



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioqímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



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

Arantzazu Rodríguez Asiain

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2012



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



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

Memoria de tesis doctoral presentada por Arantzazu Rodríguez Asiain para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Doctor José Miguel Lizcano de Vega en la Unitat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular y en el Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El director,

La doctoranda,

Dr. José Miguel Lizcano de Vega

Arantzazu Rodríguez Asiain

Bellaterra, 2012

Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

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

Este estudio también se realizó gracias a la concesión de una beca predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) para la Formación de Personal Universitario (FPU), ref.AP2006-02210

A mis padres y a mi hermano,
por esperarme siempre a la vuelta de cada curva y
tenderme la mano desde lo alto de cada repecho.

“Cuando no hay presas para las manos,
solo hay que subir un palmito los pies”.

Paquillo



Agradecimientos.

Quisiera empezar agradeciendo a mi director de tesis, Dr. Jose M. Lizcano, la valentía de poner en marcha este proyecto, y la confianza depositada en mí para llevarlo a cabo. Agradecerte incluso más, que en circunstancias adversas, siguieras apostando por mí y por las BRSKs, y que mantuvieras siempre esa valentía del inicio para tolerar cualquier posible resultado. Gracias también por procurar que no nos faltase nunca un reactivo o los medios para realizar un experimento, y por todos tus esfuerzos para poder trabajar y vivir más o menos dignamente durante todos estos años. Agradecerte tu adaptación forzada a mi concepto de orden y actualización de libreta, y la paciencia para superar mi cabezonería y convencerme con acierto cuando era mejor dejar una cosa o cuando era oportuno seguir intentándolo. Y en fin, por enseñarme todo lo que aprendí.

Al Dr. Néstor Gómez y a Josep Espadamala por multitud de cosas, pero sobretodo por su ayuda con las mutaciones de las BRSKs y los conocimientos de biología molecular que de ellos he adquirido. Fue un placer desarrollar el estudio de la expresión de las BRSKs en vuestra compañía.

Al Dr. Enrique Claro por su implicación experimental e intelectual en el estudio del efecto lípidico de los *raft* en la actividad de las BRSKs. Gracias por tu colaboración y el estar siempre dispuesto a un experimento más.

Agradecer al Dr. Jose R. Bayascas el brindarme su ayuda desinteresada cada una de las veces que acudí a él.

Al Professor Dario Alessi por acogerme amablemente unos meses en Dundee, y proporcionarnos todo tipo de material para el estudio de las BRSKs. También al Professor Ron Hay, con el que también tuve el placer de compartir inquietudes en Dundee, y que también nos cedió todo lo que fue necesario para el estudio de sumoilación.

Al Dr. Joan Blasi, por su colaboración y amabilidad en la cesión de los constructos para el estudio de fosforilación de las proteínas SNARE. Resultó una oportunidad bonita acabar este trabajo estudiando el papel de BRSK1 en la función sináptica.

Al Dr. Joan Villanueva y la Dra. Montserrat Carrascal del Laboratori de Proteòmica, por su interés y colaboración en la fosforilación de syntaxina.

A Cristina Gutiérrez del Servei de Cultius de l'Institut, por implicarse más allá de su trabajo y hacer más fácil el de los demás. Gracias Cris por tu eficacia, y por tantas cosas más.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, a les nenes del despatx y a toda la gente del departament; los que me acogieron cuando llegué, los que pasaron más o menos fugazmente y los que dejo allí. Gracias Ana, Greti, Walter, Gerard y Taty. Sin duda habría sido mucho más difícil estar escribiendo esto ahora si no nos hubiéramos cruzado y compartido infinidad de cosas.

Y por encima de todo, no tengo palabras para agradecer a toda mi familia y a todas esas personas que desde fuera (y dentro) me han ofrecido siempre su apoyo incondicional. De bien seguro encontraré una forma más sosegada y sincera de expresaros mi gratitud; igual colgada de una reunión mientras sigo vacilando si debiera pasar la cuerda por una o por las dos anillas, acabando el culo de una botella de patxaran, o simplemente gozando de vuestra compañía. Muchas gracias a todas y todos, moltíssimes gràcies, mila esker.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Las proteínas quinasas.....	3
I.1.1 Definición y relevancia de las proteínas quinasas.....	3
I.1.2 Clasificación y estructura de las proteínas quinasas.....	4
Clasificación y evolución de las proteínas quinasas	4
Estructura de las proteínas quinasas: el dominio quinasa	7
I.2 Vía de señalización dependiente de LKB1.....	11
I.2.1 El Síndrome de Peutz-Jeghers.....	11
I.2.2 Estructura y modificaciones postraduccionales de LKB1.....	12
I.2.3 Activación de LKB1: formación del complejo LKB1/STRAD/MO25.....	14
I.2.4 LKB1: proteína supresora de tumores que regula el crecimiento y la polaridad celular.....	18
I.2.5 LKB1: quinasa máster.....	19
I.3 <i>Brain-specific kinases</i> 1 y 2 (BRSK1 y BRSK2).....	23
I.3.1 Evolución y estructura de las BRSKs.....	23
I.3.2 Regulación de las BRSKs.....	23
Regulación de las BRSKs por quinasas <i>upstream</i> : ¿algo más allá de LKB1?	26
Regulación de las BRSKs por ubiquitinación	27
Regulación de las BRSKs por interacción con proteínas <i>scaffolding</i>	28
Regulación local de la traducción de las BRSKs durante el desarrollo del axón en neuronas	29

I.3.3 Función de las BRSKs: quinasas clave en la regulación de la polaridad neuronal y la función sináptica.....	29
Papel de las BRSKs en la función sináptica: sinaptogénesis y liberación de neurotransmisores	30
Papel de las BRSKs en la polaridad neuronal	31
BRSKs y el control del ciclo celular	34
I.3.4 Modelos celulares para el estudio de la diferenciación neuronal.....	36
Polarización neuronal <i>in vivo</i> y en cultivos primarios de neuronas corticales	36
Modelo de diferenciación neuronal línea celular PC12	40
II. OBJETIVOS.....	43
III. RESULTADOS.....	47
R.1 Obtención y optimización de reactivos para el estudio de las BRSKs.....	49
R.1.1 Activación de BRSK1 y BRSK2 por el complejo LKB1.....	51
El complejo LKB1/STRAD/MO25 fosforila y activa a BRSK1 y BRSK2 <i>in vitro</i>	51
LKB1 activa a BRSK1 y BRSK2 en células HeLa	52
R.1.2 Expresión, purificación y caracterización de BRSK1 y BRSK2 activa mediante infección de células de insecto con baculovirus.....	54
R.1.3 Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 utilizados en este trabajo.....	56
Especificidad de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2	57
Caracterización de los anticuerpos para la inmunoprecipitación de BRSK1 y BRSK2 endógenas de cerebro de rata	58
Caracterización de los anticuerpos para monitorizar la actividad quinasa de BRSK1 y BRSK2 inmunoprecipitadas de lisados celulares	58
Caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 para análisis inmunocitoquímicos de neuronas en cultivo	58

R.1.4 Caracterización del anticuerpo anti-pTloop BRSK fosfoespecífico.....	61
Resumen.....	63
R.2 Papel de BRSK1 y BRSK2 en la diferenciación neuronal.....	65
R.2.1 Distribución tisular y regional de BRSK1 y BRSK2.....	67
R.2.2 Aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante el desarrollo ontogénico del cerebro y la diferenciación de neuronas corticales.....	69
Análisis de la expresión y actividad de BRSK1 y BRSK2 durante el desarrollo ontogénico del cerebro de rata	69
Análisis de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación <i>in vitro</i> de neuronas corticales de rata	69
R.2.3 Caracterización del aumento de expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación neuronal de la línea celular PC12.....	73
R.2.4 Activación del promotor de BRSK1 durante la diferenciación neuronal en respuesta a las neurotrofinas NGF y BDNF.....	73
R.2.5 La vía de señalización Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 regula la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante el proceso de diferenciación neuronal.....	77
La sobre-expresión del mutante constitutivamente activo de MEK1 (MEK1-EE) induce la expresión de BRSK1 y BRSK2 en células PC12	77
La sobre-expresión del mutante oncogénico de H-Ras (H-RasV12) induce la expresión de BRSK1 y BRSK2 en células PC12	79
Inhibidores específicos de la vía de ERK1/2 bloquean el aumento de expresión de las BRSKs durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF	81
R.2.6 El factor de transcripción Sp1 (<i>Specificity Protein 1</i>) media en el aumento de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal de células PC12 inducida por NGF.....	82
Resumen.....	86
R.3 Localización de BRSK1 en microdominios de membrana <i>lipid rafts</i>: efecto del entorno lipídico en su actividad quinasa.....	87
R.3.1 Distribución de BRSK1 y BRSK2 en cultivos primarios de neuronas corticales.....	89

Localización de BRSK1 y BRSK2 en neuronas corticales de rata	89
Localización de BRSK1 y BRSK2 en astrocitos corticales de rata	92
R.3.2 Localización de BRSK1 en la fracción de membrana resistente a la solubilización con Triton X-100.....	93
R.3.3 BRSK1 se asocia a microdominios de membrana <i>lipid rafts</i> de sinaptosomas de cerebro de rata.....	95
R.3.4 La asociación de BRSK1 a <i>lipid rafts</i> de sinaptosomas de cerebro de rata resulta en una quinasa más activa.....	99
R.3.5 Caracterización de la activación de BRSK1 por el contenido lipídico de microdominios <i>raft</i>	100
Las vesículas lipídicas extraídas de la fracción <i>raft</i> activan BRSK1 <i>in vitro</i>	100
La activación de BRSK1 por vesículas <i>raft</i> es independiente de la fosforilación de la Thr189 del T-loop	102
R.3.6 Vesículas sintéticas con el mismo contenido lipídico de vesículas <i>raft</i> activan BRSK1.....	103
Resumen.....	105
R.4 Sintaxina-1A: nuevo sustrato de BRSK1.....	107
R.4.1 Estudio de fosforilación de las proteínas SNARE por BRSK1.....	109
Expresión y purificación de las proteínas SNARE SNAP25, Munc18, sintaxina-1A y sinaptobrevina	109
BRSK1 fosforila <i>in vitro</i> a la proteína t-SNARE sintaxina-1A	111
R.4.2 BRSK1 fosforila a sintaxina-1A en el residuo Serina-188.....	113
El mutante de delección sintaxina[1-168] es pobremente fosforilado por BRSK1	113
Identificación mediante espectrometría de masas de la Serina-188 como el residuo de sintaxina-1A fosforilado por BRSK1	114
El mutante puntual sintaxina Ser188/Ala (S188A) es deficientemente fosforilado por BRSK1	121
R.4.3 BRSK1 fosforila <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> la Serina-188 de sintaxina-1A.....	121
BRSK1 fosforila <i>in vitro</i> a sintaxina-1A en la Serina-188	121

BRSK1 fosforila <i>in vivo</i> a sintaxina-1A en la Serina-188	124
R.4.4 BRSK1 y sintaxina-1A co-localizan en membranas de neuronas de rata.....	126
Distribución de BRSK1 y sintaxina-1A en cultivos primarios de neuronas corticales de rata	126
Localización de BRSK1 y sintaxina-1A en microdominios de membrana <i>lipid raft</i> de sinaptosomas de cerebro de rata	128
R.4.5 BRSK1 y sintaxina-1A interaccionan <i>in vitro</i> , independientemente de la fosforilación de sintaxina-1A en la Serina-188.....	128
Resumen.....	131
 IV. DISCUSIÓN.....	133
 D.1 Regulación de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal..	135
D.2 Regulación de la actividad de BRSK1 por el entorno lipídico proporcionado por <i>lipid rafts</i>	140
Otros aspectos de la regulación de las BRSKs: modificación de BRSK1 y BRSK2 por ubiquitina y proteínas relacionadas (<i>small ubiquitin-like modifier 2</i> , SUMO2)	143
D.3 Fosforilación de la proteína t-SNARE sintaxina-1A por BRSK1.....	149
El complejo SNARE	150
Sintaxina-1A	153
Modelo general propuesto de regulación y función de las BRSKs durante la diferenciación y sinapsis neuronales.....	160
 V. CONCLUSIONES.....	163
 VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	167
M.1 Cultivos celulares.....	169

M.1.1 Líneas celulares.....	169
Almacenamiento y mantenimiento de las líneas celulares	169
Líneas celulares utilizadas	169
Material de cultivos	170
Tratamiento de las células	170
Lisis y cálculo de la concentración de proteína	171
M.1.2 Cultivos primarios de neuronas corticales.....	172
Tratamiento de los cultivos primarios	173
M.2 Fraccionamiento subcelular.....	173
M.2.1 Preparación de sinaptosomas de cerebro de rata.....	173
M.2.2 Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas de cerebro de rata.....	174
M.2.3 Aislamiento de <i>lipid rafts</i> de membranas de sinaptosomas de rata.....	175
M.3 Inmunocitoquímica.....	175
M.4 Técnicas electroforéticas para la detección de proteínas.....	176
M.4.1 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.....	176
M.4.2 Electrotransferencia de proteínas: western blot o inmunoblot.....	177
M.5 Purificación de proteínas.....	178
M.5.1 Inmunoprecipitación (IP).....	178
M.5.2 Ensayos de <i>pull down</i>	178
<i>Pull down</i> de proteínas de extractos celulares	178
<i>Pull down in vitro</i> de proteínas purificadas	178
Ensayo de sumoilación en células	179
M.5.3 Obtención de preparaciones puras de proteínas.....	180
Purificación de BRSK1 y BRSK2 en células de insecto Sf9	180
Purificación de proteínas en células <i>E. coli</i>	181
M.6 Ensayos de actividad enzimática.....	182
M.6.1 Ensayos de actividad quinasa.....	182

Ensayos radiométricos de actividad quinasa utilizando péptido sustrato	182
Ensayos radiométricos de fosforilación de proteínas en gel de poliacrilamida	183
M.6.2 Ensayos de <i>gene reporter</i> por actividad luciferasa.....	183
M.7 Técnicas lipídicas.....	184
M.7.1 Extracción de lípidos de las fracciones <i>raft</i> y <i>no-raft</i> , y reconstitución de vesículas lipídicas.....	184
M.7.2 Cuantificación de los lípidos contenidos en la fracción <i>raft</i> y generación de vesículas sintéticas.....	185
M.8 Espectrometría de masas para la detección de fosfo-péptidos.....	185
M.8.1 Obtención y digestión de la muestra.....	186
M.8.2 Espectrometría de masas e interpretación de los resultados.....	186
Espectrometría de masas LC-MS/MS capilar	186
Búsqueda en la base de datos e interpretación de los resultados	187
M.9 Biología molecular.....	187
M.9.1 Amplificación de los plásmidos de interés.....	187
Preparación de bacterias DH5 α competentes	187
Transformación de las bacterias competentes y purificación de los plásmidos	187
M.9.2 Mutagénesis dirigida.....	188
M.10 Transfección de DNA en células de mamífero.....	190
M.10.1 Transfección con polietilenamina (PEI).....	190
M.10.2 Transfección con lipofectamina 2000.....	191
M.11 Análisis estadístico.....	191
 VII. BIBLIOGRAFÍA.....	 193
 VIII. ANEXOS.....	 215

Anexo I: Brain Specific Kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid raft: modulation of kinase activity by lipid environment. <i>Biochim Biophys Acta</i>. 2011 Dec; 1811(12):1124-35. <u>Rodríguez-Asiain A</u>, Ruiz-Babot G, Romero W, Cubí R, Erazo T, Biondi RM, Bayascas JR, Aguilera J, Gómez N, Gil C, Claro E, Lizcano JM.....	217
Anexo II: GenScript final report for pSer188-syntaxin phospho-antibody.....	231
Anexo III: Lista de anticuerpos utilizados.....	245
Anexo IV: Lista de plásmidos utilizados.....	249

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS MÁS COMUNMENTE USADAS

Ala (A): Alanine	LRRK: Leucine-rich repeat kinase
AMP: Adenosine monophosphate	Lys (K): Lysine
AMPK: AMP-activated protein kinase	MAP2: Microtubule-associated protein 2
Arg (R): Arginine	MAPK: Mitogen-activated protein kinase
Asp (D): Aspartic acid	MARK: Microtubule affinity-regulating kinase
ATM: Ataxia-telangiectasia-mutated kinase	MEK1: MAPK kinase 1
ATP: Adenosine triphosphate	mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	Mg²⁺: Magnesium ion
BRSK1: Brain-specific kinase 1	MO25: Mouse protein 25
BRSK2: Brain-specific kinase 2	mTOR: mammalian target of rapamycin
CaMK: Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase	mβCD: methyl-β-cyclodextrin
CaMKK: CaMK kinase	NAB1: Neurabin-1
cAMP: cyclic adenosine monophosphate	NEM: N-ethylmaleimide
Cdc: Cell division cycle protein	NGF: Nerve growth factor
Cdk: Cyclin-dependent kinase	p90rsk: p90 ribosomal S6 kinase
CKII: Casein kinase II	PAR: Partitioning-defective proteins
Cys (C): Cysteine	PC12: Pheochromocytoma 12 cell line
DAPK: Death-associated protein kinase	PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
DIV: Days in vitro	PIP: Phosphatidylinositol phosphate
EGF: Epidermal growth factor	PJS: Peutz-Jeghers syndrome
ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2	PKA: Protein kinase A, cAMP-dependent protein kinase
GFAP: Glial fibrillary acidic protein	PKB: Protein kinase B
Glu (E): Glutamic acid	PKC: Protein kinase C
GPCR: G protein-coupled receptor	PLC: Phospholipase C
GSK3: Glycogen synthase kinase 3	PP2C: Protein phosphatase 2C
HEK-293: Human embryonic kidney 293 cell line	QIK: Qin-induced kinase
Hsp90: Heat shock protein 90	SAD-1: Synapses of amphids defective-1
LKB1: Liver kinase B1	

SAD-A: Synapses of amphids defective-A, BRSK2

SAD-B: Synapses of amphids defective-B, BRSK1

SAE: SUMO-activating enzyme

SCR: Short conserved region

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

SENP: Sentrin-specific protease

Ser (S): Serine

SIK: Salt-induced kinase

SM: Sec1/Munc18-like protein

SMV: Small multilamellar vesicle

SNAP: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)-attachment protein

SNAP25: Synaptosomal-associated protein 25

SNARE: SNAP receptor

SNRK: Sucrose non-fermenting related kinase

Sp1: Specificity protein 1

STRAD: STE20-related adaptor

SUMO: Small ubiquitin-like modifier

Thr (T): Threonine

TK: Tyrosine kinase

TKL: Tyrosine kinase-like

Tkr: Tropomysin-related kinase

TM: Transmembrane

Tsc1/2: Tuberous sclerosis complex 1/2

Tyr (Y): Tyrosine

UBA-domain: Ubiquitin-associated domain

Ubl: Ubiquitin-like protein

USP: Ubiquitin specific protease

VAMP: Vesicle-associated membrane protein

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

INTRODUCCIÓN

I.1 Las proteínas quinasas.

