquest treball han estat obtinguts per clonatge al laboratori o clonats per la Dra. Maria Deak i cedits pel Dr. Dario Alessi (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK). Es pot trobar una llista detallada a l'**annex 1**.

3.1. Transfecció amb polietilenamina (PEI)

Les línies cel·lulars HEK293T i HeLa es van transfectar amb el polímer catiónic polietilenamina (PEI), donada l'alta eficiència de transfecció. El mètode es basa en la formació del complexa PEI (carregat +) amb el DNA (carregat -), que serà endocitat per la cèl·lula. La transfecció es realitzava quan el cultiu presentaven un 60-70% de confluència. En aquest moment es barrejava el DNA amb el PEI (preparat en aigua a 1 mg/ml a pH 7,2) en 1 ml de DMEM sense sèrum (en el cas de plaques de 10 cm), s'agitava en vòrtex 5 segons i s'incubava 10 minuts a temperatura ambient per afavorir la formació dels complexos DNA/PEI. Seguidament s'afegia gota a gota la barreja sobre les plaques. Els cultius es mantenien a l'incubador durant 24-48 hores abans de ser l·lisades.

En els casos en què la transfecció es realitzava en plaques de 6 pouets, es reduïa el volum de DMEM lliure de sèrum a 250 µl.

En aquest mètode és de vital importància determinar prèviament quina és la relació DNA:PEI idònia per a cada tipus cel·lular. En el nostre cas, tant per HEK293T com per a HeLa és 1 µg DNA: 10,5 µl PEI.

3.2. Electroporació

Les electroporacions de neurones corticals i hipocampals es van realitzar amb el sistema Amaxa (Lonza), seguint el protocol descrit pel fabricant. Entre 1 i 4 µg de DNA eren electroporats en d'entre 1×10^6 i 4×10^6 neurones hipocampals o corticals.

3.3. Llisi cel·lular

Les cèl·lules eren cultivades fins que arribaven a un 90% de confluència en plaques de diferents diàmetres en funció de l'experiment. Posteriorment es rentaven dues vegades sobre gel amb PBS fred i s'afegia el tampó de llisi (**Taula M2**). Les cèl·lules es recol·lectaven amb l'ajuda d'un *scraper* (Sarstedt), es centrifugaven els llisats a 12.000 g durant 12 min a 4°C i s'obtenia el sobrenedant per a la posterior determinació de proteïna.

Per determinar la proteïna s'utilitzava el mètode de Bradford (Bradford, 1976), mitjançant el kit Coomassie (Bradford) Protein Assay (Thermo Scientific, Pierce).

Tampó	Composició
Tampó de Llisi	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,27 M sacarosa; 1 mM ortovanadat sòdic; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM glicerofosfat sòdic; 50 mM NaF; 5 mM pirofosfat sòdic; 1% NP-40 (1% Tritó en experiments de fraccionament) i just abans d'utilitzar: 0,1% β-mercaptoetanol i un cocktail d'inhibidors de proteases (Sigma)).
Tampó de fraccionament	10 mM HEPES pH 7.9, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl

Taula M2: Composició del tampó de llisi i fraccionament cel·lular

4. Fraccionament subcel·lular

Es van sotmetre a fraccionament subcel·lular cèl·lules SH-SY5Y, neurones corticals de rata i ratolí i cèl·lules 293T transfectades amb diversos vectors d'expressió.

Les cèl·lules van ser llisades quan presentaven un 90% de confluència i els cultius primaris a 7 DIV, amb 1 ml per disc de 10 cm de tampó de fraccionament fred (**Taula M2**). Aquest tampó és hipotònic, fet que fa que les cèl·lules rebentín sense necessitat de cap detergent. Després d'incubar 10 min sobre gel, les cèl·lules es recollien amb *scraper* i es transferien a un homogeneïtzador Dounce (40 vegades amunt i avall). En aquest punt es separaven 250 µl corresponent a la proteïna total abans de fraccionar (TOTAL). Seguidament, es centrifugava 15 min a 2.000 g a 4°C per separar (i descartar) la fracció nuclear i restes de cèl·lules que no havien rebentat (*pellet*). El sobrenedant era sotmès a una nova centrifugació de 15 min a 20.000 g a 4°C, per separar orgànuls com mitocondries i lisosomes i posteriorment a una centrifugació d'1 hora a 100.000 g a 4°C. El sobrenedant resultant era considerat la FRACCIÓ CITOSÒLICA, mentre que el *pellet*, un cop rentat amb tampó de fraccionament, es resuspensia en 300 µl de tampó de llisi (Taula 1) amb 1% Tritó X-100. L'extracte obtingut es mantenia 45 minuts rodant en nòria a 4°C i es sotmetia a una nova centrifugació d'1 hora a 100.000 g a 4°C. El sobrenedant resultant era considerat la FRACCIÓ MEMBRANES TRITÓ, mentre que el *pellet* era resuspès amb Tris-HCl 50 mM + 1% SDS (FRACCIÓ MEMBRANES SDS). Un cop

obtingudes les diferents fraccions es mesurava la quantitat de proteïna (descriu a l'apartat 3.3) i es carregava la mateixa quantitat de proteïna de cada fracció. Per a cada fraccionament s'utilitzaven 3 discos de 10 cm. La **figura M7** mostra un esquema simplificat del mètode.

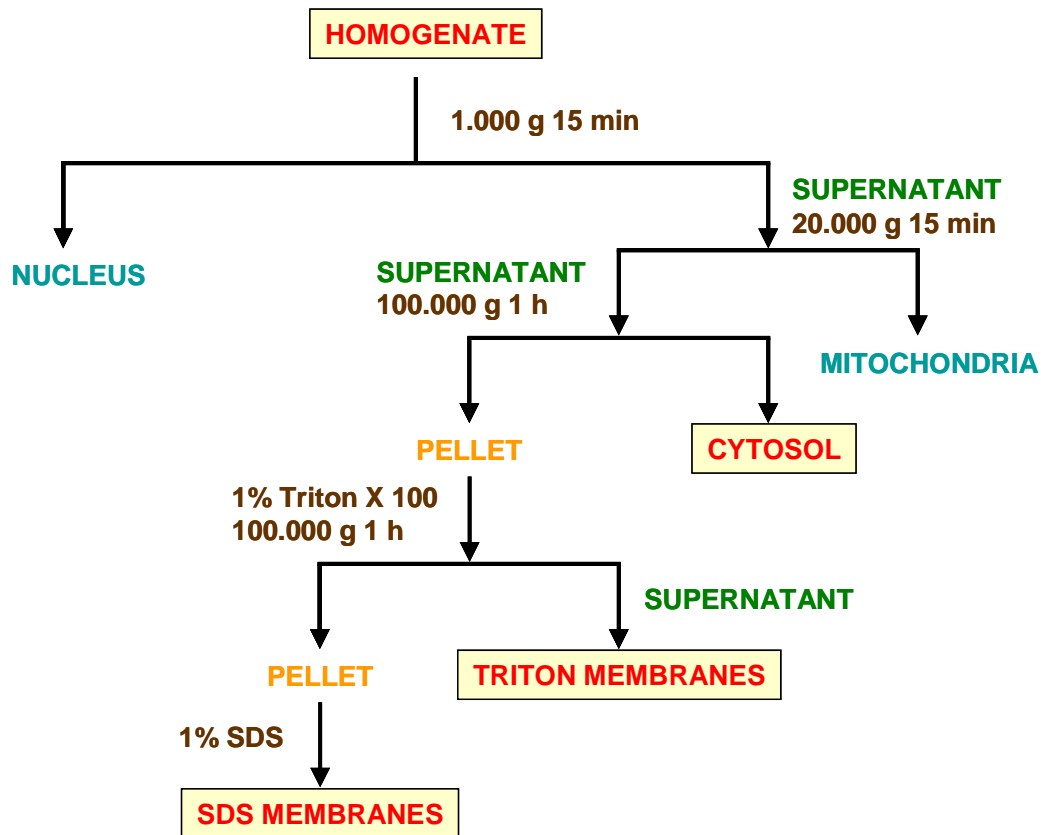


Fig. M7: Representació esquemàtica del fraccionament subcel·lular.

Tractaments realitzats a cultius cel·lulars previs al fraccionament subcel·lular:

- **Tractament amb KCl:** Es van realitzar tractaments en cèl·lules SH-SY5Y i neurones corticals de ratolí.
 - o Les cèl·lules SH-SY5Y van ser platejades i 48 hores més tard es va afegir KCl 10 mM durant 20 min a 37°C prèviament a ser llisades i procedir al fraccionament subcel·lular pertinent.
 - o Neurones corticals de ratolí a 12 DIV van ser tractades amb 50 mM KCl durant 20 min a 37°C. Immediatament després van ser llisades i subjectes a fraccionament subcel·lular.
- **Tractament amb 2-BP:** Cèl·lules SH-SY5Y van ser platejades i a les 48 hores es pretractar les cèl·lules durant 4 hores amb 100 µM de l'inhibidor de la palmitoilació 2-bromopalmitat en els casos indicats. Immediatament després les cèl·lules van ser despolaritzades amb 10 mM KCl durant 20 min a 37°C i llisades i subjectes a fraccionament subcel·lular.

5. Assaig ABE

L'*acyl-biotin exchange (ABE) assay* (assaig ABE) és una tècnica utilitzada per a la determinació de palmitoïlacions en cisteïnes. La base de la tècnica és el bloqueig dels grups tiol lliures amb l'agent alquilant de cisteïnes N-etilmaleimida (NEM), seguit del tall específic de l'enllaç tioester de les cisteïnes modificades amb el reactiu hidroxilamina (HAM), per finalment bloquejar els nous grups tiols exposats amb el reactiu específic de grups sulfidril biotinamido-4-[4'-(maleididometil) ciclohexancarboxamido] butà (biotina-BMCC). Les proteïnes palmitoïlades es poden detectar per western blot utilitzant anticossos contra streptavidina o biotina (Drisdell and Green, 2004). Una variant de la tècnica (Ohno et al., 2009) es basa en, un cop substituït el palmitat per la biotina-BMCC, immunoprecipitar la proteïna biotinilada amb estreptavidina i fer un western blot contra la proteïna d'interès, de manera que les proteïnes palmitoïlades en origen es poden discernir de les no modificades.

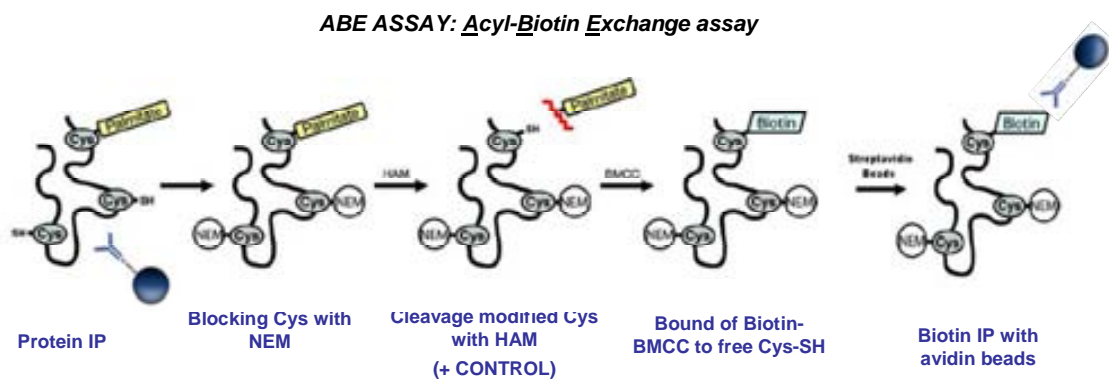


Fig. M8: Representació esquemàtica de l'assaig de palmitoïlació ABE assay. L'*acyl-biotin exchange assay* (ABE assay) consisteix en la immunoprecipitació de la proteïna d'interès amb anticossos específics seguit del bloqueig dels grups sulfidril de les cisteïnes no modificades amb el reactiu NEM. Seguidament es trenca l'enllaç del palmitat amb la proteïna amb hidroxilamina (HAM) i s'incorpora biotina a les cisteïnes que han quedat lliures. Posteriorment, s'immunoprecipita la proteïna modificada utilitzant una resina d'estreptavidina. Per últim s'analitza per immunoblot l'immunoprecipitat i es compara amb la mostra control (sense tractar amb HAM).

Es va llisar cervell de rata de 6 setmanes amb tampó de llisi ABE (Tampó A, **Taula M3**) + 50 mM NEM. Es van immunoprecipitar 1,5 mg de llisat amb anticossos específics per BRSK1 i BRSK2 1 hora a 4°C en rotació. Posteriorment es renta una vegada amb tampó A + 10 mM NEM, una vegada amb tampó astringent ABE (**Taula M3**) i tres rentats amb tampó A sense NEM. En aquest punt es separa la mostra en dos: una s'incuba tampó A i l'altre amb el mateix tampó amb 1 M HAM durant 1 hora a temperatura ambient en rotació. Després d'un rentat amb tampó de A a pH 6,2, s'incuba la mostra amb 1 µM biotina BMCC (en tampó A pH 6,2) 1 hora a 4°C en rotació. Seguidament es renta amb tampó A pH 6,2 i s'elueix la proteïna immunoprecipitada amb 80 µl de tampó d'elució ABE (**Taula M3**) 5 min a temperatura ambient. Després de diluir 20 vegades amb tampó A, s'immunoprecipita la proteïna biotinilada amb una resina d'agarosa amb avidina conjugada (Sigma) durant 1 hora a 4°C. Finalment es renta dues vegades amb

10 mM Tris-HCl pH 7,4 i la proteïna unida a la resina es desenganxa amb tampó de càrrega prèviament al *western blot*.

Una representació esquemàtica de l'assaig es mostra en la figura M8.

Tampó/Reactiu	Composició
Tampó de llisi ABE (Tampó A)	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritó X-100
Tampó astringent ABE	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% SDS + 10 mM NEM
Tampó d'elució ABE	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA and 2% SDS

Taula M3: Composició dels tampons necessaris per realitzar l'assaig ABE.

6. Tècniques immunocitoquímiques

Per a l'anàlisi immunocitoquímic, les cèl·lules crescudes sobre portaobjectes pretractats amb poli-D-lisina van ser rentades dues vegades amb PBS i fixades amb paraformaldehid (PFA) al 4% en PBS durant 20 min a temperatura ambient. Després de 3 rentats de 5 min amb PBS en agitació suau, es va permeabilitzar amb la solució A durant 7 min, seguit d'un rentat amb PBS i 15 min amb la solució B. Pel bloqueig es va utilitzar la solució C durant 1 hora. Durant el bloqueig es van preparar les dilucions dels anticossos en solució D i es van incubar tota la nit a 4°C. L'endemà es renten els portaobjectes 4 vegades amb PBS, seguit de 45 min d'incubació amb l'anticòs secundari pertinent en solució D (Dilució 1/400) i 4 rentats amb PBS. Per tenyir els nuclis cel·lulars, s'afegeix 5 ng/ml de Hoescht 33259 (Invitrogen) diluït en aigua destil·lada durant 5 min i seguit de 4 rentats amb PBS. Finalment, es munten les preparacions amb medi de muntatge Fluorosave™ (Calbiochem), i les mostres es visualitzen al microscopi de fluorescència Nikon Eclipse 90i.

Per a l'estudi de la unió de BRSK1 a membranes presinàptiques en cultius primaris de neurones corticals de rata i ratolí es van tractar els cobreobjectes durant 90 segons amb 0,1% Tritó X-100 diluït en PBS en agitació suau, immediatament abans de ser fixades amb 4% PFA.

Els tampons utilitzats per les tècniques immunocitoquímiques es mostren en la **Taula M4** i els anticossos secundaris a la **Taula M5**.

Solució	Composició
Solució A	0.02% saponina en PBS
Solució B	0.01% saponina; 10 mM glicina en PBS
Solució C	0.01% saponina; 10 mM glicina; 5% BSA en PBS
Solució D	0.01% saponina; 1% BSA en PBS

Taula M4. Tampons utilitzats per tècniques immunocitoquímiques.

Animal en el què ha estat produït	IgG reconeguda	Absorció (nm)	Color
Donkey	Sheep	488	Verd
Donkey	Sheep	594	Vermell
Donkey	Mouse	488	Verd
Donkey	Mouse	568	Vermell
Donkey	Rabbit	488	Verd
Donkey	Rabbit	568	Vermell
Donkey	Mouse	647	Vermell llunyà

Taula M5. Anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència.

7. Tècniques de biologia molecular

7.1. Preparació de bacteris competents i emmagatzematge de plasmidis.

Els DNAs plasmídics obtinguts i utilitzats durant aquest treball s'han emmagatzemat tant en *stocks* de DNA com en glicerinat bacterians.

7.1.1. Obtenció de bacteris supercompetents.

Per realitzar les tècniques de biologia molecular es van generar *stocks* de bacteris supercompetents. A primera hora es sembra una colònia d'una placa fresca d'*E.coli* DH5 α en un tub de 5 ml amb LB sense antibiòtic i es deixa créixer tot el dia a 37°C. A última hora es sembren els 2,5 ml en un erlenmeyer amb 250 ml d'LB (dilució 1/100). Es deixa créixer tota la nit a temperatura ambient i l'endemà es determina la OD600 (és aproximadament 0,6). Posteriorment es deixa el cultiu en gel durant 10 min i es centrifuga a 1000 g (3000 rpm rotor Beckman JA14) durant 10 min a 4°C. Es treu el sobrenedant (amb compte perquè el *pellet* és molt fràgil), es resuspèn amb 80 ml de tampó TB (**Taula M6**) i es torna a incubar 10 min en gel i a centrifugar a 1000 g durant 10 min a 4°C. El *pellet* resultant es resuspèn en 18,6 ml de tampó TB i a continuació s'hi afegeix 1,4 ml de DMSO (concentració final del 7%). Ràpidament es fan alíquotes de 500 μ l i es congelen en nitrogen líquid.

Reactiu	Molaritat	Mw	500 ml
PIPES	10 mM	302,4	1,512 g
CaCl ₂	15 mM	147,02	1,10 g
KCl pH 6,7 amb KOH**	250 mM	74,55	9,3g
MnCl ₂	55 mM	197,9	5,44 g
Afegir el 55 mM MnCl ₂ després d'ajustar el pH a 6,7 del KCl amb KOH!!!			

Taula M6: Composició del tampó TB

En els casos de producció de proteïna recombinant s'utilitzava la soca bacteriana *E.coli BL21 DE RP human* (resistents al cloramfenicol).

En aquests casos s'obtenien els bacteris competents frescos: Es picava una colònia d'una placa d'agar amb cloramfenicol (34 µg/ml). Es feia créixer un cultiu de 5 ml d'LB amb cloramfenicol tota la nit a 37°C en agitació i l'endemà es transferien 150 µl a un nou tub amb 5 ml d'LB + cloramfenicol. Es deixava créixer durant 90 min a 37°C en agitació i es centrifugava a 1500 g durant 5 min a 4°C. El *pellet* resultant es va resuspendre en 500 µl de CaCl₂ 50 mM estèril i es mantenien el bacteris en gel durant 30 min. Seguidament, es tornava a centrifugar de nou a 1500 g 5 min a 4°C i es resuspensia en 500 µl de CaCl₂ 50 mM estèril. En aquest punt els bacteris ja estan llestos per ser usats, però es poden mantenir en gel durant varies hores (inclús pot augmentar l'eficiència de transformació posterior).

