INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
DEL CÁNCER

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Regulación de la actividad de la quinasa humana VRK1 por la GTPasa Ran y su implicación en la respuesta al daño en el ADN

TESIS DOCTORAL

Marta Sanz García

Salamanca 2009

D. PEDRO A. LAZO-ZBIKOWSKI, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Regulación de la actividad de la quinasa humana VRK1 por la GTPasa Ran y su implicación en la respuesta al daño en el ADN” presentada por la licenciada MARTA SANZ GARCÍA ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 20 de Octubre de 2009.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski

Esta memoria ha sido realizada siendo **Marta Sanz García** beneficiaria de una Beca Predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas para el desarrollo de la tesis doctoral (2005-2009).

La investigación en el laboratorio ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-02900; SAF2007-60242 y CSD-2007-0017)
- Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI05A05; CSI14A08 y GR-15)
- Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad (SAN/1052/SA04/05; SAN/673/SA05/08)
- Federación Cajas de Ahorro de Castilla y León.

A mis padres

A Alberto

Índice

INTRODUCCIÓN	17
1. LA FAMILIA DE QUINASAS VRK	19
1.1. Las proteínas quinasas	19
1.2. La familia de quinasas humanas VRK	19
1.3. Dominios y motivos estructurales de las quinasas humanas VRK	21
1.3.1. Estructura tridimensional del dominio catalítico de VRK2 y VRK3	23
1.3.2. Estructura de los segmentos de activación de las proteínas VRK	24
1.4. La quinasa humana VRK1	25
1.4.1. Localización subcelular de VRK1	25
1.4.2. El papel de VRK1 en la regulación de diversos factores de transcripción	26
1.4.2.a. VRK1 y p53	26
1.4.2.b. VRK1 y los factores de transcripción ATF2 y c-Jun	26
1.4.2.c. VRK1 y el factor de transcripción CREB	28
1.4.3. Implicación de VRK1 en el control de la proliferación y la progresión del ciclo celular	28
1.4.4. VRK1 y su papel en el mantenimiento de la arquitectura nuclear	29
1.4.5. VRK1 y mitosis: fosforilación de la histona H3	30
1.4.6. Regulación de VRK1 a nivel postraduccional	31
1.5. Función de las quinasas humanas VRK2A y VRK2B	32
1.6. Función de la quinasa humana VRK3	33
1.7. Fenotipos asociados a la deficiencia en la expresión de distintas VRK	33
2. CARACTERÍSTICAS, FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA GTPasa RAN	35
2.1. La superfamilia de GTPasas Ras	35
2.2. Ran: el miembro nuclear de la superfamilia de GTPasas Ras	36
2.3. El ciclo RanGDP/RanGTP. Reguladores de la GTPasa Ran	38
2.3.1. RCC1, el factor de intercambio de nucleótido de Ran	38
2.3.2. RanGAP1 y los cofactores RanBP	39
2.3.3. Los reguladores de Ran establecen un gradiente de RanGTP en interfase y mitosis	40
2.4. Control del transporte núcleo-citoplasma por la GTPasa Ran	41
2.4.1. Características de los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E)	43
2.5. Papel de la GTPasa Ran en el control de la mitosis	44
2.6. Regulación de la actividad de RCC1	46
2.6.1. Regulación de la interacción de RCC1 con la cromatina	46

2.6.2. Regulación de RCC1 en mitosis mediante la fosforilación de su señal de localización nuclear	48
3. LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN	49
3.1. Tipos de daño en el ADN	50
3.2. Las quinasas PIKK: moléculas centrales en la respuesta al daño en el ADN	50
3.2.1. Interconexiones entre ATM y ATR en la respuesta al daño en el ADN	51
3.2.2. Fosforilaciones en la respuesta al daño en el ADN	52
3.3. La vía de señalización de ATM: respuesta a roturas de doble cadena en el ADN	52
3.3.1. Visión general de la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN	53
3.3.2. Ensamblaje de los focos de respuesta al daño y activación de ATM	55
3.3.3. 53BP1 en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN	56

OBJETIVOS 59

RESULTADOS 61

1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LA QUINASA HUMANA VRK1 MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS	65
1.1. Diseño experimental de la identificación de proteínas que interaccionan con VRK1	65
1.2. Identificación de proteínas que interaccionan con VRK2B	66
1.2.1. Electroforesis bidimensional del <i>pulldown</i> a gran escala de GST-VRK2B y selección de <i>spots</i>	66
1.2.2. Análisis de los <i>spots</i> seleccionados del gel GST-VRK2B	69
1.3. Identificación de proteínas que interaccionan con VRK1 y VRK1-C	72
1.3.1. Electroforesis bidimensionales de los <i>pulldowns</i> a gran escala de GST-VRK1 y GST-VRK1-C (geles pH 3-10) y selección de <i>spots</i>	72
1.3.2. Análisis de los <i>spots</i> seleccionados de los geles GST-VRK1 y GST-VRK1-C (pH 3-10)	74
1.3.3. Electroforesis bidimensionales con rango de pH estrecho de <i>pulldowns</i> a gran escala de GST-VRK1 y GST-VRK1-C y análisis de <i>spots</i>	79
1.3.4. Clasificación de las proteínas identificadas en los <i>pulldowns</i> de GST-VRK1 y GST-VRK1-C	84
1.4. Proteínas identificadas para VRK1 y VRK2B	86
2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA QUINASA VRK1 CON LA GTPasa RAN	88
2.1. Caracterización de la interacción de VRK1 con Ran	88

2.1.1. <i>Minimum information about a proteomics experiment</i> (MIAPE) de las identificaciones de Ran	88
2.1.2. Validación de la interacción de Ran con VRK1 y VRK2B.....	90
2.1.3. Los otros miembros de la familia VRK también interaccionan con Ran	91
2.1.4. VRK1 no interacciona con otras GTPasas	92
2.1.5. La interacción de Ran con VRK1 es directa y no requiere proteínas adicionales	92
2.1.6. VRK1 interacciona <i>in vitro</i> con distintas conformaciones de Ran.....	93
2.1.7. La interacción VRK1-Ran ocurre <i>in vivo</i>	95
2.1.8. VRK1 y RCC1 se detectan en el mismo complejo <i>in vivo</i> pero no interaccionan directamente	96
2.1.9. Interacción y colocalización de VRK1 y Ran endógenas.....	97
2.1.10. Ran interacciona con la región carboxilo terminal de VRK1, VRK2A y VRK2B .	100
2.1.11. Competencia entre VRK1 y VRK3 por la interacción con Ran	102
2.1.12. Mutaciones de VRK1 en la zona de interacción con Ran afectan a su afinidad por Ran	103
2.2. Análisis de la función de la interacción de VRK1 con Ran	104
2.2.1. Ran no es sustrato de fosforilación de VRK1 ni de VRK2B <i>in vitro</i>	104
2.2.2. VRK1 no afecta a la interacción de Ran con RCC1 <i>in vitro</i>	105
2.2.3. VRK1 no fosforila directamente a RCC1 <i>in vitro</i> , ni a través de un complejo VRK1-Ran-RCC1	107
2.2.4. Efecto de VRK1 sobre el intercambio de nucleótido en Ran	108
2.2.4.a. La interacción de VRK1 con RanGDP no afecta a la disociación de GDP catalizada por RCC1	108
2.2.4.b. La interacción de VRK1 con RanGDP no afecta a la incorporación de GTP catalizada por RCC1	109
2.2.5. La interacción de Ran wt o Ran(T24N), pero no la de Ran(L43E), con VRK1 produce la inhibición de su actividad quinasa <i>in vitro</i>	110
2.2.6. La inhibición de la actividad de VRK1 por Ran es dosis-dependiente	111
2.2.7. La actividad de VRK1 endógena es inhibida por su interacción con Ran.....	112
2.2.8. La interacción de Ran con VRK2A y VRK2B también inhibe su actividad quinasa <i>in vitro</i>	113
3. IMPLICACIÓN DE VRK1 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN.....	117
3.1. El daño en el ADN produce un aumento de la actividad quinasa de VRK1	117
3.1.1. Regulación de la actividad de VRK1 en respuesta a suero	117
3.1.2. Activación de VRK1 en respuesta a distintos tipos de daño en el ADN.....	119

3.2. El estado de fosforilación de VRK1 influye en su actividad.....	121
3.2.1. Fosforilaciones en VRK1 son necesarias para su actividad	121
3.2.2. El aumento de la actividad de VRK1 en respuesta a daño por luz ultravioleta depende de alguna fosforilación en la quinasa	123
3.3. VRK1 es necesaria en la respuesta al daño en el ADN.....	124
3.3.1. 53BP1 es diana de fosforilación de VRK1	124
3.3.2. VRK1 colocaliza parcialmente con 53BP1 en los focos de respuesta al daño ...	126
3.3.3. VRK1 interacciona con 53BP1 y lo fosforila en respuesta a radiación ionizante	128
3.3.4. Determinación de la zona de interacción de 53BP1 con VRK1	129
3.3.5. VRK1 es necesaria para la localización de 53BP1 en focos inducidos por IR...	130
3.3.6. VRK1 es necesaria para una total fosforilación de H2AX en serina en respuesta a IR	132
3.3.7. La activación de VRK1 en respuesta a IR es independiente de ATM.....	135
3.3.7.a. Análisis de la actividad de VRK1 en la línea celular HT-144 (ATM-/-) ..	135
3.3.7.b. VRK1 no es diana directa de fosforilación de ATM	137
3.3.8. La falta de VRK1 produce una respuesta al daño en el ADN incompleta	138

DISCUSIÓN 141

1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON VRK1.....	143
2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE VRK1 CON LA GTPasa RAN	146
3. IMPLICACIÓN DE VRK1 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN	152
3.1. Regulación de la actividad de VRK1 en respuesta a distintos tipos de estímulos.	152
3.2. VRK1 y su papel en la regulación de la respuesta al daño en el ADN.....	155

CONCLUSIONES 159

MATERIAL Y MÉTODOS 161

1. Técnicas de manipulación de ADN.....	163
1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	163
1.2. Electroforesis de ADN	163
1.3. Generación de vectores de ADN recombinantes	163
1.4. Transformación de plásmidos en bacterias <i>E. coli</i>	164
1.5. Secuenciación de ADN	164
1.6. Mutagénesis dirigida	164
2. Técnicas de manipulación de proteínas.....	165