I.1.1 Definición y relevancia de las proteínas quinasas.

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia reversible del fosfato gamma del ATP a residuos de serina (Ser), treonina (Thr) y/o tirosina (Tyr) de las proteínas sustrato. La reacción inversa de desfosforilación es catalizada por las proteínas fosfatasas, y el equilibrio entre ambas reacciones es lo que determina el grado de fosforilación de las proteínas celulares.

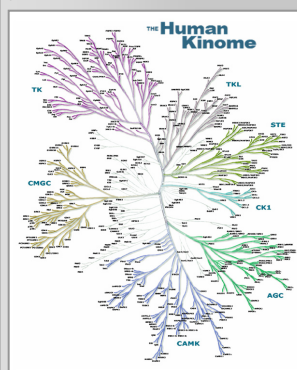
Desde el descubrimiento en los años 50 que la incorporación de fosfato del ATP a la glucógeno fosforilasa regula su actividad enzimática (Krebs & Fisher, 1956), ha habido un gran interés en estudiar el papel de la fosforilación en la regulación de la función que llevan a cabo las proteínas. Hoy en día se conoce que la fosforilación catalizada por proteínas quinasas altera el funcionamiento de las proteínas sustrato de cualquier modo concebible, incluyendo la modulación de su actividad biológica intrínseca, localización subcelular, vida media y asociación a otras proteínas. Puede también, con la cooperación de otras modificaciones post-traduccionales, determinar la extensión y duración de una respuesta celular, lo que constituye la clave de la integración de señales (Cohen P., 2000).

Las proteínas quinasas constituyen una de las superfamilias de proteínas más extensas. Aunque en los años 70 se especuló que los genomas de vertebrados podían llegar a codificar hasta 1000 proteínas quinasas y alrededor de 500 fosfatasas, la secuenciación completa de los genomas ha permitido identificar con exactitud el número de quinasas, y esbozar así lo que se ha llamado el “quinoma” de los principales organismos modelos. El genoma humano, por ejemplo, codifica para 518 proteínas quinasas, lo que representa alrededor de 1,7% del total de genes humanos (Manning et al, 2002a; **caja I.1**).

Por la diversidad de funciones de esta versátil modificación post-traducciona, se considera que la fosforilación reversible de proteínas regula todos los aspectos de la vida

Caja I.1 El dominio web **kinase.com**, producido y mantenido actualmente por el laboratorio de Gerard Manning (Salk Institute, California), alberga la mayor base de datos interactiva de proteínas quinasas “Kinbase”. El sitio web se creó en 1999 como soporte bioinformático a los análisis genómicos de los organismos *C. elegans* y *S. cerevisiae*, ampliándose en 2003 con la

secuenciación de los genomas de humanos y *Drosophila*. Actualiza los proyectos en marcha sobre los quinomas de varias especies, además de proporcionar herramientas informáticas para su análisis evolutivo.



celular. De hecho, alrededor del 30% de las proteínas celulares contienen un fosfato unido covalentemente, y niveles anormales de proteínas fosforiladas son la causa o consecuencia de numerosas enfermedades, como el cáncer, diabetes, trastornos neurológicos o disfunciones inmunológicas. Por ejemplo, 50 de los 100 oncogenes conocidos codifican para proteínas quinasas, y los 50 restantes lo hacen para proteínas que o bien regulan proteínas quinasas o bien son sustratos de éstas.

Por todo ello, las proteínas quinasas representan hoy en día la principal diana molecular en el diseño de nuevos fármacos; se estima que aproximadamente un tercio de los recursos invertidos por la industria farmacéutica en programas de *Drug Screening* están enfocados al desarrollo de fármacos que modulan la actividad de proteínas quinasas, lo que representa ya la mayor área de inversión por delante de receptores acoplados a proteínas G. En la última década, se han registrado y aprobado para su uso clínico 11 pequeñas moléculas que actúan como inhibidores de quinasas, la mayoría de ellas dirigidas contra el lugar de unión del ATP del dominio quinasa. Estos inhibidores ofrecen diferente selectividad, potencia y propiedad farmacocinética; sin embargo, tienen como diana terapéutica sólo unos pocos miembros del quinoma, incluyendo algunos receptores con actividad tirosin quinasa (EGFR, ERBB2, VEGFRs, Kit y PDGFRs), otras tirosin quinasa no receptores (ABL y SRC) y sólo una serin/treonin quinasa (mTOR). En conjunto, actualmente hay unos 150 fármacos dirigidos contra quinasas en fases clínicas avanzadas, y muchos más en varios estados del desarrollo pre-clínico; globalmente cubren todos los estadios de la transducción de señales, des de quinasas iniciadoras de la señalización intracelular, pasando por quinasas dependientes de segundos mensajeros, hasta quinasas reguladoras del ciclo celular y la diferenciación. De entre estas nuevas dianas terapéuticas en ensayos clínicos destacan por su interés creciente quinasas como PI3K, mTOR y PKB (Cohen P., 2002; Bozulic et al, 2007; Fabbro et al, 2012).

1.1.2 Clasificación y estructura de las proteínas quinasas.

Clasificación y evolución de las proteínas quinasas.

Las proteínas quinasas constituyen una extensa superfamilia de proteínas homólogas relacionadas por similitud en su dominio quinasa (o catalítico) formado por una secuencia de 250-300 aminoácidos. Hay dos grandes divisiones dentro de la superfamilia, según catalicen la fosforilación en residuos de tirosina (Tyr-quinasas) o en serina o treonina (Ser/Thr-quinasas). Por similitud del dominio quinasa, Hunter y Hanks clasificaron inicialmente las quinasas en 5 grandes grupos, ampliados posteriormente a 7 con la consecución de los quinomas de los principales organismos modelos (Hanks & Hunter, 1995; Manning et al, 2002a). Evolutivamente existen diferencias entre los quinomas humanos, de *C. elegans* y *Drosophila*, tales como familias únicas,

expandidas o perdidas. Por ejemplo, los humanos y *Drosophila* comparten varias familias de quinasas involucradas en neurología, inmunología, desarrollo y ciclo celular que están ausentes en *C. elegans*, lo que sugiere que estas funciones han evolucionado tras la divergencia de los gusanos del principal linaje de metazoos (Manning et al, 2002b).

El quinoma humano se divide en 7 grandes grupos de quinasas, 134 familias y 189 subfamilias. El principal criterio de clasificación se basa en la similitud de secuencia del dominio catalítico, apoyado por homología de dominios estructurales fuera del dominio quinasa, funciones biológicas conocidas y coincidencias con los otros quinomas modelo. Los 7 grandes grupos de proteínas quinasas en eucariotas son los siguientes:

- A) Grupo AGC: fosforilan los sustratos en residuos de serina/treonina flanqueados por aminoácidos básicos (lisinas y/o argininas). Incluye la familia de quinasas dependiente de nucleótidos cíclicos (PKA y PKG), la familia de PKC, la familia de β ARK y la familia de quinasas ribosomales S6 (rsk).
- B) Grupo CaMK: cercanas evolutivamente a las AGC quinasas, este grupo también tiende a ser dirigido por aminoácidos básicos. Es un grupo extenso de Ser/Thr-quinasas que incluye dos grandes familias: la familia de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMK) y la familia de la quinasa dependiente de AMP (AMPK).
- C) Grupo CMGC: fosforilan los sustratos en residuos de serina/treonina enclavados en dominios ricos en prolina. Comparten un dominio quinasa más largo de lo normal debido a inserciones en su extremo C-terminal. Incluye las familias de quinasas dependiente de ciclina (Cdk), MAP quinasas, glucógeno sintasa 3 quinasas (GSK3), casein quinasas II (CKII) y quinasas Cdk-like (Clk).
- D) Grupo TK: quinasas con dominios catalíticos muy similares que fosforilan específicamente en residuos de tirosina. Estas enzimas se han encontrado solo en células de metazoos, donde regulan mayoritariamente la transducción de señales implicadas en crecimiento y diferenciación celular. Este gran grupo alberga 90 miembros del quinoma, y está formado por 20 familias de receptores de membrana (entre ellos EGFR, PDGFR, FGFR, TRK y IGFR) y 10 familias no-receptores (como Src, ABL o FAK). Los determinantes de especificidad de los aminoácidos circundantes a la tirosina fosforilada no se han determinado con claridad para estos enzimas, aunque en muchos casos prefieren un residuo de glutámico en posición P+1 o P-1 (Robinson et al, 2000).
- E) Grupo TKL: el grupo de *tyrosine kinase-like* contiene las familias más diversas de proteínas quinasas; débilmente relacionadas entre ellas, pero que presentan gran similitud de secuencia con el grupo convencional de tirosina quinasas (TK).

Precisamente esta similitud sugiere que las tirosina quinasas emergieran evolutivamente a partir de las quinasas TKL más ancestrales. Este grupo está bien representado en todos los organismos eucariotas, siendo el más extenso del quinoma de plantas en el que puede llegar a contener hasta el 80% de todas sus quinasas. Las quinasas TKL fosforilan residuos de serin/treonina, e incluyen miembros como MLK, Raf, LRRK o IRAK.

- F) Grupo STE: lo constituyen principalmente tres familias que se activan secuencialmente entre ellas para activar al final la familia de las MAP quinasas (MEKs, MEKKs y MEKKKs). Algunas muestran especificidad dual, y son capaces de fosforilar indistintamente residuos de tirosina, serina o treonina. Sin embargo, no se encuentran especialmente cercanas en el árbol filogenético a las tirosina quinasas convencionales, sugiriendo que la habilidad de fosforilar residuos de tirosina tuvo orígenes independientes en la historia evolutiva de la superfamilia.
- G) Grupo CK1: estas quinasas constituyen el grupo más pequeño del quinoma. Entre ellas presentan una gran similitud de secuencia, pero sin embargo son muy diferentes al resto de proteínas quinasas. Por ejemplo, casein quinasa I (CK1) es la quinasa más divergente en cuanto a estructura de todas las proteínas quinasas, y en ella muchos de los dominios conservados se encuentran modificados. Además de la familia de CK1, este grupo lo forman tres familias de quinasas más: VRK, TTBK y TTBKL.

Casi una cuarta parte de los miembros del quinoma humano no pertenecen, sin embargo, a ninguno de los 7 grandes grupos de quinasas, y se clasifican como “otras” quinasas o quinasas “atípicas”. El primer grupo (que contiene quinasas como las TLKs, YANKs, Neks, CAMKKs, IREs, WNKs o Wee) son quinasas con un dominio catalítico bien estructurado pero con escasa similitud al resto de proteínas quinasas, lo que las sitúa en el centro del dendograma evolutivo. El segundo grupo (quinasas “atípicas”) lo forman 45 quinasas cuyo dominio catalítico carece de similitud de secuencia con el resto de quinasas, aunque experimentalmente se ha demostrado que poseen actividad proteína quinasa. Todas las familias de quinasas atípicas son pequeñas, y la mayoría solo poseen un miembro en vertebrados que no existe en invertebrados.

Es interesante que aproximadamente el 10% del quinoma está formado por quinasas que carecen de al menos uno de los motivos requeridos para la catálisis, por lo que se han denominado pseudoquinasas. Algunos ejemplos son STRAD α , WNK o HER3, y sus funciones emergentes se discuten en el próximo Capítulo de la Introducción.

Estructura de las proteínas quinasas: el dominio quinasa.

El dominio quinasa de las proteínas quinasas comprende una región conservada de 250-300 aminoácidos que imparte la actividad catalítica de estas enzimas. Se le atribuyen tres acciones bien definidas: a) unión y orientación de la molécula donadora del fosfato ATP para formar un complejo con cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}), b) unión y orientación de la proteína (o péptido) sustrato y c) transferencia del fosfato- γ del ATP al grupo hidroxilo aceptor de residuos de serina, treonina o tirosina de la proteína sustrato. El dominio quinasa se divide en 12 subdominios muy conservados, que se definen por regiones nunca interrumpidas por inserciones y que contienen patrones muy característicos de residuos conservados. En conjunto se han detectado hasta 12 residuos invariables dentro del dominio quinasa que son imprescindibles para la actividad catalítica de la enzima. Esta homología implica una estructuración tridimensional del dominio catalítico muy similar en todas las quinasas, lo que presupone también un mecanismo común de fosforilación en todas ellas.

Por su relativa simplicidad, la primera resolución de la estructura tridimensional de un dominio quinasa fue el de la quinasa dependiente de AMP cíclico PKA (Knighton et al, 1991). Su análisis tridimensional permitió deducir la topología general del dominio quinasa, definir los diferentes subdominios en los que se estructura y atribuir funciones específicas a cada uno de ellos. Estos datos se han corroborado posteriormente con las estructuras tridimensionales de otras quinasas. La **figura I.1A** representa la estructura tridimensional del dominio quinasa de PKA, donde se muestra que el dominio catalítico se estructura en dos lóbulos bien diferenciados:

- A) lóbulo menor (marcado en rojo): lóbulo pequeño situado en el extremo N-terminal que incluye los subdominios I-IV. Su estructura secundaria está formada mayoritariamente por 5 hojas β antiparalelas, y su función principal es la de unir y orientar el complejo ATP/Mg.
- B) lóbulo mayor (marcado en azul): lóbulo más grande situado en C-terminal que incluye los subdominios VIA-IX. Está formado principalmente por 6 hélices α , y su función radica en unir el sustrato e iniciar la transferencia del fosfato.

Ambos lóbulos están unidos por un *loop* de conexión (marcado en amarillo); esta profunda hendidura incluye el subdominio V y coopera en funciones de reconocimiento del sustrato y unión del complejo ATP/Mg.

En la **figura I.1B** se indica la localización de los 12 subdominios conservados (enumerados del I-XI empezando por el extremo N-terminal), acompañado de una breve descripción y relevancia de cada uno de ellos que se recoge en la **tabla I.1**. Por la importancia de la función

que desempeñan, destacan los subdominios VIB y VIII. El subdominio VIB contiene el denominado *loop* catalítico. Es un motivo consenso de 8 residuos que posee un aminoácido aspártico invariable (Asp166 en PKA), el cual se postula como base catalítica para aceptar el protón del grupo hidroxilo del sustrato. Por su parte, el subdominio VIII sea probablemente el dominio más importante de la proteína, ya que desempeña un papel muy relevante tanto en el reconocimiento del sustrato como en la regulación de la actividad quinasa. Este subdominio contiene el denominado *activation loop* o T-loop, que consiste en una secuencia de aminoácidos que alberga un residuo fosforilable, comúnmente una treonina, responsable de la activación de estas quinasas. En muchos casos, la fosforilación de este residuo provoca además cambios conformacionales que condicionan directamente la unión al péptido sustrato. La regulación de la actividad quinasa por fosforilación en el T-loop es un mecanismo muy extendido, y se encuentran ejemplos en todas las clases de quinasas: FGFR, PKA, PKB, Cdk, ERK o (como veremos con más detalle en el próximo apartado) las propias *Brain-specific kinases* (BRSKs) son unos pocos modelos.

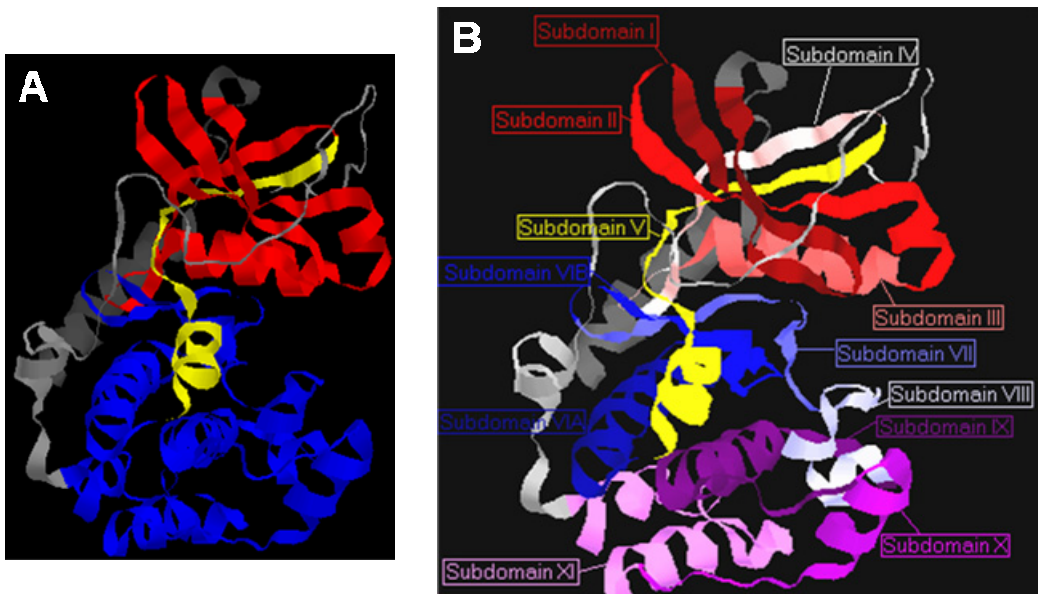


Figura 1.1 Estructura del dominio catalítico de las proteínas quinasas. (A) Estructura tridimensional del dominio catalítico de la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). En rojo se marca el lóbulo menor, en azul el lóbulo mayor y en amarillo el *loop* connector entre los dos lóbulos. **(B)** Estructura tridimensional del dominio catalítico de PKA en la que se marca la localización de los 12 subdominios conservados, enumerados del I-XI empezando por el extremo N-terminal (Hanks & Hunter, 1995; *The Protein Kinase Resource* (PKR), Smith C.M. et al, 1997).