7.1.2. Transformació de bacteris.

Per a la transformació de DNA, entre 2 i 10 ng de DNA plasmídic eren barrejats amb 100 µl de bacteris supercompetents i incubats durant 30 min en gel, per afavorir l'apropament del DNA a les membranes bacterianes. Passat aquest temps, es realitzava un xoc tèrmic (2 min a 42°C seguit de 2 min a 4°C) per aconseguir incorporar el DNA als bacteris i immediatament s'afegia 400 µl de medi SOC (**Taula M7**) i s'incubava 1 hora a 37°C en agitació. Aquesta hora permet als bacteris recuperar-se de l'estrés produït pel procés de fer-les competents i el xoc tèrmic, així com els hi permet expressar la resistència a l'antibiòtic (codificat pel plasmidi). Finalment, es plaquegen entre 30 i 500 µl en plaques d'LB amb l'antibiòtic adient.

Medi	Composició
LB	25 g/l medi <i>Luria Broth Base</i> (Invitrogen, ref. 12795-027) en aigua destil·lada (autoclavat)
SOC	2% w/v triptona; 0,5% w/v extracte de llevat; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM glucosa.

Taula M7. Composició dels medis de cultiu bacterians LB i SOC

7.1.3. Amplificació i emmagatzematge de plasmidis.

Un cop obtingudes les colònies que contenen el plasmidi desitjat, es creixen en un cultiu de 5 ml durant el dia i, en funció de la quantitat de DNA necessària es procedeix a fer una Miniprep (Qiagen) o un cultiu de 250 ml seguit d'una Midiprep (Capsumlab) seguint el protocol de la casa comercial. En qualsevol cas, sempre es procedeix a fer un glicerinat consistent en 800 µl del cultiu amb 200 µl de glicerol. Aquests stocks es guarden a -80°C.

7.2. Clonatge de vectors

7.2.1. Amplificació per PCR

La obtenció de varis constructes utilitzats durant aquest treball es van realitzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

En un volum final de 50 µl de reacció es van afegir els següents components:

Component	Concentració "stock"	Concentració final	Volum
dNTPs (dATP,dTTP,dGTP,dCTP)	10 mM (2,5 µM cada)	5 µM (1,25 µM de cada)	1 µl
Tampó polimerasa Expand	10X	1X	5 µl
Primer FW	100 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5 µl
Primer RW	100 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5 µl
DNA motlle	En funció del plasmidi inicial	0,1 i 1 ng/µl	X µl
Polimerasa Expand (Roche)	2,6 U/ µl	26 mU/µl	0,5 µl
H ₂ O destil·lada estèril			X µl

**És important afegir el 4% de DMSO a les reaccions amb els constructes de les BRKS donat que a la part 3' té un elevat contingut en CG que fa impossible d'amplificar el producte de PCR.

Es va seguir el programa de PCR següent (exemple pel constructe pCMVHA-BRSK1):

Temperatura	Temps	Fase	
95°C	1'	Hot start* ¹	
95°C	1'	25 cicles* ²	
65°C	1'		Desnaturalització DNA
72°C	2'		Hibridació de primers* ³
72°C	2'	Elongació* ⁴	
72°C	10'	Final de cicle	
4°C	Infinit	Manteniment a 4°C	

*¹ El temps de l'inici pot fluctuar entre 1' (plasmidis) i 10' (DNA genòmic)

*² Els cicles poden fluctuar entre 18 i 30.

*³ La temperatura d'hibridació dels primers va ser calculada en cada cas seguint la equació: $T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4 - 5$

*⁴ El temps d'elongació depèn de la polimerasa. En el cas de la utilitzada, la *Expand High Fidelity* (Roche), 45 seg per amplificats fins a 0,75 Kb; 1 min per 1,5 kb; 2 min per 3 Kb.

7.2.2. Mutagènesis dirigida

Les mutacions puntuals en diversos constructes obtingudes durant aquest treball es van realitzar mitjançant PCRs successives. A partir del motlle en el què es desitjava realitzar les mutacions puntuals, s'amplificava per PCR amb un primer específic de l'extrem 5' (amb les dianes de restricció per un posterior clonatge en el vector desitjat) i un altre amb la mutació desitjada (primer RW). En paral·lel es realitzava una altre PCR amb el primer amb la mutació (primer FW) i un primer específic de l'extrem 3' (amb el codó STOP en cas de ser necessari i les dianes de restricció adjacents).

Un cop obtinguts els dos fragments, es purificaven en gel d'agarosa (veure apartat 7.2.3.) i es tornava a realitzar una PCR utilitzant els productes i els *primers* en 5' i 3' de les reaccions anteriors. Finalment s'obté un producte de PCR amb la mutació desitjada.

Tots els *primers* utilitzats durant aquest treball es poden trobar en l'**annex 2**.

7.2.3. Purificacions de DNA en gels d'agarosa, digestions i lligacions.

Una vegada obtinguts els fragments de PCR es van purificar en columna amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) seguint el protocol determinat per la casa comercial, en un volum d'elució del DNA final de 30 µl.

Les bandes pures es van tallar amb els enzims de restricció adients en cada cas durant 3 hores a 37°C en un volum final de 30 µl.

Component	Volum
Tampó Enzim (10X) * ¹	3 µl
DNA a tallar* ²	15 µl
Enzim 1	1 µl
Enzim 2	1 µl
Aigua destil·lada estèril	10 µl

*¹ En cada cas es comprovava la idoneïtat de condicions del tampó pels dos enzims consultant la **taula de l'annex 3**. En cas de no ser compatibles, primer es tallava amb el tampó de l'enzim amb menys sal 3 hores i després s'hi afegia el següent tampó (alta concentració de sal) 3 hores més.

*² Provenient dels 30 µl eluïts després de la purificació del gel d'agarosa.

Paral·lelament es va tallar 1 µg del plasmidi necessari per a cada clonatge concret. En el cas del plasmidi, la última mitja hora de digestió s'hi afegia 5 µl de fosfatasa alcalina (Roche) directament sobre la reacció per evitar la relligació del plasmidi.

Els fragments i el plasmidi digerits es van purificar en gel d'agarosa. Posteriorment es va procedir a la lligació utilitzant dues relacions de plasmidi:insert (1:1 i 1:4) i es va barrejar amb 5 µl de lligasa (Takara) durant 1 hora a 16°C al termociclador. Es va afegir un control d'autolligació amb plasmidi i sense insert. Immediatament després es van afegir 100 µl de bacteris supercompetents sobre les lligacions i es va transformar i sembrar en les plaques adients com ha estat descrit anteriorment.

Les colònies de les plaques control es picaven i es creixien tota la nit en un cultiu de 5 ml d'LB amb l'antibiòtic adient. L'endemà s'extreia el plasmidi mitjançant una Miniprep (kit QIAGEN Plasmid Miniprep, QIAGEN) i es tallaven amb enzims de restricció, les dianes dels quals es trobaven dins l'insert i fóra el plasmidi, per comprovar la inserció i orientació del constructe obtingut.

Tots els clonatges van ser comprovats per seqüenciació amb primers específics al Servei de Genòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

8. Expressió de proteïnes en sistemes bacterians

8.1. Inducció de l'expressió proteica en *E.coli* BL21

Per a l'expressió de proteïnes recombinants, com s'ha esmentat anteriorment, es va utilitzar la soca *E.coli* BL21 DE RP human. Aquesta soca presenta les avantatges que és menys sensible a l'estrès causat per la sobreproducció de proteïna exògena i conté

còpies extra dels tRNAs més usats en l'expressió de proteïnes heteròlogues a *E.coli* (en el plasmidi pACYC que els hi confereix resistència al cloramfenicol).

Els plasmidis utilitzats per a la expressió de proteïnes recombinant han estat el pGEX6P1 (obtenció de proteïnes unides a GST en N-term) i el pETDuet1, pET15b, pET23a i pET28b-SUMO (obtenció de proteïnes unides a 6xHis en N-terminal).

Es va transformar 5 ng del constructe d'interès en BL21 i a partir d'una colònia es va créixer un cultiu de 5 ml d'LB amb cloramfenicol (34 µg/ml) i l'antibiòtic pel qual confereix resistència el plasmidi utilitzat. Un cop confluent, es va transferir en un cultiu de 500 ml d'LB amb els corresponents antibiòtics i es va deixar créixer fins que va arribar a una densitat òptica a 600 nm de 0,7. En aquell moment es va afegir 200 µM d'isopropil-β-D-1-tiogalacopiranòsid (IPTG) i es va cultivar 3 hores a 37°C (el temps i la temperatura podien variar en funció del constructe).

Un cop induït, es centrifugava el cultiu a 1.000 g durant 30 min a 4°C i es resuspensia el *pellet* en 30 ml de tampó de llisi (**Taula M2**) fred, es sotmetia a un cicle de congelació descongelació a -20°C, es sonicava (6 X 30 seg) i es centrifugava novament a 25.000 g durant 30 min a 4°C.

8.2. Purificació i emmagatzemament de proteïnes recombinants

A partir dels 30 ml de sobrenedant obtingut es procedia a la purificació de la proteïna amb resines específiques.

8.2.1. Purificació de proteïnes amb GST

Es van incubar 200 µl de resina glutatió-sefarosa (prèviament preequilibrada amb tampó de llisi) amb el llisat bacterià durant 2 hores a 4°C en agitació. Posteriorment a una centrifugació de 2 minuts a 1.000 g, es va rentar la resina quatre vegades amb tampó de llisi complementat amb 500 mM de NaCl i tres rentats amb tampó quinasa (**Taula M8**). Per a l'elució es van utilitzar 100 µl de tampó d'elució (**Taula M8**) complementat amb 40 mM glutatió reduït.

8.2.2. Purificació de proteïnes amb His

En el cas de les proteïnes amb una cua d'histidines unida s'utilitzava un protocols semblant amb petites modificacions. S'utilitzaven 200 µl de resina Ni²⁺-agarosa i durant la incubació de llisat amb la resina s'afegia 10 mM imidazol, als tampons de rentat se'ls afegia 20 mM imidazol i per a l'elució final s'utilitzava 200 mM imidazol.

En tots dos casos, si la utilització de les proteïnes en experiments posteriors ho requeria, es dialitzaven utilitzant sacs de diàlisi (sigma) de 10.000 Da de porus i/o es concentraven utilitzant centricones (Sartorius) de diferent mida de filtre.

Tampó	Composició
Tampó quinasa	50 mM Tris pH 7.5; 0.1 mM EGTA; 0.1 % (v/v) β-mercaptoetanol
Tampó d'elució	50 mM Tris pH 8; 0.1 mM EGTA; 0.1 % β-mercaptoetanol + 0,27 M sacarosa

Taula M8: Composició del tampons utilitzats per a la purificació de proteïnes.

9. Tècniques lipídiques

9.1. Obtenció de *lipid rafts* de sinaptosomes de rata

Els sinaptosomes són estructures artificials que contenen les terminals sinàptiques aïllades. Els sinaptosomes contenen tots els components necessaris per a l'absorció, emmagatzemament i alliberament de neurotransmissors.

Es van obtenir sinaptosomes a partir de rates Sprague-Dawley de 6 setmanes seguint el protocol anteriorment descrit (Gil et al., 2006). Es va homogeneïtzar el cervell amb 40 volums (w/v) de tampó d'homogeneïtzació (**Taula M9**) amb l'ajuda d'un homogeneïtzador de tefló (Braun) (12 vegades amunt i avall a 900 rpm). A continuació es van realitzar dues centrifugacions seqüencials, la primera a 1.000 g 5 min a 4°C (descartar cèl·lules no trencades i nuclis cel·lulars) i una altra a 12.000 g 20 min a 4°C per obtenir un *pellet* enriquit en sinaptosomes. Aquest *pellet* es va resuspendre en 10 ml de tampó sodi (**Taula M9**).

Per a la obtenció de *lipid rafts* de sinaptosoma de rata es va seguir el protocol descrit anteriorment (Gil et al., 2005).

Els sinaptosomes obtinguts es van solubilitzar incubant-los amb 1% Tritó X-100 durant 30 min a 4°C en rotació. Immediatament després es va barrejar 1,5 ml de sinaptosomes solubilitzats amb 1,5 ml de sacarosa 90% (w/v) en tampó sodi. Els 3 ml es van dipositar al fons d'un tub de centrifuga Ultra Clear (Beckman) i es va afegir a sobre un gradient de 6 ml de sacarosa al 35% (w/v) i 3 ml al 16% (w/v), tot preparat en tampó sodi. Un cop els gradients formats es va centrifugar durant 16 hores a 100.000 g a 4°C amb desacceleració lenta. Al finalitzar, es van recollir 10 fraccions d'1 ml, trobant a les primeres fraccions els *lipid rafts* i a les últimes la proteïna soluble.

Tampó	Composició
Tampó d'homogeneïtzació	PBS complementat amb 0.32 M de sacarosa
Tampó sodi	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 5 mM NaHCO ₃ ; 1 mM MgCl ₂ ; 1.2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM HEPES pH7.4; 10 mM glucosa

Taula M9: Composició dels tampons per a l'obtenció de sinaptosomes de rata

9.2. Extracció de lípids de fraccions "raft" i "no raft"

Per la determinació del contingut de sulfàtid en fraccions de "lipid rafts" i "no rafts" es va seguir el protocol establert per Bligh i Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Es van extreure els lípids afegint 4.8 ml de cloroform:metanol (1:2, vol:vol) sobre 1 ml de cada fracció en tubs de vidre. Un cop barrejats es van deixar a temperatura ambient durant 30 min, es van afegir 2 ml de cloroform i d'aigua per separar en dues fases. Després d'agitar novament, es van centrifugar els tubs 10 min a 2.000g i es va descartar la fase aquosa (fase superior). Posteriorment, es torna a extreure els lípids (3.4 ml de la fracció amb metanol) afegint i barrejant amb metanol:aigua (1:1, vol:vol). Finalment, els lípids obtinguts en 3 ml de la fracció amb metanol s'evaporen sota flux de nitrogen, es resuspenen en 1 ml de 20 mM HEPES pH 7,5 amb 100 mM NaCl i després d'incubar 1 hora a temperatura ambient s'agiten en vòrtex (s'obté una solució tèrbola) i es soniquen 30 sec per formar les vesícules (solució clarificada).

9.3. Lipid-protein overlay assay

Per a la determinació de les interaccions lípid-proteïna es van utilitzar membranes de nitrocel·lulosa amb lípids incorporats comercials (PIP stripsTM i SphingostripsTM, Echelon) i produïdes al laboratori. Per a l'obtenció d'aquestes últimes, es van preparar *stocks* de diverses dilucions de fosfatidilcolina i sulfàtid en 1:1 cloroform:metanol. Es va afegir 1 µl de cada dilució sobre una membrana de nitrocel·lulosa Hybond-C ExtraTM (Amersham Biosciences) per obtenir les quantitats de lípids desitjades i es va deixar assecar durant 30 min a temperatura ambient.

En els dos casos es va seguir el mateix protocol per a la visualització de les interaccions GST-proteïna amb els lípids (tot a temperatura ambient). Es va bloquejar la membrana durant 1 hora en agitació amb PBS complementat amb 1% de llet desnatada (solució de bloqueig) i posteriorment es va incubar 1 µg/ml de proteïna dissolta en la mateixa solució durant 1 hora en agitació. Després de 3 rentats de 10 min en agitació amb PBS complementat amb 0,1% (v/v) Tween-20 (Solució de rentat), es van incubar les membranes amb anticòs anti-GST (Santa Cruz) diluït 1/2500 en solució de bloqueig durant 1 hora en rotació, seguit de 3 rentats de 10 min amb solució de rentat. Finalment es va incubar amb un anticòs secundari contra conill (1/2000) diluït en solució de bloqueig i després de 3 rentats de 10 min amb solució de rentat es va detectar la interacció lípid-proteïna per quimioluminescència (ECL "casolà", components a la **taula M10**) utilitzant pel·lícules fotogràfiques (Medical X-Ray Film, Agfa).

9.4. Assaig d'unió a liposomes

Es van preparar *stocks* en cloroform:metanol de fosfatidilcolina (PC, 2mg/ml), fosfatidiletanolamina (PE, 2 mg/ml), colesterol (Cho, 2 mg/ml) i sulfàtids derivats de cervell boví (Sulf, 1,25 mM). Es van preparar liposomes utilitzant les relacions PC:PE:Cho (1:1:1) pels liposomes control i PC:PE:Cho:Sulf (1:1:1:4) pels liposomes amb sulfàtid. Es va evaporar el solvent dels lípids sota un raig de nitrogen i es van resuspendre en tampó *liposome binding assay buffer* (LBAB, 20 mM Tris pH 6.8, 100 mM NaCl) a una concentració final de 2,5 mg/ml. Es van incubar les preparacions 1 hora a 60°C i es van sonicar 6 vegades 30x30 seg fins aconseguir una dissolució lipídica tèrbola.

Es van barrejar 50 µl dels liposomes obtinguts (125 µg) amb 5 µg de la proteïna recombinant adient, es va incubar 20 min a temperatura ambient en rotació a la nòria i es va centrifugar durant 20 min a 16.400 g a 4°C. Es van afegir 10 µl de tampó de càrrega concentrat (5x) sobre els sobrenedants i els *pellets* es van resuspendre en 60 µl de LBAB amb tampó de carrega.

Finalment es va analitzar el sobrenedant (proteïna no unida als liposomes) i el *pellet* (liposomes amb proteïna unida) mitjançant una electroforesi en gel d'acrilamida i tinció amb blau de Coomassie.

9.5. Quantificació de sulfàtid de diferents extractes cel·lulars

Els lípids dels diferents cultius van ser extrets a partir de dues plaques de 6 cm per cultiu d'igual manera que a l'apartat 9.2. (Bligh and Dyer, 1959) amb variacions dels volums.

Pas del protocol	Extracció raft/no raft	Extracció extractes cel·lulars
Cloroform:metanol (1:2, vol:vol)	1.6:3.2 ml	0.4:0.8 ml
Quantitat extracte	1 ml de cada fracció	1 disc de 6 cm
Cloroform:aigua (1:1, vol:vol)	1:1 ml	0.5:0.5 ml
Cloroform:aigua (1:1, vol:vol) rentat	1:1 ml	0.5:0.5 ml
Fracció orgànica aïllada	3 ml	0,6 ml

Les extraccions lipídiques de l'apartat 9.2 i 9.5 i la preparació dels liposomes de l'apartat 9.4 van ser realitzats pel Dr. Enrique Claro, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Neurociències, UAB).

10. Tècniques per a l'estudi de proteïnes

Es van separar les proteïnes del llisats cel·lulars o preparacions proteiques mitjançant una electroforesi desnaturalitzant en gel d' SDS-acrilamida, amb el kit Mini-Protean III de Bio Rad.

Les mostres es van diluir en tampó de càrrega (**Taula M10**), es van escalfar durant 5 min a 100°C i es van carregar diferents quantitats de mostra (entre 5 i 35 µg) en gels amb diferent percentatge d'acrilamida en funció del pes molecular de les proteïnes a observar. Es va aplicar un voltatge constant de 185V durant 55 min.

Un cop separades, les proteïnes es van transferir en membranes de nitrocel·lulosa utilitzant el kit *Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell* (Bio Rad), durant 100 min a voltatge constant de 100 V.

Posteriorment les membranes van ser incubades amb tampó de bloqueig (**Taula M10**) durant 1 hora en agitació i incubades amb l'anticòs primari adient (**Annex 4**) durant tota la nit a 4°C en rotació. Després de 3 rentats de 5 min amb TBS-T, es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave adient en tampó de bloqueig (dilució 1/6000) durant 1 hora en agitació seguit de 3 rentats de 10 min amb TBS-T. Per a la detecció es va utilitzar el reactiu luminol, donada la reacció de quimioluminescència que dona en presència de peròxids (components de la reacció d'ECL "casolà" a la **taula M10**) i es va visualitzar sobre pel·lícules fotogràfiques (Medical X-Ray Film, Agfa).