2.1. Purificación de proteínas de fusión unidas a GST (Glutación-S-Transferasa)	165
2.2. Purificación de proteínas de fusión unidas al epítipo 6xHis.....	166
2.3. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE	166
2.4. Tinción con azul de Coomassie	167
2.5. Transferencia húmeda, <i>Western blot</i> , y tinción Ponceau.....	167
3. Cultivo celular	168
4. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo monocapa	168
5. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo y detección de proteínas endógenas o sobreexpresadas.....	170
6. Ensayos de <i>pulldown</i>	170
7. Ensayos de inmunoprecipitación.....	171
8. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	172
9. Citometría de flujo	172
10. Supresión de la expresión con ARN de interferencia.....	173
11. Identificación de proteínas por su huella peptídica	173
12. Técnicas proteómicas	174
12.1. <i>Pulldown</i> a gran escala para la purificación e identificación de proteínas asociadas a las proteínas VRK.....	174
12.2. Electroforesis bidimensional	175
12.3. Digestión triptica de <i>spots</i>	176
12.4. Determinación de las masas de los péptidos tripticos con MALDI-TOF e identificación de proteínas con MASCOT	176
13. Ensayos de interacción <i>in vitro</i>	177
14. Ensayos de actividad quinasa.....	178
15. Ensayos de intercambio de nucleótido <i>in vitro</i>	179
15.1. Ensayos de liberación de GDP	179
15.2. Ensayos de unión de GTP.....	179
16. Reactivos y estimulaciones	180
17. Anticuerpos usados	181
18. Construcciones de ADN recombinante	183
19. Líneas celulares	186
20. Oligonucleótidos	186
ABREVIATURAS	187
BIBLIOGRAFÍA	191
AGRADECIMIENTOS	211

Introducción

1. LA FAMILIA DE QUINASAS VRK (*VACCINIA-RELATED KINASES*)

1.1. Las proteínas quinasas

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional reversible y dinámica, que juega un papel importante en la regulación de las vías de señalización celular y en cáncer, al controlar gran cantidad de procesos biológicos como el crecimiento celular, transcripción génica, diferenciación, invasión, migración celular y apoptosis. Las proteínas quinasas son las enzimas que catalizan la fosforilación, o unión covalente de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina en proteínas celulares específicas. Con estas fosforilaciones se pueden controlar propiedades como la actividad enzimática del sustrato, su especificidad, su localización subcelular, su interacción con otras moléculas o su degradación (Hanks and Hunter, 1995; Hunter, 1987; Hunter, 1995). Las quinasas constituyen una gran familia de proteínas, con más de quinientos miembros en humanos, representando el dos por ciento del genoma humano (Manning et al., 2002). La magnitud y complejidad de la superfamilia de proteínas quinasas ponen de manifiesto su importancia en la regulación de la señalización celular. Se estima que en torno al treinta por ciento de las proteínas humanas están fosforiladas (Cohen, 2001).

La disregulación de la actividad de las proteínas quinasas, con el consecuente cambio en los estados de fosforilación de las proteínas, está relacionada con la aparición de diferentes enfermedades humanas, entre ellas el cáncer, jugando un papel clave en el desarrollo de tumores y la progresión del cáncer (Ashman and Villar, 2009). Se conocen más de trescientos genes implicados en el desarrollo de cánceres humanos (Futreal et al., 2004), pero sólo un número limitado de ellos puede funcionar como dianas de fármacos efectivos. Las proteínas quinasas son buenas candidatas, ya que participan en las vías de señalización de oncogenes y supresores de tumores (Hunter, 1997), constituyendo dianas contra las que desarrollar inhibidores, que pueden convertirse en fármacos efectivos contra el cáncer (Gaestel et al., 2007; Giamas et al., 2007; Malumbres and Barbacid, 2007; Traxler et al., 2001). De ahí la importancia del estudio y conocimiento de las quinasas implicadas en el control de la señalización celular.

1.2. La familia de quinasas humanas VRK

En el año 2002, Manning y colaboradores, haciendo uso de las bases de datos disponibles, catalogaron y clasificaron filogenéticamente todas las quinasas humanas en lo que se denominó el “quinoma humano”. Así, un total de 518 genes que codificaban para quinasas se

clasificaron en ocho grupos distintos, a su vez divididos en varias subfamilias. Dentro del grupo de las caseína quinasas tipo 1 (CK1), que constituye una rama evolutiva, se encuadra la familia de serina/treonina quinasas VRK (del inglés *Vaccinia-Related Kinases*). Las quinasas VRK presentan homología con la familia CK1 en el dominio catalítico, sin embargo divergieron pronto de las quinasas CK1 en la evolución, y están relacionadas con ellas sólo de forma distante (figura 1).

Figura 1. La familia de quinasas VRK en el quionoma humano. Las quinasas VRK se clasifican en el grupo de las caseína quinasas 1 (CK1) (en azul celeste en la figura), aunque divergieron pronto en la evolución de la rama de las CK1 (Manning et al., 2002).

La familia de quinasas humanas VRK está constituida por tres miembros, dos de ellos catalíticamente activos, VRK1 y VRK2, y un tercero, VRK3, sin actividad quinasa debido a sustituciones en aminoácidos clave dentro del dominio quinasa (Blanco et al., 2006; Lopez-Borges and Lazo, 2000; Nichols and Traktman, 2004). VRK2 presenta dos isoformas, A y B, generadas por maduración alternativa de su ARN mensajero, que difieren en su región carboxilo terminal (Blanco et al., 2006).

Inicialmente, VRK1 y VRK2 fueron identificadas en un trabajo en el que se buscaban nuevos genes implicados en el control de la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular (Nezu et al., 1997). Se identificaron como un EST (término inglés que se usa para designar al producto de un gen que se expresa en una célula), mediante hibridación y secuenciación a partir de una librería de ADN complementario proveniente de tejidos fetales de hígado (con alta tasa de proliferación celular), y recibieron ese nombre por su homología con la quinasa B1 del virus *Vaccinia*. Esta quinasa presenta una expresión temprana durante la infección del virus y tiene un papel esencial en la replicación del ADN viral (Banham and Smith, 1992; Lin et al., 1992). VRK1 tiene un 39% de identidad con B1 y VRK2 un 34% (Nezu et al., 1997; Nichols and Traktman, 2004). Además, la expresión ectópica de VRK1 es capaz de complementar parcialmente la deficiencia en la replicación del ADN viral que presenta el mutante sensible a temperatura *ts2* del virus *Vaccinia*, defectivo en la quinasa B1 (Boyle and

Traktman, 2004). En el trabajo llevado a cabo por Nezu y colaboradores en 1997, se observó que VRK1 y 2 presentaban altos niveles de expresión en tejidos altamente proliferativos, como testículos e hígado fetal, y en líneas celulares tumorales, por lo que se postuló que las quinasas VRK podrían estar involucradas en la regulación de la división y crecimiento celular con un posible papel en tumorigénesis (Nezu et al., 1997). Posteriormente, se identificó el tercer miembro de la familia, VRK3 (Vega et al., 2003).

Aparte de la familia VRK humana, existen ortólogos de estas proteínas en otros organismos; sin embargo, únicamente en organismos evolucionados (en vertebrados) se encuentran tres miembros en la familia VRK, mientras que en organismos menos evolucionados (en invertebrados) existe sólo un único miembro. Este hecho podría reflejar cómo tuvo lugar la evolución de las quinasas VRK: parece que un único gen VRK ancestral se duplicó dos veces cuando evolucionó la rama de los vertebrados, dejando a los invertebrados con un único gen VRK y los vertebrados con tres (Klerkx et al., 2009). Cabe destacar que no existen ortólogos de las VRK en eucariotas unicelulares, como *S. cerevisiae* o *S. pombe*.

1.3. Dominios y motivos estructurales de las quinasas humanas VRK

Tras la identificación de VRK1 y VRK2 como dos serina/treonina quinasas putativas con homología a la quinasa B1 del virus *Vaccinia* (Nezu et al., 1997), se demostró que efectivamente, VRK1 era una serina/treonina quinasa activa, que presentaba una fuerte autofosforilación *in vitro* en residuos de serina y treonina, y que era capaz de fosforilar al factor de transcripción y supresor de tumores p53 en la treonina 18 (Lopez-Borges and Lazo, 2000).

Tanto VRK1 como VRK2A y B presentan un dominio catalítico en la zona amino terminal de la proteína, con un sitio típico de unión al ATP (figura 2). VRK1 y VRK2 (A y B) son los miembros de la familia que comparten mayor homología entre sí, con un 44%, llegando a un 53% considerando sólo los dominios catalíticos (Nichols and Traktman, 2004). La isoforma VRK2B es una forma truncada de VRK2A, al presentar un codón de terminación prematuro, por lo que las dos isoformas de VRK2 tan sólo difieren en los últimos residuos de la zona carboxilo terminal. Así, la isoforma larga (VRK2A) posee un dominio transmembrana (TR) de la que carece la isoforma corta (VRK2B) y que la hace estar anclada en membranas (Blanco et al., 2006). Las regiones carboxilo terminal (a lo largo de este trabajo se denominará así a la región fuera del dominio quinasa) de VRK1 y VRK2 presentan baja homología entre sí, y con cualquier otra secuencia conocida y se postula que deben tener un papel en la regulación de las quinasas (Blanco et al., 2006; Lopez-Borges and Lazo, 2000).

Figura 2. Dominios y motivos estructurales de las quinasas humanas VRK. Se muestran alineadas según homología de secuencia de aminoácidos.

VRK1, por su parte, presenta en su región carboxilo terminal una secuencia consenso diana de la vía de degradación endocítica-lisosomal (aa 304-320) (Valbuena et al., 2008a). La degradación proteolítica de VRK1 por esta vía ha sido demostrada, y es inducida por p53 (Valbuena et al., 2006). Además, VRK1 también presenta en la región carboxilo terminal una señal de localización nuclear (NLS), enmarcada en el denominado motivo BAB o motivo básico-ácido-básico (aa 356-396). Este motivo es característico y está conservado en varias quinasas VRK homólogas de distintos organismos y consiste en una región de aminoácidos ácidos flanqueada por dos regiones de aminoácidos básicos (figura 3) (Aihara et al., 2004). La quinasa VRK1 murina presenta un motivo BAB, así como la quinasa VRK de *D. melanogaster* (NHK-1); VRK2 de *X. laevis* (xVRK2) presenta dos motivos BAB en su región carboxilo terminal, y VRK-1 de *C. elegans* (ceVRK-1) presenta tres motivos BAB. La quinasa humana VRK2A presenta un doble motivo BAB solapado, mientras que en la isoforma corta (VRK2B) este motivo aparece truncado. La posición de los motivos BAB en las regiones carboxílicas se puede ver en la figura 3A, y el alineamiento de las secuencias de estos motivos, en la figura 3B. No se conoce la función del motivo BAB, pero el hecho de que sea un motivo característico y conservado en las quinasas VRK hace pensar que deba tener un papel importante y común en la función o regulación de éstas, y por tanto, apoya la hipótesis de que las regiones carboxilo terminal de VRK1 y VRK2 están implicadas en la regulación de las quinasas.