Subdominio (residuos en modelo PKA)	Descripción
I (43-64)	Situado en N-terminal del dominio, se estructura en dos hojas β que actúan de solapa cubriendo los fosfatos α y β no-transferibles del ATP. Contiene el motivo consenso rico en glicina (<u>G</u> X <u>G</u> XXGXV) imprescindible en la unión del complejo ATP/Mg a la quinasa.
II (65-83)	Se estructura en un hoja β seguida de una pequeña hélice α no particularmente bien conservada. La hoja β contiene un residuo invariable muy importante (<u>L</u> ys72 en PKA) imprescindible para la actividad del enzima.
III (84-98)	Consiste en una larga hélice α , la única bien estructurada del lóbulo menor. En mitad del subdominio se encuentra un residuo ácido invariable (<u>G</u> lu91 en PKA) que ayuda a estabilizar las interacciones entre la Lys del subdominio anterior y los fosfatos α y β no-transferibles del ATP.
IV (99-113)	Estructurado en hoja β , no contiene ningún residuo invariable, por lo que parece tener una función más estructural que catalítica o de reconocimiento del sustrato.
V (114-137)	Actúa de puente estructural entre los dos lóbulos del dominio, aunque también cumple funciones importantes de catálisis y reconocimiento del sustrato. Contiene la última hoja β del lóbulo menor, la primera hélice α del mayor, y un <i>loop</i> de conexión entre ellas. Varios de sus residuos contribuyen a formar el <i>pocket</i> hidrofóbico que rodea al anillo de adenina del ATP. En varias quinasas se han identificado residuos de este subdominio que participan en el reconocimiento selectivo del sustrato, como el Glu127 en PKA, que marca la unión a la primera Arg de la secuencia consenso en sus sustratos (RRXS \underline{Y}).
VIA (138-160)	Forma la larga e hidrofóbica hélice α que atraviesa todo el lóbulo mayor. No contiene residuos relevantes, por lo que parece que su función es meramente estructural.
VIB (161-177)	Se estructura en dos pequeñas hojas β conectadas por un <i>loop</i> . Este <i>loop</i> (llamado <i>loop</i> catalítico) contiene la secuencia consenso HR <u>D</u> LK <u>X</u> X <u>N</u> imprescindible en la función de catálisis: el residuo de ácido aspártico invariable (Asp166 en PKA) representa la base catalítica del enzima, aceptando el protón del grupo hidroxilo del lugar de fosforilación en el sustrato. Esto libera un ión que permite la transferencia del fosfato- γ del ATP al residuo fosforilado del sustrato. El otro residuo invariable del consenso (Asn171 en PKA) asiste a la estabilización del <i>loop</i> catalítico mediante puentes de hidrógeno, a la vez que quela los iones Mg^{2+} de los fosfatos α y β del ATP.
VII (178-193)	Contiene dos hojas β conectadas por un <i>loop</i> . En medio se encuentra un triplete muy conservado (<u>D</u> FG) implicado en la correcta orientación del fosfato γ y del ATP para su transferencia al sustrato.
VIII (194-210)	Forma una cadena retorcida que encaja en la hendidura entre los dos lóbulos. Contiene un motivo consenso altamente conservado (<u>A</u> PE) implicado en la estabilización del lóbulo mayor. Este dominio es probablemente el más importante en las quinasas, ya que juega un papel muy relevante tanto en el reconocimiento del sustrato como en la regulación de la actividad quinasa (muchas de las proteínas quinasas son activadas por fosforilación de alguno de los residuos contenidos en este subdominio). En el caso de PKA, por ejemplo, varios de sus residuos forman un <i>pocket</i> hidrofóbico en el que encaja otra superficie hidrofóbica del sustrato, y la fosforilación de la Thr197 del subdominio es imprescindible para una activación completa de la enzima. La secuencia que contiene el residuo fosforilable responsable de la activación de estas quinasas se denomina <i>activation loop</i> o T-loop.
IX (211-240)	Se estructura en una gran hélice α con funciones estructurales y de reconocimiento del sustrato. Contiene un residuo invariable (<u>A</u> sp220 en PKA) que actúa estabilizando el <i>loop</i> catalítico del subdominio VIA.
X (241-260)	Forma una pequeña hélice α que se sitúa en la base del lóbulo mayor, encarada hacia el exterior del dominio. No posee una secuencia especialmente conservada, y su función no es conocida. Algunas proteínas quinasas tienen largas inserciones y deleciones entre los subdominios X-XI, cuya función es también desconocida.

XI (261-297)	Situado en el extremo C-terminal del dominio, se estructura en dos hélices α que albergan un aminoácido de Arg invariable (<u>Arg</u> 280 en PKA). Las serin/treonin-quinasa contienen un motivo consenso en este subdominio (HX-Aromático-Hidrofóbico) que parece definir el límite C-terminal del dominio quinasa.
---------------------	--

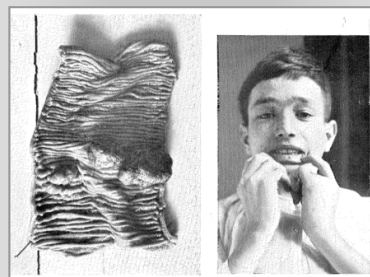
Tabla I.1 Descripción de los 12 subdominios en los que se estructura el dominio quinasa. Breve descripción de la estructura y función de los 12 subdominios conservados en los que se estructura el dominio quinasa. Los aminoácidos subrayados denotan residuos invariables. En una secuencia de aminoácidos X representa cualquier residuo (Hanks & Hunter, 1995; *The Protein Kinase Resource* (PKR), citación en Smith C.M. et al, 1997).

I.2 Vía de señalización dependiente de LKB1.

I.2.1 El Síndrome de Peutz-Jeghers.

El síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) fue descrito por primera vez en 1921 por el médico holandés Johannes Peutz (Peutz J., 1921) y caracterizado casi tres décadas más tarde como “síndrome de significancia diagnóstica” por Harold Jeghers (Jeghers et al, 1949). Esta enfermedad autosómica dominante se caracteriza por el desarrollo de pólipos en el intestino (hamartomas), así como la aparición marcada de pigmentación en las membranas mucosas. A pesar del carácter benigno de los pólipos, los pacientes de PJS tienen además un riesgo muy elevado de desarrollar tumores malignos en múltiples tejidos; el estudio más actualizado y completo sobre 416 pacientes estima que alrededor del 85% habrá desarrollado uno o varios tumores malignos a la edad de 70 años, lo que representa un riesgo 4 veces superior al resto de la población (Hearle et al, 2006). A día de hoy no se dispone de datos firmes sobre la supervivencia a largo plazo de los pacientes afectados con PJS, aunque un estudio realizado en 1989 constató que casi la mitad de los 72 pacientes estudiados habían muerto de cáncer antes de los 60 años (Spigelman et al, 1989). La estima de incidencia es también incierta y varía ampliamente entre 1:10.000 y 1:300.000 nacimientos, quizás debido a su rareza y a la dificultad de realizar un diagnóstico preciso (**caja I.2**).

Caja I.2 Los sitios web jeghers.com y peutz-jeghers.com ofrecen documentación muy detallada y amplia sobre todos los aspectos que conciernen al síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), desde recopilación de toda la literatura científica hasta guías prácticas para los pacientes. La primera herramienta contiene una colección única de literatura médica recopilada e indexada por el propio Dr. Harold J. Jeghers desde los años 20 hasta finales de siglo, incluyendo por supuesto todos los casos diagnosticados de PJS. La ilustración es una reproducción de la única figura que contiene el artículo original de J. Peutz de 1921 en el que se describe el primer caso de PJS; se muestra una fotografía de un segmento del yeyuno con pólipos y al paciente mostrando las máculas de pigmentación de su labio inferior.



En 1997, el análisis de linaje genético reveló que el locus responsable de PJS estaba localizado en el cromosoma 19p13.3, y un año más tarde se descubrió que 11 de las 12 familias con PJS estudiadas poseían diversas mutaciones en el gen que codifica para la proteína Ser/Thr-quinasa *Liver Kinase B1* (LKB1), también designada oficialmente SKT11 por la *Human Genome Organization* (Hemminki et al, 1997; Hemminki et al, 1998). Existe sólo una isoforma del gen de LKB1 en el genoma humano, que abarca 23 Kb y se compone de 10 exones, 9 de los

cuales son codificantes. LKB1 se expresa de forma ubicua en todos los tejidos fetales y adultos estudiados (Rowan et al, 2000). Hasta el día de hoy se han identificado casi 150 mutaciones diferentes de LKB1 en pacientes de PJS, y también en cánceres esporádicos. Recientemente se ha demostrado que un tercio de los adenocarcinomas de pulmón (la causa de muerte más común en el mundo asociada a cáncer) o la quinta parte de tumores cervicales contienen mutaciones en LKB1, lo que muestra la relevancia de la disfunción de esta quinasa en el origen, diferenciación y metástasis de algunos tipos de cánceres esporádicos (Ji et al, 2007; Herrmann et al, 2011). La mayoría de estas mutaciones resultan en rupturas sustanciales del dominio catalítico, aunque también hay un gran número de mutaciones puntuales que afectan tanto al dominio quinasa como a la región C-terminal no-catalítica. No se han identificado mutaciones en el extremo N-terminal, lo que sugiere que esta región no es crucial para la actividad supresora de tumores de LKB1 (Alessi et al, 2006).

I.2.2 Estructura y modificaciones postraduccionales de LKB1.

La proteína LKB1 humana posee 433 residuos, con un peso molecular aproximado de 55 kDa. Pertenece al grupo de quinasas CaMK, aunque contiene un dominio catalítico (residuos 49-309) que presenta escasa homología al resto de proteínas quinasas, y justifica porque LKB1 se sitúa en el centro del dendrograma evolutivo del quinoma. Las regiones N y C-terminal no catalíticas no se relacionan con ninguna otra proteína y tampoco poseen dominios funcionales conocidos.

LKB1 se fosforila en al menos 8 residuos, 4 por quinasas *upstream* (Ser31, Ser325, Thr366 y Ser431) y 4 por autofosforilación (Thr185, Thr189, Thr336 y Ser404) (**figura I.2**). La mutación de cualquiera de estos residuos a Ala (para abolir la fosforilación) o Glu (para mimetizarla) no presenta efecto significativo alguno sobre la actividad quinasa de LKB1 o sobre su localización celular (Sapkota et al, 2002a). Sin embargo, la Ser431 y la Thr336 son residuos claves para la capacidad de LKB1 de suprimir el crecimiento celular: ensayos clonogénicos de células G361 (que carecen de LKB1) muestran que la mutación de la Ser431 a Ala o Glu y de la Thr336 (el mayor lugar de autofosforilación) a Glu inhiben la habilidad de LKB1 de suprimir el crecimiento celular, lo que indica que ambos residuos son claves en la función supresora de tumores de LKB1 (Sapkota et al, 2001). La Ser431 (conservada en LKB1 de *Drosophila* y *Xenopus*) es fosforilada por la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y por la quinasa *p90 ribosomal S6 protein* (p90rsk), de manera que ambas quinasas regularían el crecimiento celular a través de la fosforilación de LKB1. De hecho, la fosforilación de la Ser431 de LKB1 es crucial para su función en la regulación del ciclo celular en células de mamífero y en el establecimiento de la polaridad en células de *Drosophila* (Sapkota et al, 2001; Martin & Johnston, 2003). Además, la fosforilación

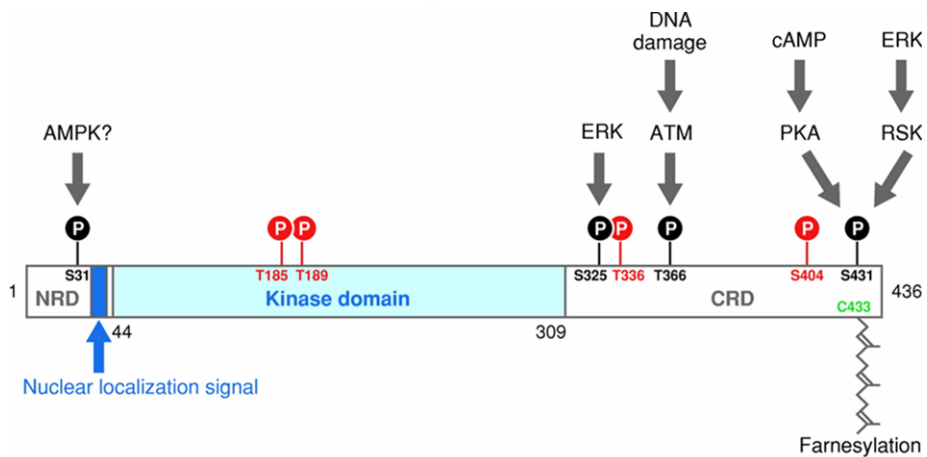


Figura I.2 Representación esquemática de la estructura y modificaciones postraduccionales de LKB1 de ratón. Los dominios no catalíticos N y C-terminal (NRD, *N-terminal regulatory domain* y CDR, *C-terminal regulatory domain*) se representan en blanco, y el dominio quinasa se resalta en azul. Los residuos autofosforilados se indican en rojo y los fosforilados por otras quinasas en negro; el lugar de farnesilación Cys433 se indica en verde. Se muestran los agonistas y las quinasas *upstream* postuladas para fosforilar cada lugar. Figura modificada de Alessi *et al*, 2006.

de este residuo por PKA en respuesta a niveles elevados de cAMP también es esencial en la diferenciación axonal de neuronas, donde se observa que la forma fosforilada de LKB1 en la Ser431 se localiza principalmente en los axones de neuronas polarizadas y se acumula en una única neurita en neuronas no diferenciadas (Barnes *et al*, 2007; Shelly *et al*, 2007; Shelly *et al*, 2010). Sin embargo no se disponen de evidencias claras que la fosforilación de la Ser431 sea necesaria para la actividad de LKB1, ya que mutaciones de este residuo no alteran la habilidad de LKB1 de autofosforilarse o de fosforilar a sus sustratos *in vitro* (Fogarty & Hardie, 2009). Esto no excluye la existencia de mecanismos indirectos más complejos de regulación como, por ejemplo, que la fosforilación de la Ser431 altere la localización de LKB1 y por tanto afecte a su habilidad de fosforilar los sustratos en regiones subcelulares específicas (Xie *et al*, 2008). Con respecto a los otros tres residuos fosforilados de LKB1, se ha descrito que la quinasa activada por daño en el DNA (*ataxia-telangiectasia-mutated*, ATM) fosforila la Thr366 en respuesta a radiación ionizante (Sapkota *et al*, 2002b). Por su parte, la MAP quinasa ERK1/2 interacciona con LKB1 a través de su dominio catalítico, y la fosforila *in vivo* en la Ser325 (Zheng *et al*, 2009), mientras que la quinasa responsable de fosforilar el residuo Ser31 no ha sido aun caracterizada.

LKB1 posee en su extremo C-terminal una secuencia consenso óptima para ser prenilada (Cys-Lys-Gln-Gln) (figura I.2). El marcaje con ^{14}C -ácido mevalónico y análisis mediante espectrometría de masas muestra que la Cys433 de este motivo (conservado en LKB1 de *Xenopus* y *Drosophila*) se prenila *in vivo* por adición de una molécula de farnesil- C_{15} (Collins *et al*,

2000; Sapkota et al, 2001). A diferencia de otras quinasas preniladas como Ras que únicamente existen en la membrana celular, el fraccionamiento subcelular de células de mamífero indica que solo un pequeño *pool* de LKB1 endógena se asocia a la membrana plasmática. Sin embargo se trata de una modificación muy relevante, como se deduce de los estudios genéticos realizados en *Drosophila* que muestran que tanto la prenilación de la Cys433 como la fosforilación de la Ser431 por PKA son imprescindibles para que LKB1 regule la polaridad celular (Martin & Johnston, 2003). El mecanismo por el cual la prenilación regula a LKB1 aun se desconoce; a pesar de la proximidad de las dos determinantes modificaciones postraduccionales, no parece que la fosforilación en la Ser431 afecte a la farnesilación en la Cys433, y viceversa (Sapkota et al, 2001).

Por último LKB1 se acetila como mínimo en 9 residuos de Lys, siendo la más relevante la Lys48 (Lan et al, 2008). Esta modificación tiene un efecto en la distribución subcelular de LKB1, como muestra la sobre-expresión de la desacetilasa SIRT1 o de mutantes de LKB1 deficientes en acetilación (mutantes en los que la Lys se substituye por Arg), que favorecen la localización citoplasmática de LKB1.

I.2.3 Activación de LKB1: formación del complejo LKB1/STRAD/MO25.

Mediante estudios combinados de *yeast two-hybrid* y purificación de afinidad se ha observado que (en células de mamífero) LKB1 forma un complejo proteico con otras dos proteínas: *STE20-related adaptor* (STRAD) y *mouse protein 25* (MO25) (Baas A.F et al, 2003; Boudeau et al, 2003a):

- A) STRAD: el genoma humano codifica para dos isoformas muy relacionadas entre si de STRAD (STRAD α y STRAD β). Ambas poseen una elevada homología de secuencia con la familia de proteínas quinasas STE20, pero sin embargo carecen de varios residuos clave indispensables para su actividad catalítica por lo que resultan en enzimas inactivas. Así, las isoformas de STRAD se han clasificado como pseudoquinasas, y son incapaces de autofosforilarse o fosforilar proteínas (**caja I.3**).
- B) MO25: el genoma humano codifica también para dos isoformas de MO25 (MO25 α y MO25 β) estrechamente relacionadas entre si, pero que sin embargo no presentan homología con ninguna otra proteína. Originalmente, MO25 α se identificó como una proteína inusualmente conservada que se expresaba en estadios tempranos de la embriogénesis de ratón. Hasta ahora se pensaba que todas las funciones biológicas de MO25 estaban mediadas por su habilidad de regular LKB1 como componente del complejo LKB1/STRAD/MO25. Sin embargo, un trabajo reciente muestra que MO25

(además de interactuar con STRAD) puede unir y activar a al menos 5 miembros más de la familia STE20-quinasa (Filippi et al, 2011). Por ello se ha sugerido que la unión de MO25 a las pseudoquinasa y quinasa activas de esta familia de proteínas representa un modelo ancestral de activación, proponiendo a MO25 como un activador máster de las quinasa STE20.

Cuando se aísla el complejo LKB1/STRAD/MO25, los tres componentes aparecen en la misma estequiometría, lo que sugiere una elevada afinidad de las subunidades individuales por cada una de las otras (Boudeau et al, 2003a).

Al sobre-expresar LKB1 en células de mamífero se observa que esta se localiza mayoritariamente en el núcleo, con una población residual en el citoplasma. La región N-terminal no catalítica de LKB1 contiene una señal de localización nuclear (NLS) (figura 1.2), y mutaciones de este motivo provocan que se disperse a través de toda la célula (Sapkota et al, 2002a). Sorprendentemente este mutante retiene aún la capacidad supresora de tumores de LKB1, lo que sugiere que la pequeña población citosólica desempeña un papel importante en esta función. De acuerdo con ello, los mutantes de LKB1 incapaces de entrar a núcleo poseen la función supresora de crecimiento celular (Tiainen et al, 2002).

STRAD α y MO25 α se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo cuando se sobre-expresan por separado, pero ambas restringen completamente su localización en el citoplasma cuando se expresan conjuntamente. Al sobre-expresar LKB1 junto con STRAD α y MO25 α se observa un cambio de distribución de LKB1, que se exporta del núcleo para localizarse completamente en el citoplasma celular. Así, STRAD α localiza LKB1 en el citosol de la célula, a través de su habilidad para ejercer de adaptadora entre LKB1 y la maquinaria de exportación nuclear CRM1 (Boudeau et al, 2003a; Boudeau et al, 2004; Dorfman & Macara, 2008). Es posible que existan otros mecanismos adicionales que mantengan LKB1 en el citoplasma, como la desacetilación de la Lys48 anteriormente mencionada (Lan et al, 2008), o la interacción con la proteína LIP1 (Smith D.P. et al, 2001). La unión de LKB1 a STRAD y MO25 no solo provoca su translocación del núcleo al citoplasma sino que además induce su activación. Así, la presencia de estas dos subunidades incrementa unas cien veces la actividad de LKB1 (Baas A.F et al, 2003, Hawley et al, 2003).