Reactiu/Tampó	Composició
Tampó de càrrega	Tris-HCl 25 mM pH 6,8; 2% p/v SDS; 10% glicerol, DTT 1 M, 0,002% p/v de blau de bromofenol
Tampó d'electroforesi	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% SDS
Tampó de transferència	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% de Metanol
Tampó de rentat (TBS-T)	20 mM Tris; 150 mM NaCl a pH 7,6; 0,2 % Tween-20
Tampó de bloqueig	TBS-T + 5% de llet desnatada
Anticossos secundaris (Pierce)	rabbit anti-sheep (# 31480), goat anti-mouse (# 31430) y goat anti-rabbit (# 31460)
Reactiu de detecció 1	200 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,45 mM àcid cumàric; 10 mM luminol.
Reactiu de detecció 2	200 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,02% peròxid d'hidrogen

Taula M10: Reactius utilitzats per a la detecció de proteïnes

11. Tècniques per a la purificació de proteïnes

Es van utilitzar tècniques d'immunoprecipitació (IP) i pull-down (PD) per aïllar proteïnes endògenes o sobreexpressades d'extractes cel·lulars i proteïnes recombinants en assajos *in vitro*.

11.1. Immunoprecipitació (IP)

Es va incubar 1 µg de l'anticòs pertinent amb 10 µl de proteïna G-sepharose (GE Healthcare) en tampó de llisi (**taula M2**) durant 45 min a 4°C en agitació. Després de dos rentats amb tampó de llisi, es va incubar la resina amb entre 100 µg i 1'5 mg de l'extracte adient durant 90 min a 4°C en rotació. Posteriorment es van realitzar 2 rentats amb tampó de llisi complementat amb 500 mM de NaCl i un rentat amb tampó quinasa (**Taula M8**). En el cas en què la finalitat era observar interaccions entre proteïnes, s'abaixava l'astringència dels rentats, utilitzant 150 mM de sal en comptes de 500 mM. Les proteïnes immunoprecipitades eren eluïdes amb tampó de càrrega (taula) i bullides a 100°C durant 5 min, per posteriorment ser analitzades per western blot.

11.2. Pull-down (PD)

L'assaig de pull-down es va utilitzar en els casos en que es disposava d'extractes amb sobreexpressió de proteïnes fusionades a "tags" específics. Es van incubar 5 µl de la resina adequada pre-equilibrats amb tampó de llisi amb entre 100 i 500 µg d'extracte proteic durant 1 hora a 4°C en rotació. Es va procedir als rentats, elució i anàlisi de la mostra purificada d'igual manera que per la IP.

12. Assajos d'ubiquitinació

Es van realitzar assajos per determinar la ubiquitinació de proteïnes amb proteïna recombinant (*in vitro*) i en models cel·lulars (*in vivo*).

12.1. Ubiquitinació *in vitro*

La reacció d'ubiquitinació a les cèl·lules es pot mimetitzar *in vitro* amb una proteïna substrat, les 3 lligases d'ubiquitina, monòmers d'ubiquitina i ATP-Mg²⁺. Per fer-ho es van obtenir els diferents reactius necessaris:

- **E2 lligases UbcH5 i UbcH7:** Es van obtenir els plasmidis pET15b-UbE2D2 i pET23a-UbcH7 de la casa comercial *Addgene*, codificants per His-UbcH5b i His-UbcH7 respectivament.
- **Ubiquitina:** A partir dels vectors d'expressió en eucariotes d'ubiquitina cedits pel Dr. Bernat Crosas, del departament de Biologia Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, es van subclonar en vectors d'expressió bacteriana pETDuet-1. A més, es van crear les mutacions puntuals de les lisines no ramificables en posició 48 (K48R) i 63 (K63R), en el mateix vector.
- **E3 lligasa Smurf1:** Es va subclonar a partir dels vectors pCMV5b-Flag-Smurf1 WT i C699A obtinguts a *Addgene*, a vectors d'expressió bacteriana pGEX6P1, per obtenir Smurf1 unida a GST. Tot i això, finalment es va utilitzar Flag-Smurf1 obtinguda de la casa comercial Sigma.
- **His-BRSK1:** Es va obtenir a partir de cèl·lules d'insecte Sf9, seguint el protocol descrit a l'apartat 14.
- **GST-Par6:** Es va obtenir subclonant a partir del vector d'expressió eucariota pCMV5b-Flag-Par6 obtingut a *Addgene* a vectors d'expressió bacteriana pGEX6P1.

Per completar la reacció es va obtenir la E1 lligasa Ube1 de la casa comercial *Tebu-Bio*.

En un volum final de 15 µl, es van afegir 3 µl de tampó d'ubiquitinació 5 vegades concentrat (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT i 2 mM ATP), 100 ng de E1 (Tebu-Bio, Ref. UB101), 150 ng de His-UbcH5b recombinant, 500 ng de Flag-Smurf1 (Sigma, Ref. SRP0227), 2 µg de proteïna substrat i 5 µg d'ubiquitina recombinant. La reacció es va dur a terme durant 1 hora a 30°C i es va aturar afegint 500 µl de tampó TNTE (50 mM Tris-HCl; 0,1% Tritó X-100; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA). Posteriorment es va immunoprecipitar la proteïna substrat amb anticossos específics durant 1 hora a 4°C. Després de 2 rentats amb tampó TNTE complementat amb 0,5 M NaCl i 1 rentat amb TNTE, es va afegir tampó de càrrega i es va analitzar el patró d'ubiquitinació per electroforesi i western blot. En tots els experiments es realitzava un control de reacció sense un dels components.

12.2. Ubiquitinació *in vivo*

Per avaluar la ubiquitinació de les BRSKs *in vivo*, es van transfectar 2 µg de HA-BRSK, 2 µg de His-Ubiquitina i, en els casos indicats, 2 µg de Flag-Smurfs, en cèl·lules 293T seguint els protocols estàndard. 48 hores més tard les cèl·lules es van llisar amb 1 ml de tampó Ub1 complementat amb 10 mM NEM, es va sonicar el llisat i es va realitzar el pull-down amb 10 µl de resina *His-Select Nickel Agarose* (Sigma). La proteïna precipitada va ser rentada 2 vegades amb tampó Ub1, 2 vegades amb tampó Ub2 i una vegada amb tampó Ub3. Finalment la proteïna es va eluir amb tampó de carrega diluït en tampó Ub3, es va escalfar 5 min a 100 °C i es va analitzar per electroforesi i *western blot*. La composició del tampons es mostra en la **taula 11**.

Tampó	Composició
Ub1	6M clorur de guanidini, 0.1M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 10 mM imidazol, pH 8
Ub2	25% tampó Ub1 + 75% tampó Ub3
Ub3	25 mM Tris-HCl, 20 mM imidazol, pH 6.8

Taula M11: Composició dels tampons utilitzats per la determinació de la ubiquitinació *in vivo*.

13. Obtenció del complex trimèric LKB1-STRAD-MO25

La obtenció del complex trimèric LKB1-STRAD-MO25 es va realitzar en col·laboració amb la Dra. Julia Lorenzo, del grup d'Enginyeria de Proteïnes i Enzimologia de la Unitat de Proteòmica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB.

Es van transfectar 500 ml de cèl·lules 293T en suspensió amb 300 µg de GST-LKB1, 300 µg de Flag-STRAD i 300 µg de Myc-MO25. A les 48 hores es van llisar en 200 ml de tampó de llisi (**Taula M2**) i es van transferir a un homogeneïtzador Dounce (15 vegades amunt i avall). Després d'una centrifugació a 12.000 g durant 12 min, es van incubar els sobrenedants amb 200 µl de resina glutatió sefarosa durant 90 min en rotació. La proteïna precipitada es va rentar 4 vegades amb tampó de llisi complementat amb 150 mM NaCl, 4 vegades amb tampó de llisi i una vegada amb tampó d'elució (**taula M8**). La proteïna es va eluir en 1 ml de tampó d'elució complementat amb 40 mM glutatió i es va concentrar amb centricons fins a 0,5 mg/ml (Millipore). La puresa del complex es va analitzar amb gel desnaturalitzant d'acrilamida i tinció per Coomassie Blue.

14. Obtenció de BRSK1 pura de cèl·lules d'insecte

Per obtenir BRSK1 pura de cèl·lules d'insecte es van generar baculovirus amb el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) a partir del vector pFastBAC codificant per His-BRSK1 (Donat pel Dr. Dario Alessi, MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK).

La obtenció de partícules víriques i infecció de cèl·lules d'insecte la va realitzar el Dr. Ricardo Biondi (Research Group PhosphoSites, Johann Wolfgang Goethe University Hospital, Frankfurt, Alemanya). Es van infectar 500 ml de cèl·lules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf9) a una densitat de 1.5x10⁶ cèl·lules/ml amb una MOI (multiplicity of infection) de 5. Pasades 72 hores es va centrifugar el cultiu a 10 min a 4000 rpm. El

pellet es va resuspendre en 50 ml de tampó de llisi (**Taula M2**) i es va congelar amb nitrogen líquid.

La purificació de BRSK1 va ser realitzada per la Dra. Arantza Rodríguez Asiain. Després de disgregar el llisat amb un homogeneïtzador de vidre (20 *strokes*), es va centrifugar el llisat a 8000 rpm, 15 min a 4°C. Al sobrenedant se li va afegir NaCl fins obtenir una concentració final de 0,5M i es va purificar His-BRSK1 amb 5 ml de resina Ni²⁺-agarosa 2 hores a 4°C en agitació. Finalment es va rentar durant 14 hores la columna amb Tris 50 mM pH 7.4 con 0.5 M NaCl y 10 mM imidazol i es va eluir la proteïna amb 12 ml de tampó Tris 50 mM pH 7.4 amb 0.27 M sacarosa i 200 mM imidazol. La puresa de la mostra va ser comprovada per electroforesis i tinció de Coomassie.

15. Assajos d'activitat enzimàtica

Per avaluar l'efecte del sulfàtid en l'autofosforilació de BRSK1 es va pre-incubar 2 µg de BRSK1 pura d'insecte amb 9 µl de tampó LBAB, liposomes control o liposomes amb sulfàtid preparats pel *liposome-binding assay* (apartat 8.4) durant 10 min a 30°C. Després de l'addició de 10mM d'acetat magnèsic i 0,2 mM [γ -³²P]-ATP (600 cpm/pmol) durant 1 hora a 30°C, la reacció es va aturar afegint 8 µl de tampó de càrrega i bullides a 95°C durant 5 min. Després de resoldre les proteïnes amb gels SDS-PAGE, es va visualitzar l'autofosforilació de BRSK1 per autordiografia. La proteïna total va ser visualitzada per tinció de Coomassie.

Les reaccions per a l'estudi de la fosforilació *in vitro* de Tau1 per BRSK1 en presència de liposomes es van dur a terme en un volum final de 40 µl. Es va preincubar 100 ng de His-BRSK1 pura d'insecte i 100 ng de GST-HA-Tau amb 9 µl de tampó LBAB, liposomes control o liposomes amb sulfàtid durant 10 min a 30°C. La reacció es va iniciar afegint 10 mM d'acetat de magnesi i 100 µM d'ATP durant 1 hora a 30°C. Per finalitzar es va afegir 10 µl de tampó de càrrega (**taula M10**) i es van bullir les mostres durant 5 min a 100°C. Les mostres es van resoldre en un gel de poliacrilamida, transferides a membranes de nitrocel·lulosa i van ser detectades amb anticossos específics per a les proteïnes indicades en cada cas.

Per últim, les reaccions de fosforilació de BRSK1 de bacteri per LKB1 es van fer de manera anàloga als experiments d'autofosforilació de la BRSK1 d'insecte. En aquest cas, la reacció conté 1 µg de GST-BRSK1 purificada de bacteri i 1 µg del complex LKB1-STRAD-MO25.

16. Cristal·lització del domini SCR2 de BRSK1

16.1. Clonatge del vector pET28b-SUMO-SCR2.

El domini SCR2 es va clonar per PCR amb els primers His-SUMO-SCR2 FW i pGEX6P1 RW (**Annex 2**) amb els enzims de restricció BamHI i XhoI al vector pET28b-SUMO.

16.2. Inducció de l'expressió de His-SUMO-SCR2 i llisi bacteriana

El vector pET28b-SUMO-SCR2 es va transformar en bacteris *E. coli* BL21 RP Human. Es va picar una colònia i es van crèixer 6 litres de cultiu fins que la OD va arribar a 0,7, que es va induir amb 200 µM IPTG durant 3 hores a 37°C. Posteriorment els bacteris es van centrifugar 1.000 g durant 30 min a 4°C. El pellet resultant es va resuspendre en 50 ml de Tris-HCl 50 mM + 20% sacrosa i després de congelar i descongelar se li afegí 0,5 M NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 10 mM Imidazol i 0,1% NP-40, es sonica 6 cops (30 sec x 30 sec) i es centrifuga 15 min a 15.000 g.

16.3. Purificació del fragment His-SUMO-SCR2

El sobrenedant del pas anterior s'afegí a una columna amb 5 ml de resina His-Nickel agarosa prèviament pre-equilibrada amb tampó SCR2 (Tris-HCl 20 mM pH 8, 1 mM β-mercaptoetanol, 10 mM Imidazol i 350 mM NaCl). Immediatament després es renta la columna amb 50 ml de tampó SCR2, abans d'eluir la proteïna amb 10 ml de tampó SCR2 + 250 mM imidazol.

16.4. Tall amb la proteasa de SUMO SENP2 i dialització de les mostres.

En els casos en que es va tallar amb la proteasa de SUMO SENP2, prèviament al tall es va transformar el vector pET28b-SENP2 (codificant per His-SENP2) en bacteris *E. coli* BL21, es van induir durant 3 hores a 37°C i es va purificar la proteasa amb una resina de Ni²⁺-agarosa. Per realitzar els talls del fragment His-SUMO-SCR2, es van incubar 25 µg de SENP2 i es va afegir la mostra en sacs de diàlisi (Sigma, ref. D9777) amb el tampó SCR2 amb diferents concentracions de sal (indicat en cada cas). El tampó es va canviar entre 2 i 3 vegades abans de deixar-lo durant tota la nit.

16.5. Proves d'obtenció del domini SCR2 pur

Per assajar la diferent solubilitat del fragment SCR2 es van dialitzar 3 µg de la barreja de His-SUMO amb SCR2 amb el tampó SCR2 amb 100 mM de NaCl o sense NaCl com està descrit en l'apartat anterior. Al finalitzar la dialització, es va extreure la mostra del sac de diàlisi i es va centrifugar a 10.000 g durant 5 min a 4°C. El *pellet* es va resuspendre en tampó de càrrega diluït i es va analitzar la proteïna precipitada (*pellet*) i soluble (SN).

Per la purificació del fragment SCR2 per columnes de Ni²⁺-agarosa (amb 1 ml de resina) es va utilitzar 3 µg de la barreja de His-SUMO amb SCR2 dissolta en el tampó SCR2. Es va passar la mostra dues vegades per la resina i es va recuperar l'eluit. Posteriorment

es va rentar amb 10 ml de tampó SCR2 i per analitzar el material adherit a la resina, es va eluir amb tampó SCR2 + 250 mM imidazol.

16.6. Dicroïsmo circular del fragment SCR2

Per a l'anàlisi del fragment SCR2 per dicroïsmo circular es va utilitzar 100 µl del fragment pur a 0,1 mg/ml en tampó Tris-HCl 20 mM 250 mM NaCl + 1 mM BME. Es va utilitzar l'aparell J-715, JASCO .

16.7. Gel filtració del fragment His-SUMO-SCR2

Per obtenir el fragment His-SUMO-SCR2 sense fragments de degradació es va realitzar una gel filtració Sephadex 200. Es va rentar la columna amb 20 ml de tampó SCR2 (amb 250 mM NaCl) i es va aplicar 12 ml del fragment His-SUMO-SCR2 a 1 mg/ml. Es van recollir les fraccions 37 a 47 (5 ml per fracció) i es van analitzar 40 µl per gel d'acrilamida desnaturalitzant i tinció de Coomassie. Les fraccions 37 a 41 es van ajuntar i concentrar utilitzant *centricons* de 10.000 MW, centrifugant a 5.000 g a 4°C fins a obtenir 150 µl de mostra a aproximadament 10 mg/ml.

16.8. Proves de cristal·lització del fragment His-SUMO-SCR2

Es va afegir la mostra obtinguda en l'apartat 16.7 a diferents plaques comercials de la marca Molecular Dimensions (**Taula M12**).

Placa	Condicions	pHs	% Proteïna precipitada	Referència
MDL-JCSG-Plus	Diferents PEG i sals	Entre 4 i 10	60-70	MD1-40
MDL-PACT	Diferents PEG, anions i cations	Entre 4 i 9	100	MD1-36
MDL-Morpheus	Diferent alcohols		100	MD2-100-73

Taula M12: Característiques de les plaques utilitzades per a les proves de cristal·lització del fragment His-SUMO-SCR2.

17. Eines bioinformàtiques

Per a la determinació dels possibles llocs de palmitoilació de BRSK1 es va utilitzar el software CSS-Palm 3.0. (<http://csspalm.biocuckoo.org/>)(Ren et al., 2008), mentre que per altres modificacions post-traduccionals (PTM) es van utilitzar les eines del web ExPASy (<http://web.expasy.org>) de predicció de PTM.

Les prediccions de l'estructura 3-D de BRSK1 es van realitzar amb el programa I-TASSER, desenvolupat pel laboratori del Dr. Zhang (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) i la posició i orientació dels residus aminoacídics es va analitzar amb el programa Pymol (<http://www.pymol.org/>).

Per a l'anàlisi de l'estructura secundària del fragment SCR2 de BRSK1 a partir de les dades obtingudes per dicroisme circular es va utilitzar el programa K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>)

Per realitzar els experiments de biologia molecular i purificacions de proteïnes es van utilitzar diferents softwares:

- **Disseny de primers i comprovació de seqüències:** *Web Expasy (Translate tool;* <http://web.expasy.org/translate/>) i *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
- **Alineaments de seqüències:** *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- **Anàlisi de restricció:** *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/RestrictionMapper>).
- **Càlculs del pes molecular i punt isoelèctric de proteïnes:** *Web Expasy (Compute pI/Mw Tool;* http://web.expasy.org/compute_pi/)

18. Anàlisi de dades

L'anàlisi estadístic així com les gràfiques es va realitzar amb el programa GraphPad Prism 5.0. Per avaluar la significança estadística es va realitzar un test ANOVA d'una via amb un test de correcció Tukey de comparació múltiple. La significança es va determinar quan $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ i *** $P < 0.001$).

BIBLIOGRAFIA



Adler,C.E., Fetter,R.D., and Bargmann,C.I. (2006). UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nat Neurosci* 9, 511-518.

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, Dario R., Deak, Maria, Casamayor, Antonio, Barry Caudwell, F., Morrice, Nick, Norman, David G., Gaffney, Piers, Reese, Colin B., MacDougall, Colin N., Harbison, Diane, Ashworth, Alan, and Bownes, Mary. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Current biology* : CB 7[10], 776-789. 1-10-1997.

Alessi, Dario R., Sakamoto, Kei, and Bayascas, Jose R. LKB1-dependent signaling pathways. *Annual review of biochemistry* 75, 137-163. 2006.

Alvarado-Kristensson,M., Rodriguez,M.J., Silio,V., Valpuesta,J.M., and Carrera,A.C. (2009). SADB phosphorylation of [γ]-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat Cell Biol* 11, 1081-1092.

Alwine,J.C. (1985). Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Molecular and Cellular Biology* 5, 1034-1042.

Andrews,P.S., Schneider,S., Yang,E., Michaels,M., Chen,H., Tang,J., and Emkey,R. (2010). Identification of Substrates of SMURF1 Ubiquitin Ligase Activity Utilizing Protein Microarrays. *ASSAY and Drug Development Technologies* 8, 471-487.