A

B

			Región básica	Región ácida	Región básica
<i>D. melanogaster</i>	NHK1	369	ARKAKKIDSPVLNSSLDEKISASEDDEEEEEKSHRKKTA	KK	408
<i>H. sapiens</i>	VRK1	356	KKRKKKEIEESKEPGVEDTEWSNTQTEEAQTRSRTRKRVQK	KK	396
<i>M. musculus</i>	VRK1	356	KKRKKKEAEEASAVCAVEDMECSDTQVQEAQTRSRTRKKAQK	KK	396
<i>X. laevis</i>	VRK2	349	HIKKR-----DSGDTDSPFDLEEFEEET--KIQGTKLKS	KK	382
<i>X. laevis</i>	VRK2	394	KKRRKKKEEEVLNLEEEANAQWINREDFEETHSQRRKALSRN	KK	435
<i>C. elegans</i>	VRK	345	KRSTRRRLAVK-----EESDNKDNDEVE-----VKPEKKATP	KK	375
<i>C. elegans</i>	VRK	376	RKRRTTRKAV--EVNNDSDDNEEQYENP-----KSKSSR	KK	406
<i>C. elegans</i>	VRK	410	KSKRAK-----EEDVDDEEEIIIP-----KSSRSRSK	KK	436

Figura 3. Conservación del motivo BAB en quinasas VRK homólogas. A. Alineamiento de quinasas VRK de distintos organismos que presentan motivos BAB, según homología de secuencia de aminoácidos. B. Alineamiento de aminoácidos de los motivos BAB de distintas quinasas homólogas VRK. En azul, residuos básicos. En rosa, residuos ácidos. Adaptado de (Aihara et al., 2004).

Por su parte, VRK3 es el miembro de la familia de quinasas humanas VRK más divergente, con un 33% de homología con VRK1, y un 23% con VRK2. Presenta una señal de localización nuclear en la región amino terminal y un dominio quinasa en su zona carboxilo terminal, pero este dominio está degenerado por presentar sustituciones de aminoácidos clave para la actividad, por tanto no tiene actividad catalítica *in vitro* (Kang and Kim, 2006; Nichols and Traktman, 2004).

1.3.1. Estructura tridimensional del dominio catalítico de VRK2 y VRK3

Recientemente, ha sido determinada la estructura de los dominios catalíticos de VRK2 y VRK3 (Scheeff et al., 2009). Las dos estructuras revelan que los dominios catalíticos presentan una conformación activa y cerrada, con una estructura rígida de sus segmentos de activación, al igual que otras quinasas del grupo CK1 (Nolen et al., 2004), lo que sugiere que las quinasas VRK podrían ser constitutivamente activas (Scheeff et al., 2009).

Los dominios catalíticos de VRK2 y VRK3 presentan una alta similitud estructural con los de otras proteínas quinasas, indicando que la pérdida de actividad de VRK3 no conlleva cambios estructurales o conformacionales importantes. En el sitio de unión al ATP de VRK3, los cambios en aminoácidos clave suponen impedimentos estéricos y electrostáticos para la unión del ATP. El sitio activo de VRK3 conserva una conformación similar al de VRK2, aunque presenta sustituciones en residuos clave para la actividad. Lo mismo ocurre con el segmento de activación, que es muy similar al de VRK2 en conformación, y en el cual las sustituciones de aminoácidos deben interferir con la unión al sustrato. La falta de unión a ATP y

actividad catalítica de VRK3, y la conservación del plegamiento del dominio quinasa sugiere que la estructura de VRK3 debe ser mantenida para permitir el establecimiento de interacciones con otras proteínas, es decir, para servir como proteína de anclaje, función conocida en otras pseudoquinasas (Boudeau et al., 2006; Scheeff et al., 2009).

1.3.2. Estructura de los segmentos de activación de las proteínas VRK

El segmento de activación es una región de unos 20-40 aminoácidos situada en el dominio catalítico de las proteínas quinasa. Gran cantidad de quinasas son reguladas a través de la fosforilación en residuos del segmento de activación, produciendo un cambio conformacional de un estado inactivo, desfosforilado y generalmente desestructurado, a un estado fosforilado, activo y estable, que permite la unión del sustrato (Nolen et al., 2004; Pike et al., 2008). Muchas quinasas se activan por autofosforilación del segmento de activación.

Figura 4. Alineamiento de los segmentos de activación de CK1, B1 y distintas VRK. El alineamiento de aminoácidos se llevó a cabo con el programa DSGene, utilizando ClustalW.

En el caso de las quinasas VRK, no se conoce el papel del segmento de activación en la regulación de la actividad de las quinasas, pero presentan algunas peculiaridades con respecto a la estructura de su segmento de activación. El segmento de activación en las proteínas quinasas está flanqueado por el motivo DFG, y el motivo APE. El motivo DFG cambia a DYG en algunas de las quinasas VRK, y el motivo APE pasa a ser SXN en la mayoría del grupo de las CK1, y SXD en las VRKs (Klerkx et al., 2009; Nichols and Traktman, 2004; Scheeff et al., 2009). En la figura 4 se puede ver el alineamiento de los segmentos de activación de varias quinasas de la familia VRK, junto con el de la quinasa B1 del virus *Vaccinia* y el de CK1δ. En muchas serina/treonina quinasas existe un sitio típico de fosforilación conservado en el *loop* de activación del segmento de activación, importante para la activación de la quinasa. Sin embargo, en las quinasas VRK no hay ningún sitio típico de fosforilación en su *loop* de activación (Scheeff et al., 2009), aunque sí una tirosina conservada en las VRK humanas y murinas. Por otro lado, se observan dos residuos treonina en el *loop* P+1 bastante conservados entre todas las quinasas VRK (figura 4), si bien estos residuos también aparecen en otras serina/treonina quinasas, y está descrito que participan en la estabilización y organización del segmento de

activación mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno con residuos del dominio catalítico (Scheeff et al., 2009). El hecho de que estos residuos estén conservados en las proteínas VRK indica que podrían jugar un papel clave en la actividad de las quinasas.

Más allá de las características particulares que presenta el segmento de activación de las quinasas VRK, también el sitio de unión al ATP presenta sustituciones características de aminoácidos que lo diferencian del sitio de unión al ATP del resto de serina/treonina quinasas (Fedorov et al., 2007). En el estudio llevado a cabo por Fedorov y colaboradores se demostró que las quinasas humanas VRK1 y VRK2 presentaban un bajo grado de unión a una batería de inhibidores competitivos con el ATP desarrollados para otras quinasas. Por tanto, las proteínas VRK deberían ser dianas idóneas para el desarrollo de inhibidores específicos ya que se minimizarían los efectos secundarios debidos a la interacción de los inhibidores con otras quinasas (Fedorov et al., 2007).

1.4. La quinasa humana VRK1

Las características y expresión de VRK1 llevaron desde un principio a relacionar la función de esta quinasa con el control de la proliferación celular (Nezu et al., 1997). Desde entonces, el estudio de las dianas de fosforilación y la expresión de VRK1 tanto a nivel génico como proteico han ayudado a esclarecer en parte el papel de esta quinasa en la biología celular.

1.4.1. Localización subcelular de VRK1

VRK1 es una quinasa principalmente nuclear, debido a su señal de localización nuclear. Sin embargo, VRK1 también se detecta en el citoplasma de algunas líneas celulares y tejidos estudiados (Valbuena et al., 2007a). Esto sugiere que la localización de VRK1 debe estar regulada, pero el mecanismo o los factores que la regulan están aún por definir. Por otro lado, VRK1 expresada exógenamente muestra una localización exclusivamente nuclear (Lopez-Borges and Lazo, 2000; Nichols and Traktman, 2004). Además, se ha detectado una subpoblación de VRK1 citoplasmática en el aparato de Golgi, la cual colocaliza con el marcador de aparato de Golgi Giantin (Valbuena et al., 2007a). Otros autores han demostrado que VRK1 nuclear se localiza tanto en el nucleoplasma, como asociada a la cromatina de células en interfase y en mitosis, pero no en la matriz nuclear (Kang et al., 2007). En estudios proteómicos a gran escala, se ha detectado a VRK1 en complejos de la maquinaria de iniciación de la transcripción asociados a la cromatina, junto con factores de ensamblaje, histonas y la acetiltransferasa p300 (Guermah et al., 2006), y asociada a la cromatina tras la inducción de la expresión de Myc (Shiio et al., 2003). También se ha detectado VRK1 en el nucleolo (datos del

laboratorio y (Andersen et al., 2005)), sugiriendo que la localización nuclear de VRK1 puede ser dinámica y formar parte tanto del nucleoplasma como de cuerpos nucleares (Lamond and Sleeman, 2003).

1.4.2. El papel de VRK1 en la regulación de diversos factores de transcripción

Entre las dianas de fosforilación de VRK1 existen varios factores de transcripción con importantes papeles en la señalización celular: ATF2 (Sevilla et al., 2004b), c-Jun (Sevilla et al., 2004a), CREB (Kang et al., 2008) y p53 (Lopez-Borges and Lazo, 2000).