La reciente cristalización del complejo trimérico ha supuesto un punto de inflexión en los estudios llevados a cabo en los últimos años sobre el mecanismo molecular de interacción entre las tres subunidades. Previamente se había descrito que STRAD α se une directamente al dominio quinasa de LKB1 a través de su dominio pseudoquinasa, formando un dímero LKB1/STRAD imprescindible para la funcionalidad de LKB1 (el *knockdown* de STRAD α inhibe la habilidad de LKB1 de arrestar el crecimiento celular; Baas A.F et al, 2003). Por su parte, también

se conocía la importancia de los tres últimos residuos de STRAD (motivo WEF, Trp-Glu-Phe) para unir MO25; esta interacción induce la estabilización del dímero LKB1/STRAD, de acuerdo con estudios de *knockdown* de MO25 que reducían de manera significativa la cantidad de STRAD α endógena asociada a LKB1 (Boudeau et al, 2003a). Los análisis cristalográficos

Caja I.3 Pseudoquinasas: ¿vestigios de la evolución? Casi una cincuenta de las quinasas codificadas en el genoma humano (10% del quinoma) poseen mutaciones en los motivos necesarios para la catálisis, por lo que se han denominado pseudoquinasas. Asumiendo la incapacidad de fosforilación, sus funciones biológicas han sido un misterio, considerándose hasta bien poco como meros vestigios de la evolución. Sin embargo, estudios recientes han otorgado a ciertas pseudoquinasas funciones muy relevantes en la transducción de señales, a través de la aglutinación de varios componentes de redes de señalización o actuando de activadores alostéricos de proteínas quinasas activas. Es el caso por ejemplo de STRAD activando a LKB1, de HER3 formando parte del heterodímero activo o de KSR aglutinando los componentes de la cascada de señalización de las MAP quinasas y probablemente actuando de activador alostérico de RAF.

Otras pseudoquinasas, a pesar de no tener un dominio catalítico funcional, son capaces de fosforilar en mayor o menor grado sus sustratos debido a colaboraciones de residuos clave en otros dominios de la proteína; es el caso bien documentado de WNK, que fosforila y activa a las quinasas SPAK y OSR1 a pesar de la pérdida de Lys invariable del subdominio II. Se plantea entonces si algunas de estas quinasas clasificadas como pseudoquinasas son realmente quinasas inactivas o quinasas activas “inusuales”. En este sentido, Zeqiraj *et al* hacen una revisión de los casos más destacados y proponen una nueva subclasificación de las pseudoquinasas en 5 grupos diferenciados (Zeqiraj & van Aalten, 2010).

Con todo ello, los resultados derivados del estudio de este grupo de quinasas está suscitado un gran interés. Su incipiente implicación en varios eventos de transducción de señales sitúa a las pseudoquinasas en procesos fundamentales para la célula. Y, sin duda habrá que indagar en el futuro su participación en mecanismos anómalos de señalización asociados a enfermedades (Boudeau et al, 2006; Kornev & Taylor, 2009; Zeqiraj & van Aalten, 2010; Kiss-Toth, 2011).

concluyen que interacciones cooperativas con ATP y MO25 fuerzan a STRAD α a adoptar una conformación cerrada típica de quinasas activas que le permite unir a LKB1 como pseudosustrato (**figura I.3**); esta unión promueve la conformación activa de LKB1, estabilizada finalmente por interacciones adicionales entre MO25 y el *activation loop* de LKB1. Mutantes de STRAD incapaces de unir ATP y MO25, con predicción de adoptar una conformación abierta inactiva, son incapaces de activar LKB1 (Zeqiraj et al, 2009a; Zeqiraj et al, 2009b). Con la resolución cristalográfica del complejo LKB1/STRAD/MO25 se describe por tanto un nuevo mecanismo alostérico de activación de quinasas independiente de fosforilación, mediado por la conformación activa de una pseudoquinasa más que por la propia actividad quinasa. Este nuevo mecanismo será relevante para entender la evolución de otras pseudoquinasas, cuyas funciones emergentes se empiezan ahora a describir (**caja I.3**).

Además de interaccionar con STRAD y MO25, una población importante de LKB1 se asocia de manera excluyente con la

chaperona *heat shock protein 90* (Hsp90) y la co-chaperona Cdc37 (Boudeau et al, 2003b; Nony et al, 2003). Recientemente se ha observado que este complejo Hsp90/Cdc37 no solo regula la estabilidad de LKB1 sino que también regula su actividad. Así, LKB1 se asocia a Hsp90/Cdc37 por su extremo N-terminal formando un complejo heterotrimérico que por un lado mantiene a LKB1 inactiva y por otro la previene de su degradación (Gaude et al, 2011).

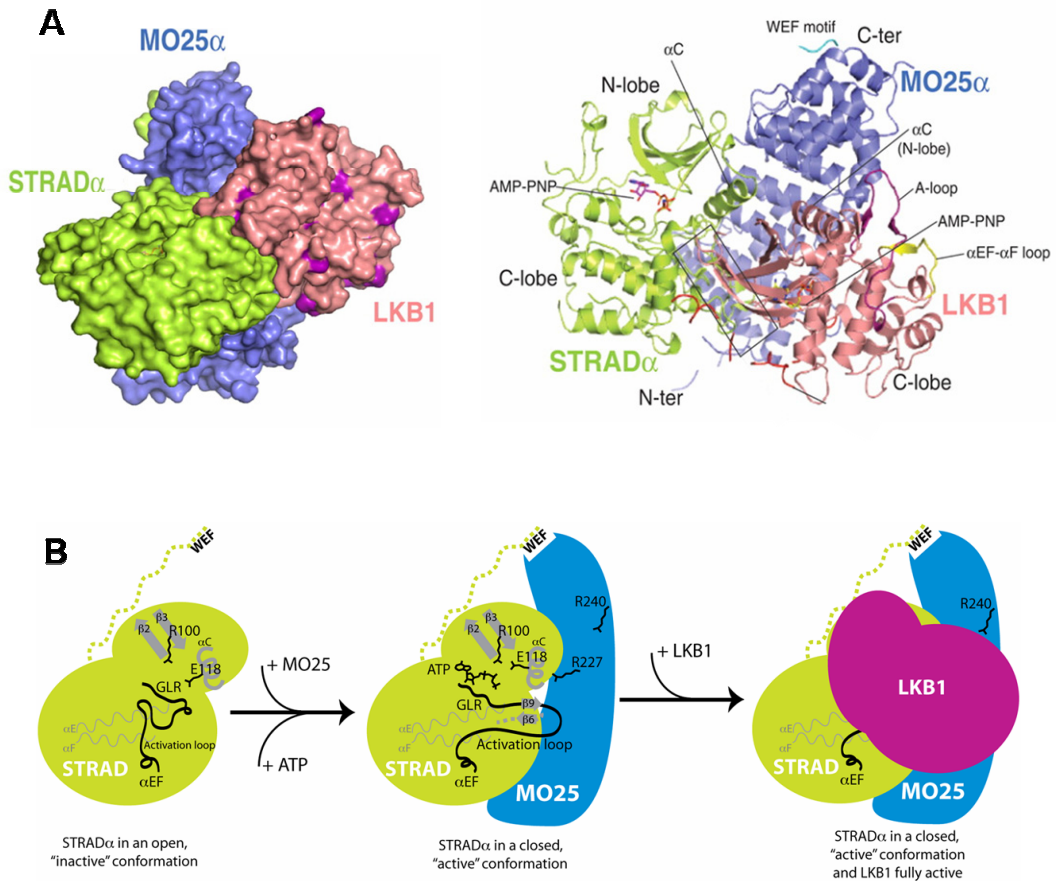


Figura 1.3 Estructura del complejo LKB1/STRAD/MO25 y modelo de activación de LKB1. (A)

Izquierda, mapa de superficie del complejo heterotrimérico LKB1/STRAD/MO25. Derecha, representación de la estructura tridimensional del complejo heterotrimérico unida a dos moléculas del análogo de ATP adenil-5'-il imidodifosfato (AMP-PNP), una acomplejada a LKB1 y la otra a STRAD. Verde, STRAD; azul, MO25; magenta LKB1. En STRAD se marcan sus dos lóbulos en C y N-terminal (C & N-lobe); se localizan la hélice α (α C) y el motivo WEF implicados en su unión a MO25 y el dominio α EF- α F *loop* implicado en la unión al pseudosustrato LKB1. En MO25 se marcan sus extremos N y C-terminal. En LKB1 se localiza la hélice α (α C) que rota hacia la conformación cerrada activa, y su *loop* de activación A-loop. Imágenes modificadas de Zeqiraj *et al*, 2009a. **(B)** Modelo de activación de LKB1 basado en datos estructurales y de mutagénesis conocidos. La unión de ATP y/o MO25 a STRAD induce a STRAD a adoptar una conformación cerrada análoga a la de las quinasas activas, que conduce a la formación de un complejo LKB1 plenamente activo. Verde, STRAD; azul, MO25; magenta LKB1. Representación extraída de Zeqiraj *et al*, 2009b.

I.2.4 LKB1: proteína supresora de tumores que regula el crecimiento y la polaridad celular.

La inactivación de LKB1 en los pacientes de PJS y la elevada predisposición de estos a padecer cáncer sugiere que esta quinasa funciona como una proteína supresora de tumores. Las evidencias experimentales se obtuvieron mediante estudios de sobre-expresión de LKB1 y el análisis de los ratones *knockout* para LKB1. La sobre-expresión de LKB1 salvaje en líneas celulares que carecen de LKB endógena (HeLa y G361) provoca el arresto del ciclo celular en fase G1, mientras que la sobre-expresión de mutantes inactivos de LKB1 (aislados de pacientes de PJS) es incapaz de inhibir el crecimiento celular (Tiainen et al, 1999). Así, la actividad intrínseca Ser/Thr quinasa de LKB1 se requiere para bloquear la división celular.

La disrupción de ambos alelos de LKB1 (ratón *knockout LKB1^{-/-}*) conlleva letalidad embrionaria a mitad de gestación (E11), lo que indica que LKB1 juega un papel importante en el desarrollo embrionario del ratón. Los embriones *LKB1^{-/-}* empiezan a presentar múltiples anomalías en el desarrollo a partir del día E8, como defectos en el cierre del tubo neural, desarrollo anormal de la aorta e hipoplasia del primer arco branquial; también se observan alteraciones severas del desarrollo extraembrionario como defectos en la formación de la placenta (Ylikorkala et al, 2001; Jishage et al, 2002). Estos embriones presentan entre el día E8 y E9.5 niveles elevados del mRNA del factor de crecimiento vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), por lo que LKB1 regula negativamente la producción de VEGF y el desarrollo vascular.

El ratón heterocigoto *LKB1^{+/-}* es viable y no presenta ningún fenotipo obvio ni en el nacimiento ni en la primera etapa de la edad adulta. Ahora bien, la mayoría de ratones *LKB1^{+/-}* desarrollan pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal hacia la edad de 45 semanas, histológicamente muy similares a los encontrados en pacientes de PJS. Los estudios genéticos y de inmunoreactividad de estos pólipos muestran que en muchos de ellos se requiere la pérdida total de la expresión de LKB1 como precondition al desarrollo de los hamartomas, ya sea por pérdida del alelo salvaje o por inactivación epigenética (Miyoshi et al, 2002; Jishage et al, 2002; Rossi et al, 2002; Bardeesy et al, 2002). De manera paralela a la evolución clínica de los pacientes de PJS, un número significativo de ratones *LKB1^{+/-}* desarrollan hepatocarcinomas hacia la edad de 50 semanas, en los que se requiere también la pérdida completa de LKB1 (Nakau et al, 2002).

Cómo LKB1 es capaz de ejercer la función de proteína supresora de tumores sigue siendo una cuestión candente hoy en día; fruto de su intenso estudio en la última década toma forma una nueva visión global en la que a través de LKB1 se relaciona de manera muy estrecha la

regulación del metabolismo con el control del crecimiento y la polaridad celular. En los estudios iniciales quedó patente que LKB1 ejerce en parte su función supresora de tumores mediante la regulación de la polaridad celular; de hecho, su homólogo en *C. elegans* (Par-4) fue descrito precisamente como miembro de la familia génica de expresión materna Par, imprescindible para el establecimiento de la polaridad celular durante el primer ciclo de la embriogénesis del gusano (Kemphues et al, 1988; Watts et al, 2000). También el homólogo en *Drosophila* es imprescindible para la correcta formación del eje antero-posterior (Martin & Johnston, 2003). De forma análoga, existen en mamíferos evidencias claras de que un papel importante de LKB1 reside en el control de la polaridad celular. Por un lado, la activación de LKB1 en células epiteliales del intestino no polarizadas provoca su dramática re-polarización (Baas A.F et al, 2004); en este sentido, la aparición de hamartomas gastrointestinales en pacientes de PJS podría deberse a un crecimiento descontrolado de células diferenciadas que han perdido la capacidad de regular su polaridad por inactivación de LKB1. Otros tipos celulares que requieren un elevado grado de polarización para mantener la viabilidad y funcionalidad celular, están regidos también por la acción de LKB1; un caso muy representativo es la regulación de la polaridad en neuronas, donde la quinasa y su principal efector en cerebro (las BRSKs) definen una nueva vía de señalización imprescindible para la correcta formación y mantenimiento del eje axón-dendrita (esta vía se desglosa ampliamente en el próximo apartado). También resulta interesante la reciente implicación de una variante de *splicing* de LKB1 en el proceso de espermatogénesis, posiblemente junto con la diferenciación neuronal el otro ejemplo más dramático de polarización celular: los ratones que carecen de LKB1 en testículos son estériles, y los pocos espermatozoides maduros que producen son inmóviles y presentan una morfología gravemente anormal de la cabeza (es más grande y redondeada, con falta de la típica forma en gancho que proporciona el acrosoma en espermias de ratones salvajes) (Towler et al, 2008; comentado en Shaw R., 2008).

1.2.5 LKB1: quinasa máster.

En el año 2003, los laboratorios de Dario Alessi y Grahame Hardie en Escocia demostraron que LKB1 es suficiente y necesaria para activar a la quinasa dependiente de AMP (AMP quinasa, AMPK) (Hawley et al, 2003). La AMPK es una proteína quinasa que funciona como el principal regulador del metabolismo energético celular, activándose cuando la ratio ATP/AMP disminuye como consecuencia de un estrés celular. AMPK se encarga entonces de restaurar la carga energética a través de la estimulación de vías catabólicas (como el transporte de glucosa, glucólisis y oxidación de ácidos grasos), así como la inhibición de vías anabólicas consumidoras de energía (como la síntesis proteica). Estructuralmente, AMPK es un heterotrímero formado por

una subunidad catalítica (AMPK α), una subunidad *scaffolding* (AMPK β) y una subunidad reguladora (AMPK γ). Bajo condiciones de estrés energético (como situaciones de privación de nutrientes o hipoxia), la unión de AMP a AMPK γ induce un cambio conformacional que permite la fosforilación por LKB1 de la Thr172 contenida en el T-loop del dominio quinasa en la subunidad AMPK α . Esta fosforilación provoca la activación de AMPK, que mediante la fosforilación de diferentes sustratos orquesta la regulación del metabolismo celular con la finalidad de restablecer los niveles energéticos (Hardie G., 2005). La implicación de una proteína supresora de tumores (LKB1) en la activación de AMPK, respalda la importancia de la regulación del metabolismo en el desarrollo tumoral (donde la elevada tasa de división celular solo puede soportarse si la célula posee suficientes recursos metabólicos) (Shackelford & Shaw, 2009; van Veelen et al, 2011). De hecho, se está revisando cómo la manipulación terapéutica de la vía de AMPK en el tratamiento de trastornos metabólicos como la diabetes afecta al desarrollo tumoral. Recientemente se han realizado varias revisiones clínicas que aportan pruebas que el uso de metformina (el fármaco más administrado en pacientes con diabetes tipo II), podría estar asociado a una disminución en la incidencia y una mejor prognosis de ciertos cánceres (Currie et al, 2009; Libby et al, 2009; Bodmer et al, 2010; Landman et al, 2010). Ello explica que actualmente haya varios ensayos clínicos en curso que incorporan la metformina como adyuvante a la quimioterapia clásica en el tratamiento contra el cáncer (Kourelis & Siegel, 2011).

Un año más tarde del descubrimiento de la activación de AMPK por LKB1, se describió que LKB1 de hecho fosforila y activa a otras 12 quinastas de la subfamilia de la AMPK (Lizcano et al, 2004). Estos autores, tras observar que la secuencia del *activation loop* (T-loop) fosforilada por LKB1 en AMPK está altamente conservada en otras proteínas relacionadas evolutivamente con ella (quinastas que forman la subfamilia *AMPK-related kinases*), demostraron que el complejo LKB1/STRAD/MO25 es un complejo máster *upstream* que actúa fosforilando y activando a 14 de los miembros de esta subfamilia de quinastas (**figura I.4A**). Apenas se conoce la función y regulación de estas nuevas quinastas (**tabla I.2**). Sin embargo, se piensa que albergan el mecanismo a través del cual LKB1 regula el crecimiento y la polaridad celular (**figura I.4B**) (Alessi et al, 2006; Bright et al, 2009). Cabe destacar que entre los miembros de las *AMPK-related kinases* se encuentran las isoformas de MARK (*Microtubule Affinity-Regulating Kinases*) y de BRSK (*Brain-specific kinases*), relacionadas ambas con mecanismos involucrados en establecer y mantener la polaridad celular. Precisamente describir y comprender la función y regulación de las BRSKs es el objetivo de este trabajo.

AMPK-related kinase	Descripción
BRSK1 (SAD-A) BRSK2 (SAD-B)	Quinasas expresadas específicamente en cerebro cuya función es imprescindible para el correcto establecimiento de la polaridad neuronal. Además de la diferenciación neuronal, regulan la sinaptogénesis y liberación de neurotransmisores.
NUAK1 (ARK5) NUAK2 (SNARK)	Expresadas mayoritariamente en cerebro y corazón, su actividad se incrementa en situaciones de privación de glucosa. Propuestas como factores tumorales implicados en supervivencia celular: la sobre-expresión de NUAK1 suprime la apoptosis inducida por ciertos estímulos (incluida la privación de nutrientes), y se ha propuesto también como regulador de la actividad Caspasa-6. A su vez, la expresión de NUAK2 está sobre-activada en líneas celulares tumorales resistentes a apoptosis. Ratones deficientes en NUAK2 son obesos y presentan varios desórdenes metabólicos, por lo que también se ha involucrado a esta quinasa en la regulación del metabolismo celular. Sólo se ha descrito un sustrato <i>in vitro</i> de NUAK2 (la subunidad reguladora de la fosfatasa de miosina MYPT1), aunque resta por validar su significado fisiológico.
SIK (SIK1)	Quinasa involucrada en la respuesta a estrés nutricional. Clonada a partir de glándulas adrenales de rata sometidas a una dieta rica en sales. Su mRNA se induce por despolarización de la membrana en el cerebro. Se cree importante en la regulación de la expresión génica durante la fase temprana de la estimulación por ACTH: fosforila a TORC2 estimulando su exportación nuclear e inhibiendo por tanto la actividad de CREB. Se activa también en respuesta a incrementos en los niveles de sodio intracelular.
QIK (SIK2)	Expresada en todos los tejidos pero en mayor grado en el tejido adiposo. QIK fosforila el sustrato del receptor de insulina-1 (IR1) en el mismo residuo que lo hace AMPK, modulando así la eficiencia de la transducción de señales de la vía de insulina. Presenta una elevada expresión en adipocitos de ratones diabéticos, donde participa en los mecanismos que confieren la resistencia a insulina. Al igual que SIK, también fosforila al co-activador de CREB TORC2 en células no estimuladas, para secuestrarlo en el citoplasma, inhibiendo así la expresión génica dependiente de CREB.
QSK (SIK3)	El knock-down de QSK en células de <i>Drosophila</i> resulta en un conjunto de defectos mitóticos, incluidas anomalías en el huso y el alineamiento de los cromosomas.
MARK1, MARK2, MARK3 y MARK4	Las isoformas de MARK son los enzimas más estudiados y mejor caracterizados de la subfamilia de AMPK. Regulan el desarrollo de la polaridad antero-posterior de la célula en el estadio embrionario de una sola célula de <i>C. elegans</i> y <i>Drosophila</i> . También controlan la gastrulación en <i>Xenopus</i> . En mamíferos las MARKs fosforilan Tau, marcándola para ser hiperfosforilada por las quinasas GSK3 i Cdk5, un evento que induce la agregación de Tau formando filamentos y <i>tangles</i> característicos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.
SNRK	El mRNA de SNRK se induce tres veces cuando las neuronas granulares se cultivan en condiciones de bajo K ⁺ . Juega un papel en la regulación de las respuestas implicadas en la supervivencia de estas células. Posee también una elevada expresión en testis.