Arimura,N. and Kaibuchi,K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205.

Astle,M.V., Ooms,L.M., Cole,A.R., Binge,L.C., Dyson,J.M., Layton,M.J., Petratos,S., Sutherland,C., and Mitchell,C.A. (2011). Identification of a Proline-rich Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase (PIPP)-Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) Complex That Regulates Neurite Elongation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 23407-23418.

Ávila,J., LUCAS,J.J., PÉREZ,M.A.R., and HERNÁNDEZ,F. (2004). Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological Reviews* 84, 361-384.

B

Baas, A. F., Boudeau, J., Sapkota, G. P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N. A., Alessi, D. R., and Clevers, H. C. Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *The EMBO journal* 22[12], 3062-3072. 2003.

Baas, Annette F., Kuipers, Jeroen, van der Wel, Nicole N., Batlle, Eduard, Koerten, Henk K., Peters, Peter J., and Clevers, Hans C. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116[3], 457-466. 2004.

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.

Balastik,M., Ferraguti,F., Pires-da Silva,A., Lee,T.H., Alvarez-Bolado,G., Lu,K.P., and Gruss,P. (2008). Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 12016-12021.

Ballatore,C., Lee,V.M.Y., and Trojanowski,J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.

Banker,G.A. and Cowan,W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research* 126, 397-425.

Barnes AP FAU - Polleux,F. and Polleux,F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual Reviews in Neuroscience*.

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, Anthony P., Lilley, Brendan N., Pan, Y. Albert, Plummer, Lisa J., Powell, Ashton W., Raines, Alexander N., Sanes, Joshua R., and Polleux, Franck. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129[3], 549-563. 2007.

Barylko,B., Mao,Y.S., Wlodarski,P., Jung,G., Binns,D.D., Sun,H.Q., Yin,H.L., and Albanesi,J.P. (2009). Palmitoylation Controls the Catalytic Activity and Subcellular Distribution of Phosphatidylinositol 4-Kinase II+₁. *Journal of Biological Chemistry* 284, 9994-10003.

Bayascas,J.R., Wullschleger,S., Sakamoto,K., García-Martínez,J.M., Clacher,C., Komander,D., van Aalten,D.M.F., Boini,K.M., Lang,F., Lipina,C., Logie,L., Sutherland,C., Chudek,J.A., van Diepen,J.A., Voshol,P.J., Lucocq,J.M., and Alessi,D.R. (2008). Mutation of the PDK1 PH Domain Inhibits Protein Kinase B/Akt, Leading to Small Size and Insulin Resistance. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3258-3272.

Bech-Otschir,D., Kraft,R., Huang,X., Henklein,P., Kapelari,B., Pollmann,C., and Dubiel,W. (2001). COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20, 1630-1639.

Belotti,E., Polanowska,J., Daulat,A.M., Audebert,S., Thome,V., Lissitzky,J.C., Lembo,F., Biblek,K., Omi,S., Lenfant,N., Gangar,A., Montcouquiol,M., Santoni,M.J., Sebbagh,M., Aurrand-Lions,M., Angers,S., Kodjabachian,L., Reboul,J., and Borg,J.P. (2013). The human PDZome: a gateway to PDZ mediated functions. *Molecular & Cellular Proteomics*.

Benjamins,J.A., Hadden,T., and Skoff,R.P. (1982). Cerebroside Sulfotransferase in Golgi Enriched Fractions from Rat Brain. *Journal of neurochemistry* 38, 233-241.

Berntson,Z., Hansson,E., Rönnbäck,L., and Fredman,P. (1998). Intracellular sulfatide expression in a subpopulation of astrocytes in primary cultures. *Journal of neuroscience research* 52, 559-568.

Betz, Andrea, Thakur, Pratima, Junge, Harald J., Ashery, Uri, Rhee, Jeong Seop, Scheuss, Volker, Rosenmund, Christian, Rettig, Jens, and Brose, Nils. Functional Interaction of the Active Zone Proteins Munc13-1 and RIM1 in Synaptic Vesicle Priming. *Neuron* 30[1], 183-196. 1-4-2001.

Binder,L.I., Guillozet-Bongaarts,A.L., Garcia-Sierra,F., and Berry,R.W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1739, 216-223.

Bito, Haruhiko, Furuyashiki, Tomoyuki, Ishihara, Hisamitsu, Shibasaki, Yoshikazu, Ohashi, Kazumasa, Mizuno, Kensaku, Maekawa, Midori, Ishizaki, Toshimasa, and Narumiya, Shuh. A Critical Role for a Rho-Associated Kinase, p160ROCK, in Determining Axon Outgrowth in Mammalian CNS Neurons. *Neuron* 26[2], 431-441. 1-5-2000.

Bligh,E.G. and Dyer,W.J. (1959a). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

Bligh,E.G. and Dyer,W.J. (1959b). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

Blomqvist,M., Kaas,A., Mansson,J.E., Formby,B., Rynmark,B.M., Buschard,K., and Fredman,P. (2003a). Developmental expression of the type I diabetes related antigen sulfatide and sulfated lactosylceramide in mammalian pancreas. *Journal of Cellular Biochemistry* 89, 301-310.

Blomqvist,M., OSTERBYE,T.H.O.M., MÄNSSON,J.E., HORN,T.H.O.M., BUSCHARD,K.A.R.S., and FREDMAN,P.A.M. (2003b). Selective lack of the C16:0 fatty acid isoform of sulfatide in pancreas of type II diabetic animal models. *APMIS* 111, 867-877.

Boggs,J.M., Gao,W., and Hirahara,Y. (2008). Signal transduction pathways involved in interaction of galactosylceramide/sulfatide containing liposomes with cultured

oligodendrocytes and requirement for myelin basic protein and glycosphingolipids. *Journal of neuroscience research* 86, 1448-1458.

Boggs,J.M., Gao,W., Zhao,J., Park,H.J., Liu,Y., and Basu,A. (2010). Participation of galactosylceramide and sulfatide in glycosynapses between oligodendrocyte or myelin membranes. *FEBS letters* 584, 1771-1778.

Boggs,J.M. and Wang,H. (2001). Effect of liposomes containing cerebroside and cerebroside sulfate on cytoskeleton of cultured oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 66, 242-253.

Boname,J.M., Thomas,M., Stagg,H.R., Xu,P., Peng,J., and Lehner,P.J. (2010). Efficient Internalization of MHC I Requires Lysine-11 and Lysine-63 Mixed Linkage Polyubiquitin Chains. *Traffic* 11, 210-220.

Boudeau, Jerome, Baas, Annette F., Deak, Maria, Morrice, Nick A., Kieloch, Agnieszka, Schutkowski, Mike, Prescott, Alan R., Clevers, Hans C., and Alessi, Dario R. MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *The EMBO journal* 22[19], 5102-5114. 2003.

Boudeau, Jerome, Miranda-Saavedra, Diego, Barton, Geoffrey J., and Alessi, Dario R. Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* 16[9], 443-452. 1-9-2006.

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.

Bradke,F. and Dotti,C.G. (1999). The Role of Local Actin Instability in Axon Formation. *Science* 283, 1931-1934.

Breeding,C.S., Hudson,J., Balasubramanian,M.K., Hemmingsen,S.M., Young,P.G., and Gould,K.L. (1998). The *cdr2* + Gene Encodes a Regulator of G2/M Progression and Cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 9, 3399-3415.

Bright, Nicola J., Carling, David, and Thornton, Claire. Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 283[22], 14946-14954. 2008.

Brown,D.A. (2006). Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology* 21, 430-439.

Bryan,B., Cai,Y., Wrighton,K., Wu,G., Feng,X.H., and Liu,M. (2005). Ubiquitination of RhoA by Smurf1 promotes neurite outgrowth. *FEBS Letters* 579, 1015-1019.

Buschard,K., Blomqvist,M., Osterbye,T., and Fredman,P. (2005). Involvement of sulfatide in beta cells and type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* 48, 1957-1962.

Buschard,K. (2001). Treatment with Sulfatide or its Precursor, Galactosylceramide, Prevents Diabetes in NOD Mice. *Autoimmunity* 34, 9-17.

Buschard,K., Blomqvist,M., Mansson,J.E., Fredman,P., Juhl,K., and Gromada,J. (2006). C16:0 Sulfatide Inhibits Insulin Secretion in Rat beta Cells by Reducing the Sensitivity of KATP Channels to ATP Inhibition. *Diabetes* 55, 2826-2834.

Buschard,K., Hoy,M., Bokvist,K., Olsen,H.L., Madsbad,S., Fredman,P., and Gromada,J. (2002). Sulfatide Controls Insulin Secretion by Modulation of ATP-sensitive K⁺-Channel Activity and Ca²⁺-Dependent Exocytosis in Rat Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 51, 2514-2521.

Buschard,K., Josefsen,K., Horn,T., and Fredman,P. (1993). Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Lancet* 342, 840.

C

Caenepeel,S., Charydczak,G., Sudarsanam,S., Hunter,T., and Manning,G. (2004). The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11707-11712.

Calakos, Nicole, Schoch, Susanne, S³dhof, Thomas C., and Malenka, Robert C. Multiple Roles for the Active Zone Protein RIM1 β in Late Stages of Neurotransmitter Release. *Neuron* 42[6], 889-896. 24-6-2004.

Carling,D., Clarke,P.R., Zammit,V.A., and Hardie,D.G. (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 186, 129-136.

CARLING,D. and Grahame Hardie,D. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1012, 81-86.

Chen,G., Sima,J., Jin,M., Wang,K.y., Xue,X.j., Zheng,W., Ding,Y.q., and Yuan,X.b. (2008). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat Neurosci* 11, 36-44.

Chen,X.Y., Gu,X.T., Saiyin,H., Wan,B., Zhang,Y.J., Li,J., Wang,Y.L., Gao,R., Wang,Y.F., Dong,W.P., Najjar,S.M., Zhang,C.Y., Ding,H.F., Liu,J.O., and Yu,L. (2012). Brain-selective Kinase 2 (BRISK2) Phosphorylation on PCTAIRE1 Negatively Regulates Glucose-stimulated Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287, 30368-30375.

Chen,X. and Macara,I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* 7, 262-269.

Chen, Y. M., Wang, Q. J., Hu, H. S., Yu, P. C., Zhu, J., Drewes, G., Piwnica-Worms, H., and Luo, Z. G. Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103[22], 8534-8539. 2006.

Cheng, P.I., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., and Poo, M.M. (2011). Phosphorylation of E3 Ligase Smurf1 Switches Its Substrate Preference in Support of Axon Development. *Neuron* 69, 231-243.

Choi, Yong Jin, Di Nardo, Alessia, Kramvis, Ioannis, Meikle, Lynsey, Kwiatkowski, David J., Sahin, Mustafa, and He, Xi. Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes & development* 22[18], 2485-2495. 2008.

Cohen, Philip. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nature reviews. Drug discovery* 1[4], 309-315. 2002.

Collins, S. P., Reoma, J. L., Gamm, D. M., and Uhler, M. D. LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *The Biochemical journal* 345 Pt 3, 673-680. 2000.

Conde, C. and Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-332.

Cope, G. and Deshaies, R. (2006). Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. *BMC Biochemistry* 7, 1.

Cowan, C.R. and Hyman, A.A. (2004). ASYMMETRIC CELL DIVISION IN C. ELEGANS: Cortical Polarity and Spindle Positioning. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 427-453.

Crino, P.B., Nathanson, K.L., and Henske, E.P. (2006). The Tuberous Sclerosis Complex. *N Engl J Med* 355, 1345-1356.

Crump, J. G., Zhen, M., Jin, Y., and Bargmann, C. I. The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. *Neuron* 29[1], 115-129. 2001.
Ref Type: Abstract

Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P., Cohen, P., Alessi, D.R., and Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* 337, 575-583.

D

Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.G., and Abad-Rodriguez, J. (2005). Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci* 8, 606-615.

Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIA-mediated control of actin stability. *The Journal of Cell Biology* 162, 1267-1279.

Deng, Li, Wang, Chen, Spencer, Erika, Yang, Liyong, Braun, Amy, You, Jianxin, Slaughter, Clive, Pickart, Cecile, and Chen, Zhijian J. Activation of the IKB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* 103[2], 351-361. 13-10-2000.

Denison, F.C., Hiscock, N.J., Carling, D., and Woods, A. (2009). Characterization of an Alternative Splice Variant of LKB1. *Journal of Biological Chemistry* 284, 67-76.

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.

Dotti, C.G. and Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330, 254-256.

Drahos, K.E., Welsh, J.D., Finkielstein, C.V., Capelluto, D.G.S., and Kobe, B. (2009). Sulfatides partition disabled-2 in response to platelet activation. *PLoS one* 4, e8007.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141-1154.

Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase (p110mark): A NOVEL PROTEIN KINASE THAT REGULATES TAU-MICROTUBULE INTERACTIONS AND DYNAMIC INSTABILITY BY PHOSPHORYLATION AT THE ALZHEIMER-SPECIFIC SITE SERINE 262. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7679-7688.

Drisdell, Renaldo C. and Green, William N. Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *BioTechniques* 36[2], 276-285. 2004.

Drucker, Daniel J. The biology of incretin hormones. *Cell metabolism* 3[3], 153-165. 1-3-2006.

E

Ebisawa,T., Fukuchi,M., Murakami,G., Chiba,T., Tanaka,K., Imamura,T., and Miyazono,K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12477-12480.

Eckhardt,M., Hedayati,K.K., Pitsch,J., Lullmann-Rauch,R., Beck,H., Fewou,S.N., and Gieselmann,V. (2007). Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Journal of Neuroscience* 27, 9009.

El-Husseini, Alaa El-Din, Schnell, Eric, Dakoji, Srikanth, Sweeney, Neal, Zhou, Qiang, Prange, Oliver, Gauthier-Campbell, Catherine, Aguilera-Moreno, Andrea, Nicoll, Roger A., and Bredt, David S. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108[6], 849-863. 2002.

Esch,T., Lemmon,V., and Banker,G. (1999). Local Presentation of Substrate Molecules Directs Axon Specification by Cultured Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19, 6417-6426.

Etienne-Manneville,S. (2004). Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of Cell Science* 117, 1291-1300.

F

Fang, Guowei, Yu, Hongtao, and Kirschner, Marc W. Direct Binding of CDC20 Protein Family Members Activates the Anaphase-Promoting Complex in Mitosis and G1. *Molecular cell* 2[2], 163-171. 1-8-1998.

Fehse,F., Trautmann,M., Holst,J.J., Halseth,A.E., Nanayakkara,N., Nielsen,L.L., Fineman,M.S., Kim,D.D., and Nauck,M.A. (2005). Exenatide Augments First- and Second-Phase Insulin Secretion in Response to Intravenous Glucose in Subjects with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90, 5991-5997.

Fivaz, Marc, Bandara, Samuel, Inoue, Takanari, and Meyer, Tobias. Robust Neuronal Symmetry Breaking by Ras-Triggered Local Positive Feedback. *Current biology : CB* 18[1], 44-50. 8-1-2008.

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 Ca²⁺ and AMP. *Biochemical Journal*.

Fredman,P., Mattsson,L., Andersson,K., Davidsson,P., Ishizuka,I., Jeansson,S., Mansson,J.E., and Svennerholm,L. (1988). Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *Biochem. J* 251, 17-22.

Fredman,P., Månsson,J.E., Rynmark,B.M., Josefsen,K., Ekblond,A., Halldner,L., Osterbye,T., Horn,T., and Buschard,K. (2000). The glycosphingolipid sulfatide in the islets of Langerhans in rat pancreas is processed through recycling: possible involvement in insulin trafficking. *Glycobiology* 10, 39-50.

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 Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase. *Biochemistry* 47, 4151-4159.

Fukata,Y., Dimitrov,A., Boncompain,G., Vielemeyer,O., Perez,F., and Fukata,M. (2013). Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *The Journal of Cell Biology* 202, 145-161.

Fukata,Y. and Fukata,M. (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11, 161-175.

G

Gartner,A., Huang,X., and Hall,A. (2006). Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 β) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *Journal of Cell Science* 119, 3927-3934.

Gavrin,L.K. and Saiah,E. (2013). Approaches to discover non-ATP site kinase inhibitors. *Med. Chem. Commun.* 4, 41-51.

Gil, Carles, Cub \acute{a} , Roger, Blasi, Juan, and Aguilera, Josq. Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochemical and biophysical research communications* 348[4], 1334-1342. 2006.

Gil, Carles, Soler-Jover, Alex, Blasi, Juan, and Aguilera, Josq. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochemical and biophysical research communications* 329[1], 117-124. 2005.
Ref Type: Abstract

Go,L. and Mitchell,J. (2003). Palmitoylation is required for membrane association of activated but not inactive invertebrate visual Gq α . *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135, 601-609.

Gonzalez-Billault,C., Mu \acute{n} oz-Llancao,P., Henriquez,D.R., Wojnacki,J., Conde,C., and Caceres,A. (2012). The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton* 69, 464-485.

Greaves,J., Salaun,C., Fukata,Y., Fukata,M., and Chamberlain,L.H. (2008). Palmitoylation and Membrane Interactions of the Neuroprotective Chaperone Cysteine-string Protein. *Journal of Biological Chemistry* 283, 25014-25026.

Grzegorz,N., Mark,R., and Harper,J.W. (2006). Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 596-613.

Guo, Zekun, Tang, Wenwen, Yuan, Jian, Chen, Xinya, Wan, Bo, Gu, Xiuting, Luo, Kuntian, Wang, Yingli, and Yu, Long. BRSK2 is activated by cyclic AMP-dependent protein kinase A through phosphorylation at Thr260. *Biochemical and biophysical research communications* 347[4], 867-871. 2006.

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.

Hagting,A., den Elzen,N., Vodermaier,H.C., Waizenegger,I.C., Peters,J.M., and Pines,J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *The Journal of Cell Biology* 157, 1125-1137.

Hall,A. and Lalli,G. (2010). Rho and Ras GTPases in Axon Growth, Guidance, and Branching. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.

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, 576-596.

Harel,R. and Futerman,A.H. (1993). Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* 268, 14476-14481.

Hatanaka,Y.F. and Murakami,F. (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *The Journal of comparative neurobiology* 454 1-4.

Hawley, Simon A., Boudeau, Jerome, Reid, Jennifer L., Mustard, Kirsty J., Udd, Lina, Mekele, Tomi P., Iessi, Dario R., and Hardie, D. Grahame. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology* 2[4], 28. 2003.

Hawley, Simon A., Pan, David A., Mustard, Kirsty J., Ross, Louise, Bain, Jenny, Edelman, Arthur M., Frenguelli, Bruno G., and Hardie, D. Grahame. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism* 2[1], 9-19. 1-7-2005.

He,L., Liu,J., Zhou,Q., and Sui,S. (2006). Lipid Rafts Identified on Synaptic Vesicles from Rat Brain. *Tsinghua Science & Technology* 11, 452-458.

Hearle,N., Schumacher,V.r., Menko,F.H., Olschwang,S., Boardman,L.A., Gille,J.J.P., Keller,J.J., Westerman,A.M., Scott,R.J., Lim,W., Trimbath,J.D., Giardiello,F.M., Gruber,S.B., Offerhaus,G.J., de Rooij,F.W.M., Wilson,J.H.P., Hansmann,A., M+Åslein,G., Royer-Pokora,B., Vogel,T., Phillips,R.K.S., Spigelman,A.D., and Houlston,R.S. (2006). Frequency and Spectrum of Cancers in the Peutz-Jeghers Syndrome. *Clinical Cancer Research* 12, 3209-3215.

Hemminki,A., Markie,D., Tomlinson,I., Avizienyte,E., Roth,S., Loukola,A., Bignell,G., Warren,W., Aminoff,M., Hoglund,P., Jarvinen,H., Kristo,P., Pelin,K., Ridanpaa,M., Salovaara,R., Toro,T., Bodmer,W., Olschwang,S., Olsen,A.S., Stratton,M.R., de la Chapelle,A., and Aaltonen,L.A. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184-187.