1.4.2.a. VRK1 y p53

VRK1 fosforila al supresor de tumores p53 en la treonina 18 (Barcia et al., 2002; Lopez-Borges and Lazo, 2000; Vega et al., 2004), residuo implicado en la interacción de p53 con su inhibidor Mdm2 (Schon et al., 2002). Además de VRK1, otras quinasas también fosforilan a p53 en treonina 18: CK2, DNA-PK o Chk2 (Toledo and Wahl, 2006). La fosforilación en treonina 18 por VRK1 impide la interacción de p53 con Mdm2, y promueve el reclutamiento del cofactor p300, y por tanto la acetilación de p53, aumentando así la estabilidad de p53 y evitando su degradación. Este p53 estabilizado es transcripcionalmente activo y es capaz de inducir la transcripción de sus genes diana específicos, y por tanto de activar la respuesta dependiente de p53 (Vega et al., 2004). La activación de p53 por VRK1, a su vez, promueve la degradación de VRK1, estableciéndose un circuito de autorregulación. Así, p53, al ser activado por VRK1, es capaz de inducir la expresión de un gen que promueve la degradación de VRK1 por la vía de degradación proteolítica endocítica-lisosomal (Valbuena et al., 2006). Además, se ha comprobado que el cofactor p300 protege a VRK1 de esta degradación cambiando la especificidad de p53 por sus dianas de transcripción (Valbuena et al., 2008a). Existe una correlación inversa en los niveles de expresión de p53 y VRK1 en distintas líneas celulares estudiadas, que demuestran la existencia de este circuito de autorregulación entre VRK1 y p53 (Valbuena et al., 2006). Además, en carcinomas de pulmón con mutaciones en p53 que lo inactivan transcripcionalmente, se detectan niveles de VRK1 anormalmente elevados (Valbuena et al., 2007b). Se ha propuesto que la activación de p53 por VRK1, y la consecuente degradación de VRK1 inducida por p53, funcionan en condiciones de crecimiento normales en ausencia de estrés, y serviría para mantener unos niveles basales de p53 activado. Así, en caso de producirse algún estrés celular, se produciría un cambio en el balance p53/VRK1 que promovería la activación mantenida de p53 (Vega et al., 2004).

1.4.2.b. VRK1 y los factores de transcripción ATF2 y c-Jun

Otros factores de transcripción que participan en respuesta a numerosos tipos de estrés celular son también dianas de fosforilación de VRK1.

El factor de transcripción c-Jun es fosforilado por diversas MAP quinasas (*Mitogen-Activated Protein*), incluyendo ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) y JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) (Chang and Karin, 2001), para regular la expresión génica en respuesta a estrés, promoviendo apoptosis, proliferación u oncogénesis (Dunn et al., 2002; Shaulian and Karin, 2002). VRK1 fosforila a c-Jun en serina 63 y serina 73, promoviendo la acumulación intracelular y estabilización de c-Jun de manera independiente de JNK, y estimulando la transcripción dependiente de c-Jun. JNK fosforila estos mismos residuos en c-Jun, por lo que el efecto de ambas quinasas sobre c-Jun debe ser aditivo o cooperativo (Sevilla et al., 2004a).

ATF2, factor de transcripción de la familia de factores ATF/CREB de respuesta a AMP cíclico, activa genes implicados en crecimiento celular, diferenciación, respuesta inmune y respuesta a estrés, promoviendo proliferación y oncogénesis (van Dam and Castellazzi, 2001). Es activado por distintas quinasas como JNK, p38 o ERK (Bhoulmik and Ronai, 2008). VRK1 fosforila a ATF2 en los residuos serina 62 y treonina 73, aumentando los niveles intracelulares de ATF2 y la transcripción dependiente de éste. JNK fosforila a ATF2 en residuos muy próximos a estos (treonina 69 y treonina 71), y tiene un efecto aditivo con VRK1 en la estimulación de la actividad de ATF-2 (Sevilla et al., 2004b). También los residuos de ATF2 diana de VRK1 lo son de las quinasas PKA (*Protein Kinase A*) y CaMK-IV (quinasa dependiente de calmodulina IV) (Sevilla et al., 2004b).

Según estos datos, puede decirse que VRK1 regula la transcripción génica a través de su participación en una red compleja de fosforilaciones de factores de transcripción, en la que participan distintas quinasas, que responden a distintos estímulos, y en la que la respuesta final va a depender del tipo de estímulo, el tipo celular, y el balance entre las distintas vías de respuesta (figura 5). La función específica de las fosforilaciones de ATF-2 y c-Jun por VRK1 aún no ha sido determinada. Así mismo, tampoco se conoce el tipo de estímulos al que puede responder VRK1. En este trabajo se estudiará la posible activación de VRK1 en respuesta a estrés genotóxico.

Figura 5. Regulación de la transcripción génica por VRK1. Esquema de los factores de transcripción regulados por VRK1, a su vez regulados por una red de distintas quinasas que responden a diferentes estímulos extracelulares. Adaptado (Sevilla et al., 2004b) y (Klerkx et al., 2009).

1.4.2.c. VRK1 y el factor de transcripción CREB

Un estudio reciente describe la fosforilación del factor de transcripción CREB por VRK1 en la serina 133 (Kang et al., 2008), residuo implicado en la activación de CREB (Johannessen et al., 2004). Esta fosforilación promueve la unión de CREB al elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) del promotor del gen de ciclina D1, activando la transcripción de esta última. La unión de VRK1 a CREB se produce durante la transición G1/S. Este resultado liga la función de VRK1 con la regulación de la progresión del ciclo celular, en concreto con la progresión de la fase G1 a S a través de la inducción de la expresión de ciclina D1. Además, estos autores demuestran que la expresión de VRK1 es estimulada por la unión de Myc al promotor del gen de VRK1 (Kang et al., 2008). Anteriormente, se había descrito que los niveles de ARN mensajero de VRK1 se regulan positivamente tras la inducción de la expresión del factor de transcripción Myc en células B humanas (Schuhmacher et al., 2001).

1.4.3. Implicación de VRK1 en el control de la proliferación y la progresión del ciclo celular

Diversos estudios acerca de la expresión de VRK1 apuntan a su participación en el control de la proliferación y de la progresión del ciclo celular.

La proteína VRK1 se expresa de manera ubicua, con altos niveles de expresión en tejidos con altas tasas de proliferación (Nezu et al., 1997). El nivel de expresión de VRK1 es mayor en líneas celulares tumorales que en líneas celulares normales (Valbuena et al., 2007a). Durante el desarrollo hematopoyético del ratón, los niveles máximos de expresión de VRK1 murina coinciden con la máxima expansión celular de las células fetales de hígado y sangre periférica (Vega et al., 2003). En epitelios escamosos normales humanos, VRK1 se expresa cerca de la capa basal, donde hay mayor proliferación celular, y su expresión se pierde a medida que las células epiteliales se diferencian, patrón de expresión similar al del marcador de proliferación Ki67 (Santos et al., 2006). La misma correlación se observa entre VRK1 y p63 (marcador de células en proliferación y células madre) en epitelio escamoso de faringe (Valbuena et al., 2008b).

La expresión de VRK1 a nivel proteico correlaciona con marcadores de proliferación en carcinomas de pulmón y de cabeza y cuello: survivina, ciclina B1 y A, CDK2, CDK6, fosfo-Rb, Ki67 y topoisomerasa II en el caso de carcinomas de cabeza y cuello (Santos et al., 2006), y survivina y ciclina A en carcinomas de pulmón (Valbuena et al., 2007b). En ambos tipos de cánceres, VRK1 correlaciona inversamente con p16, un inhibidor de la progresión del ciclo celular. Se ha encontrado VRK1 sobreexpresada a nivel génico en sarcoma de tejidos blandos (Nishijo et al., 2009).

La expresión de VRK1 es regulada positivamente por Myc (Kang et al., 2008; Schuhmacher et al., 2001), así como por E2F1, factor de transcripción esencial en la transición G1/S (Cam and Dynlacht, 2003): E2F1 regula positivamente la expresión de VRK1, mientras

que p16 junto con Rb no fosforilable reducen la expresión de VRK1 (Santos et al., 2006; Vernell et al., 2003). El promotor del gen de VRK1 tiene un sitio de unión de E2F (Semizarov et al., 2004).

Por su parte, se ha visto que VRK1 incrementa la actividad de los promotores de los genes de CDK2 y survivina (Santos et al., 2006), además del de ciclina D1, como se ha comentado anteriormente (Kang et al., 2008), a través de la activación de CREB.

Además del posible papel de VRK1 en la transición G1/S, a la que apuntan la regulación del factor de transcripción CREB en esa etapa del ciclo celular (Kang et al., 2008), y la regulación de su expresión por el factor E2F1 (Santos et al., 2006), recientemente se ha demostrado que VRK1 es necesaria para la salida de la fase G0 y entrada en la fase G1 del ciclo celular (Valbuena et al., 2008b). La retirada de suero a células en cultivo provoca la disminución de los niveles de ARN mensajero de VRK1 y la adición de suero a células paradas en la fase G0 activa al promotor de VRK1, aumentando los niveles de su ARN mensajero. La activación del gen de VRK1 en la transición G0/G1 es paralela a la de *myc* y *fos*, y es anterior a la expresión del ARN mensajero de ciclina D1, lo que sitúa a VRK1 como un gen de respuesta temprana en la progresión del ciclo celular. Además, el silenciamiento de VRK1 con ARN de interferencia específico produce una disminución en la proliferación celular, y una parada del ciclo en G0 (Valbuena et al., 2008b; Vega et al., 2004).

Todas estas características hacen que VRK1 pueda ser una diana idónea para el desarrollo de inhibidores específicos que controlen la proliferación celular en terapia oncológica. Además, podría servir como marcador de pronóstico en cánceres. Dos trabajos apoyan esta afirmación: en tumores de mama, bajos niveles del gen de VRK1, conjuntamente con bajos niveles de otros genes relacionados con proliferación, constituyen un marcador de buen pronóstico (Fournier et al., 2006). La sobreexpresión de varios genes entre los que se encuentra el de VRK1, constituye un patrón de expresión génica marcador de mal pronóstico en el tratamiento clínico de pacientes con cáncer de mama (Martin et al., 2008).

1.4.4. VRK1 y su papel en el mantenimiento de la arquitectura nuclear

A través de la fosforilación de BAF (*Barrier to Autointegration Factor*), se ha postulado un papel de VRK1 en el mantenimiento de la arquitectura nuclear. BAF es una pequeña proteína de 10 KDa que se une como homodímero al ADN, además de a los componentes de la membrana interna del núcleo con dominios LEM (Lap2, emerin, MAN1) (Shumaker et al., 2001). La localización de BAF varía durante el ciclo celular, y es crítica para su función. Durante interfase, se localiza en la envuelta nuclear y se asocia a la cromatina, participando en el anclaje de la cromatina a la periferia nuclear. En mitosis, BAF es soluble y adquiere una localización más difusa. En anafase juega un papel esencial en el reensamblaje de la envuelta nuclear mediante el reclutamiento de las proteínas de la membrana interna nuclear

(Haraguchi et al., 2001). VRK1 fosforila a BAF en su parte amino terminal, principalmente en la serina 4, y en menor grado en las treoninas 2 y 3 (Nichols et al., 2006). Esta fosforilación impide la unión de BAF al ADN y consecuentemente regula la localización de BAF. Así, BAF fosforilado por VRK1 se localiza en fracciones solubles, y BAF no fosforilado se une a la cromatina y la matriz nuclear. De esta manera, se postula que VRK1, a través de la regulación de BAF, juega un papel importante en la dinámica de la envuelta nuclear (Nichols et al., 2006).