Tabla I.2 Miembros de la subfamilia de la AMPK (AMPK-related kinases) y función asociada. BRSK1/2, Brain-specific Kinases 1/2; NUAK1/2; SIK, Salt-induced Kinase; QIK, Qin-induced Kinase; QSK; MARK1-4, Microtubule Affinity-Regulating Kinase 1-4; SNRK, Sucrose Non-fermenting Related Kinase.

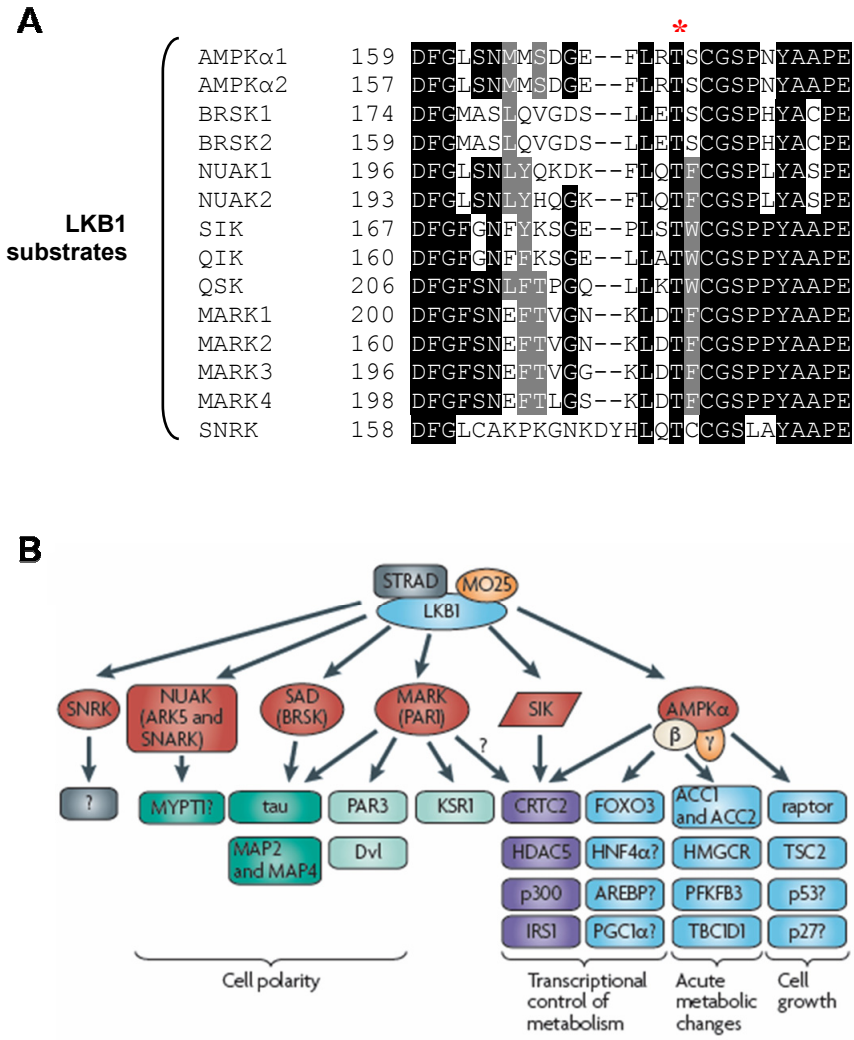


Figura 1.4 Activación de las AMPK-related kinases y señalización dependiente de LKB1. (A) Alineamiento múltiple de las secuencias del T-loop de las AMPK-related Kinases. El residuo de Thr conservado fosforilado por LKB1 se señala con asterisco. La sobra negra indica residuos idénticos, y la gris residuos conservados. (B) El complejo LKB1/STRAD/MO25 directamente fosforila y activa a 14 de los miembros de las AMPK-related Kinases, que a su vez fosforilan varios sustratos para mediar los efectos en la polaridad celular, metabolismo y control del crecimiento. Figura modificada de Shackelford & Shaw, 2009.

I.3 Brain-specific kinases 1 y 2 (BRSK1 y BRSK2).

I.3.1 Evolución y estructura de las BRSKs.

Las *Brain-specific kinase 1 y 2* (BRSK1 y BRSK2), también conocidas como SAD-B y SAD-A respectivamente, son dos serin/treonin-quinásas de mamíferos que pertenecen a la subfamilia de las *AMPK-related kinases*. Son proteínas muy conservadas evolutivamente, y existen ortólogos en *C. elegans* (SAD-1), *Drosophila* (CG6114) y ascidias (HrPOPK-1), este último algo más distante (**figura I.5A**). Como la mayoría de las *AMPK-related kinases* que son activadas por LKB1, las BRSKs poseen un dominio quinasa muy cercano al extremo N-terminal seguido inmediatamente de un dominio de unión a ubiquitina (*ubiquitin-associated domain*, *UBA domain*). No existen dominios funcionales en el resto de la proteína, aunque todos los homólogos de BRSKs comparten un bloque único de unos 165 aminoácidos muy cercano al extremo C-terminal (*short conserved region*, *SCR*) (Crump et al, 2001) (**figura I.5B**).

Las dos isoformas de BRSKs de mamíferos poseen una elevada similitud de secuencia (78%), y divergen exclusivamente en el extremo C-terminal, ya que el dominio quinasa en N-terminal de las dos isoformas es prácticamente idéntico (94% de identidad). En humanos, BRSK1 contiene 778 aminoácidos y BRSK2 674, con un peso molecular de 85 y 75 kDa respectivamente. El análisis de *western* y *northern blot*, muestra que la expresión de ambas isoformas se restringe al cerebro, aunque muy pobremente también se detecta expresión en testículos y páncreas (Kishi et al, 2005; Inoue et al, 2006).

I.3.2 Regulación de las BRSKs.

En 2004, Lizcano *et al* demostraron que el complejo LKB1/STRAD/MO25 activa las BRSKs de forma análoga a como activa AMPK, mediante la fosforilación de la treonina conservada del T-loop en las *AMPK-related kinases* (Thr189 y Thr174 de BRSK1 y BRSK2 respectivamente). A parte de esta activación, poco más se sabe de la regulación de las BRSKs. Los activadores conocidos de AMPK como AICAR, fenformina o incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular no resultan en la activación del resto de las *AMPK-related kinases* (Lizcano et al 2004; Sakamoto et al, 2004). En este mismo sentido, las subunidades reguladoras de AMPK (AMPK β y AMPK γ) no interaccionan con las BRSKs, lo que explica su insensibilidad hacia las variaciones en las concentraciones de AMP, y por tanto su desvinculación de la regulación del metabolismo energético celular (Al-Hakim et al, 2005).

A

```

hBRISK1 1 -----MSSGKKEGGGGSPAYHLPHPHPPHQAQVGVGYPYRLEKTLGKGQGTGLVKLVGVHCITGCKVAIKIVNREKLSVESVLMK
hBRISK2 1 -----MTSTKDKDG-----AQAQVGVGYPYRLEKTLGKGQGTGLVKLVGVHCITCCKVAIKIVNREKLSVESVLMK
CG6114 1 -----MCKENNVAFAENCQVGVGYPYRLEKTLGKGQGTGLVKLVGVHCITGCKVAIKIVNREKLSVESVLMK
HrPOPK-1 1 -----MSNAFQPEVGVGYPYRLEKTLGKGQGTGLVKLVGVHCITGCKVAIKIVNREKLSVESVLMK
SAD-1 1 MFPEALKEVLGEINSLKLAIVNNELSSKIMSENIIVSTRFVQAQVCGVGVGYPYRLEKTLGKGQGTGLVKLVGVHCITGCKVAIKIVNREKLSVESVLMK

hBRISK1 78 VEREIAIKLIEHPHVLALHDVYENKKYLYLLEHVSGGELFDYLVKKGRLTPKEARKFFRQIISALDFCHSYSICHRDLKPENLLLDEK
hBRISK2 63 VEREIAIKLIEHPHVLALHDVYENKKYLYLLEHVSGGELFDYLVKKGRLTPKEARKFFRQIISALDFCHSHSICHRDLKPENLLLDEK
CG6114 62 VEREIAIMKLIHPHVLALHDVYENKKYLYLLEHVSGGELFDYLVKKGRLTPKEARKFFRQIISALDFCHSHSICHRDLKPENLLLDEK
HrPOPK-1 58 VEREIAIMKLIHPHVLALHDVYENKKYLYLLEHVSGGELFDYLVKKGRLTPKEARKFFRQIISALDFCHSHSICHRDLKPENLLLDEK
SAD-1 91 VEREIAIMKLIHPHVLALHDVYENKKYLYLLEHVSGGELFDYLVKKGRLTPKEARKFFRQIISALDFCHSHSICHRDLKPENLLLDEK

hBRISK1 168 NNIIADFGMASLQVDSLLETSCGSPHYACPEVIIRGEKYDGRKADVWVSCGVILFALLVGLPFDDDLNRQLLEKVKRGVGFHPHFVPPD
hBRISK2 153 NNIIADFGMASLQVDSLLETSCGSPHYACPEVIIRGEKYDGRKADVWVSCGVILFALLVGLPFDDDLNRQLLEKVKRGVGFHPHFVPPD
CG6114 152 NNIIADFGMASLQVDSLLETSCGSPHYACPEVIIRGEKYDGRKADVWVSCGVILFALLVGLPFDDDLNRQLLEKVKRGVGFHPHFVPPD
HrPOPK-1 148 NNIIADFGMASLQVDSLLETSCGSPHYACPEVIIRGEKYDGRKADVWVSCGVILFALLVGLPFDDDLNRQLLEKVKRGVGFHPHFVPPD
SAD-1 181 NNIIADFGMASLQVDSLLETSCGSPHYACPEVIIRGEKYDGRKADVWVSCGVILFALLVGLPFDDDLNRQLLEKVKRGVGFHPHFVPPD

hBRISK1 258 CQSLLRGMIEVNEPFRLLSLEQVLRKHPHYLGGKHEPPLCELPAGRR--VAMSLPISNCEDPDVLDSMHSGLGCFNDNKLKLLSSEEN
hBRISK2 243 CQSLLRGMIEVNEPFRLLSLEQVLRKHPHYLGGKHEPPLCELPAGRR--VQIISLPISLDDDPDVLDSMHSGLGCFNDNKLKLLSSEEN
CG6114 242 CQSLLRGMIEVNEPFRLLSLEQVLRKHPHYLGGKHEPPLCELPAGRR--VQIISLPISLDDDPDVLDSMHSGLGCFNDNKLKLLSSEEN
HrPOPK-1 238 ANLLRGMIEVNEPFRLLSLEQVLRKHPHYLGGKHEPPLCELPAGRR--VQIISLPISLDDDPDVLDSMHSGLGCFNDNKLKLLSSEEN
SAD-1 271 VQSLLRGMIEVNEPFRLLSLEQVLRKHPHYLGGKHEPPLCELPAGRR--VQIISLPISLDDDPDVLDSMHSGLGCFNDNKLKLLSSEEN

hBRISK1 346 QKMIYLLLLDRKRRYPSCEDEDLPPR-----NDVPPRKRVDSPMIS-----RQKRRPFR
hBRISK2 329 QKMIYFLLLRKRRYPSCEDEDLPPR-----NEIDPPRKRVDSPMIN-----RQKRRPFR
CG6114 329 TEKIYFLLLRKRRYPSCEDEDLPPR-----NDVPPRKRVDSPMIS-----RQKRRPFR
HrPOPK-1 328 TEKIYFLLLRKRRYPSCEDEDLPPR-----CKHPAPRKRVDSPMIS-----RQKRRPFR
SAD-1 358 TEKIYFLLLRKRRYPSCEDEDLPPR-----NDVPPRKRVDSPMIS-----RQKRRPFR

hBRISK1 398 KSMEVLSITDAGGGSPVETRRALMAQHSOR-----SRSVSCASTGLSSPLSSPRSPVFSFSPPEGADREARGGGSPS
hBRISK2 381 KSMEVLSITDAGGGSPVETRRALMAQHSOR-----SRSVSCASTGLSSPLSSPRSPVFSFSPPEGADREARGGGSPS
CG6114 419 VSSVRSYHSPRRCNSPMSAQOANALSRPSSPAAGTRHSTYGDRLRSCCHSSVSRTPSHSSQKSIEGDVVVVREPRERRDLSRQE
HrPOPK-1 384 IPQRKSAESLCLDSSSPLSRKKTETHOR-----SQSLTCESSSR-----SRSVSCASTGLSSPLSSPRSPVFSFSPPEGADREARGGGSPS
SAD-1 425 RQKSGRHSITDAGGGSPVETRRALMAQHSOR-----SRSVSCASTGLSSPLSSPRSPVFSFSPPEGADREARGGGSPS

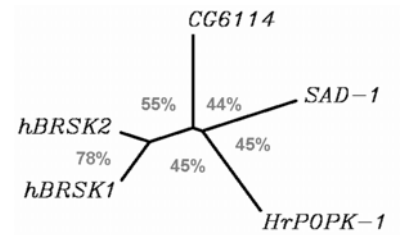
hBRISK1 474 TQTLPSRGRPGGGAGEQPPPPSARSPLPGLPPGSPRSSGGPLHSLPLHTPRASPTGPIG-----TTPPSPGGGVCAGARRRLN
hBRISK2 430 TQTLPSRGRPGGGAGEQPPPPSARSPLPGLPPGSPRSSGGPLHSLPLHTPRASPTGPIG-----TTPPSPGGGVCAGARRRLN
CG6114 509 RGGGSPRDRGDCGIPGSPGSSGSSASPSVHHRANSGLTIAISMFDDPSNSVVPNPGSPMNNSSPMPGSPCNTPGGOLMARRLT
HrPOPK-1 427 TQTLPSRGRPGGGAGEQPPPPSARSPLPGLPPGSPRSSGGPLHSLPLHTPRASPTGPIG-----TTPPSPGGGVCAGARRRLN
SAD-1 509 RDSGRSSRKEKDRSDKSASSSCKNDASSSTSSPHKYSPSPVMSSESVVSSSMNNTN--SSTNSLIAGNSQTSIGSTSGPWRRLN

hBRISK1 555 STNSFLGSPRFHRRKMQVPTA-EINSSLTPESSPELAKRSWFGNFISSLR-----EEQIFVVKDKPLSSIKADIVHAFLSIPSLSH
hBRISK2 481 STNSFLGSPRFHRRKMQVPTA-EINSSLTPESSPELAKRSWFGNFISSLR-----EEQIFVVKDKPLSSIKADIVHAFLSIPSLSH
CG6114 599 NIKNSFLGSPRFHRRKMQVPTA-EINSSLTPESSPELAKRSWFGNFISSLR-----EEQIFVVKDKPLSSIKADIVHAFLSIPSLSH
HrPOPK-1 478 STNSFLGSPRFHRRKMQVPTA-EINSSLTPESSPELAKRSWFGNFISSLR-----EEQIFVVKDKPLSSIKADIVHAFLSIPSLSH
SAD-1 596 NIKNSFLGSPRFHRRKMQVPTA-EINSSLTPESSPELAKRSWFGNFISSLR-----EEQIFVVKDKPLSSIKADIVHAFLSIPSLSH

hBRISK1 637 SVSOTSFRAYKAKG---GEAVFQVVKFQVDDIYEGGLAQKEN-----EYVVTFTLLSGSRRFRKRVVETIQAOQLSSTHDQ--
hBRISK2 563 SVSOTSFRAYKAKG---GEAVFQVVKFQVDDIYEGGLAQKEN-----EYVVTFTLLSGSRRFRKRVVETIQAOQLSSTHDQ--
CG6114 679 SVSOTSFRAYKAKG---GEAVFQVVKFQVDDIYEGGLAQKEN-----EYVVTFTLLSGSRRFRKRVVETIQAOQLSSTHDQ--
HrPOPK-1 566 SVSOTSFRAYKAKG---GEAVFQVVKFQVDDIYEGGLAQKEN-----EYVVTFTLLSGSRRFRKRVVETIQAOQLSSTHDQ--
SAD-1 682 SVSOTSFRAYKAKG---GEAVFQVVKFQVDDIYEGGLAQKEN-----EYVVTFTLLSGSRRFRKRVVETIQAOQLSSTHDQ--

hBRISK1 720 -----PSVQALADEKNGAOTRPAGAPRSIOPPPGRPDPPLSSSPRRGPPDKKLLLATNGTPLP-----
hBRISK2 640 -----PAAQHSDTINCMMEMTGRLSKCCGIPKS-----
CG6114 758 SSPP-----TVTSVQAVSESSCCSVSSERLSYKROVIENDMENDSIFSYKSGNGRFASTNNNNAMVVDIPGSPIAVRNSNE
HrPOPK-1 649 -----IVAAQONKTSCEPFAFSHEIQCKTVNNLHODNSMAMAINNPNKSKVK-----
SAD-1 764 DRQQQAALMVRPRRLSDSSVGSACSDSESNASSINMIARSHDKTETTSATSSDPYGPSPSMRVSSTGTSANSYKSETPHRRNTTAVTASS

hBRISK1 -----
hBRISK2 -----
CG6114 837 TAEHERNRELQSERQATMSGSAIA-----
HrPOPK-1 -----
SAD-1 854 SASNRYGPSSSSSGYSNNADYSYHPEYSQRSNGSSAPKNQYSPGQRSFAFMSFKNADKV
    
```



B

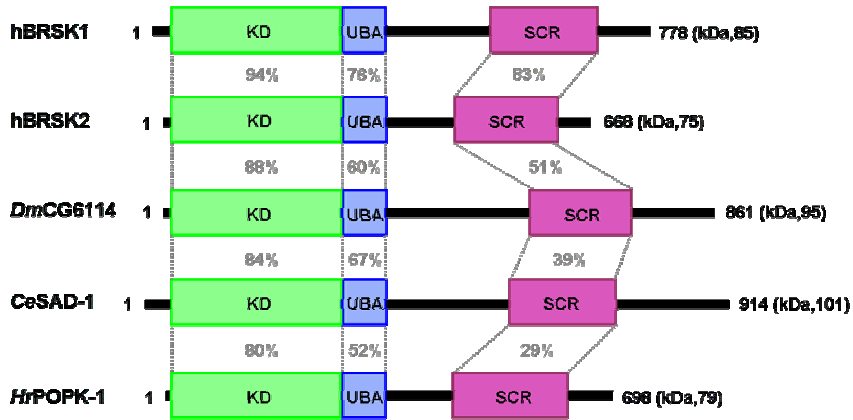


Figura I.5 Evolución y estructura molecular de las BRSKs. (A) Alineamiento múltiple de las secuencias de las isoformas BRSK1 y BRSK2 humanas y sus ortólogos en *Drosophila* (CG6114), *C. elegans* (SAD-1) y *H. roretzi* (HrPOPK-1). La sombra negra indica residuos idénticos, y la gris residuos conservados. En verde se resalta la secuencia que forma el dominio quinasa, en azul el dominio de unión a ubiquitina (UBA-domain) y en magenta la región conservada en C-terminal (*short conserved region*, SCR). En la parte inferior se muestra el dendrograma enraizado de las 5 quinastas con el porcentaje de homología entre ellas. (B) Representación esquemática de la comparación de las estructuras moleculares entre las BRSKs y sus ortólogos en mosca, gusano y ascidia. Se usa el mismo patrón de colores que en (A) para indicar el dominio quinasa (*Kinase Domain*, KD), el dominio de unión a ubiquitina (UBA) y la región conservada en C-terminal (SRC). Los números en gris muestran el porcentaje de identidad en aminoácidos de cada región entre las diferentes formas homólogas.