Hess,D.T., Slater,T.M., Wilson,M.C., and Skene,J.H. (1992). The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *The Journal of Neuroscience* 12, 4634-4641.

Hezel,A.F., Gurumurthy,S., Granot,Z., Swisa,A., Chu,G.C., Bailey,G., Dor,Y., Bardeesy,N., and DePinho,R.A. (2008). Pancreatic Lkb1 Deletion Leads to Acinar Polarity Defects and Cystic Neoplasms. *Molecular and Cellular Biology* 28, 2414-2425.

Higa,S., Tokoro,T., Kitajima,I., and Ohtsuka,T. (2007). SAD kinase directly phosphorylates the active zone proteins Bassoon and Piccolo. *Neuroscience Research* 58, S74.

Hirahara,Y., Bansal,R., Honke,K., Ikenaka,K., and Wada,Y. (2004). Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in sulfatide null mice. *Glia* 45, 269-277.

Hosokawa,N., Hara,T., Kaizuka,T., Kishi,C., Takamura,A., Miura,Y., Iemura,S.i., Natsume,T., Takehana,K., Yamada,N., Guan,J.L., Oshiro,N., and Mizushima,N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981-1991.

Hudson,C.C., Liu,M., Chiang,G.G., Otterness,D.M., Loomis,D.C., Kaper,F., Giaccia,A.J., and Abraham,R.T. (2002). Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Molecular and Cellular Biology* 22, 7004-7014.

Hung, Wesley, Hwang, Christine, Po, Michelle D., and Zhen, Mei. Neuronal polarity is regulated by a direct interaction between a scaffolding protein, Neurabin, and a presynaptic SAD-1 kinase in *Caenorhabditis elegans*. *Development (Cambridge, England)* 134[2], 237-249. 2007.

Hur,E.M. and Zhou,F.Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11, 539-551.

Hurley,R.L., Anderson,K.A., Franzone,J.M., Kemp,B.E., Means,A.R., and Witters,L.A. (2005). The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 29060-29066.

I

Inoki, Ken, Zhu, Tianqing, and Guan, Kun Liang. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115[5], 577-590. 26-11-2003.

Inoue, Eiji, Mochida, Sumiko, Takagi, Hiroshi, Higa, Susumu, Deguchi-Tawarada, Maki, Takao-Rikitsu, Etsuko, Inoue, Marie, Yao, Ikuko, Takeuchi, Kosei, Kitajima, Isao, Setou, Mitsutoshi, Ohtsuka, Toshihisa, and Takai, Yoshimi. SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release. *Neuron* 50[2], 261-275. 2006.

Inoue,Y. and Imamura,T. (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Science* 99, 2107-2112.

Isaac,G., Pernber,Z., Gieselmann,V., Hansson,E., Bergquist,J., and Msnsson,J.E. (2006). Sulfatide with short fatty acid dominates in astrocytes and neurons. *FEBS Journal* 273, 1782-1790.

Iwanaga, Tsuyoshi, Tsutsumi, Ryouhei, Noritake, Jun, Fukata, Yuko, and Fukata, Masaki. Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling. *Progress in lipid research* 48[3-4], 117-127. 2009.

J

Jacobs,T., Causeret,F.d.r., Nishimura,Y.V., Terao,M., Norman,A., Hoshino,M., and Nikoli-ç,M. (2007). Localized Activation of p21-Activated Kinase Controls Neuronal Polarity and Morphology. *The Journal of Neuroscience* 27, 8604-8615.

Jaleel,M., Villa,F., Deak,M., Toth,R., Prescott,A.R., Van Aalten,D.M.F., and Alessi,D.R. (2006a). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemical Journal* 394, 545.

Jaleel, Mahaboobi, Villa, Fabrizio, Deak, Maria, Toth, Rachel, Prescott, Alan R., van Aalten, Daan M. F., and Alessi, Dario R. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *The Biochemical journal* 394[Pt 3], 545-555. 2006b.

Jaulin,F. and Kreitzer,G. (2010). KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *The Journal of Cell Biology* 190, 443-460.

Jeghers,H., McKusick,V.A., and Katz,K.H. (1949). Generalized Intestinal Polyposis and Melanin Spots of the Oral Mucosa, Lips and Digits. *N Engl J Med* 241, 1031-1036.

Jeon,C.Y., Moon,M.Y., Kim,J.H., Kim,H.J., Kim,J.G., Li,Y., Jin,J.K., Kim,P.H., Kim,H.C., Meier,K.E., Kim,Y.S., and Park,J.B. (2012). Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation. *Journal of Neurochemistry* 120, 684-698.

Jeon,S., Kim,Y.S., Park,J., and Bae,C.D. (2005). Microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) is activated by electroconvulsive shock in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 95, 1608-1618.

Ji, Hongbin, Ramsey, Matthew R., Hayes, D. Neil, Fan, Cheng, McNamara, Kate, Kozlowski, Piotr, Torrice, Chad, Wu, Michael C., Shimamura, Takeshi, Perera, Samantha A., Liang, Mei Chih, Cai, Dongpo, Naumov, George N., Bao, Lei, Contreras, Cristina M., Li, Danan, Chen, Liang, Krishnamurthy, Janakiraman, Koivunen, Jussi, Chirieac, Lucian R., Padera, Robert F., Bronson, Roderick T., Lindeman, Neal I., Christiani, David C., Lin, Xihong, Shapiro, Geoffrey I., JSnne, Pasi A., Johnson, Bruce E., Meyerson, Matthew, Kwiatkowski, David J., Castrillon, Diego H., Bardeesy, Nabeel, Sharpless, Norman E., and Wong, Kwok Kin. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448[7155], 807-810. 2007.

Jiang, Hui, Guo, Wei, Liang, Xinhua, and Rao, Yi. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120[1], 123-135. 2005.

Jimenez,A.I., Fernandez,P., Dominguez,O., Dopazo,A., and Sanchez-Cespedes,M. (2003). Growth and Molecular Profile of Lung Cancer Cells Expressing Ectopic LKB1: Down-Regulation of the Phosphatidylinositol 3G ζ -Phosphate Kinase/PTEN Pathway.

Jin,C., Yang,Y.a., Anver,M.R., Morris,N., Wang,X., and Zhang,Y.E. (2009). Smad Ubiquitination Regulatory Factor 2 Promotes Metastasis of Breast Cancer Cells by Enhancing Migration and Invasiveness. *Cancer Research* 69, 735-740.

Jishage,K.i., Nezu,J.i., Kawase,Y., Iwata,T., Watanabe,M., Miyoshi,A., Ose,A., Habu,K., Kake,T., Kamada,N., Ueda,O., Kinoshita,M., Jenne,D.E., Shimane,M., and Suzuki,H. (2002). Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 8903-8908.

Joberty,G., Petersen,C., Gao,L., and Macara,I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2, 531-539.

Johansson,A., Driessens,M., and Aspenstrom,P. (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Journal of Cell Science* 113, 3267-3275.

Jung,C.H., Jun,C.B., Ro,S.H., Kim,Y.M., Otto,N.M., Cao,J., Kundu,M., and Kim,D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell* 20, 1992-2003.

K

Kang,R., Swayze,R., Lise,M.F., Gerrow,K., Mullard,A., Honer,W.G., and El-Husseini,A. (2004). Presynaptic Trafficking of Synaptotagmin I Is Regulated by Protein Palmitoylation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 50524-50536.

Kang, Rujun, Wan, Junmei, Arstikaitis, Pamela, Takahashi, Hideto, Huang, Kun, Bailey, Aaron O., Thompson, James X., Roth, Amy F., Drisdell, Renaldo C., Mastro, Ryan, Green, William N., Yates, John R., Davis, Nicholas G., and El-Husseini, Alaa. Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456[7224], 904-909. 2008.

Kanoh,J. and Russell,P. (1998). The Protein Kinase Cdr2, Related to Nim1/Cdr1 Mitotic Inducer, Regulates the Onset of Mitosis in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* 9, 3321-3334.

Karus,M., Samtleben,S., Busse,C., Tsai,T., Dietzel,I., Faissner,A., and Wiese,S. (2012). Normal sulfation levels regulate spinal cord neural precursor cell proliferation and differentiation. *Neural Development* 7, 20.

Kaufman,R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 13, 1211-1233.

Kawakami,F., Suzuki,K., and Ohtsuki,K. (2008a). A novel consensus phosphorylation motif in sulfatide-and cholesterol-3-sulfate-binding protein substrates for CK1 in vitro. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31, 193-200.

Kawakami,F., Yamaguchi,A., Suzuki,K., Yamamoto,T., and Ohtsuki,K. (2008b). Biochemical characterization of phospholipids, sulfatide and heparin as potent stimulators for autophosphorylation of GSK-3 and the GSK-3 -mediated phosphorylation of myelin basic protein in vitro. *Journal of biochemistry* 143, 359.

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.

Khazaei,M.R., Bunk,E.C., Hillje,A.L., Jahn,H.M., Riegler,E.M., Knoblich,J.A., Young,P., and Schwamborn,J.C. (2011). The E3-ubiquitin ligase TRIM2 regulates neuronal polarization. *Journal of Neurochemistry* 117, 29-37.

Kim,J.S., Hung,W., Narbonne,P., Roy,R., and Zhen,M. (2010a). *C. elegans* STRADalpha and SAD cooperatively regulate neuronal polarity and synaptic organization. *Development* 137, 93-102.

Kim,J.S., Hung,W., and Zhen,M. (2010b). The long and the short of SAD-1 kinase. *Commun. Integr. Biol.* 3, 251-255.

Kim,J.S., Lilley,B.N., Zhang,C., Shokat,K.M., Sanes,J.R., and Zhen,M. (2008). A chemical-genetic strategy reveals distinct temporal requirements for SAD-1 kinase in neuronal polarization and synapse formation. *Neural Development* 3, 23.

King, Randall W., Peters, Jan Michael, Tugendreich, Stuart, Rolfe, Mark, Hieter, Philip, and Kirschner, Marc W. A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81[2], 279-288. 21-4-1995.

Kishi, Masashi, Pan, Y. Albert, Crump, Justin Gage, and Sanes, Joshua R. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science (New York, N.Y.)* 307[5711], 929-932. 2005.

Ko,M., Zou,K., Minagawa,H., Yu,W., Gong,J.S., Yanagisawa,K., and Michikawa,M. (2005). Cholesterol-mediated Neurite Outgrowth Is Differently Regulated between Cortical and Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42759-42765.

Komander,D., Fairservice,A., Deak,M., Kular,G.S., Prescott,A.R., Peter Downes,C., Safrany,S.T., Alessi,D.R., and van Aalten,D.M. (2004). Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *EMBO J* 23, 3918-3928.

Komander,D. and Rape,M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203-229.

Komuro,H., Yacubova,E., Yacubova,E., and Rakic,P. (2001). Mode and Tempo of Tangential Cell Migration in the Cerebellar External Granular Layer. *The Journal of Neuroscience* 21, 527-540.

L

Lang,P., Gesbert,F., Delespine-Carmagnat,M., Stancou,R., Pouchelet,M., and Bertoglio,J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15, 510-519.

Lee,Y.I., Seo,M., Kim,Y., Kim,S.Y., Kang,U.G., Kim,Y.S., and Juhn,Y.S. (2005). Membrane Depolarization Induces the Undulating Phosphorylation/Dephosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3beta, and This Dephosphorylation Involves Protein

Phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 22044-22052.

Lemeer,S. and Heck,A.J. (2009). The phosphoproteomics data explosion. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 414-420.

Levene,P.A. and Alsberg,C.L. (1906). The cleavage products of vitellin. *Journal of Biological Chemistry* 2, 127-133.

Li,R., Wan,B., Zhou,J., Wang,Y., Luo,T., Gu,X., Chen,F., and Yu,L. (2012). APC/C-Cdh1 Targets Brain-Specific Kinase 2 (BRSK2) for Degradation via the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *PLoS ONE* 7, e45932.

Liang,J., Shao,S.H., Xu,Z.X., Hennessy,B., Ding,Z., Larrea,M., Kondo,S., Dumont,D.J., Gutterman,J.U., Walker,C.L., Slingerland,J.M., and Mills,G.B. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 218-224.

Liang,X., Lu,Y., Wilkes,M., Neubert,T.A., and Resh,M.D. (2004). The N-terminal SH4 Region of the Src Family Kinase Fyn Is Modified by Methylation and Heterogeneous Fatty Acylation: ROLE IN MEMBRANE TARGETING, CELL ADHESION, AND SPREADING. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8133-8139.

Liley,A.W. (1956). The effects of presynaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 134, 427-443.

Lilley, BrendanáN, Pan, Y. áAlbert, and Sanes, JoshuaáR. SAD Kinases Sculpt Axonal Arbors of Sensory Neurons through Long- and Short-Term Responses to Neurotrophin Signals. *Neuron* . 20-6-2013.

Lin,D., Edwards,A.S., Fawcett,J.P., Mbamalu,G., Scott,J.D., and Pawson,T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2, 540-547.

Lin,H., Lin,Q., Liu,M., Lin,Y., Wang,X., Chen,H., Xia,Z., Lu,B., Ding,F., Wu,Q., and Wang,H.R. (2013). PKA/Smurf1 signaling-mediated stabilization of Nur77 is required for anticancer drug cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene*.

Lindgren,S. (1986). Effects of KCl-induced depolarization on the GABA concentration in the corpus striatum and in the substantia nigra. *J. Neural Transmission* 66, 161-170.

Lipmann,F.A. and Levene,P.A. (1932). Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *Journal of Biological Chemistry* 98, 109-114.

Lizcano, Jose M., G÷ransson, Olga, Toth, Rachel, Deak, Maria, Morrice, Nick A., Boudeau, Jqróme, Hawley, Simon A., Udd, Lina, MSkelS, Tomi P., Hardie, D. Grahame, and Alessi, Dario R. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal* 23[4], 833-843. 2004.

Lu,K., Li,P., Zhang,M., Xing,G., Li,X., Zhou,W., Bartlam,M., Zhang,L., Rao,Z., and He,F. (2011). Pivotal Role of the C2 Domain of the Smurf1 Ubiquitin Ligase in Substrate Selection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 16861-16870.

Lu, Rui, Niida, Hiroyuki, and Nakanishi, Makoto. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *The Journal of biological chemistry* 279[30], 31164-31170. 2004.

M

MacDonald,P.E., El-kholy,W., Riedel,M.J., Salapatek,A.M., Light,P.E., and Wheeler,M.B. (2002). The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 51, S434-S442.

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

Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T., and Sudarsanam,S. (2002b). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912-1934.

Marcus,J., Honigbaum,S., Shroff,S., Honke,K., Rosenbluth,J., and Dupree,J.L. (2006). Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia* 53, 372-381.

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.

Martin,T.F.J. (2000). Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat Cell Biol* 2, E9-E11.

Marx,A., Nugoor,C., Müller,J., Panneerselvam,S., Timm,T., Bilang,M., Mylonas,E., Svergun,D.I., Mandelkow,E.M., and Mandelkow,E. (2006). Structural Variations in the Catalytic and Ubiquitin-associated Domains of Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity Regulating Kinase (MARK) 1 and MARK2. *Journal of Biological Chemistry* 281, 27586-27599.

Matsuo,N., Terao,M., Nabeshima,Y.i., and Hoshino,M. (2003). Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24, 69-81.

Matthews,H.R. (1995). Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: A possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & Therapeutics* 67, 323-350.

Meiri,D., Greeve,M.A., Brunet,A., Finan,D., Wells,C.D., LaRose,J., and Rottapel,R. (2009). Modulation of Rho Guanine Exchange Factor Lfc Activity by Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 29, 5963-5973.

Menager,C., Arimura,N., Fukata,Y., and Kaibuchi,K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of Neurochemistry* 89, 109-118.

Michaelson,D., Silletti,J., Murphy,G., D'Eustachio,P., Rush,M., and Philips,M.R. (2001). Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and Rhogdi Binding. *The Journal of Cell Biology* 152, 111-126.

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, 2261-2266.

Molander-Melin,M., Pernber,Z., Franken,S., Gieselmann,V., M+ñnsson,J.E., and Fredman,P. (2004). Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. *Journal of Neurocytology* 33, 417-427.

Moll,U.M., Marchenko,N., and Zhang,X. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25, 4725-4743.

Momcilovic,M., Hong,S.P., and Carlson,M. (2006). Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 281, 25336-25343.

Morgan,J.L., Dhingra,A., Vardi,N., and Wong,R.O.L. (2006). Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat Neurosci* 9, 85-92.

Moulder,K.L., Cormier,R.J., Shute,A.A., Zorumski,C.F., and Mennerick,S. (2003). Homeostatic Effects of Depolarization on Ca²⁺ Influx, Synaptic Signaling, and Survival. *The Journal of Neuroscience* 23, 1825-1831.

Mueller,T.D. and Feigon,J. (2002). Solution Structures of UBA Domains Reveal a Conserved Hydrophobic Surface for ProteinGÇôProtein Interactions. *Journal of Molecular Biology* 319, 1243-1255.

Muller,M., Lutter,D., and Puschel,A.W. (2010). Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA- and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity. *J Cell Sci* 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, 14336-14341.

N

Nakamura, Masafumi, Zhou, Xiao Zhen, and Lu, Kun Ping. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Current biology* : CB 11[13], 1062-1067. 10-7-2001.

Nakamura,Y., Makabe,K.W., and Nishida,H. (2005). POPK-1/Sad-1 kinase is required for the proper translocation of maternal mRNAs and putative germ plasm at the posterior pole of the ascidian embryo. *Development* 132, 4731-4742.

Nakayama, Masanori, Goto, Takaaki M., Sugimoto, Masayuki, Nishimura, Takashi, Shinagawa, Takafumi, Ohno, Sigeo, Amano, Mutsuki, and Kaibuchi, Kozi. Rho-Kinase Phosphorylates PAR-3 and Disrupts PAR Complex Formation. *Developmental cell* 14[2], 205-215. 12-2-2008.

Narimatsu, Masahiro, Bose, Rohit, Pye, Melanie, Zhang, Liang, Miller, Bryan, Ching, Peter, Sakuma, Rui, Luga, Valbona, Roncari, Luba, Attisano, Liliana, and Wrana, Jeffrey L. Regulation of Planar Cell Polarity by Smurf Ubiquitin Ligases. *Cell* 137[2], 295-307. 17-4-2009.

Nie,J., Lilley,B.N., Pan,Y.A., Faruque,O., Liu,X., Zhang,W., Sanes,J.R., Han,X., and Shi,Y. (2013). SAD-A Potentiates Glucose-Stimulated Insulin Secretion as a Mediator of Glucagon-Like Peptide 1 Response in Pancreatic β Cells. *Molecular and Cellular Biology* 33, 2527-2534.

Nie,J., Sun,C., Faruque,O., Ye,G., Li,J., Liang,Q., Chang,Z., Yang,W., Han,X., and Shi,Y. (2012). Synapses of amphids defective (SAD-A) kinase promotes glucose-stimulated insulin secretion through activation of p21-activated kinase (PAK1) in pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry*.

Nikolic,M., Chou,M.M., Lu,W., Mayer,B.J., and Tsai,L.H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395, 194-198.

Nishimura,T., Yamaguchi,T., Kato,K., Yoshizawa,M., Nabeshima,Y.i., Ohno,S., Hoshino,M., and Kaibuchi,K. (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* 7, 270-277.

Niu,G.M., Ji,Y., Jin,D.Y., Hou,J., and Lou,W.H. (2010). [Clinical implication of BRSK2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90, 1084-1088.

Nobes, Catherine D. and Hall, Alan. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81[1], 53-62. 7-4-1995.