Esta función de VRK1 está conservada en otros organismos. El ortólogo de VRK1 en *C. elegans* también fosforila a BAF y tiene un papel esencial en el reensamblaje de la envuelta nuclear tras mitosis, regulando la localización de BAF y su interacción con la cromatina (Gorjanacz et al., 2007). Se ha detectado la fosforilación de BAF por NHK-1 en oocitos de *D. melanogaster*, con una función en la formación del cariosoma (Lancaster et al., 2007). B1 también fosforila a BAF durante la infección viral, evitando la unión de BAF al ADN viral, y favoreciendo la infección, mecanismo que emula al de la fosforilación de BAF por VRK1 en la dinámica de la envuelta nuclear (Wiebe and Traktman, 2007).

1.4.5. VRK1 y mitosis: fosforilación de la histona H3

Las modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas nucleosomales son un importante mecanismo para procesos como la transcripción y la mitosis (Berger, 2007). La fosforilación de la cola amino terminal de la histona H3 es importante para la condensación de la cromatina en mitosis, así como para la activación de la transcripción en respuesta a señales mitogénicas (Cheung et al., 2000; Hsu et al., 2000; Sassone-Corsi et al., 1999). VRK1 es capaz de fosforilar a histona H3 en los residuos treonina 3 y serina 10 en mitosis (Kang et al., 2007), residuos también fosforilados respectivamente por las quinasas Haspin (Dai et al., 2005) y Aurora B (Crosio et al., 2002; Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005; Hsu et al., 2000). La fosforilación de histona H3 en treonina 3 por Haspin se produce principalmente durante prometáfase y metafase y se relaciona con el correcto alineamiento de los cromosomas en mitosis (Dai et al., 2005). La fosforilación de histona H3 en serina 10 se relaciona con la condensación de la cromatina en mitosis (Prigent and Dimitrov, 2003; Wei et al., 1999), y se da a lo largo de todas las fases de la mitosis (Crosio et al., 2002; Li et al., 2005; Polioudaki et al., 2004). La fosforilación de serina 10 por VRK1 en mitosis es similar a la producida por Aurora B, y ambas quinasas son necesarias para una total fosforilación de este residuo durante la mitosis (Kang et al., 2007). Además, la sobreexpresión de VRK1 produce la condensación del núcleo de células en interfase, al igual que la expresión ectópica de NIMA (*Never-In-Mitosis*, quinasa de *A. nidulans* que fosforila histona H3 en serina 10) en células eucarióticas (Lu and Hunter, 1995). Estos datos señalan un papel de VRK1 en la modificación de la cromatina durante la mitosis, papel también asociado a la quinasa NHK-1 de *D. melanogaster*, que

fosforila la histona H2A asociada al nucleosoma durante mitosis (Aihara et al., 2004; Ivanovska et al., 2005).

1.4.6. Regulación de VRK1 a nivel postraducciona

Mientras que existe gran cantidad de información acerca de la regulación de la expresión de VRK1, poco es conocido acerca de la regulación de la función de la proteína y de su actividad. Las modificaciones postraduccionales de proteínas juegan un papel relevante en el control de su localización subcelular y su actividad. Hasta el momento, no se ha descrito ninguna modificación postraducciona de VRK1 *in vivo*. Se ha determinado, mediante ensayos *in vitro*, un residuo de autofosforilación de VRK1 en la región carboxilo terminal (treonina 355), si bien no es el único residuo de autofosforilación y no se conoce si juega algún papel relevante en la actividad o localización de la quinasa *in vivo* (Barcia et al., 2002). La autofosforilación de VRK1 debe jugar un papel en la estabilidad de la proteína, ya que la quinasa inactiva expresada exógenamente es mucho más inestable que la silvestre y presenta una vida media mucho más corta (Valbuena et al., 2008b). Dadas las características estructurales de VRK1, se postula que la región carboxilo terminal debe tener un papel clave en la regulación de la quinasa (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Programas de predicción de estructura pronostican una estructura relajada de esta región, lo que la debe hacer accesible a modificaciones postraduccionales o interacciones con otras proteínas, de manera que pueda adoptar distintas conformaciones, regulando así el dominio catalítico, y también la localización, estabilidad de la proteína, o su especificidad de sustrato.

Por otro lado, VRK1 tiene en su secuencia gran cantidad de dianas consenso de fosforilación por otras quinasas, como PKC, PKA, caseína quinasa, *polo-like* quinasas, o quinasas relacionadas con PI3K. En un estudio realizado para identificar residuos fosforilados por ATM o ATR en respuesta a luz ultravioleta mediante técnicas proteómicas, se identificaron 570 sitios de fosforilación, siendo uno de ellos el residuo treonina 378 de VRK1 (Stokes et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento no existen más datos acerca de posibles modificaciones postraduccionales en VRK1, ni de la existencia de reguladores *upstream* de VRK1.

Igualmente, hasta ahora no se ha descrito ninguna interacción proteína-proteína de VRK1, salvo su interacción con sus sustratos de fosforilación ATF2, c-Jun, CREB e histona H3, que deben ser interacciones transitorias. La identificación de interacciones estables de VRK1 puede ayudar a entender más aspectos de su función, y a encontrar posibles reguladores de la quinasa, que bien pueden introducir modificaciones postraduccionales, modificar su actividad o especificidad, o formar complejos estables con ella, lo que además podría contribuir a situar a la quinasa dentro de distintas vías de señalización celular. La identificación de nuevas interacciones proteína-proteína de la quinasa VRK1 es uno de los objetivos de este trabajo.

1.5. Función de las quinasas humanas VRK2A y VRK2B

Al igual que VRK1, VRK2 inicialmente se relacionó con un papel en proliferación celular, al ser encontrada con alta expresión en tejidos altamente proliferativos (Nezu et al., 1997; Vega et al., 2003). La diferencia principal con VRK1 radica en su localización. La isoforma VRK2A es citosólica y se localiza tanto en el citoplasma como anclada en membranas del retículo endoplasmático, mitocondria y núcleo, debido a la región transmembrana dentro de su región carboxilo terminal. La isoforma VRK2B carece de la región transmembrana, y aunque no presenta señal de localización nuclear, se detecta tanto en el citoplasma como en el núcleo (Blanco et al., 2006). VRK2A se expresa en todas las líneas celulares estudiadas, no así VRK2B, que presenta niveles variables, seguramente dependiendo de los mecanismos de maduración alternativa de cada tipo celular.

La función de VRK2B tiene cierta redundancia con la de VRK1, ya que también es capaz de fosforilar y activar al factor de transcripción p53 (Blanco et al., 2006). El análisis comparado de la expresión de VRK1 y VRK2B revela que puede existir una cierta complementariedad entre ellas, de forma que cuando VRK1 presenta una localización citoplasmática, existe una alta expresión de VRK2B nuclear, pudiendo así reemplazar funcionalmente a VRK1 en el núcleo (Blanco et al., 2006).

Dada la homología entre VRK1 y VRK2, no es de extrañar que VRK2A comparta sustratos nucleares *in vitro* con VRK1 y VRK2B, como p53 o BAF. Sin embargo, estas fosforilaciones no tienen asociada una función *in vivo*, dada la localización citoplasmática de la isoforma VRK2A (Blanco et al., 2006; Nichols et al., 2006). La función de VRK2A se relaciona con la modulación de la transcripción génica en respuesta a estrés por hipoxia e interleuquina-1 β mediada por JNK (Blanco et al., 2007; Blanco et al., 2008). JIP1 es una proteína de ensamblaje o *scaffold* que integra la vía de MAP quinasas MLK-MKK7-JNK en respuesta a estímulos de estrés, activando c-Jun y la transcripción dependiente de sitios AP1 (Morrison and Davis, 2003). VRK2A interacciona establemente con JIP1, TAK1 (MAP3K de la familia MLK) y MKK7, lo que produce una inhibición de la asociación de JNK al complejo, y finalmente una menor activación de JNK, inhibiendo de esta manera la respuesta. Este efecto es independiente de la actividad quinasa de VRK2A. Esta función de VRK2A pone de manifiesto que las interacciones entre componentes de una vía de señalización pueden modular la respuesta y dar especificidad a una señal. VRK2A, a través de la interacción con complejos de MAP quinasas, puede alterar el balance de las respuestas de distintas vías de señalización a una misma señal (Blanco et al., 2007; Blanco et al., 2008).

1.6. Función de la quinasa humana VRK3

Existe muy poca información acerca de la función de esta quinasa. Su localización es principalmente nuclear (Kang and Kim, 2006; Nichols and Traktman, 2004) debido a su señal de localización nuclear. Su falta de actividad quinasa, y la conservación del plegamiento de su dominio catalítico hacen pensar que pueda funcionar como proteína de anclaje para la formación de complejos de señalización (Scheeff et al., 2009). De hecho, la interacción del dominio catalítico de VRK3 con la fosfatasa dual VHR (*Vaccinia-H1-Related*) incrementa la actividad de ésta (Kang and Kim, 2006; Kang and Kim, 2008). VHR es una fosfatasa de MAP quinasas (MKP), capaz de desfosforilar a ERK. La interacción de VRK3 con VHR incrementa la desfosforilación de ERK en el núcleo, y por tanto inhibe la vía de señalización de ERK. ERK activado por PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, análogo de diacilglicerol) induce un aumento en los niveles de VRK3, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación negativo en la señalización de las MAP quinasas a través de VRK3 (Kang and Kim, 2006).

1.7. Fenotipos asociados a la deficiencia en la expresión de distintas VRK

Los primeros análisis acerca de los fenotipos asociados a las mutaciones o pérdida de proteínas VRK han sido realizados en organismos modelo. Los fenotipos observados varían desde la letalidad embrionaria en los casos más severos, a la esterilidad de los individuos adultos.

En *D. melanogaster*, una cepa con una mutación hipomórfica en *nhk-1* presenta un fenotipo caracterizado por esterilidad en moscas hembra y macho debido a defectos en la formación del huso en meiosis (Ivanovska et al., 2005); otras mutaciones en *nhk-1* producen defectos mitóticos como formación aberrante del huso mitótico (Cullen et al., 2005). Mutaciones severas en el gen de NHK-1 son letales para el embrión (Cullen et al., 2005).