Por tanto, la regulación de las BRSKs no tiene nada que ver con la regulación de AMPK. A diferencia de esta, la expresión restrictiva de las BRSKs en el cerebro, y que fosforilen *in vitro* el mismo set de péptidos sustrato que AMPK pero con una *ratio* significativamente diferente (Lizcano et al, 2004), sugiere que estas enzimas tienen distintas preferencias de sustrato (que a su vez sugieren distintos mecanismos de regulación). Es importante pues definir los estímulos fisiológicos aun no descritos que regulan las BRSKs, así como identificar los sustratos fisiológicamente relevantes que fosforilan. Aun con todo, en los últimos años se han propuesto ciertos mecanismos de regulación de las BRSKs que implican desde fosforilaciones por quinastas *upstream* (a parte de LKB1) hasta interacciones con otras proteínas. Aunque es motivo de controversia, estas modificaciones estarían implicadas en facilitar o comprometer la habilidad de LKB1 de fosforilar a las BRSKs, más que mediar ellas *per se* directamente en su activación.

Regulación de las BRSKs por quinasas *upstream*: ¿algo más allá de LKB1?

A día de hoy, la única regulación asumida de las BRSKs por quinasas *upstream* es la que ejerce LKB1 a través de la fosforilación de la treonina del T-loop. La evidencia genética de esta regulación la proporcionan neuronas corticales de ratón *knockout* condicional para LKB1. Este ratón (con defectos en la polaridad neuronal muy similares al del doble *knockout* para BRSKs) presenta una reducción drástica de la fosforilación de las BRSKs en el T-loop, lo que resulta en la inactivación de estas quinasas en ausencia de LKB1 (Barnes et al, 2007). Esto no descarta que otras quinasas en el córtex sean capaces de fosforilar las BRSKs, aunque los resultados demuestran sin duda que mediante la fosforilación del T-loop, LKB1 es la principal activadora de las BRSKs al menos en el córtex neonatal (que ha sido también uno de nuestros modelos de trabajo).

Se ha especulado que, alternativamente a LKB1, la quinasa quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKK) activa las BRSKs mediante la fosforilación de la treonina del T-loop, de manera análoga a como lo hace para la AMPK. Está bien documentado que en respuesta a incrementos en los niveles de Ca^{2+} intracelular, las CaMKKs (especialmente la CaMKK β) activan a la AMPK mediante la fosforilación de la Thr172 del *activation loop*, de forma alternativa a LKB1 (Hawley et al, 2005; Hurley et al, 2005; Woods et al, 2005). Mediante cromatografía de afinidad de extractos de cerebro de rata, un trabajo identificó la interacción de CaMKK α con BRSK1, y mostró que las CaMKKs fosforilan *in vitro* a BRSK1 en la treonina del T-loop (Thr189) (Fujimoto et al, 2008). Sin embargo, posteriormente numerosos autores han sido incapaces de detectar un aumento en la actividad de BRSK1 y BRSK2 mediada por CaMKK β , tanto *in vitro* (tras la incubación con la quinasa) como *in vivo* (en células de mamífero que co-expresan CaMKK β) (Fogarty et al, 2010; Bright et al, 2008). Estos estudios muestran una leve activación de BRSK1 por CaMKK α *in vitro* (del orden de tres veces menos que la que proporciona LKB1), aunque fuera necesaria una concentración 20 veces mayor de quinasa en el ensayo para obtener un nivel de fosforilación comparable al de AMPK (que ya de por sí es un mal sustrato de esta isoforma). Con todo, BRSK1 es un pobre sustrato de CaMKK α , y menos aún de CaMKK β , lo que sugiere que las variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular no tendrían efecto fisiológico sobre la regulación de las BRSKs.

Por otra parte, Guo Z. *et al* describieron que la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) podía fosforilar *in vitro* a las BRSKs. Estos autores muestran que PKA fosforila a BRSK2 en la Thr260 *in vitro*, lo que estimula dos veces su actividad (Guo Z. et al, 2006). Esta treonina, situada en el extremo C-terminal del dominio quinasa de BRSK2, no es idéntica en la isoforma BRSK1 ni tampoco en su homólogo en *C. elegans* SAD-1. Con posterioridad se ha observado que, sin

embargo, la activación de la vía de PKA mediante estimulación con forskolina no afecta a la actividad de las BRSKs, ya sea en su forma no-fosforilada inactiva (mutantes T189A, T174A) como en su forma activa salvaje (Bright et al, 2008). De tal manera, hoy en día no solo se ha descartado que la activación de PKA active a BRSK2, sino que además no aumenta su activación por LKB1.

Como cualquier quinasa que es activada por fosforilación, la regulación de la desfosforilación juega un papel importante en determinar el estado de activación de las BRSKs en la célula. No existen evidencias directas de esta regulación, aunque se ha propuesto a la fosfatasa insensible a ácido ocadaico PP2C como candidata a catalizar la desfosforilación *in vitro* de la treonina del T-loop de las BRSKs, promoviendo así su inactivación (Bright et al, 2008).

Regulación de las BRSKs por ubiquitinación.

Las AMPK-related kinases (a excepción de las isoformas de AMPK α y NUAK) son las únicas quinasas del genoma humano que contienen un dominio de unión a ubiquitina (UBA-domain) (Manning et al, 2002a). Los análisis estructurales revelan que, a pesar de no ser un dominio especialmente conservado en cuanto a homología de secuencia, se pliega siempre de manera similar formando un haz compacto de tres hélices α en el que queda expuesta una gran superficie hidrofóbica a través de la cual puede unir ubiquitina (Hicke et al, 2005). Se desconoce la función que ejerce el UBA-domain en la regulación de las BRSKs, en parte debido a la dificultad de mostrar que este dominio une ubiquitina *in vitro*. Sin embargo, hay dos trabajos que aportan datos interesantes. Por un lado, la mutación de la glicina conservada en el UBA-domain de las AMPK-related kinases (Gly343 en BRSK1 y Gly310 en BRSK2) impide la fosforilación y activación por LKB1, lo que sugiere que este dominio regularía la conformación del dominio quinasa y su accesibilidad a LKB1 (Jaleel et al, 2006; Bright et al, 2008). Por otro lado, los análisis de resonancia magnética nuclear del UBA-domain de MARK3 indican que posee una elevada inestabilidad conformacional intrínseca, estando sujeto continuamente a transiciones dinámicas entre el equilibrio de conformación plegada y desplegada. Esto compromete severamente el reconocimiento de ubiquitina por el dominio, lo que explica su débil afinidad por estas pequeñas proteínas. A expensas de unir ubiquitina, el UBA-domain interaccionaría preferentemente con el lóbulo pequeño del dominio quinasa, estabilizándolo en una conformación abierta activa (Murphy et al, 2007). Un año después de este trabajo, se mostró por primera vez que las BRSKs se modifican *in vivo* por cadenas atípicas de poliubiquitina (ubiquitinas unidas entre sí por Lys29 y Lys33) (Al-Hakim et al, 2008). Esta ubiquitinación no controla la estabilidad de la quinasa sino que afecta a su regulación: cuando las BRSKs están poliubiquitinadas, las cadenas de ubiquitina competirían con el dominio quinasa por unirse al

UBA-domain, impidiendo así la interacción dominio-quinasa-/dominio-UBA. Esto conllevaría la desestabilización del dominio quinasa, inhibiendo la fosforilación del T-loop por LKB1 y, por tanto, inactivando las BRSKs (figura I.6).

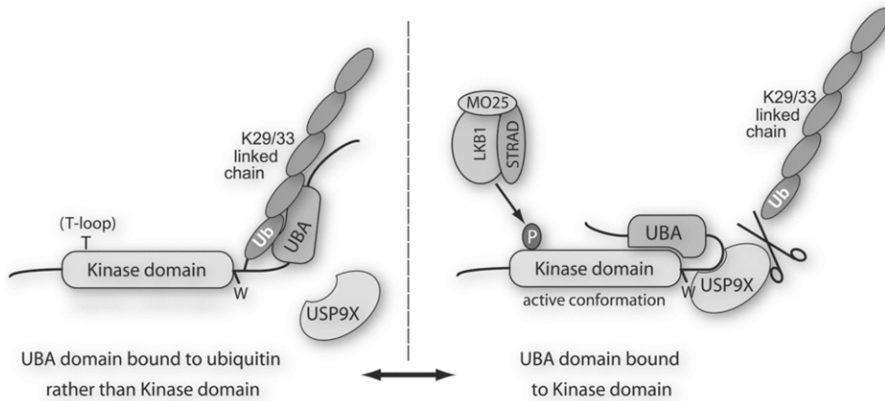


Figura I.6 Modelo de regulación de las AMPK-related kinases por ubiquitinación. Modelo propuesto por Al-Hakim *et al* de regulación de las BRSKs por poliubiquitinación. La enzima USP9X (ubiquitin specific protease-9) cataliza la desubiquitinación de las isoformas NUAK1 y MARK4, con las que además se ha demostrado que interacciona a través del único residuo conservado en el límite C-terminal del dominio quinasa de todas las AMPK-related kinases (Trp305 en NUAK1 y Trp309 en MARK4). Figura extraída de Al-Hakim *et al*, 2008.

Regulación de las BRSKs por interacción con proteínas scaffolding.

Hasta hoy, no se han descrito interacciones con otras proteínas que regulen la actividad o localización de las BRSK; en cambio, su homólogo en *C. elegans* (SAD-1), involucrado en la polaridad neuronal y la sinaptogénesis, interacciona con la proteína scaffolding Neurabin (NAB1). Esta interacción es necesaria para que SAD-1 regule la polaridad neuronal, pero es dispensable para su función en la morfología sináptica (Hung et al, 2007). Ello implica que NAB1 reclutaría a SAD-1 para formar un complejo de señalización involucrado selectivamente en el establecimiento de la polaridad, otorgando así a la quinasa una especificidad de función. Un mecanismo similar podría extrapolarse a las BRSKs de mamíferos, pero no a través de Neurabin (o al menos no involucrando los mismos residuos en la interacción): a pesar de la existencia de dos isoformas de NAB1 en mamíferos localizadas en las sinapsis de neuronas maduras (Neurabin y Spinophilin), los tres últimos aminoácidos de SAD-1 responsables de la interacción con NAB1 están ausentes en las BRSKs.

Mediante el uso de la técnica *tandem affinity purification* (TAP) en células HEK-293, Al-Hakim *et al* realizaron un extensivo estudio con la finalidad de identificar proteínas que interaccionan con cada una de las *AMPK-related kinases*. Este trabajo no mostró ningún *partner* para las BRSKs, pero sin embargo detectó que varias *AMPK-related kinases* interaccionan con la proteína *scaffolding* 14-3-3, que se une directamente al residuo de treonina del T-loop una vez fosforilado por LKB1. La unión de 14-3-3 a las quinasas QSK, SIK y las isoformas MARK, las ancla en el citoplasma celular, y en el caso de QSK y SIK estimula además su actividad catalítica (Al-Hakim *et al*, 2005; Göransson *et al*, 2006).

Hay por tanto precedentes que sugieren la existencia de proteínas *scaffolding* que interaccionarían con las BRSKs, y que podrían regular de alguna manera su localización celular o incluso modular su actividad quinasa. De hecho, análisis mediante cromatografía de gel filtración de extractos de cerebro y de líneas celulares llevados a cabo en nuestro laboratorio (resultados no mostrados en este trabajo), indican la presencia de las BRSKs en complejos proteicos de elevado peso molecular (> 700 kDa).

Regulación local de la traducción de las BRSKs durante el desarrollo del axón en neuronas.

Recientemente, se ha sugerido que la traducción de las BRSKs podría estar regulada positivamente y de forma localizada en las neuritas no diferenciadas de la neurona, mediante un mecanismo que implica la inhibición del *Tuberous Sclerosis Complex* 1 y 2 (Tsc1/Tsc2). Estos estudios muestran que el aumento de actividad de mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin* 1) provocado por la inhibición de Tsc1/Tsc2 en las neuritas no-diferenciadas, promueve el crecimiento y el desarrollo del axón, en parte debido a la activación de la síntesis proteica de las BRSKs. Mutaciones en Tsc1/Tsc2 son la causa de la esclerosis tuberosa (TSC), síndrome autosómico dominante caracterizado por una elevada predisposición tumoral y la aparición de varias anomalías neurológicas, tales como epilepsia, retraso mental o autismo. Coherentemente, se han detectado niveles elevados de BRSK2 en hamartomas extraídos de pacientes de TSC (Choi *et al*, 2008; Wildonger *et al*, 2008).

I.3.3 Función de las BRSKs: quinasas clave en la regulación de la polaridad neuronal y la función sináptica.

La expresión de las BRSKs se restringe básicamente al sistema nervioso, con una amplia distribución en el cerebro y la médula espinal, tanto en embriones como en animales postnatales (lo que sugiere que la expresión génica de estas quinasas está activada en fases tempranas del

desarrollo neuronal). Desde la identificación en el año 2001 del ortólogo SAD-1 de *C. elegans*, se ha puesto de manifiesto la gran relevancia de las BRSKs en la función neuronal. Por un lado, se ha demostrado que las BRSKs promueven y mantienen la polarización neuronal en estadios tempranos de la diferenciación, y por otro regulan la sinaptogénesis y la función sináptica en neuronas maduras. Cómo las BRSKs ejercen su función se desconoce a día de hoy, debido en parte a las escasas proteínas identificadas como sustratos y a que no se han descrito los mecanismos envueltos en su regulación. Es evidente pues que un reto reside en la caracterización de modificaciones post-traduccionales y/o asociaciones proteicas que varíen la actividad, localización o estabilidad de las BRSKs, así como la identificación de sus sustratos fisiológicos.

Papel de las BRSKs en la función sináptica: sinaptogénesis y liberación de neurotransmisores.

La quinasa SAD-1 (*Synapses of Amphids Defective-1*) de *C. elegans* fue el primer ortólogo de las BRSKs identificado. Se expresa en el sistema nervioso y localiza en regiones del axón ricas en sinapsis. Mediante el uso de animales deficientes en SAD-1 (mutantes *sad-1*), Crump *et al* mostraron que esta quinasa regula la sinaptogénesis y la polaridad axón-dendrita. Los clusters de vesículas sinápticas en los mutantes *sad-1* están difusos y desorganizados, y los axones fallan en terminar su crecimiento (proceso necesario para una correcta formación sináptica) (Crump *et al*, 2001). Un trabajo reciente muestra un fenotipo idéntico cuando se pierde la función del homólogo de STRAD α en *C. elegans* (STRD-1, mutantes *strd-1*), sugiriendo que en *C. elegans* la pseudoquinasa STRD-1 es un regulador clave de la polaridad neuronal y la función sináptica que funciona a través de SAD-1 (Kim *et al*, 2010a). Este estudio muestra además una interacción directa entre las dos proteínas que coordinaría la localización sináptica de SAD-1 en los axones de neuronas. Otra evidencia de la función sináptica de SAD-1 se deduce del análisis sistemático de genes imprescindibles para la estructura y la función sináptica en *C. elegans*, en el que se identifica esta quinasa y se clasifica dentro de un grupo de proteínas asociadas al citoesqueleto y la zona activa de las sinapsis (Sieburth *et al*, 2005).

También se ha descrito un papel en la función sináptica para la isoforma BRSK1 en mamíferos. En neuronas maduras del hipocampo y cerebelo de ratón, BRSK1 se localiza principalmente en los terminales presinápticos, asociada fuertemente a vesículas sinápticas y a la citomatrix de la zona activa. La sobre-expresión de BRSK1 salvaje en neuronas hipocámpales en cultivo incrementa la frecuencia de corriente excitatoria postsináptica (mEPSC), mientras que no se detecta cambio alguno al sobre-expresar una forma catalíticamente inactiva de BRSK1 (Inoue *et al*, 2006). Este aumento excitatorio no se debe a un aumento del desarrollo sináptico,

como podía suponerse de los estudios en *C. elegans*, por lo que los autores concluyen que en mamíferos la actividad de BRSK1 regula presinápticamente la liberación de neurotransmisores. La región conservada en C-terminal de las BRSKs (SCR) sería importante para esta función. Cómo lo hace está sin embargo aun por elucidar, ya que hasta la fecha no se ha descrito ningún sustrato fisiológico de BRSK1 que esté involucrado en la función sináptica. Estos autores proponen que, al menos en parte, este proceso podría estar mediado por la proteína RIM1 (residente en la zona activa e involucrada en el *priming* de vesículas), al detectar que puede ser fosforilada *in vitro* por BRSK1. Sin embargo, se necesitan estudios que validen la relevancia de esta fosforilación *in vivo*, y que revisen otros posibles sustratos implicados en las diferentes etapas del proceso de fusión de vesículas y liberación de neurotransmisores. El abordaje de este punto ha sido, precisamente, uno de los objetivos de este trabajo.