Noctor,S.C., Martinez-Cerdeno,V., Ivic,L., and Kriegstein,A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136-144.

Norton,W.T., Abe,T., Poduslo,S.E., and DeVries,G.H. (1975). The lipid composition of isolated brain cells and axons. *Journal of neuroscience research* 1, 57-75.

O

Ohno,Y., Ito,A., Ogata,R., Hiraga,Y., Igarashi,Y., and Kihara,A. (2009). Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 is involved in its signaling functions and internalization. *Genes to Cells* 14, 911-923.

Ohno, Yusuke, Kihara, Akio, Sano, Takamitsu, and Igarashi, Yasuyuki. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1761[4], 474-483. 2006.

Ohta,K., Sato,C., Matsuda,T., Toriyama,M., Lennarz,W.J., and Kitajima,K. (1999). Isolation and Characterization of Low Density Detergent-Insoluble Membrane (LD-DIM) Fraction from Sea Urchin Sperm. *Biochemical and biophysical research communications* 258, 616-623.

Oinuma,I., Katoh,H., and Negishi,M. (2007). R-Ras Controls Axon Specification Upstream of Glycogen Synthase Kinase-3beta through Integrin-linked Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 282, 303-318.

Olsen, Jesper V., Blagoev, Blagoy, Gnäd, Florian, Macek, Boris, Kumar, Chanchal, Mortensen, Peter, and Mann, Matthias. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* 127[3], 635-648. 3-11-2006.

Ozdamar,B., Bose,R., Barrios-Rodiles,M., Wang,H.R., Zhang,Y., and Wrana,J.L. (2005). Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGFbeta Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science* 307, 1603-1609.

P

Panneerselvam, Saravanan, Marx, Alexander, Mandelkow, Eva Maria, and Mandelkow, Eckhard. Structure of the Catalytic and Ubiquitin-Associated Domains of the Protein Kinase MARK/Par-1. *Structure (London, England : 1993)* 14[2], 173-183. 2-2-2006.

Perez-Iratxeta,C. and Andrade-Navarro,M. (2008). K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology* 8, 25.

Pernber,Z., Molander Melin,M., Berthold,C.H., Hansson,E., and Fredman,P. (2002). Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. *Journal of neuroscience research* 69, 86-93.

Pickart,C.M. (2001). MECHANISMS UNDERLYING UBIQUITINATION. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533.

Polleux,F., Giger,R.J., Ginty,D.D., Kolodkin,A.L., and Ghosh,A. (1998). Patterning of Cortical Efferent Projections by Semaphorin-Neuropilin Interactions. *Science* 282, 1904-1906.

Polleux,F., Morrow,T., and Ghosh,A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567-573.

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

Ren, Jian, Wen, Longping, Gao, Xinjiao, Jin, Changjiang, Xue, Yu, and Yao, Xuebiao. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 21[11], 639-644. 2008.

Rodríguez,J.A., Piddini,E., Hasegawa,T., Miyagi,T., and Dotti,C.G. (2001). Plasma Membrane Ganglioside Sialidase Regulates Axonal Growth and Regeneration in Hippocampal Neurons in Culture. *The Journal of Neuroscience* 21, 8387-8395.

Rodríguez-Asiain,A., Ruiz-Babot,G., Romero,W., Cubí,R., Erazo,T., Biondi,R.M., Bayascas,J.R., Aguilera,J., Gómez,N., il,C., Iaro,E., and izcano,J.M. (2011). Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 1124-1135.

Roos, Jack, Hummel, Thomas, Ng, Norman, KISmbt, Christian, and Davis, Graeme W. *Drosophila Futsch Regulates Synaptic Microtubule Organization and Is Necessary for Synaptic Growth.* *Neuron* 26[2], 371-382. 1-5-2000.

Rowan, A., Churchman, M., Jefferey, R., Hanby, A., Poulson, R., and Tomlinson, I. In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours. *The Journal of pathology* 192[2], 203-206. 2000.

Roy,A., Kucukural,A., and Zhang,Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725-738.

Ruiz-Canada, Catalina, Ashley, James, Moeckel-Cole, Stephanie, Drier, Eric, Yin, Jerry, and Budnik, Vivian. New Synaptic Bouton Formation Is Disrupted by Misregulation of Microtubule Stability in aPKC Mutants. *Neuron* 42[4], 567-580. 27-5-2004.

S

Sabater,L., Gómez-Choco,M., Saiz,A., and Graus,F. (2005). BR serine/threonine kinase 2: A new autoantigen in paraneoplastic limbic encephalitis. *Journal of Neuroimmunology* 170, 186-190.

Salaun,C., Greaves,J., and Chamberlain,L.H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* 191, 1229-1238.

Sandhoff,R., Grieshaber,H., Djafarzadeh,R., Sijmonsma,T.P., Proudfoot,A.E.I., Handel,T.M., Wiegandt,H., Nelson,P.J., and Grone,H.J. (2005). Chemokines bind to sulfatides as revealed by surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1687, 52-63.

Sapkota, G. P., Kieloch, A., Lizcano, J. M., Lain, S., Arthur, J. S., Williams, M. R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D. R. Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell vrowth. *The Journal of biological chemistry* 276[22], 19469-19482. 2001.

Sapkota, Gopal P., Boudeau, Jqrôme, Deak, Maria, Kieloch, Agnieszka, Morrice, Nick, and Alessi, Dario R. 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. *The Biochemical journal* 362[Pt 2], 481-490. 2002a.

Sapkota, Gopal P., Deak, Maria, Kieloch, Agnieszka, Morrice, Nick, Goodarzi, Aaron A., Smythe, Carl, Shiloh, Yosef, Lees-Miller, Susan P., and Alessi, Dario R. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *The Biochemical journal* 368[Pt 2], 507-516. 2002b.

Ref Type: Abstract

Sato,Y., Yoshikawa,A., Yamashita,M., Yamagata,A., and Fukai,S. (2009). Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3. *EMBO J* 28, 3903-3909.

Schaefer, Andrew W., Schoonderwoert, Vincent Th, Ji, Lin, Mederios, Nelson, Danuser, Gaudenz, and Forscher, Paul. Coordination of Actin Filament and Microtubule Dynamics during Neurite Outgrowth. *Developmental cell* 15[1], 146-162. 8-7-2008.

Schwamborn,J.C., Khazaei,M.R., and P++schel,A.W. (2007a). The Interaction of mPar3 with the Ubiquitin Ligase Smurf2 Is Required for the Establishment of Neuronal Polarity. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35259-35268.

Schwamborn,J.C., Muller,M., Becker,A.H., and Puschel,A.W. (2007b). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J* 26, 1410-1422.

Schwamborn,J.C. and Püschel,A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature neuroscience* 7, 923-929.

Schwamborn,J.C. and Puschel,A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7, 923-929.

Selkoe,D.J. (2004). Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies. *Annals of Internal Medicine* 140, 627-638.

Shahinian,S. and Silvius,J.R. (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* 34, 3813-3822.

Shaw, Reuben J., Bardeesy, Nabeel, Manning, Brendan D., Lopez, Lyle, Kosmatka, Monica, DePinho, Ronald A., and Cantley, Lewis C. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell* 6[1], 91-99. 1-7-2004a.

Ref Type: Abstract

Shaw,R.J., Kosmatka,M., Bardeesy,N., Hurley,R.L., Witters,L.A., DePinho,R.A., and Cantley,L.C. (2004b). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3329-3335.

Shelly, Maya, Cancedda, Laura, Heilshorn, Sarah, Sumbre, Germbn, and Poo, Mu Ming. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129[3], 565-577. 2007.

Shelly, Maya, Cancedda, Laura, Lim, ByungáKook, Popescu, Andrei T., Cheng, Pei lin, Gao, Hongfeng, and Poo, Mu ming. Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth. *Neuron* 71[3], 433-446. 11-8-2011.

Shi, Song Hai, Jan, Lily Yeh, and Jan, Yuh Nung. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112[1], 63-75. 2003.

Shroff,S.M., Pomicter,A.D., Chow,W.N., Fox,M.A., Colello,R.J., Henderson,S.C., and Dupree,J.L. (2009). Adult CST null mice maintain an increased number of oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research* 87, 3403-3414.

Sieburth,D., Ch'ng,Q., Dybbs,M., Tavazoie,M., Kennedy,S., Wang,D., Dupuy,D., Rual,J.F., Hill,D.E., Vidal,M., Ruvkun,G., and Kaplan,J.M. (2005). Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature* 436, 510-517.

Simons,K. and Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Smyth,A., Gilchrist,M., and O'Connor,W. (2005). A Selective Depolarisation-Induced Increase in Excitatory Amino Acid Neurotransmitter Release in Rat Medial Prefrontal Cortex Using a Microdialysis Model of Traumatic Brain Injury. In IUTAM Symposium on

Impact Biomechanics: From Fundamental Insights to Applications, M.D.Gilchrist, ed. Springer Netherlands), pp. 393-404.

Song,P., Xie,Z., Wu,Y., Xu,J., Dong,Y., and Zou,M.H. (2008). Protein Kinase C-dependent LKB1 Serine 428 Phosphorylation Increases LKB1 Nucleus Export and Apoptosis in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12446-12455.

Stewart,S. and Fang,G. (2005). Destruction BoxGÇôDependent Degradation of Aurora B Is Mediated by the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome and Cdh1. *Cancer Research* 65, 8730-8735.

Stokoe,D., Stephens,L.R., Copeland,T., Gaffney,P.R.J., Reese,C.B., Painter,G.F., Holmes,A.B., McCormick,F., and Hawkins,P.T. (1997). Dual Role of Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the Activation of Protein Kinase B. *Science* 277, 567-570.

Subramanian,L., Blumenfeld,H., Tohn,R., Ly,D., Aguilera,C., Maricic,I., Mansson,J.E., Buschard,K., Kumar,V., and Delovitch,T.L. (2012). NKT Cells Stimulated by Long Fatty Acyl Chain Sulfatides Significantly Reduces the Incidence of Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *PloS one* 7, e37771.

Suzuki,C., Murakami,G., Fukuchi,M., Shimanuki,T., Shikauchi,Y., Imamura,T., and Miyazono,K. (2002). Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane . *Journal of Biological Chemistry* 277, 39919-39925.

Suzuki,K., Kawakami,F., Sasaki,H., Maruyama,H., and Ohtsuki,K. (2009). Biochemical characterization of tau protein and its associated syndapin 1 and protein kinase C for their functional regulation in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1790, 188-197.

T

Takahashi,T. and Suzuki,T. (2012). Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *Journal of Lipid Research* 53, 1437-1450.

Thompson,S., Pearson,A.N., Ashley,M.D., Jessick,V., Murphy,B.M., Gafken,P., Henshall,D.C., Morris,K.T., Simon,R.P., and Meller,R. (2011). Identification of a Novel Bcl-2-interacting Mediator of Cell Death (Bim) E3 Ligase, Tripartite Motif-containing Protein 2 (TRIM2), and Its Role in Rapid Ischemic Tolerance-induced Neuroprotection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 19331-19339.

Tiainen, M., Ylikorkala, A., and MSkelS, T. P. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96[16], 9248-9251. 1999.

Tiainen,M., Vaahtomeri,K., Ylikorkala,A., and M+ñkel+ñ,T.P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21WAF1/CIP1. *Human Molecular Genetics* 11, 1497-1504.

Tian,J.H., Das,S., and Sheng,Z.H. (2003). Ca²⁺-dependent Phosphorylation of Syntaxin-1A by the Death-associated Protein (DAP) Kinase Regulates Its Interaction with Munc18. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26265-26274.

Tiruchinapalli,D.M., Oleynikov,Y., Keli,S., Shenoy,S.M., Hartley,A., Stanton,P.K., Singer,R.H., and Bassell,G.J. (2003). Activity-Dependent Trafficking and Dynamic Localization of Zipcode Binding Protein 1 and beta-Actin mRNA in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 23, 3251-3261.

Tsujita,K., Itoh,T., Kondo,A., Oyama,M., Kozuka-Hata,H., Irino,Y., Hasegawa,J., and Takenawa,T. (2010). Proteome of Acidic Phospholipid-binding Proteins: SPATIAL AND TEMPORAL REGULATION OF CORONIN 1A BY PHOSPHOINOSITIDES. *Journal of Biological Chemistry* 285, 6781-6789.

V

Van Aelst,L. and Cline,H.T. (2004). Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 297-304.

van Horck,F.P.G., Ahmadian,M.R., Haeusler,L.C., Moolenaar,W.H., and Kranenburg,O. (2001). Characterization of p190RhoGEF, A RhoA-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor That Interacts with Microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4948-4956.

Van Zyl,R., Gieselmann,V., and Eckhardt,M. (2010). Elevated sulfatide levels in neurons cause lethal audiogenic seizures in mice. *Journal of neurochemistry* 112, 282-295.

Veit,M., Becher,A., and Ahnert-Hilger,G. (2000). Synaptobrevin 2 Is Palmitoylated in Synaptic Vesicles Prepared from Adult, But Not from Embryonic Brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15, 408-416.

Velasco,S., D+jez-Revuelta,N., Hern+índez-Iglesias,T., Kaltner,H., Andr+®S., Gabius,H.J., and Abad-Rodr+iguez,J. (2013). Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *Journal of neurochemistry* n/a.

Votin,V., Nelson,W.J., and Barth,A.I.M. (2005). Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *Journal of Cell Science* 118, 5699-5708.

Wang,H.R., Zhang,Y., Ozdamar,B., Ogunjimi,A.A., Alexandrova,E., Thomsen,G.H., and Wrana,J.L. (2003). Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation. *Science* 302, 1775-1779.

Wang,H., Ogunjimi,A.A., Zhang,Y., Ozdamar,B., Bose,R., and Wrana,J.L. (2006). Degradation of RhoA by Smurf1 Ubiquitin Ligase. In *Methods in Enzymology Regulators and Effectors of Small GTPases: Rho Family*, C.William E.Balch, ed. Academic Press), pp. 437-447.

Wang,R., Li,K.m., Zhou,C.h., Xue,J.l., Ji,C.n., and Chen,J.z. (2011). Cdc20 mediates D-box-dependent degradation of Sp100. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415, 702-706.

Wang,Y., Wan,B., Li,D., Zhou,J., Li,R., Bai,M., Chen,F., and Yu,L. (2012). BRSK2 is regulated by ER stress in protein level and involved in ER stress-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 423, 813-818.

Watts, J. L., Morton, D. G., Bestman, J., and Kempfues, K. J. The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development (Cambridge, England)* 127[7], 1467-1475. 2000.

Webb,Y., Hermida-Matsumoto,L., and Resh,M.D. (2000). Inhibition of Protein Palmitoylation, Raft Localization, and T Cell Signaling by 2-Bromopalmitate and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry* 275, 261-270.

Weingarten,M.D., Lockwood,A.H., Hwo,S.Y., and Kirschner,M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862.

Westerman,A.M., Entius,M.M., Boor,P.P.C., Koole,R., Baar,E.d., Offerhaus,G.J., Lubinski,J., Lindhout,D., Halley,D.J.J., de Rooij,F.W.M., and Wilson,J.H.P. (1999). Novel mutations in the LKB1/STK11 gene in Dutch Peutz-Jeghers families. *Hum. Mutat.* 13, 476-481.

Wiesner,S., Ogunjimi,A.A., Wang,H.R., Rotin,D., Sicheri,F., Wrana,J.L., and Forman-Kay,J.D. (2007). Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell* 130, 651-662.

Wildonger, Jill, Jan, Lily Yeh, and Jan, Yuh Nung. The Tsc1-Tsc2 complex influences neuronal polarity by modulating TORC1 activity and SAD levels. *Genes & development* 22[18], 2447-2453. 2008.

Wilkinson,C.R.M., Seeger,M., Hartmann-Petersen,R., Stone,M., Wallace,M., Semple,C., and Gordon,C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-943.

Wingo,S.N., Gallardo,T.D., Akbay,E.A., Liang,M.C., Contreras,C.M., Boren,T., Shimamura,T., Miller,D.S., Sharpless,N.E., Bardeesy,N., Kwiatkowski,D.J., Schorge,J.O., Wong,K.K., and Castrillon,D.H. (2009). Somatic LKB1 Mutations Promote Cervical Cancer Progression. *PLoS ONE* 4, e5137.

Winzeler,A.M., Mandemakers,W.J., Sun,M.Z., Stafford,M., Phillips,C.T., and Barres,B.A. (2011). The Lipid Sulfatide Is a Novel Myelin-Associated Inhibitor of CNS Axon Outgrowth. *The Journal of Neuroscience* 31, 6481-6492.

Witte, Harald, Neukirchen, Dorothee, and Bradke, Frank. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology* 180[3], 619-632. 2008.

Woods, Angela, Dickerson, Kristina, Heath, Richard, Hong, Seung Pyo, Momcilovic, Milica, Johnstone, Stephen R., Carlson, Marian, and Carling, David. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism* 2[1], 21-33. 1-7-2005.

Woods, Angela, Johnstone, Stephen R., Dickerson, Kristina, Leiper, Fiona C., Fryer, Lee G. D., Neumann, Dietbert, Schlattner, Uwe, Wallimann, Theo, Carlson, Marian, and Carling, David. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current biology : CB* 13[22], 2004-2008. 11-11-2003.

X

Xia,Z.P., Sun,L., Chen,X., Pineda,G., Jiang,X., Adhikari,A., Zeng,W., and Chen,Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461, 114-119.

Xiao,B., Sanders,M.J., Underwood,E., Heath,R., Mayer,F.V., Carmena,D., Jing,C., Walker,P.A., Eccleston,J.F., Haire,L.F., Saiu,P., Howell,S.A., Aasland,R., Martin,S.R., CARLING,D., and Gamblin,S.J. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230-233.

Xie,M., Zhang,D., Dyck,J.R.B., Li,Y., Zhang,H., Morishima,M., Mann,D.L., Taffet,G.E., Baldini,A., Khoury,D.S., and Schneider,M.D. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 17378-17383.

Xie,X., Wang,Z., and Chen,Y. (2007). Association of LKB1 with a WD-repeat protein WDR6 is implicated in cell growth arrest and p27Kip1 induction. *Mol Cell Biochem* 301, 115-122.

Y

Yan,D., Guo,L., and Wang,Y. (2006). Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *The Journal of Cell Biology* 174, 415-424.

Yang,W.L., Zhang,X., and Lin,H.K. (2010). Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 29, 4493-4503.

Ylikorkala,A., Avizienyte,E., Tomlinson,I.P.M., Tiainen,M., Roth,S., Loukola,A., Hemminki,A., Johansson,M., Sistonen,P., Markie,D., Neale,K., Phillips,R., Zauber,P., Twama,T., Sampson,J., Järvinen,H., Mäkelä,T.P., and Aaltonen,L.A. (1999). Mutations and Impaired Function of LKB1 in Familial and Non-Familial Peutz-Jeghers Syndrome and a Sporadic Testicular Cancer. *Human Molecular Genetics* 8, 45-51.

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, 1323-1326.

Yoshida,H. and Goedert,M. (2011). Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau by Ampk-Related Kinases. *Journal of Neurochemistry* no.

Yoshimura,T., Arimura,N., Kawano,Y., Kawabata,S., Wang,S., and Kaibuchi,K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 62-68.

Yoshimura, Takeshi, Kawano, Yoji, Arimura, Nariko, Kawabata, Saeko, Kikuchi, Akira, and Kaibuchi, Kozo. GSK-3beta Regulates Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity. *Cell* 120[1], 137-149. 14-1-2005.

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, 20746-20752.

Z

Zempel,H., Thies,E., Mandelkow,E., and Mandelkow,E.M. (2010). Abeta oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci.* 30, 11938-11950.