En *C. elegans*, la eliminación de ceVRK-1 por ARN de interferencia específico también es letal embrionario, ya que aparecen fallos en las divisiones celulares, como defectos en la organización de la cromatina y del huso mitótico (Kamath et al., 2003) y fallos en la formación de los poros nucleares de la membrana nuclear (Klerkx et al., 2009); en adulto se produce un fenotipo de crecimiento lento (Kamath et al., 2003). Además, mutaciones en *vrk-1* en células de la línea germinal resulta en la incapacidad de formar gametos y esterilidad (Klerkx et al., 2009).

En lo que se refiere a las VRK humanas, se ha visto que el silenciamiento de la expresión de VRK1 humana con ARN de interferencia en células en cultivo reduce la proliferación y produce una parada del ciclo celular en G0 (Valbuena et al., 2008b; Vega et al.,

2004). También se ha analizado el fenotipo en ratones hipomórficos para VRK1 (expresan un 15% de la proteína completa). Los ratones son viables, pero tanto machos como hembras son infértiles. La falta de VRK1 produce defectos en la proliferación o diferenciación de las células espermatogénicas, que conducen a la falta de mitosis y meiosis en las células adultas de testículos del ratón (Wiebe et al., 2009).

Un reciente estudio demuestra que una mutación en el gen de VRK1, que introduce un codón de parada en la señal de localización nuclear (R358X), produce un síndrome atípico denominado atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelosa (SMA-PCH), una variante rara de atrofia muscular infantil, que causa atrofia muscular, ataxia, microcefalia, insuficiencia respiratoria y muerte prematura (Renbaum et al., 2009). Este hallazgo sugiere que VRK1 pueda tener un papel en el desarrollo del sistema nervioso y el mantenimiento neuronal.

Además, los efectos de la eliminación del gen *vrk2* en ratón han sido estudiados de forma inadvertida. El gen *vrk2* se transcribe en la dirección opuesta en el genoma de ratón al gen *pog*. Los ratones *vrk2*(-/-)/*pog*(-/-) son viables, y presentan defectos mucho más severos en la proliferación de las células germinales que los ratones con una mutación por inserción en el gen *pog*. Por tanto, es posible que VRK2 también tenga una función en el desarrollo de las células germinales (Lu and Bishop, 2003).

En conjunto, estos datos apoyan la importancia de VRK1 en el control de la proliferación celular, especialmente en la proliferación de células germinales. Además, indican que VRK1 es importante durante el desarrollo, ya que la carencia total de VRK1 produce la muerte embrionaria por fallos en la división celular, y en concreto, apuntan a una participación de VRK1 en el desarrollo neuronal (Wiebe et al., 2009).

2. CARACTERÍSTICAS, FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA GTPasa RAN

2.1. La superfamilia de GTPasas Ras

La familia de proteínas G pequeñas, o proteínas de unión a GTP, son proteínas homólogas a la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas, con un dominio globular de unión a GTP. Constituyen una superfamilia compuesta por más de 150 proteínas, que comparten una misma función: hidrolizar un fosfato gamma del nucleótido guanosín trifosfato (GTP) para dar lugar a un fosfato inorgánico y guanosín difosfato (GDP), de ahí que se clasifiquen como GTPasas (Takai et al., 2001). Los miembros de esta familia mejor conocidos son las GTPasas Ras, por eso las proteínas G pequeñas también se conocen como superfamilia de GTPasas Ras. Esta superfamilia se puede clasificar estructuralmente en al menos cinco subfamilias: la familia Ras, Rho, Arf, Ran y Rab (Goldfinger, 2008). Las proteínas G pequeñas regulan una amplia variedad de funciones celulares, actuando como relojes biológicos, que marcan los tiempos de inicio y finalización de funciones celulares específicas. Además no solo juegan un papel en la regulación temporal de las funciones específicas celulares, sino también en la regulación espacial. Controlan procesos tan variados como el crecimiento celular, la diferenciación, la movilidad celular o el transporte de vesículas lipídicas.

Las GTPasas actúan como un interruptor molecular que cicla entre un estado de unión a GDP y otro de unión a GTP (figura 6). Generalmente, una típica proteína G es activa cuando está unida a GTP, e inactiva cuando está unida a GDP. Cuando el GTP unido es hidrolizado a GDP, el dominio globular de unión al GTP sufre un cambio conformacional que inactiva a la proteína (Bourne et al., 1991). Debido al bajo grado intrínseco de hidrólisis y disociación de nucleótido que presentan las GTPasas, este ciclo es controlado por dos tipos de reguladores: GAPs (proteínas activadoras de GTPasa), que estimulan la hidrólisis intrínseca del GTP, y GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina), que inducen una rápida disociación del nucleótido unido (GDP), permitiendo una rápida activación al estado de unión a GTP. Otro tipo de reguladores son los GDI (inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina), que estabilizan la forma inactiva de las GTPasas, al evitar el intercambio de GDP por el factor GEF correspondiente. Las proteínas que interaccionan con la forma activa de las GTPasas se denominan efectores.

Figura 6. Esquema del ciclo GDP/GTP de las GTPasas. Los GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) inducen la disociación de GDP de la GTPasa y el intercambio por GTP. Los GAPs (proteínas activadoras de GTPasa) estimulan la actividad intrínseca de la GTPasa de hidrólisis del GTP unido, para dar lugar a GDP.

2.2. Ran: el miembro nuclear de la superfamilia de GTPasas Ras

Ran (*Ras-related nuclear*) forma en sí misma una subfamilia dentro de la superfamilia de GTPasas Ras. A diferencia de otras GTPasas Ras, presenta una localización predominantemente nuclear (Bischoff and Ponstingl, 1991a; Bischoff and Ponstingl, 1991b). Se expresa a altos niveles en organismos eucariotas, es esencial para la viabilidad de estos, y presenta un alto grado de conservación entre homólogos de distintas especies que van de humanos a levaduras y plantas (Sazer and Dasso, 2000).

Ran, originalmente denominada como TC4, fue identificada mediante un rastreo o *screening* de una librería de ADN complementario de teratocarcinoma humano con oligonucleótidos degenerados, basados en la secuencia DTAGQE conservada de miembros de la familia Ras (Drivas et al., 1990). A diferencia de otras proteínas relacionadas con Ras, Ran no contiene un residuo cisteína próximo al extremo carboxilo, conocido como el sitio aceptor para modificaciones postraduccionales como la prenilación o palmitoilación, que sí se da en la mayoría de las GTPasas Ras. En lugar de la cisteína, Ran presenta una secuencia de residuos ácidos cargados negativamente en el extremo carboxilo terminal, DEDDDL (Drivas et al., 1990). La localización subcelular de Ran, al no estar regulada por modificaciones postraduccionales, depende exclusivamente de su interacción con sus reguladores y efectores. En células HeLa, Ran es la GTPasa Ras más abundante, representando el 0,4% del total de las proteínas celulares (Bischoff and Ponstingl, 1991b). Estas características predecían una función para esta GTPasa distinta a la del resto de GTPasas Ras, e hicieron que se englobara dentro de una nueva rama en la superfamilia Ras.

La función mejor establecida y estudiada de la GTPasa Ran es su papel central en la regulación del transporte de macromoléculas entre el núcleo y citoplasma a través de los poros de la membrana nuclear (Clarke and Zhang, 2008; Stewart, 2007). En 1993, dos grupos independientes identificaron a Ran como una proteína necesaria para la importación de proteínas al núcleo (Melchior et al., 1993; Moore and Blobel, 1993), haciendo uso de un sistema de transporte *in vitro* compuesto de núcleos y fracciones citoplasmáticas de huevos de *X. laevis*, a partir del cual, en ambos casos, se aisló y purificó bioquímicamente a Ran como un factor esencial para el transporte.

El transporte de macromoléculas a través de la membrana nuclear abarca desde la exportación al citoplasma de moléculas de ARN mensajero o de transferencia sintetizadas en el núcleo, la importación activa de proteínas nucleares, que son concentradas en el nucleoplasma, y la exportación de proteínas citoplasmáticas que son excluidas del núcleo por transporte activo (Gorlich and Kutay, 1999). Toda esta gran variedad de sustratos transportados son reconocidos por distintos receptores solubles de transporte, que se unen a ellos de manera directa, o a través de moléculas adaptadoras, y los transportan a través de los complejos del poro nuclear. La

mayoría de los sustratos transportados se unen a receptores tipo importina- β (también conocidos como familia de carioferinas, que incluye importinas y exportinas). La exportación de ARN mensajero recae en otro tipo de receptores distintos a los de importina- β , la familia Tap/Mex67. Los receptores van y vienen continuamente entre el núcleo y el citoplasma, de manera independiente de Ran, e interaccionan específicamente con motivos ricos en fenilalanina y glicina presentes en las nucleoporinas del poro nuclear (Englmeier et al., 1999; Ribbeck et al., 1999; Weis, 2002). La función de la GTPasa Ran consiste en regular las interacciones entre los receptores y los sustratos transportados (Gorlich and Kutay, 1999). Para ello es clave el ciclo de conversión entre el estado de unión a GDP y el de unión a GTP de la GTPasa, y la localización subcelular de los reguladores de Ran, que determinan estos dos estados, repartidos entre el núcleo y el citoplasma, lo que va a establecer la direccionalidad del transporte núcleo-citoplasma. Los cambios conformacionales en Ran resultantes de la unión del nucleótido actúan como interruptor molecular para el ensamblaje y desensamblaje de los complejos sustrato-receptor, un mecanismo que recuerda al utilizado por otras proteínas de la familia Ras. La compartimentalización de los reguladores de Ran establece un gradiente de RanGTP a lo largo de la envuelta nuclear, lo que va a asegurar que el sustrato a importar o exportar se una y consecuentemente se disocie de sus respectivos receptores de transporte en el compartimento celular adecuado (Izaurre et al., 1997; Richards et al., 1997).