Una investigación reciente extiende la función sináptica de BRSK1 al sistema nervioso periférico, donde se observa que esta quinasa localiza específicamente en las uniones neuromusculares, asociada (al igual que en el sistema nervioso central) a la zona activa y a las vesículas sinápticas (Hagiwara et al, 2011). Estos autores postulan que BRSK1 regularía la liberación de neurotransmisores en las placas motoras terminales de una manera análoga a como lo hace en el sistema nervioso central.

Otra analogía interesante es la que se deriva del primer trabajo publicado recientemente sobre el ortólogo de las BRSKs en *Drosophila* (CG6114). El fenotipo de las moscas deficientes en CG6114 (mutantes *sugar-free frosting*, *sff*) es similar al fenotipo de los mutantes *sad-1* en *C. elegans* y de los ratones *knockout* de BRSK1/2, aunque presentan un rasgo adicional: mucho antes de iniciarse la sinaptogénesis embrionaria se detecta una glicosilación neuronal alterada, que concuerda con un defecto en la compartimentalización del aparato de Golgi (Baas S. et al, 2011). Así, análogamente al reclutamiento y fusión de vesículas sinápticas, CG6114 regularía el tráfico vesicular en las membranas del Golgi en embriones de *Drosophila* en desarrollo. Estos resultados inducen a suponer que las BRSKs jugarían un papel más generalizado en la regulación del proceso de fusión de vesículas con membranas celulares de la neurona, no restringido solamente al proceso sináptico.

Papel de las BRSKs en la polaridad neuronal.

Además de la función sináptica, los estudios iniciales en *C. elegans* atribuyen a SAD-1 un papel en la regulación de la polaridad neuronal: los animales mutantes *sad-1* presentan fallos en la terminación del crecimiento axonal y, por el contrario, la sobreexpresión de SAD-1 provoca su prematura terminación (Crump et al, 2001). Los mecanismos por los cuales SAD-1 controla la polaridad neuronal en *C. elegans* son desconocidos, aunque lo haría a través de sustratos y

mecanismos de regulación diferentes a los involucrados en la función sináptica. Así, la interacción de SAD-1 con la proteína *scaffolding* NAB1 es necesaria para la polaridad, pero no es indispensable para la morfología sináptica (a diferencia de los mutantes *sad-1*, los animales mutantes *nab-1* muestran una morfología normal de los clusters de vesículas). De hecho, la distinción entre las dos funciones estaría mediada por la expresión de dos isoformas de SAD-1 generadas por *splicing* alternativo, una larga [SAD-1(L)] capaz de interactuar con NAB1 e involucrada en la regulación de la identidad axón-dendrita, y una más corta truncada en C-terminal [SAD-1(S)] incapaz de unir NAB1 e implicada en la función sináptica (Hung et al, 2007; Kim et al, 2010b).

La caracterización del fenotipo de ratones deficientes en las BRSKs confirmó la función esencial de estas quinasas en el establecimiento de la polaridad neuronal en mamíferos (Kishi et al, 2005). Los ratones *knockout* para BRSK1 o BRSK2 (mutantes BRSK1^{-/-} o BRSK2^{-/-}) son animales sanos y fértiles, sin fenotipo aparente. Sin embargo, los ratones doble *knockout* para ambas isoformas (BRSK1/BRSK2^{-/-}) presentan poco movimiento al nacer, responden pobremente a estímulos externos y acaban por morir antes de las 2 horas de vida, lo que sugiere un fenotipo neuronal relevante. De hecho, el análisis histo-citológico indica que estos ratones mueren al nacer por un gran fallo en la polaridad neuronal. Comparado con los ratones control, los embriones de ratones doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-} poseen el cerebro anterior notablemente más pequeño (**figura I.7A**): el ventrículo cerebral es más grande en los mutantes, y el córtex es anormalmente fino aunque bien laminado. Además, a diferencia de las neuronas control que presentan un único y largo axón y múltiples dendritas más cortas y gruesas, las neuronas corticales e hipocampales de ratones BRSK1/BRSK2^{-/-} no distinguen entre procesos axonales y dendríticos, y todas sus neuritas son relativamente uniformes en longitud y complejidad (**figura I.7B**). Este fenotipo sugiere que las BRSKs se requieren para establecer una correcta polaridad neuronal y, por tanto, para la constitución de un eje axón-dendrita adecuado. Los mecanismos por los que las BRSKs promueven la polaridad neuronal en mamíferos son desconocidos. Sin embargo, la placa cortical del ratón doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-} muestra una significativa disminución de los niveles de la proteína tau fosforilada en la Ser262 (Kishi et al, 2005). Tau forma parte de la clase de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, *Microtubule-Associated Protein*), por lo que su fosforilación por las BRSKs implica éstas en la regulación de la estabilidad de la red de microtúbulos, crítica para el proceso de polarización neuronal. De hecho, tau es un sustrato común para muchas de las AMPK-related kinases, que la fosforilan en varios residuos de serina y treonina con diferentes especificidades *in vitro* (Yoshida & Goedert, 2011). En este reciente trabajo se muestra sin embargo que, comparado con las isoformas de las MARK, BRSK2 y sobretodo BRSK1 fosforilan pobremente a tau en la Ser262, por lo que es muy

probable que además de tau haya otros efectores de las BRSKs (desconocidos hasta la fecha) que orquesten la regulación de la polaridad neuronal.

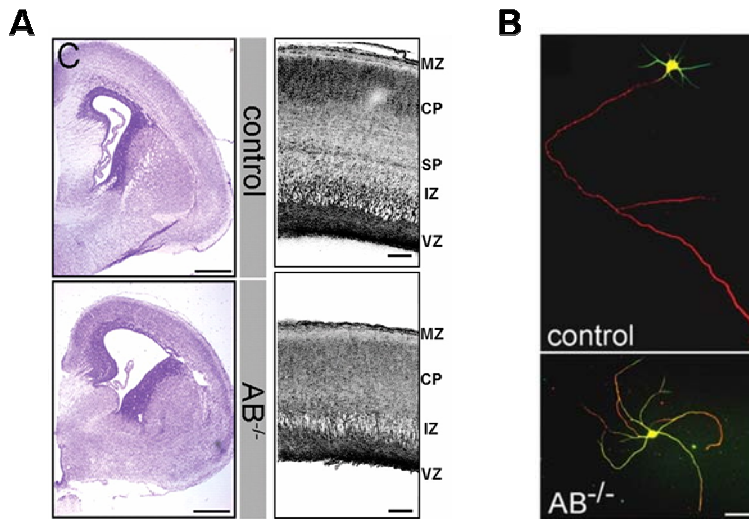


Figura 1.7 Defectos en la polaridad neuronal del ratón doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-}. (A) Secciones del cerebro de embriones a día E19 de ratones control y doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-} (AB^{-/-}) teñidas con cresil violeta (izquierda) o fluoro-Nissl (derecha). Se observa que el ventrículo cerebral es mayor en animales mutantes, y el córtex es notablemente más fino aunque bien estructurado. MZ, zona marginal; CP, placa cortical; SP, subplaca; IZ, zona intermedia; VZ, zona ventricular. (B) Microscopía de fluorescencia de neuronas hipocámpales de ratones control y doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-} (AB^{-/-}) cultivadas *in vitro* durante 7 días y visualizadas mediante inmunofluorescencia para el marcador axonal tau-1 (rojo) y el marcador dendrítico MAP2 (verde). Las neuronas control poseen un único y largo axón rico en tau y múltiples dendritas más cortas y gruesas ricas en MAP2. Las neuronas de animales mutantes poseen múltiples prolongaciones de similar longitud y calibre que contienen tanto tau-1 como MAP2. La barra blanca de escala representa 50 μ m. Figuras adaptadas de Kishi *et al*, 2005.

Un modelo de mecanismo consensuado es que las BRSKs actúan por debajo de LKB1 en el establecimiento de la especificidad axonal, lo que define una nueva y única vía de señalización (LKB1-BRSKs) imprescindible para la polarización de neuronas. El ratón *knockout* condicional de LKB1 en neuronas piramidales posee un fenotipo muy similar al del doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-}: los ventrículos del córtex cerebral son más grandes y las paredes más finas en los animales mutantes, además de detectarse la pérdida de las prolongaciones axonales en las neuronas corticales (Barnes *et al*, 2007). De acuerdo con estos resultados, se observa el mismo fenotipo al disminuir la expresión de LKB1 en los progenitores corticales de rata mediante RNA de interferencia (Shelly *et al*, 2007). La fosforilación de las BRSKs en la treonina conservada del T-loop es prácticamente nula en el córtex de ratones que carecen de LKB1, y la habilidad de LKB1 sobre-expresada de inducir la formación de múltiples axones se reduce severamente al silenciar la expresión de las BRSKs (Barnes *et al*, 2007; Shelly *et al*, 2007). Por tanto se requiere

la actividad de las BRSKs por debajo de LKB1 para que las neuronas establezcan correctamente la identidad axón-dendrita. Estos estudios ponen de manifiesto también la participación de la quinasa PKA en el eje de señalización LKB1-BRSKs mediante la fosforilación de la Ser431 de LKB1: a pesar de que LKB1 está presente en todas las neuritas de neuronas corticales, tiene un papel importante en la especificidad de los axones, y no las dendritas, lo que indicaría que su actividad está regulada espacialmente en las neuronas. Esta regulación espacial estaría controlada por PKA, dado que la forma de LKB1 fosforilada en la Ser431 por PKA (pSer431-LKB1) está presente en todas las neuritas no-diferenciadas y, en cambio, se concentra drásticamente en el axón de neuronas polarizadas. Además, se da un incremento significativo de la fosforilación en la Ser431 de LKB1 desde la última fase embrionaria hasta el nacimiento, justo el intervalo en que las neuronas recién generadas extienden el axón. Experimentos con neuronas hipocampales en cultivo muestran que el aumento local de cAMP en una neurita es suficiente para promover su diferenciación axonal, en parte debido por la consecuente activación de PKA y la fosforilación de LKB1 en la Ser431. Cómo se produce la necesaria amplificación local de cAMP en una neurita en concreto está en discusión, aunque se ha propuesto que podría explicarse mediante mecanismos de *feedback* positivos (Shelly et al, 2010; Shelly & Poo, 2011; Barnes et al, 2008; Barnes & Polleux, 2009).

En resumen, el modelo descrito por estos autores propone que la exposición de neuronas no diferenciadas a factores tróficos de diferenciación (como BDNF o NGF), se traduce en un incremento localizado de cAMP en una neurita en concreto, que induce una cascada de fosforilación en la que participan PKA, LKB1 y las BRSKs. La activación final de las BRSKs resulta en el desarrollo de la neurita a axón, en parte a través de la regulación de la estabilidad de la red de microtúbulos mediada por la fosforilación de tau (**figura I.8**).

BRSKs y el control del ciclo celular.

Por último, estudios recientes relacionan a BRSK1 con el control del ciclo celular. Así, las BRSKs no solo promoverían la polaridad neuronal, sino que también serían esenciales en mantener la diferenciación neuronal una vez establecida la polaridad. En 2004, Lu *et al* observaron que las BRSKs comparten cierta homología con la quinasa de levaduras Cdr2 (involucrada en regular la mitosis a través de su asociación con la proteína Wee1). Estos autores mostraron que de hecho BRSK1 fosforila *in vitro* a varias proteínas relacionadas con la división celular (Wee1A en la Ser642, Cdc25-C en la Ser216 y Cdc25-B en la Ser361); y que en células HeLa, en respuesta al daño al DNA inducido por luz ultravioleta, BRSK1 sobre-expresada se activa y se transloca del citoplasma al núcleo provocando el arresto del ciclo en fase G₂/M (Lu et al, 2004). Recientemente se ha observado que en neuronas, las BRSKs interactúan con la

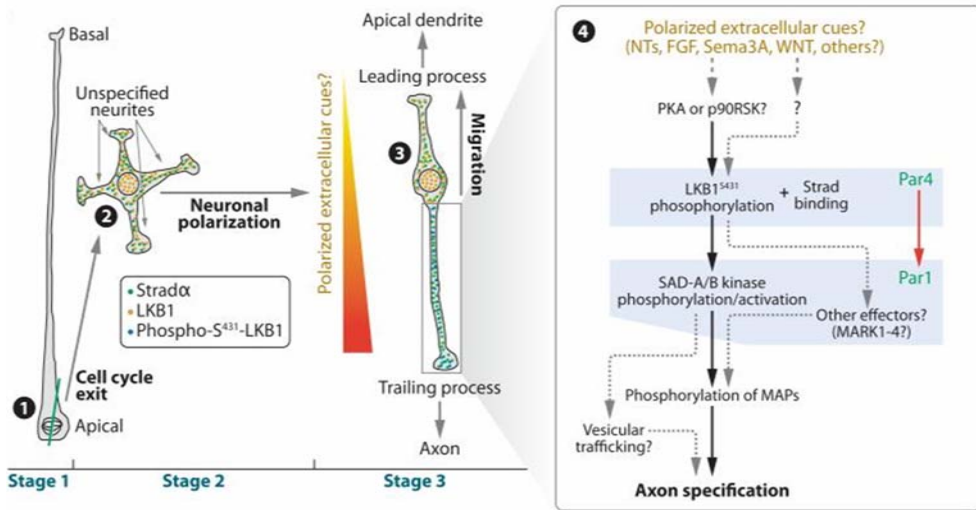


Figura 1.8 Modelo celular y molecular de la función de la vía LKB1-BRSKs en la polarización de neuronas corticales. Tras una división celular asimétrica de los progenitores gliales (1), las neuronas post-mitóticas muestran pronto en la zona subventricular una fase de transición en la que se da un crecimiento no dirigido de las neuritas (2). Posteriormente en la zona intermedia, estas neuronas adoptan una morfología bipolar, en la que mediante una migración radial extienden una prolongación líder hacia la superficie que formará las dendritas apicales y una prolongación terminal hacia el ventrículo que formará el axón (3). Se propone que la prolongación terminal se especifica para formar un axón en respuesta a señales extracelulares que preferentemente inducen la fosforilación de LKB1 en la Ser431, posiblemente a través de PKA (4). LKB1 fosforilada se concentra en la neurita que formará el axón, y tras su activación mediante la unión a STRAD y MO25, fosforila a las quinasas BRSK1/2 que son necesarias para la especificidad axonal, en parte a través de la fosforilación de proteínas de unión a microtúbulos (MAP), como tau. Figura extraída de Barnes et al. 2009.

quinasa *checkpoint* del ciclo celular Wee1 y la fosforilan en la Ser642 previamente reportada *in vitro* (Müller et al, 2010). Esta fosforilación inicia la *down-regulation* de Wee1, imprescindible para mantener el estado de diferenciación una vez la neurona ha extendido el axón. Estos autores sugieren que los defectos en la polaridad neuronal observados en los ratones doble *knockout* BRSK1/BRSK2^{-/-} están causados en parte por la expresión anormalmente persistente de Wee1 (como consecuencia de la ausencia de fosforilación en la Ser642). La supresión de Wee1 mediante *knockdown* rescata al fenotipo mutante y restablece la polaridad normal en estas neuronas.

Relacionado también con la progresión del ciclo celular, BRSK1 se ha involucrado en el control de la homeostasis de los centrosomas mediante la fosforilación de γ -tubulina en la Ser131 (Alvarado-Kristensson et al, 2009). Parecido a la descripción de dos isoformas de SAD-1 en *C. elegans* [SAD-1(S) y SAD-1(L)], estos autores muestran la existencia en roedores de una isoforma corta de BRSK1 generada por *splicing* alternativo (BRSK1_{short}). Al contrario que la forma larga de BRSK1 (cuya expresión se restringe al cerebro), esta forma corta (constituida

básicamente por el dominio quinasa) se expresa principalmente en hígado y riñón, y su actividad fluctúa durante el ciclo celular. Esta forma BRSK1*short* se localiza en los centrosomas de células U2OS (osteosarcoma humano) y NIH3T3 (fibroblastos de ratón) donde controla su duplicación: la reducción de los niveles endógenos de BRSK1*short* disminuye el número de centrosomas, mientras que su sobre-expresión los amplifica. Idéntico resultado se obtiene al sobre-expresar una forma mutada de γ -tubulina que mimetiza la fosforilación en la Ser131 (tubulina-S131D) o una forma que impide su fosforilación por BRSK1 (tubulina-S131A). Así, la fosforilación de γ -tubulina por BRSK1 promovería la polarización de microtúbulos en los centriolos, proceso esencial para iniciar la duplicación de centrosomas (Alvarado-Kristensson et al, 2009; Chen & Vogel, 2009; Carrera & Alvarado-Kristensson, 2009). Se necesitarán futuras investigaciones para establecer con claridad cual es la función global de las BRSKs en el control del ciclo celular, así como la relevancia de la existencia de la forma corta de BRSK1 en tejidos extracerebrales.

I.3.4 Modelos celulares para el estudio de la diferenciación neuronal.

Polarización neuronal *in vivo* y en cultivos primarios de neuronas corticales.

Las neuronas se encuentran entre los tipos celulares más polarizados del organismo, y están compartimentalizadas en dos dominios molecular y funcionalmente bien diferenciados (el axón y las dendritas), que proporcionan la habilidad de las neuronas de integrar y transmitir la información en el cerebro. Mediante aproximaciones *in vitro* de cultivos primarios de neuronas corticales e hipocámpales de roedores, en la última década se ha producido un gran progreso en la identificación de los mecanismos moleculares que intervienen en el establecimiento de la polaridad neuronal. Con todos estos datos, actualmente se propone un modelo integrativo de polarización neuronal *in vivo*, resultado de una compleja interacción entre señales extracelulares y vías intracelulares de señalización (Barnes & Polleux, 2009; Barnes et al, 2008).