Zeng,P.Y. and Berger,S.L. (2006). LKB1 Is Recruited to the p21/WAF1 Promoter by p53 to Mediate Transcriptional Activation. *Cancer Research* 66, 10701-10708.

Zeng, Wenwen, Sun, Lijun, Jiang, Xiaomo, Chen, Xiang, Hou, Fajian, Adhikari, Anirban, Xu, Ming, and Chen, Zhijian J. Reconstitution of the RIG-I Pathway Reveals a Signaling Role of Unanchored Polyubiquitin Chains in Innate Immunity. *Cell* 141[2], 315-330. 16-4-2010.

Zeqiraj,E., Filippi,B.M., Goldie,S., Navratilova,I., Boudeau,J., Deak,M., Alessi,D.R., and van Aalten,D.M. (2009a). ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS Biol* 7, e1000126.

Zeqiraj,E., Filippi,B.M., Deak,M., Alessi,D.R., and van Aalten,D.M.F. (2009b). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation. *Science* 326, 1707-1711.

Zhang, Huaye and Macara, Ian G. The PAR-6 Polarity Protein Regulates Dendritic Spine Morphogenesis through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Developmental cell* 14[2], 216-226. 12-2-2008.

Zhang,X., Zhu,J., Yang,G.Y., Wang,Q.J., Qian,L., Chen,Y.M., Chen,F., Tao,Y., Hu,H.S., Wang,T., and Luo,Z.G. (2007). Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat Cell Biol* 9, 743-754.

Zhimin,L. and Tony,H. (2009). Degradation of Activated Protein Kinases by Ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 435-475.

Zhong, Diansheng, Guo, Lizheng, de Aguirre, Itziar, Liu, Xiuju, Lamb, Neil, Sun, Shi Yong, Gal, Anthony A., Vertino, Paula M., and Zhou, Wei. LKB1 mutation in large cell carcinoma of the lung. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 53[3], 285-294. 1-9-2006.

Zhou,J., Wan,B., Gu,X., Zhong,Z., Wang,Y., Li,R., and Yu,L. (2012). Jab1 interacts with brain-specific kinase 2 (BRSK2) and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical and biophysical research communications*.

Zolessi FR FAU - Poggi,L., Poggi,L.F., Wilkinson CJ FAU - Chien,C.-B., Chien CB FAU - Harris,W., and Harris,W.A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Development*.

Zuckerman,D.M., Hicks,S.W., Charron,G., Hang,H.C., and Machamer,C.E. (2011). Differential Regulation of Two Palmitoylation Sites in the Cytoplasmic Tail of the beta-Adrenergic Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 286, 19014-19023.

Zurashvili,T., Cordón-Barris,L., Ruiz-Babot,G., Zhou,X., Lizcano,J.M., Gómez,N., Giménez-Llort,L., and Bayascas,J.R. (2012). Interaction of PDK1 with phosphoinositides is essential for neuronal differentiation, but dispensable for neuronal survival. *Molecular and Cellular Biology*.

ANNEXOS

Annex 1: Llistat de plasmidis utilitzats.

Plasmidi	Tag	Proteïna	Expressió	Procedència
pCMVHA	HA	BRSK1 WT	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMVHA	HA	BRSK1 T/A	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMVHA	HA	BRSK1 T/E	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. aa 1-295	Eucariota	In house
pCMVTag4	Flag	BRSK1 C-terminal aa 296-778	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C54S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C217S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C54S-C217S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C153S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C198S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. ΔC295	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C54S-ΔC295	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C54S-C153S-C198S-C217S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C147S-C191S-C258S-C295S	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 K.D. C54S-C147S-C153S-C191S-C198S-C217S-C258S-C295S (8C→S)	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	BRSK1 WT C54S-C147S-C153S-C191S-C198S-C258S-C217S-C295S-C328S-C364S (10C→S)	Eucariota	In house
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 WT	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	BRSK2 WT	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	MARK4 WT	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	PKBα	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	ERK5	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX	GST	Sintaxina 1A	Bacteri	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona
pGEX	GST	Sinaptobrevina2	Bacteri	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona
pGEX	GST	Munc18	Bacteri	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 K.D. 1-295	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 K.D. 1-400	Bacteri	In house
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 UBA 304-366	Bacteri	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein

				Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 SCR1 295-400	Bacteri	In house
pGEX6P1	GST-HA	BRSK1 SCR2 548-728	Bacteri	In house
pGEX	GST	Tau-1	Bacteri	Dr. Joan Blasi Universitat de Barcelona
pEBG2T	GST	LKB1 WT	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	Flag	Strada	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	Myc	Mo25 α	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV	HA	Ubiquitin WT	Eucariota	Dr. Bernat Crosas Institut de Biologia Molecular Barcelona-CSIC
pCMV	His	Ubiquitin WT	Eucariota	In house
pCMV	HA	BRSK2	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pCMV5b	Flag	Smurf1 WT	Eucariota	Addgene (Dr. Jeff Wrana)
pCMV5b	Flag	Smurf2 WT	Eucariota	Addgene (Dr. Jeff Wrana)
pCS2	Myc	mTrim2	Eucariota	Dr. Martin Balastik Beth Israel Deaconess Medical Center Boston
pCMV5b	Flag	Smurf1 C699A	Eucariota	Addgene (Dr. Jeff Wrana)
pCMVHA	HA	Ube2D1 (UbcH5)	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	Ube2L3 (UbcH7)	Eucariota	In house
pCMVTag4	Flag	BRSK1 WT	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	Smurf1 WT	Eucariota	In house
pET15	His	Ube2D1 (UbcH5)	Procariota	Addgene (Dr. Wade Harper)
pET23a	His	Ube2L3 (UbcH7)	Procariota	Addgene (Dr. Peter Howley)
pETDuet1	His	Ubiquitina WT	Procariota	In house
pETDuet1	His	Ubiquitina K48R	Procariota	In house
pETDuet1	His	Ubiquitina K63R	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	Smurf1 WT	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	Smurf1 C699A	Procariota	In house
pCMV5b	Flag	Par6	Eucariota	Addgene (Dr. Jeff Wrana)
pGEX6P1	GST	Par6	Procariota	In house
pCMVHA	HA	Smurf1 T306D	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	Smurf1 T306A	Eucariota	In house
pCMVHA	HA	Smurf1 K28/85A	Eucariota	In house
pGEX2T	GST	RhoA	Procariota	Addgene (Dr. R. Cerione)
pGEX6P1	GST	SCR1 R330Q/R332Q/R334Q	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	SCR1 R357Q/K358Q/R360Q	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	SCR1 R330Q/R332Q/R334Q R357Q/K358Q/R360Q	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	SCR2 R565Q R568Q R569Q K570 Q R700Q R701Q K703Q R704Q	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	B1 SCR2 Sonda 1	Procariota	In house
pGEX6P1	GST	B1 SCR2 Sonda 2	Procariota	In house
pET28b	His	SUMO-SCR2	Procariota	In house
pET28b	His	SEN2	Procariota	Dr. David Reverter Institut de

				Biotecnologia i Biomedicina (IBB-UAB)
pEGFP-C1	GFP	BRSK1 WT	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEGFP-C1	GFP	BRSK2 WT	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEGFP-C1	GFP	BRSK1 T/A	Eucariota	Dr. Dario R. Alessi MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)
pEGFP-C1	GFP	Buit	Eucariota	
pCMVHA	HA	Buit	Eucariota	
pCMVTag4	Flag	Buit	Eucariota	
pGEX6P1	GST-HA	Buit	Bacteri	

Annex 2: Llistat de primers utilitzats.

Proteïna	Primer (5'→3')	Enzim restricció	Tm
HA-BRSK1 Kin Dom	FW ccggaattcggTCGTCCGGGGCCAAGGAG	EcoRI	57°C
	RW ccgctcgagtcaAGGGGCTGGCTCCAGGCAC	XhoI	61°C
Flag-BRSK1 C-term	FW cgcggatccgccaccatgGGCCGCCGGGTAGCCATG	BamHI	59°C
	RW cccaagcttGGGCAGAGGGGTCCCCTTG	HindIII	61°C
HA-BRSK1 C54S	FW CGGGGTCCACAGCATCACGGG		65°C
	RW CCCGTGATGCTGTGGACCCCG		65°C
HA-BRSK1 C147S	FW CTGCGCTGGACTTCAGCCACAGCTACTCC		65°C
	RW GGAGTAGCTGTGGCTGAAGTCCAGCGCAG		65°C
HA-BRSK1 C153S	FW ACAGCTACTCCATCAGCCACAGAGACCTA		65°C
	RW TAGGTCTCTGTGGCTGATGGAGTAGCTGT		65°C
HA-BRSK1 C191S	FW TCCTGGAGACCAGCAGCGGGTCCCCCAT		65°C
	RW ATGGGGGGACCCGCTGCTGGTCTCCAGGA		65°C
HA-BRSK1 C198S	FW CCCCCATTATGCGAGTCCAGAGGTGATT		65°C
	RW AATCACCTCTGGACTCGCATAATGGGGGG		65°C
HA-BRSK1 C217S	FW CAGACATGTGGAGCAGTGGAGTCATCCTC		65°C
	RW GAGGATGACTCCACTGCTCCACATGTCAG		65°C
HA-BRSK1 C258S	FW TCATTCTCCAGATAGCCAGAGCCTCCTG		65°C
	RW TCATTCTCCAGATAGCCAGAGCCTCCTG		65°C
HA-BRSK1 C295S	FW ACGAGCCAGACCCGAGCCTGGAGCCAGCC		65°C
	RW ACGAGCCAGACCCGAGCCTGGAGCCAGCC		65°C
HA-BRSK1 ΔC295	RW ccgctcgagtcaAGGGGCTGGCTCCAGGCTCGGGT	XhoI	75°C
HA-BRSK1 C328S	FW TGGCATCACTGGGCAGCTTCAGGGACCGC		65°C
	RW GCGGTCCCTGAAGCTGCCAGTGATGCCA		65°C
HA-BRSK1 C364S	FW AGCGGTATCCAGCAGTGAGGACCAGGAC		65°C
	RW GTCCTGGTCTCACTGCTGGGATACCGCT		65°C
GST-B1 1-295 (Stop codon)	FW CAGACCCGTGCCTGTAGCCAGCCCCTGGC		65°C
	RW GCCAGGGGCTGGCTACAGGCACGGGTCTG		65°C
GST-B1 1-400	FW cccaagctTCGTCCGGGGCCAAGGAG	HindIII	57°C
	RW cgcggatccTCATTCCATGGACTTCCGCTC	BamHI	59°C
GST-B1 SCR1 295-400	FW cgcggatccgccaccatgGGCCGCCGGGTAGCCATG	BamHI	59°C
	RW ccggaattcTCATTCCATGGACTTCCGCTC	EcoRI	59°C
GST-B1 SCR2 548-728	FW cgcggatccTGGAGGAGTCGTCTCAAC	BamHI	51°C
	RW ccggaattcCTACTCGTCTGCCAGGGCC	EcoRI	59°C
His-Ub WT (eucariota)	FW CCGGAATTCGTGGCGGCCGCCACCATG	EcoRI	59°C
	RW CCCAAGCTTTCACCACCTCTGAGACGGAG	HindIII	63°C
HA-Ubch5	FW ccggaattcggATGGCTAGCATGACTGGT	EcoRI	49°C
	RW cgggggtaccTTACATCGCATACTTCTG	KpnI	45°C
HA-Ubch7	FW ccggaattcggATGGCGGCCAGCAGGAGG	EcoRI	57°C
	RW cgggggtaccTTAGTCCACAGGTCGCTT	KpnI	49°C
His-Ub WT (procariota)	FW ggaattccATGCAGATCTTCGTGAAG	EcoRI	51°C
	RW ccgctcgagTCACCCACCTCTGAGACG	XhoI	57°C
His-Ub K48R	FW GATCTTTGCTGGGAGACAGCTGGAAGATG		65°C

(procariota)	RW CATCTTCCAGCTGTCTCCCAGCAAAGATC		65°C
His-Ub K63R	FW CTACAACATCCAGAGAGAGTCGACCCTGC		65°C
(procariota)	RW GCAGGGTCGACTCTCTCTGGATGTTGTAG		65°C
GST-Smurf1	FW CcgctcgagggAGCAACGTGGTGACACGG	XhoI	53°C
	RW ccgctcgagAGCAACGTGGTGACACGG	XhoI	53°C
GST-Par6	FW cgggatccCGACAAGCCCGGCGGCAG RW cgggaattcTCAGAGGCTGAAGCCGCTAAC	BamHI EcoRI	
Smurf1 T306D	FW taataaccgaacagaccagtttacagac RW gtctgtaaactggctgttcggttatta		65°C 65°C
Smurf1 T306A	FW Taataaccgaacagcccagtttacagac RW gtctgtaaactgggctgttcggttatta		65°C 65°C
Smurf1 K28A	FW gaacctgcaaaggcagacttctcagg RW cctgaagaagtctgccttgcaaggttc		65°C 65°C
Smurf1 K85A	FW gtggaaccataaggcaattcacaagaaa RW Tttcttgaattgccttatggttccac		65°C 65°C
His-SUMO-SCR2	FW cgcggatccTGGAGGAGTCGTCTCAA	BamHI	47°C
SCR1 R330Q/R332Q/R334Q	FW tctctgggctgctccaggaccaggagcagctgcatcgcgagct RW agctcgcatgagcagctgctcctggtcctggaagcagcccagtg		65°C 65°C
SCR1 R357Q/K358Q/R360Q	FW atctgcttttgatcagcaggagcagatcccagctgtg RW cacagctgggatactgctcctgctgatccaaaagcagat		65°C 65°C
SCR2 R565Q R568Q R569Q K570 Q	FW cctgggctcccctcaattcaccagcaacagatgcaggtccct RW agggacctgcatctgttgctggtgaaattgagggagcccagg		65°C 65°C
SCR2 R700Q R701Q K703Q R704Q	FW ctcggtcccagccaacagtccagcaagtggaggagacca RW tggctccaccactgtggaactgttgctgggaccggag		65°C 65°C
GST-B1 SCR2 Sonda 1	FW cgcggatccTTCCTGGGCTCCCCTCGC RW ccggaattctcaGGACTCTGGCGTCAAGCT	BamHI EcoRI	57°C 53°C
GST-B1 SCR2 Sonda 2	FW cgcggatccATCTCGGGTCCCAGCCGT RW ccggaattctcaGTCATGAGTGCTCAGGAG	BamHI EcoRI	55°C 51°C
His-SUMO-SCR2	FW cgcggatccTGGAGGAGTCGTCTCAA	BamHI	47°C
Primers utilitzats per seqüenciació (5' → 3')			
pCMVHA FW	ACGCAAATGGGCGGTAGGCG		
pEBG2T RW	TGGGGACCCTCACTCTAGAG		
hGH_PA-terminator	CTTAATTTTATTAGGACAAGGCTGGTGG		
SV40pA-R	GAAATTTGTGATGCTATTGC		
pGEX6P1 FW	GGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG		
pGEX6P1 RW	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG		
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAGT		
M13 RW	CAGGAAACAGCTATGAC		
T7 FW	TAATACGACTCACTATAGGG		
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		

Annex 4: Anticossos utilitzats durant aquest treball.

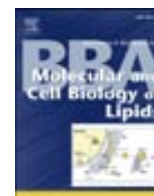
Anticòs	Obtingut en:	Obtingut de:	Referència	Cedit per:	MW (KDa)
BRSK1	Sheep	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)		Dr. Dario R. Alessi	85
BRSK2	Sheep	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)		Dr. Dario R. Alessi	75
BRSK1	Rabbit	Sigma	SAB4200393		85
BRSK2	Rabbit	Sigma	SAB4200431		75
MAP2	Rabbit	Santa Cruz	sc-20172		IC
LKB1	Sheep	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)		Dr. Dario R. Alessi	55
GAPDH	Mouse	Ambion	4300		37
TfR	Mouse	Zymed Laboratories	136800		90
Thy1	Mouse	Cancer Research Institute (London, UK)		Dr. Giampietro Schiavo	27
Synaptofisina	Mouse	Sigma	S-5768		IC
HA	Mouse	Sigma	H-3663		1
FLAG	Mouse	Sigma	F-3165		1
Flotillina-1	Mouse	BD-Transduction laboratories	610820		47
GST	Rabbit	Santa Cruz	sc-459		27
pTauS262	Rabbit	AbCam	ab4856		62
pTloop BRSK	Sheep	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)		Dr. Dario R. Alessi	85-75
Myc	Mouse	Sigma	M-4439		1
GFAP	Rabbit	Abcam	ab7260		IC
GalC	Rabbit	Millipore	ab7260	Dr. Alex Gella	IC
Sulphl	Mouse	Sahlgren's University Hospital, Suècia		Dr. Jan-Eric Mansson	IC
ERK1/2	Rabbit	Cell Signaling	4695		42-44
Smurf1	Mouse	Sigma	WH0057154M1		86
Par6 α	Rabbit	Sigma	A2484		38
Par6 α	Goat	Santa Cruz	sc-14405		IC
His	Mouse	Santa Cruz	sc-8036		1
Tau-1	Mouse	Millipore	MAB3420		IC

**IC: Anticòs utilitzat per immunocitoquímica.

Annex 5:

**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 ^{a,1}, Gerard Ruiz-Babot ^{a,1}, Walter Romero ^a, Roger Cubí ^a, Tatiana Erazo ^a, Ricardo M. Biondi ^b, Jose R. Bayascas ^a, Jose Aguilera ^a, Nestor Gómez ^a, Carles Gil ^a, Enrique Claro ^{a,*}, Jose M. Lizcano ^{a,*}

^a Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

^b 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 (E. Claro), josemiguel.lizcano@uab.es (J.M. Lizcano).

¹ 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^{-/-} BRSK2^{-/-} 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% CO₂) 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/cm², and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ 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 NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM Na₂HPO₄, 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 MgCl₂, 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- β -cyclodextrin (M β CD, Sigma, Spain) treatments were performed with purified synaptosomes prior to detergent solubilization. M β 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 μ 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 μ 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 (1.5×10^6 /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 μ 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- β -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 μ g of protein.