Sin embargo, tras la identificación de la función de Ran en el transporte núcleo-citoplasma en 1993, diversos estudios empezaron a plasmar otras funciones para la GTPasa, especialmente en situaciones de ausencia de membrana nuclear, es decir, durante mitosis (Clarke et al., 1995; Kornbluth et al., 1994; Ren et al., 1994). El análisis de las consecuencias de la perturbación del sistema de la GTPasa Ran resultó en una larga lista de procesos celulares que se veían afectados, aparte del transporte núcleo-citoplasma, como la replicación del ADN, entrada en mitosis, crecimiento nuclear, estructura de la envuelta nuclear, estructura de la cromatina, y progresión del ciclo celular (Sazer, 1996). En conjunto, indicaban que Ran era una compleja y multifuncional proteína con funciones independientes del transporte (Sazer and Dasso, 2000). Sin embargo, el mecanismo por el cual Ran controla estos procesos es similar al del transporte, esto es, la localización de los reguladores de Ran genera una acumulación de RanGTP en torno a los cromosomas después de la rotura de la envuelta nuclear, que a su vez estabiliza o desestabiliza complejos específicos de sustrato-receptor de transporte, asegurando que proteínas que participan o regulan el ciclo celular, están presentes y activadas en el sitio correcto, y en el tiempo correcto (Kalab et al., 2006; Sazer, 2005). En los últimos años, se ha hecho cada vez más evidente el papel de Ran en la coordinación de la mitosis, dada su participación en la regulación de múltiples procesos, como el ensamblaje del huso mitótico, la duplicación del centrosoma, la unión de microtúbulos al cinetocoro, la dinámica de

microtúbulos, el alineamiento de los cromosomas, y la dinámica de la envuelta nuclear (Clarke and Zhang, 2008).

2.3. El ciclo RanGDP/RanGTP. Reguladores de la GTPasa Ran

El único GEF conocido para la GTPasa Ran es RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*), una proteína nuclear que se asocia a la cromatina, y que estimula la actividad de intercambio de nucleótido de Ran, produciendo RanGTP en el núcleo (Bischoff and Ponstingl, 1991a) (figura 7). El GAP de Ran, RanGAP1, es por el contrario citosólica, y estimula la actividad GTPasa intrínseca de Ran produciendo RanGDP en el citoplasma (Bischoff et al., 1994). Además, en interfase, Ran es importada al núcleo por un mecanismo dependiente de NTF2 (factor de transporte nuclear 2) (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998), una proteína pequeña que interacciona con RanGDP. La localización subcelular de RanGAP1 y RCC1, sumado a la importación de Ran por el factor NTF2, produce una relativa alta concentración de RanGTP en el núcleo, confinando RanGDP al citoplasma, con una menor concentración (Kalab et al., 2006).

Figura 7. Esquema del ciclo RanGDP/RanGTP. RCC1, el factor de intercambio de nucleótido de Ran, es nuclear y genera RanGTP en el núcleo. La proteína citosólica RanGAP1 activa la actividad GTPasa de Ran, produciendo RanGDP en el citoplasma.

2.3.1. RCC1, el factor de intercambio de nucleótido de Ran

RCC1 fue inicialmente identificado como el gen defectivo de una línea celular de hámster sensible a temperatura, tsBN2, (Nishimoto et al., 1978) que a la temperatura restrictiva presentaba arresto en la fase G1 del ciclo celular, condensación prematura de los cromosomas, y después de la entrada prematura en mitosis, incapacidad para completarla. El gen codifica una proteína nuclear asociada a la cromatina (Ohtsubo et al., 1989), la cual es bastante abundante y se estima que está presente hasta en una copia por nucleosoma (Dasso et al., 1992). El análisis de la secuencia de aminoácidos revela la presencia de una serie de siete repeticiones internas de un motivo de entre 51 y 68 residuos, que da lugar a una estructura tipo β -propeller (estructura tipo toroidal, o “molinillo β ”) de siete hojas beta. Este motivo de RCC1 es diferente al motivo

WD40 que forma la estructura β -*propeller* de la subunidad beta de las proteínas G (Renault et al., 1998).

RCC1 humano fue purificado a partir de la cromatina de células HeLa en un complejo estable con la GTPasa Ran (Bischoff et al., 1990; Bischoff and Ponstingl, 1991b), lo que llevó a la identificación de RCC1 como el GEF de Ran (Bischoff and Ponstingl, 1991a). RCC1 estimula el intercambio de nucleótidos en Ran unas cinco órdenes de magnitud, pero no presenta preferencias por GTP o GDP, por lo que *in vitro* es capaz de intercambiar ambos nucleótidos (Klebe et al., 1995a). Sin embargo, *in vivo*, la concentración del nucleótido GTP está unas treinta veces en exceso sobre la de GDP, por lo que RCC1 intercambia GDP por GTP, produciendo RanGTP (Klebe et al., 1995b). Como los factores de intercambio de otras GTPasas, RCC1 estimula la liberación del nucleótido de Ran mediante la estabilización de la forma libre de nucleótido de Ran (figura 8). Es decir, primero se forma un complejo ternario RCC1-Ran-GDP, en el cual Ran ve disminuida su afinidad por el nucleótido, produciéndose la salida de éste para dar lugar a un complejo binario RCC1-Ran estable. En presencia de exceso de GTP (lo que ocurre en condiciones fisiológicas), se forma otro complejo ternario RCC1-Ran-GTP, que rápidamente libera a RCC1 (Klebe et al., 1995a; Klebe et al., 1995b).

Figura 8. Esquema de la reacción de intercambio de GDP por GTP en Ran catalizada por RCC1. RCC1 se une a RanGDP, produciéndose la salida de GDP y formándose un complejo intermedio estable RCC1-Ran. Después se incorpora GTP, produciéndose la salida de RCC1, y dando lugar a RanGTP.

La estructura β -*propeller* confiere a RCC1 una apariencia de *donut*. El estudio bioquímico y estructural de la interacción RCC1-Ran ha confirmado que Ran se une a RCC1 por una de sus caras, mientras que la otra cara de RCC1 se une a la cromatina (Azuma et al., 1999; Renault et al., 2001). Además, residuos ácidos en RCC1 juegan un papel esencial en la reacción de intercambio mediante su interacción con una lisina en el *loop* de unión a fosfato (P *loop*) de Ran (Renault et al., 2001). RCC1 se une por una de sus caras a la cromatina, una interacción mediada preferentemente por las histonas H2A y H2B. Además, la interacción con ellas incrementa la actividad de intercambio de nucleótido de RCC1 (Nemergut et al., 2001). La regulación de la actividad de RCC1 se detalla más adelante en el apartado 3.5 de la Introducción.

2.3.2. RanGAP1 y los cofactores RanBP

La actividad GTPasa intrínseca de Ran es prácticamente nula, pero su interacción con la proteína citoplasmática RanGAP1, su proteína activadora de actividad GTPasa (GAP), estimula

la hidrólisis de GTP *in vitro* unas cinco órdenes de magnitud (Bischoff et al., 1994). La actividad de RanGAP1, a su vez, es regulada por un tipo de efectores de la GTPasa Ran, las proteínas RanBP (Ran *Binding Protein*), que contienen los denominados dominios de unión a RanGTP o dominios RanBD (Ran *Binding Domain*), una secuencia de 135 aminoácidos suficiente para unirse por sí sola a RanGTP (Coutavas et al., 1993).

Entre las proteínas RanBP se encuentra RanBP1, una proteína principalmente citoplasmática, con un solo dominio RanBD. La principal función de RanBP1 es actuar como cofactor de RanGAP1 para estimular la hidrólisis de GTP por Ran (Bischoff et al., 1995). RanBP1, *in vitro*, incrementa unas diez veces la hidrólisis de GTP por Ran estimulada por RanGAP1 (Bischoff et al., 1995), ya que la unión de RanBP1 a RanGTP, facilita la unión de RanGAP1 a ésta (Macara, 2001). RanBP1 por sí sola no estimula la actividad GTPasa de Ran (Bischoff et al., 1995).

Otro cofactor de RanGAP1 es RanBP2, una gran nucleoporina que se localiza en la cara citoplasmática del complejo del poro nuclear, y que se asocia a RanGAP1 sumoilado (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Presenta cuatro dominios RanBD que interaccionan con RanGTP (Yokoyama et al., 1995). RanBP2 también favorece la actividad GTPasa de RanGAP1 (Macara, 2001).

2.3.3. Los reguladores de Ran establecen un gradiente de RanGTP en interfase y mitosis

La localización de los reguladores de la GTPasa Ran sugiere que debe existir un gradiente de concentración de RanGTP a través de la envuelta nuclear en interfase, y en torno a los cromosomas mitóticos condensados en mitosis, con una alta concentración de RanGTP en el núcleo, y en los cromosomas, ya que RCC1 está unido a la cromatina tanto en interfase como en mitosis y RanGAP1, RanBP1 y RanBP2 son citoplasmáticos. El establecimiento de este gradiente de RanGTP es esencial para la direccionalidad del transporte núcleo-citoplasma, y para el desarrollo de importantes procesos mitóticos, como el ensamblaje del huso mitótico o de la envuelta nuclear (Caudron et al., 2005; Izaurralde et al., 1997; Zhang et al., 2002).

La existencia del gradiente de RanGTP ha sido confirmada experimentalmente. En primer lugar se demostró en sistemas *in vitro*, utilizando extractos de huevos de *X. laevis* suplementados con núcleos, y fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (FRET). De esta manera, se pudo visualizar, por un lado, la existencia de una alta concentración de RanGTP (y de sustratos liberados de importinas) en torno a los cromosomas de extractos de huevos mitóticos de *X. laevis*, y por otro lado, la existencia de un enriquecimiento de RanGTP en el nucleoplasma en interfase, y de una diferencia de concentración de RanGTP entre el núcleo y el citoplasma (Kalab et al., 2002). Posteriormente, estos mismos autores visualizaron *in vivo* la existencia del gradiente de RanGTP en torno a los cromosomas de células HeLa en mitosis (Kalab et al., 2006). También, en estudios de mitosis en embriones de *D. melanogaster*,

se comprobó que Ran, en su mayoría, permanece asociada a estructuras del huso mitótico no cromosomales durante la mitosis, sugiriendo que RanGTP no se difunde libremente por el citoplasma mitótico una vez que es generado por RCC1 asociado a la cromatina (Trieselmann and Wilde, 2002).