In vivo, la mayoría de neuronas post-mitóticas polarizan el eje axón-dendrita mientras realizan la migración: durante este proceso, las neuronas extienden un proceso líder y un proceso retrasado a partir de los cuales se formaran las dendritas y el axón respectivamente. Por tanto, existe una relación funcional importante entre los mecanismos moleculares involucrados en la polarización de procesos durante la migración y en la polarización final del eje axón-dendrita. Algunas neuronas (neuronas bipolares y ganglionares de la retina) exhiben la polaridad axón-dendrita directamente a partir de la polaridad apico-basal de sus progenitores (Morgan et al, 2005; Zolessi et al, 2006), pero la mayoría (entre ellas las neuronas corticales) sufren extensos cambios morfológicos para adquirir la polaridad final (Hatanaka & Murakami, 2002; Noctor et al, 2004). En el neo-córtex de ratón, las neuronas se generan entre los días E11 y E17 a partir de los progenitores radiales en la zona ventricular. Estas células poseen un largo proceso basal en

la zona marginal y uno corto apical en la zona ventricular (**figura I.9A**). Cuando salen del ciclo celular mediante una división celular asimétrica, las neuronas post-mitóticas atraviesan una transición multipolar donde múltiples neuritas emergen rápidamente del soma celular antes de que se forme un proceso mayor en dirección radial (proceso líder). En este punto, la neurona inicia una translocación radial dejando atrás un proceso retrasado (axón) que se alarga tangencialmente hacia la zona intermedia. El soma celular continúa translocando hasta su destino final en la placa cortical, mientras el axón se alarga rápidamente y el proceso líder da

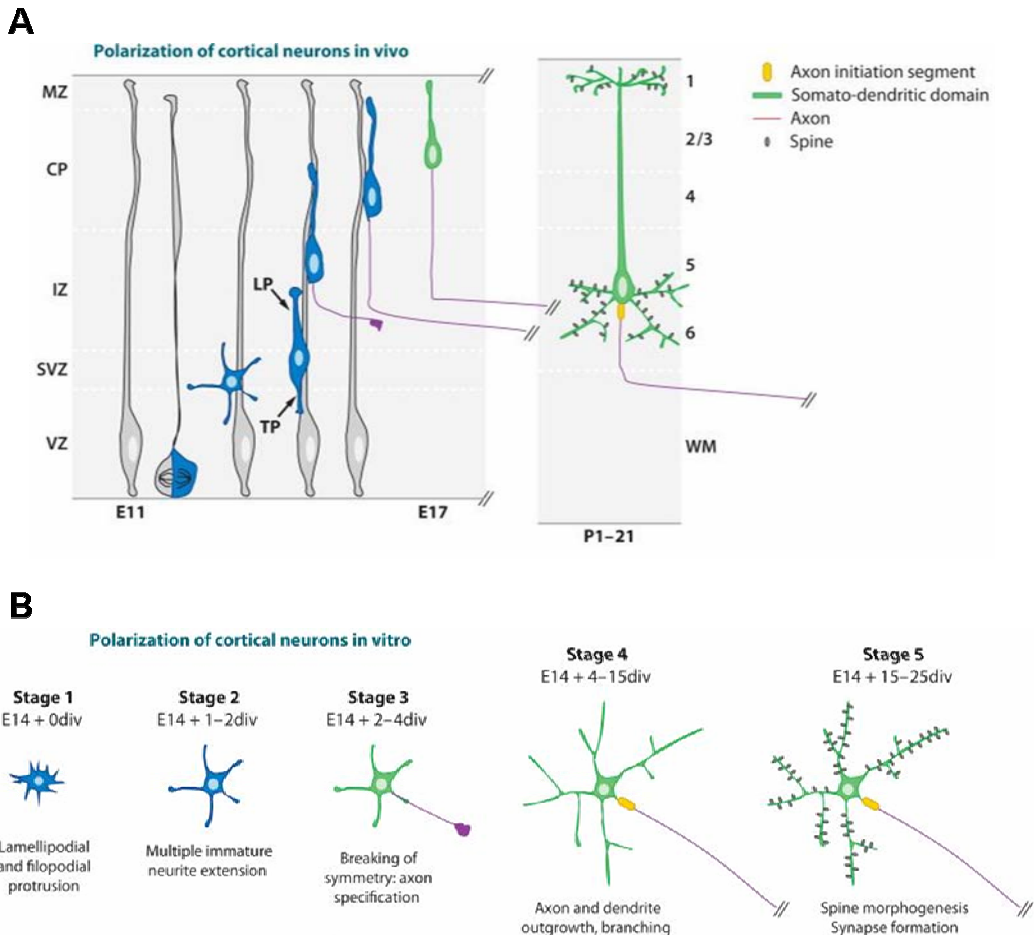


Figura I.9 Polarización de neuronas corticales *in vivo* e *in vitro*. (A) Secuencia de eventos que lideran la polarización de neuronas corticales *in vivo*. Durante la migración neuronal en el cerebro embrionario, las neuronas corticales polarizan el axón y las dendritas a partir del proceso retrasado (TP, *trailing process*) y el proceso líder (LP, *lider process*) respectivamente. La polarización completa se adquiere con el segmento axonal de iniciación (cilindro en amarillo) y la aparición de espinas dendríticas (protuberancias en negro) durante las tres primeras semanas del desarrollo post-natal. (B) Secuencia de eventos que lideran la polarización de neuronas corticales *in vitro*. En cultivos primarios, las neuronas corticales post-mitóticas se diferencian mediante un proceso dividido en 5 estadios (Dotti et al, 1988), des del desarrollo de neuritas inmaduras en neuronas recién sembradas (estadio 1) hasta el estadio 5 de diferenciación en que las neuronas corticales maduras exhiben axones, dendritas, espinas dendríticas y sinapsis funcionales. Figura extraída de Barnes & Polleux, 2009.

lugar a una dendrita apical que se ramifica en la zona marginal. Finalmente, las neuronas corticales completan la polarización durante las primeras semanas postnatales, en las que adquieren el segmento axonal de iniciación y las espinas dendríticas (Barnes & Polleux, 2009; Barnes et al, 2008) (**figura I.9A**).

Muchos de los avances sobre los mecanismos celulares y moleculares implicados en la polarización neuronal *in vivo* se han obtenido mediante el uso de un modelo de diferenciación *in vitro* en el que las neuronas corticales embrionarias de rata son disociadas a día E17 y cultivadas en un sustrato bi-dimensional. En esta aproximación, introducida por Gary Banker a finales de los años 80 (Dotti & Banker, 1987; Dotti et al, 1988; Goslin & Banker 1989; Craig & Banker, 1994), las neuronas en cultivo llevan a cabo una polarización espontánea (en ausencia señales extracelulares asimétricas), en la que comparten muchos de los atributos celulares y moleculares que caracterizan el axón y las dendritas *in vivo*. La observación morfológica de las neuronas en cultivo llevó a estos autores a proponer que el proceso de polarización neuronal *in vitro* ocurre a través de la transición por 5 estadios bien diferenciados (**figura I.9B**) (Dotti et al, 1988): en el estadio 1, las neuronas post-mitóticas recién sembradas presentan una intensa actividad en el desarrollo de lamelopodios y filopodios, que acaba por generar múltiples dendritas inmaduras (estadio 2). El estadio 3 representa un paso crítico en el que se rompe la simetría neuronal, y una neurita crece rápidamente para formar el axón mientras que las otras adquieren la identidad de dendritas. El siguiente estadio se caracteriza por un rápido crecimiento del axón y las dendritas (estadio 4), mientras que finalmente en la última transición las neuronas completan la diferenciación adquiriendo las espinas dendríticas y el segmento axonal de iniciación (estadio 5). En esta última fase, las neuronas corticales maduras muestran estructuras sinápticas funcionales.

Los resultados que se han derivado en los últimos años de aproximaciones *in vitro* mediante cultivos primarios de neuronas, implican a 6 grandes ejes de señalización intracelular involucrados en el establecimiento de la polaridad neuronal (**figura I.10**): PI3-quinasa (phosphatidylinositol 3-kinase) y PTEN (fosfatasa que cataliza la desfosforilación de PIP3 a PIP2); PKB; GSK3 (glycogen synthase kinase 3); LKB1 y BRSKs; Ras y Rho (pequeñas GTPasas); y, PAR3/6 y las formas atípicas de la proteína quinasa C (aPKC). Globalmente, estos mecanismos afectan la degradación local de proteínas, la dinámica del citoesqueleto y el tráfico dirigido a la membrana celular, procesos clave en la adquisición del fenotipo neuronal (Barnes & Polleux, 2009). Existen varias evidencias experimentales que sugieren que la activación de estas vías de señalización durante la polarización neuronal estaría sujeta a la exposición de señales extracelulares. Sin embargo, a día de hoy, la única cascada de señalización que se ha mostrado directamente relacionada (*in vitro* e *in vivo*) con señales extracelulares es la vía LKB1-BRSKs. Shelly *et al* mostraron que las neuritas inmaduras de neuronas hipocampales en cultivo pueden

detectar la presencia del factor neurotrófico BDNF, y este reconocimiento marca la especificidad del axón ya que la primera neurita que contacta con el BDNF se transforma sistemáticamente en axón (Shelly et al, 2007). Este efecto del BDNF requiere la activación de PKA que, como se mostró con anterioridad (**figura I.8**), fosforila LKB1 en la Ser431, que a su vez fosforila y activa a las BRSKs (imprescindibles para el establecimiento axón-dendrita). *In vivo*, la pérdida de LKB1 en los progenitores neuronales conlleva la ausencia de iniciación del axón en neuronas corticales (Barnes et al, 2007), en un proceso que se requiere la fosforilación de LKB1 en la Ser431. De forma análoga a lo observado *in vitro*, Shelly *et al* relacionan esta fosforilación con los efectos del BDNF en la estimulación de PKA (Shelly et al 2007) (**figura I.10**).

Todos estos datos configuran una nueva visión del proceso de polarización neuronal, en la que se requiere la cascada de señalización LKB1-BRSKs y en la que probablemente jueguen un papel determinante las señales extracelulares.

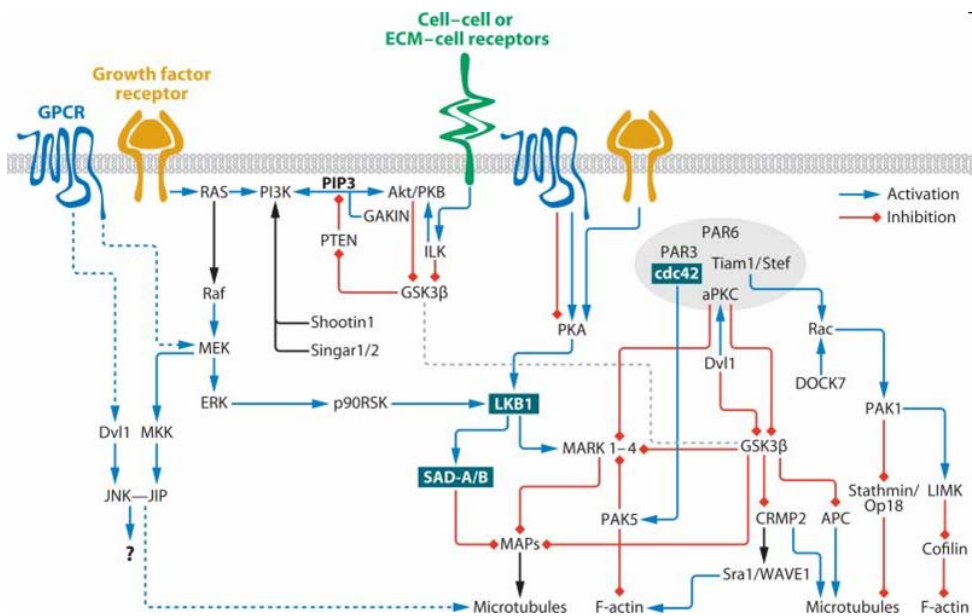


Figura I.10 Vías de señalización implicadas en el establecimiento del eje axón-dendrita durante la polarización neuronal en mamíferos. Representación esquemática de las 5 vías de señalización implicadas en la polarización neuronal: PIP3K y PTEN, PKB, GSK3, LKB1-BRSKs, Ras y PAR3/6 (ver el texto para los detalles). GPCR; receptores acoplados a proteína-G; ECM, matriz extra-celular. Las flechas rojas indican regulación negativa, y las azules activación. Figura extraída de Barnes & Polleux, 2009.

Modelo de diferenciación neuronal línea celular PC12.

Las células PC12 derivadas de feocromocitoma de rata (tumor de células cromafinas de la médula adrenal), se caracterizan por ser células pequeñas (6-14µm de diámetro), de morfología redondeada, y que contienen catecolaminas (principalmente dopamina). Desde que Greene *et al* describieran esta línea tumoral, se conoce que la exposición prolongada de células PC12 a la acción de la neurotrofina NGF conduce a la adquisición de un fenotipo neuronal: las células dejan de dividirse y desarrollan extensiones neuríticas (Greene & Tischler, 1976), acompañado de un desarrollo de la excitabilidad eléctrica y de un incremento en la sensibilidad a acetilcolina (Dichter *et al*, 1977). El carácter neuronal de células PC12 expuestas a NGF se validó con la demostración que pueden formar sinapsis colinérgicas funcionales con miotúbulos de la línea celular de músculo esquelético L6 (Schubert *et al*, 1977). Por ello, el modelo celular PC12 ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos de señalización implicados en la diferenciación neuronal. Además de NGF, las células PC12 responden de manera diferente a otras neurotrofinas, factores de crecimiento u hormonas, por lo que constituyen un buen modelo que permite estudiar de forma independiente procesos celulares como la diferenciación, proliferación o supervivencia.

De forma análoga a la diferenciación neuronal *in vivo* e *in vitro* en cultivos primarios de neuronas, la diferenciación de células PC12 es un proceso complejo en el que se ven involucradas varias vías de señalización. El NGF interacciona en la membrana plasmática con dos tipos de receptores: el receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) y el receptor tropomiosin-*related kinase A* (TrkA). La unión de NGF a estos receptores induce su activación, en el caso de los receptores con actividad tirosin-quinasa intrínseca (Trk) creando residuos fosforilados que servirán de lugares de unión para varias moléculas adaptadoras y enzimas. En ambos casos, el reclutamiento por la cara citosólica de estas moléculas pone en marcha tres principales vías de señalización (Skaper S., 2008; Vaudry *et al*, 2002) (**figura I.11**):

- A) Ras-MAPK: la activación de Ras estimula la señalización a través de las proteínas quinasas Raf-1, B-Raf, MEK1 y p38. De entre ellas, la activación de MEK1 (y consecuentemente la activación de ERK1/2) es necesaria y suficiente para inducir la diferenciación en células PC12. Así, la introducción de formas constitutivamente activas de miembros de la vía Ras-ERK1/2 (incluyendo Ras, Raf y MEK1) en células PC12 mimetizan el efecto del NGF al inducir la extensión neurítica (Bar-Sagi & Feramisco, 1985; Wood *et al*, 1993; Cowley *et al*, 1994). Y la introducción de sus formas negativas bloquean la diferenciación de células PC12 inducida con NGF (Szeberenyi *et al*, 1990; Schaap *et al*, 1993; Cowley *et al*, 1994). De acuerdo a estos resultados, la inhibición

farmacológica de MEK1 resulta en el bloqueo de la diferenciación neuronal inducida con NGF (Pang et al, 1995).

- B) Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K): la activación de PI3K promueve la supervivencia y diferenciación neuronal mediante la generación de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3) en la membrana plasmática, que recluta proteínas de señalización como factores intercambiadores de nucleótidos para Rac y Rho, y conlleva la activación de las proteínas quinasas PKB y p70^{S6K}.
- C) Fosfolipasa Cy (PLC γ): la activación del receptor Trk por NGF recluta a PLC γ a la membrana donde hidroliza el fosfatidilinositol-2-fosfato (PIP2) para generar inositol-3-fosfato (que moviliza el Ca²⁺ intracelular) y diacilglicerol (que activa a algunas isoformas de la proteína quinasa PKC). En conjunto, estas dos moléculas activan numerosos enzimas, entre ellos las proteínas quinasas CaMK y todas las isoformas de PKC.

A parte de la activación de los receptores Trk por NGF, la activación de los receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs) por sus ligandos (como el péptido PACAP) estimulan ciertos aspectos de la diferenciación neuronal, especialmente la extensión neurítica. Tanto la señalización estimulada por NGF como por PACAP requieren la activación de ERK1/2, pero a diferencia del NGF, PACAP la promueve de forma independiente a Ras (sostenida solamente por

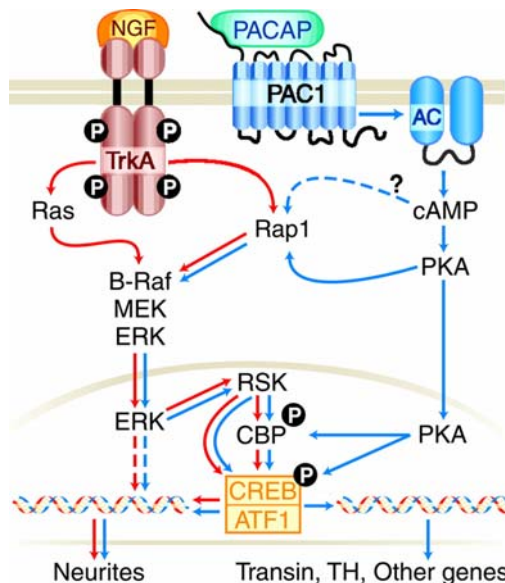


Figura 1.11 Vías de señalización implicadas en la diferenciación neuronal de células PC12. Representación esquemática de las vías de señalización implicadas en la diferenciación de células PC12 inducida por NGF (ver el texto para los detalles). Las flechas rojas indican la señalización dependiente de NGF, y las azules dependiente de PACAP. Figura extraída de Vaudry *et al*, 2002.

la activación de Rap). Así, la activación de GPCRs resulta en la activación de la adenilato ciclasa, que mediante la generación de cAMP induce la activación de la proteína quinasa PKA. Esta participa en la diferenciación neuronal contribuyendo a la activación de ERK1/2 vía Rap, o bien directamente fosforilando otros efectores como el factor de transcripción CREB o la proteína de unión a microtúbulos tau (Skaper S., 2008; Vaudry et al, 2002) (**figura I.11**).

Varios estudios muestran además la existencia de un mecanismo de trans-activación de los receptores con actividad tirosin-quinasa por los receptores GPCRs, de manera que en células PC12 el receptor Trk se puede activar en ausencia del ligando NGF, mediante la activación de los receptores GPCRs por PACAP (Lee F.S. & Chao, 2001; Lee F.S. et al, 2002).

OBJETIVOS

Las proteínas quinasas BRSK1 y BRSK2 (*Brain-specific kinase 1 y 2*) pertenecen a la familia de las *AMPK-related kinases*, y son activadas por la proteína supresora de tumores LKB1 mediante la fosforilación de un residuo de Thr del T-loop del dominio quinasa. Los estudios genéticos realizados en *C. elegans* y ratón muestran que las BRSKs se expresan mayoritariamente en cerebro, donde juegan un papel clave en el establecimiento de la polaridad (diferenciación) neuronal y en la sinaptogénesis. Por otra parte, un reciente trabajo apunta que BRSK1 podría además modular la función sináptica y liberación de neurotransmisores en la neurona madura. Así pues, estos trabajos pioneros sugieren que las quinasas LKB1-BRSKs constituyen una nueva vía de señalización crucial para la función neuronal. Sin embargo, se desconoce cómo las BRSKs ejercen su función, dado que no se han descrito los mecanismos que regulan su actividad (LKB1 es una quinasa constitutivamente activa) y los sustratos a través de los cuales median su función. Por ello, se proponen los siguientes objetivos:

- 1. Obtención del material y herramientas moleculares necesarias para el estudio de las BRSKs. Optimización del material generado y caracterización de la activación de BRSK1 y BRSK2 por la quinasa *upstream* LKB1.**
- 2. Estudio de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación de neuronas corticales, e identificación de las vías de señalización implicadas utilizando el modelo celular PC12.**
- 3. Caracterización de la localización subcelular de las BRSKs en cerebro y neuronas corticales en cultivo.**
- 4. Identificación de los putativos sustratos de BRSK1 que medien en la función sináptica de esta quinasa.**