Twenty 10-cm diameter dishes of HEK293 cells were transfected with 3 μ g each of the vectors encoding for GST-LKB1, FLAG-STRAD α and Myc-MO25 α . 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 μ g/ml ampicillin was grown until the absorbance at 600 nm was 0.8. 100 μ M isopropyl- β -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 μ 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 [γ - 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 μ 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 μ 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 μ 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). After calculating the slopes of cholesterol in lipid extract samples (mL^{-1}) and standard cholesterol (mg^{-1}) by linear regression, cholesterol concentration was the quotient between both slope values (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 Sphingo-strips in TBS-T), and incubated with either 0.5 μ 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

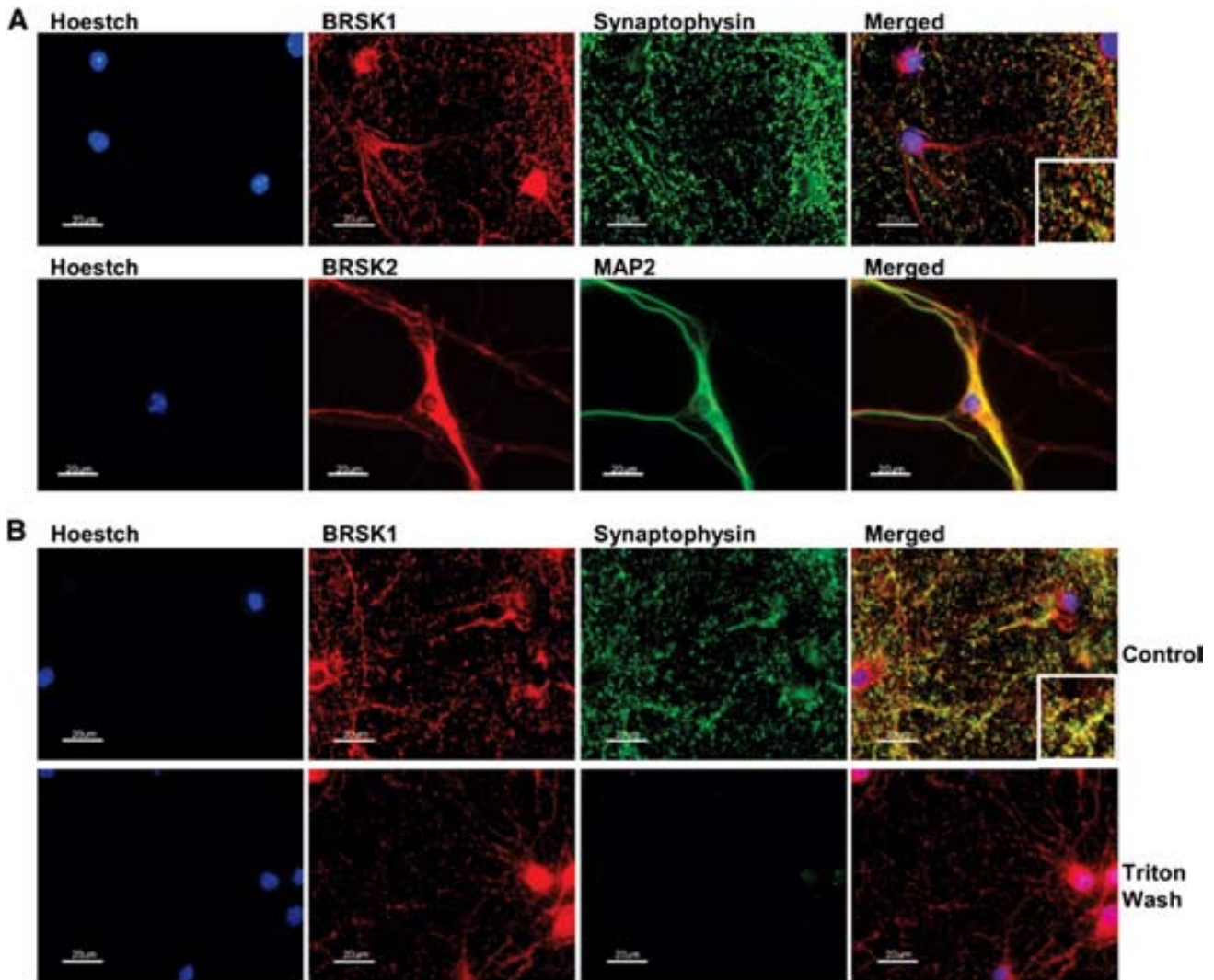


Fig. 1. BRSK1 tightly associates with synaptic vesicles in cortical neurons. Immunofluorescence microscopy. (A) Mouse cortical neurons were cultured for 10 days, fixed with paraformaldehyde and immunofluorescently stained for BRSK1 (red, upper panels), BRSK2 (red, lower panels) and synaptophysin or MAP2 (green). Left panels show nuclei staining (Hoestch). (B) Rat cortical neurons were cultured, fixed and immunofluorescently 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 μm .

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

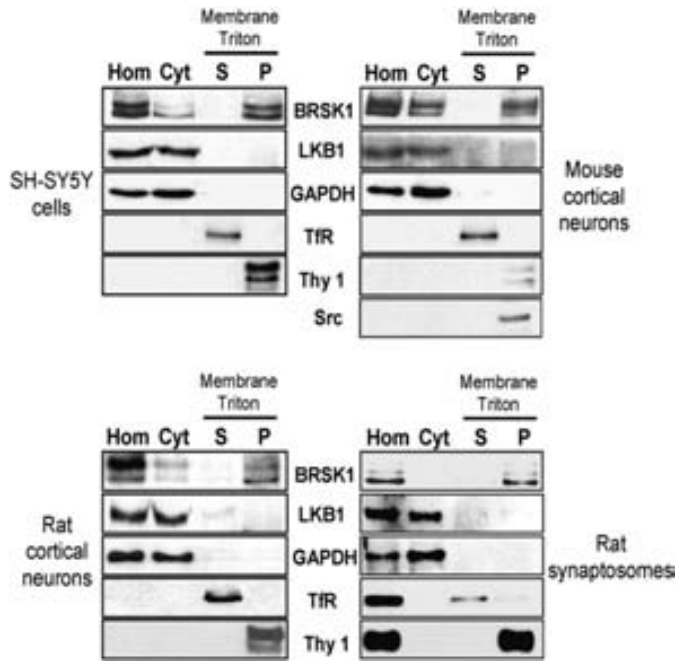


Fig. 2. Subcellular localization of BRSK1. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells, mouse cortical neurons, rat cortical neurons and rat synaptosomes were fractionated as described in the Materials and methods section. Hom, homogenate; Cyt, cytosol. The pellet containing the membrane fraction was solubilized 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.

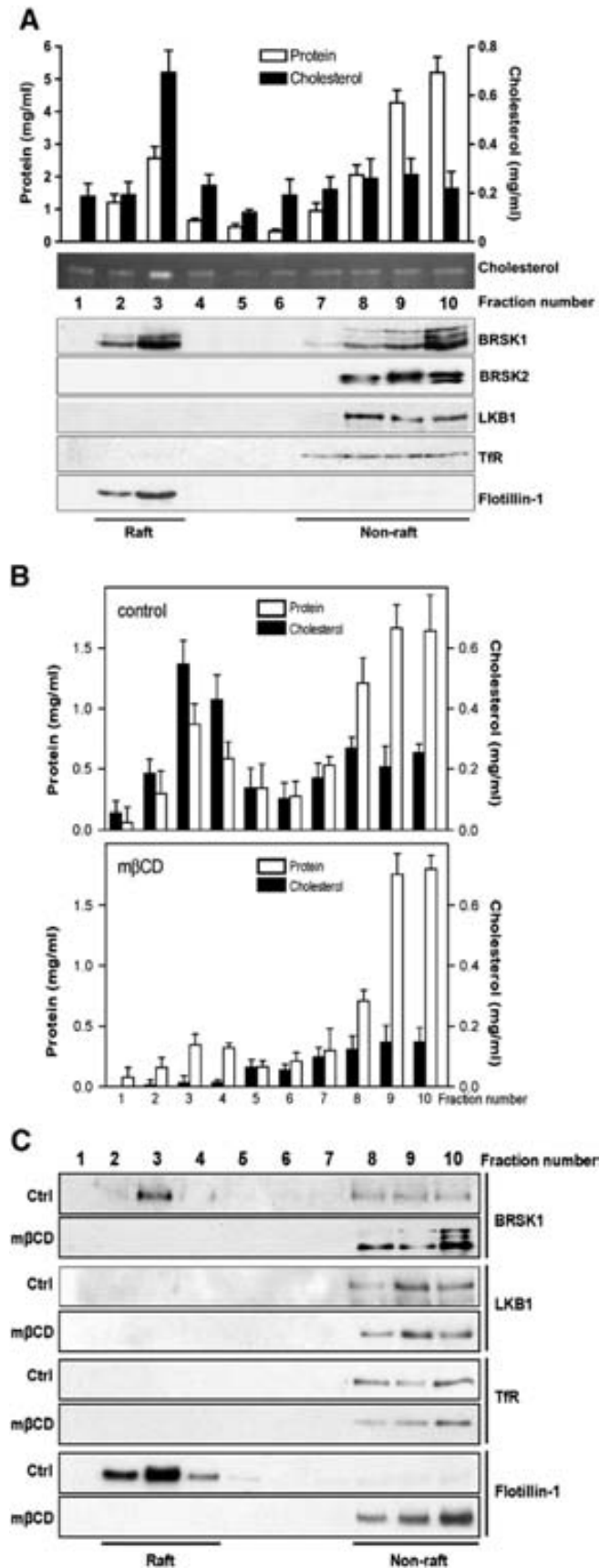


Fig. 3. BRSK1 localization in lipid rafts from rat brain synaptosomes. (A) Distribution of protein, cholesterol, BRSK1, BRSK2, LKB1 and raft markers in sucrose gradient fractions from rat brain synaptosomes solubilized with 1% Triton X-100 at 4 °C. The upper panel shows the protein (open bars) and cholesterol (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 (NH_2OH); 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 NH_2OH 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 BRSK kinase activity. To avoid this problem we decided to check BRSK1 activity status by

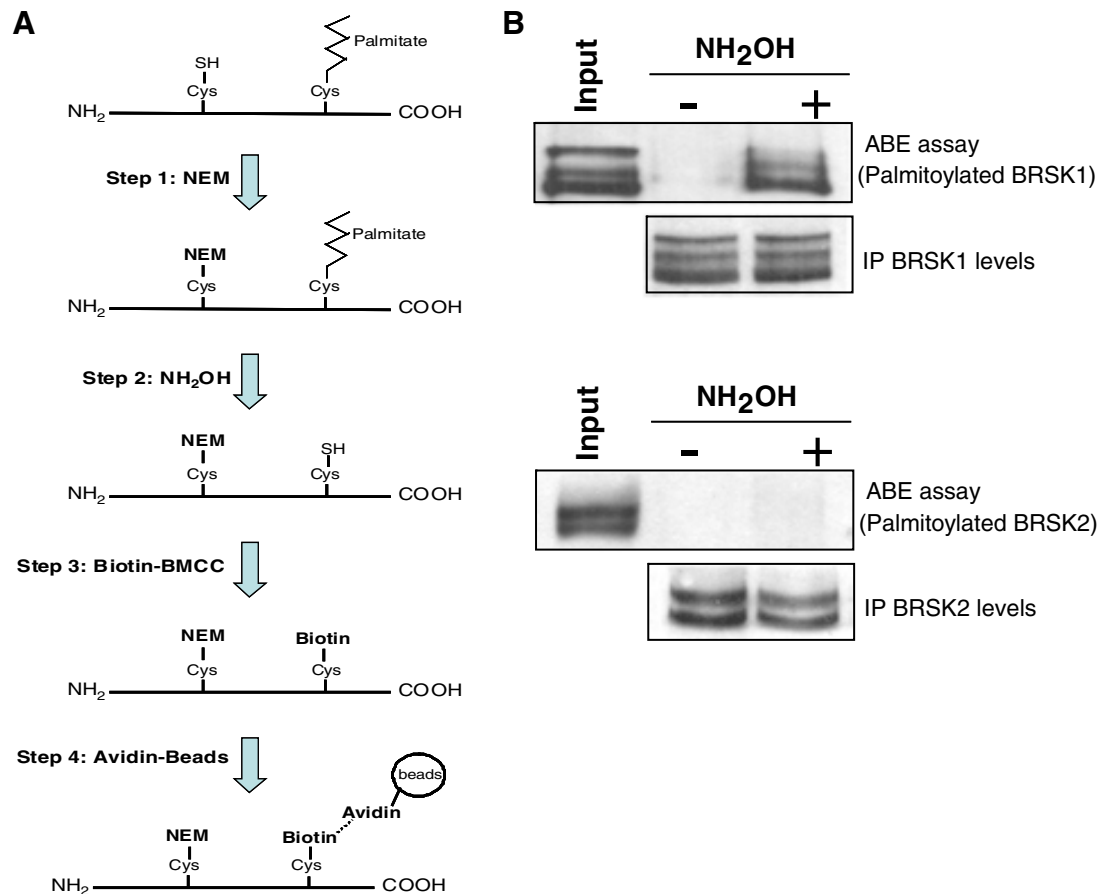


Fig. 4. Rat brain BRSK1, but not BRSK2, is palmitoylated. (A) Scheme of the acyl-biotin exchange (ABE) method. Lysing of the samples and immunoprecipitation of the protein is performed in the presence of NEM to block any preexisting free sulfhydryls (step 1). Unlike the thioester bonds (palmitoylated cysteines), Cys residues covalently attached to NEM are not sensitive to hydroxylamine (NH_2OH). Thus, NH_2OH 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 (NH_2OH)-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-

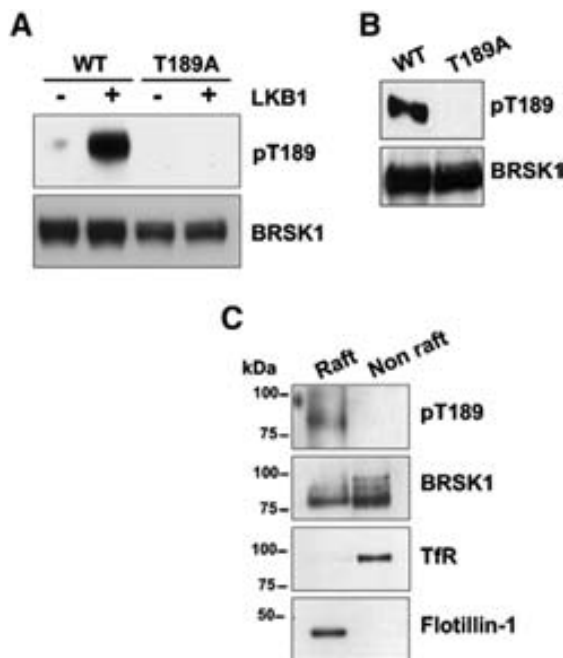


Fig. 5. Lipid raft environment enhances BRSK1 activity. Characterization of a phosphospecific antibody that recognizes active BRSK1 (pT189). (A) 200 ng of affinity purified, bacterially expressed BRSK1-wt and BRSK1-T189A mutant were incubated with active LKB1 and Mg-ATP for 30 min, and Thr189 phosphorylation 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 μ 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.

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 μ 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 μ 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

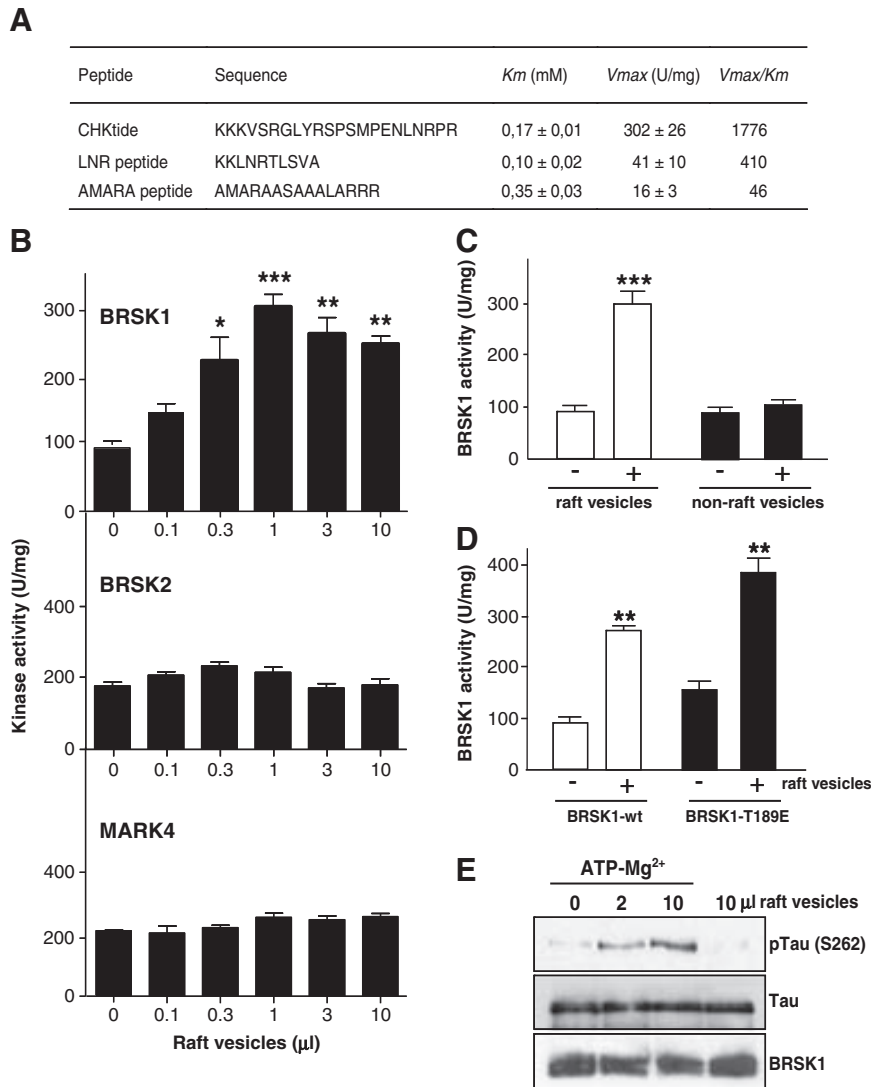


Fig. 6. Lipid raft vesicles from rat brain synaptosomes enhance BRSK1 kinase activity in vitro. (A) Kinetic analysis of the pure preparation of recombinant BRSK1 used in this work. Enzyme activities were determined at different concentrations of the indicated peptide substrate, using 60 ng of pure BRSK1, 200 μ M [γ - 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 μ M [γ - 32 P]-ATP and 200 μ 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 μ 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

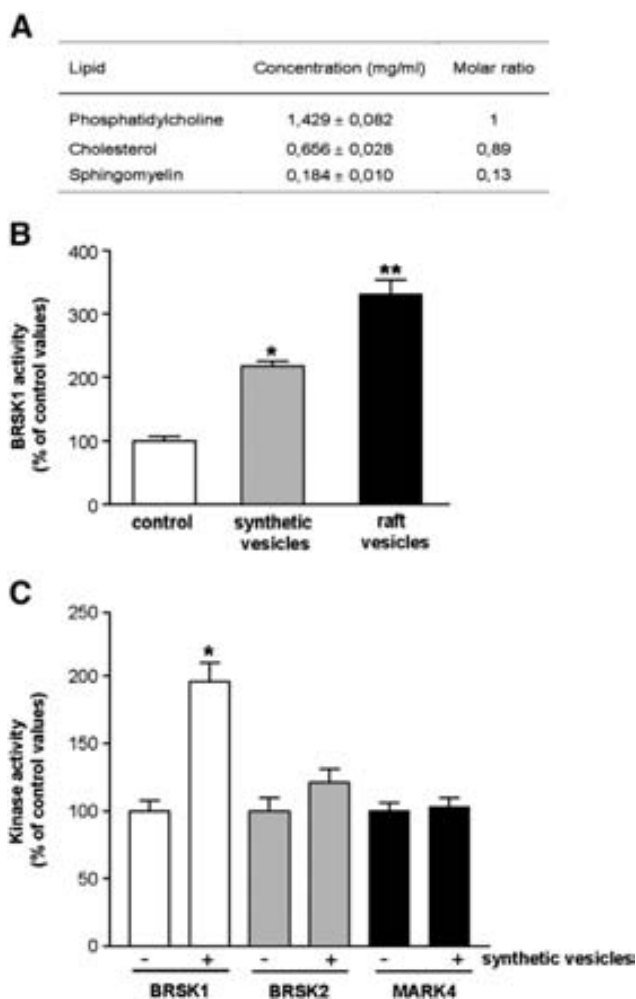


Fig. 7. Synthetic lipid vesicles activate BRSK1 kinase activity. (A) Concentration and molar ratio values of the major lipid species present in raft fractions from brain synaptosomes. Lipids from the sucrose density fraction 3 (raft fraction) were chloroform/methanol extracted, and concentration of cholesterol, 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 μ 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 μ 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 the synaptosomal raft fraction, and confirmed the absence of LKB1 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 β CD treatment. Since lipid

rafts are membrane microdomains enriched in sphingolipids and cholesterol, depletion of cholesterol with drugs such as m β 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 α -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)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃), 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 thioester 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 Ca²⁺ 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 α 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, Neural 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. Lizzano, 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. Parpura, 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. Smotryns, 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.