2.4. Control del transporte núcleo-citoplasma por la GTPasa Ran

Como ya se ha comentado, el papel de la GTPasa Ran en el control del transporte núcleo-citoplasma consiste en regular el ensamblaje y desensamblaje de los complejos entre los sustratos transportados y los receptores de transporte, asegurando la direccionalidad del transporte. Los receptores de transporte tipo importina- β , o carioferinas, comprenden más de veinte miembros en mamíferos, y se componen de exportinas e importinas. Las carioferinas tienen papeles especializados, y cada una transporta específicamente unos sustratos. Las carioferinas son una familia de proteínas de unión a RanGTP, por tanto efectores de Ran (Gorlich et al., 1997), que funcionan como receptores de los sustratos a transportar, ya que se unen a sus motivos de importación (NLS o señal de localización nuclear) o exportación (NES o señal de exportación nuclear) (Gorlich and Kutay, 1999; Macara, 2001; Stewart, 2007; Weis, 2003). Las carioferinas comparten la habilidad de translocarse a través del complejo del poro nuclear mediante interacciones transitorias con motivos ricos en fenilalanina y glicina de componentes del poro nuclear (Frey et al., 2006; Rexach and Blobel, 1995).

La exportina por excelencia en mamíferos, que reconoce las secuencias NES en sustratos proteicos, es CRM1 (*Chromosome-Region Maintenance protein-1*). CRM1 tiene baja afinidad por las secuencias NES. Sin embargo, en el núcleo, RanGTP se une a CRM1, produciéndole un cambio conformacional que expone el sitio de unión a la señal de exportación nuclear, aumentando por tanto la afinidad de CRM1 por la señal NES (Petosa et al., 2004). De esta manera se forma un complejo ternario estable RanGTP-CRM1-sustrato, que se transloca a través del poro de la envuelta nuclear. Una vez en el citoplasma, RanBP1 y RanBP2 compiten con CRM1 por la unión a RanGTP, desestabilizando el complejo ternario, y favoreciendo la unión de RanGAP1. RanGAP1 estimula la hidrólisis de GTP por Ran, produciendo por tanto la disociación del complejo, y liberándose RanGDP, CRM1 y el sustrato (figura 9) (Askjaer et al., 1999; Bischoff and Gorlich, 1997).

RanBP3, otra proteína con un dominio RanBD de unión a RanGTP, funciona como cofactor de CRM1. RanBP3 se une a CRM1 en el núcleo e incrementa la afinidad de éste por RanGTP y por la señal NES (Englmeier et al., 2001; Lindsay et al., 2001), mediante la inducción también de un cambio conformacional en CRM1 (Petosa et al., 2004). Además, el

complejo RanGTP-RanBP3-CRM1-sustrato tiene una mayor afinidad por el complejo del poro nuclear, lo que favorece su transporte a través de la membrana (Lindsay et al., 2001).

Figura 9. Papel central de la GTPasa Ran en el transporte núcleo-citoplasma. RanGTP produce la disociación de los complejos importados al núcleo mediante su unión a importina-β, que libera el sustrato. Por el contrario, la unión de RanGTP a CRM1 promueve el ensamblaje de complejos de exportación. En el citoplasma, la unión de RanGTP a RanGAP1, RanBP1 y RanBP2 estimula la hidrólisis de GTP, y la disociación del complejo de exportación. Adaptado de (Clarke and Zhang, 2008).

Tras la exportación, CRM1 retorna al núcleo vacío (Macara, 2001). RanGDP es importado al núcleo a través de su interacción con el factor de transporte nuclear NTF2 (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). NTF2 es una pequeña proteína de 15 KDa que difunde libremente a través de la membrana nuclear, y que puede por lo tanto favorecer la difusión pasiva de Ran al interior del núcleo. NTF2 se une específicamente a RanGDP y no a RanGTP, y puede unirse simultáneamente a los motivos ricos en fenilalanina y glicina presentes en las nucleoporinas (Clarkson et al., 1996; Paschal et al., 1996). En el núcleo, RCC1 induce el desensamblaje del complejo por la conversión de Ran al estado de unión a GTP.

Los complejos de importación se forman en el citoplasma entre las proteínas que poseen una señal de localización celular y las importinas. La importina mejor caracterizada es importina-β, la cual necesita de un adaptador, importina-α, que es la que se une a la señal NLS (Gorlich et al., 1995). La característica clave de las importinas es que la unión de RanGTP y la unión de los sustratos a importar son mutuamente excluyentes. Por eso, en el citoplasma, donde hay una baja concentración de RanGTP, el complejo importina-α/importina-β interacciona con

el sustrato, y se translocan al núcleo. En el núcleo, RanGTP se une a importina- β , desplazando a importina- α y la proteína transportada, que se liberan (figura 9) (Stewart, 2007). Estudios estructurales han revelado que en realidad, el desensamblaje de importina- α de importina- β es un mecanismo alostérico, ya que la unión de RanGTP a importina- β produce un cambio conformacional en ésta, que impide su interacción con el dominio IBB (dominio de unión a importina- β) de importina- α , resultando en la liberación de importina- α (Lee et al., 2005; Vetter et al., 1999a). A su vez, el dominio IBB de importina- α , una vez liberada, se une de manera autoinhibitoria con el sitio de reconocimiento de NLS, liberando así el sustrato importado (Kobe, 1999). Importina- β , unida a RanGTP, se recicla al citoplasma, donde el complejo se desensambla tras la hidrólisis del GTP. Sin embargo, importina- α se recicla al citoplasma a través de su interacción con una exportina, CAS (*Cellular Apoptosis Susceptibility*), a la cual se une RanGTP. El complejo ternario se transloca y se disocia en el citoplasma tras la hidrólisis del GTP (Stewart, 2007).

Se puede decir que la unión de RanGTP a importinas o exportinas tiene efectos remarcadamente opuestos, ya que en el caso de CRM1 y CAS, favorece la unión al sustrato a exportar, y en el caso de importina- β , produce la liberación del sustrato importado. Este hecho puede ser explicado por las diferentes respuestas estructurales que se producen tras la interacción de RanGTP, dada la flexibilidad de las superhélices de motivos HEAT que componen las carioferinas (Conti et al., 2006).

2.4.1. Características de los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E)

El mutante Ran(T24N) es un mutante “defectivo en función” o “dominante negativo”, ya que inhibe la importación de proteínas al núcleo. El residuo treonina 24 de Ran es análogo a residuos de proteínas de la familia Ras que al ser mutados afectan a la unión del nucleótido o a las interacciones con proteínas reguladoras de éstas. Al igual que el mutante T17N de Ras (Farnsworth and Feig, 1991; John et al., 1993), Ran(T24N) no puede unirse prácticamente al nucleótido, es defectivo en la unión a GTP y tiene una afinidad reducida por GDP (Klebe et al., 1995a). Además, Ran(T24N) se asocia fuertemente al factor de intercambio de nucleótido, RCC1, formando un complejo inhibitorio estable, y cuando se expresa exógenamente impide la formación de RanGTP *in vivo*, ya que reduce el RCC1 disponible para estimular el intercambio de nucleótidos, bloqueando el transporte. Ran(T24N) funciona como dominante negativo en la importación de sustratos, y mimetiza la conformación de Ran unida a GDP (RanGDP) (Albee et al., 2006).

El mutante Ran(L43E) es un “mutante de dominio efector”. Inicialmente, este mutante se estudió puesto que el residuo leucina 43 está dentro de una región que se corresponde con el dominio *Switch I* de Ras, por lo que era candidata a estar involucrada en interacciones con efectores. La mutación L43E es análoga a las mutaciones del residuo isoleucina 36 del dominio

efector de Ras (Marshall, 1993). Ran(L43E) es insensible a la estimulación de su actividad GTPasa por RanGAP1, por lo que *in vivo* o *in vitro* se queda unido a GTP (Carey et al., 1996; Lounsbury et al., 1996). Tanto Ran(T24N), como Ran(L43E), son miméticos estructurales de las conformaciones RanGDP o RanGTP (respectivamente), independientemente del nucleótido unido (Porter et al., 2006)

2.5. Papel de la GTPasa Ran en el control de la mitosis

El establecimiento de un gradiente de RanGTP en torno a los cromosomas mitóticos es esencial para el correcto desarrollo de la mitosis. De hecho, la expresión de mutantes que impiden la formación de este gradiente produce importantes defectos mitóticos. El mutante Ran(L43E) es tóxico para la célula (Lounsbury et al., 1996), ya que en mitosis impide la formación de un gradiente de RanGTP. En huevos de *X. laevis*, la expresión exógena de los mutantes de Ran G19V, Q69L o L43E, todos ellos deficientes en actividad GTPasa, impide la formación del huso mitótico alrededor de la cromatina, y tiende a producir husos multipolares. Así mismo, estos mutantes son capaces de promover por sí solos el ensamblaje de microtúbulos por todo el extracto del huevo de *X. laevis*. También, la inhibición de la generación de RanGTP por el mutante Ran(T24N), o la adición de RanGAP1 y RanBP1, previene la formación del huso mitótico, o el alineamiento correcto de los cromosomas en el mismo (Carazo-Salas et al., 1999; Wilde and Zheng, 1999). En células humanas en cultivo, la expresión de los mutantes Ran(T24N) y Ran(Q69L) producen los mismos efectos que en huevos de *X. laevis*: husos mitóticos multipolares, alineamiento defectuoso de los cromosomas y desorganización del huso mitótico (Moore et al., 2002).

En mitosis, RCC1 se localiza en los cromosomas mitóticos, mientras que RanBP1 y RanGAP1 se encuentran principalmente dispersos por el citoplasma, lejos de la cromatina. Debido a esta localización de los reguladores de Ran, RanGTP se genera de manera localizada en la cromatina, produciéndose un gradiente intracelular de RanGTP difusivo, de manera que la concentración de RanGTP decrece con la distancia a los cromosomas (Clarke and Zhang, 2008; Kalab et al., 2006; Li and Zheng, 2004b).

La idea central para entender el papel de Ran en el control de distintos procesos mitóticos, se basa en que los factores necesarios para la activación de estos procesos se encuentran en complejos inhibitorios con importinas, de los cuales son liberados por RanGTP, y por tanto activados, de una manera espacio-temporal dependiente (Clarke and Zhang, 2008). Este mecanismo está próximamente relacionado con el que utiliza Ran en el control del transporte núcleo-citoplasma.

Un tipo de factores regulados por este mecanismo, ampliamente estudiados, son los implicados en el ensamblaje del huso mitótico y la estabilización de los microtúbulos, denominados factores de ensamblaje del huso (SAF, *Spindle Assembly Factors*) (Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001). Importina- α e importina- β interaccionan con las señales NLS de los factores de ensamblaje del huso, de forma que la actividad del factor queda inhibida. Sin embargo, cerca de la cromatina, el complejo es disociado por la interacción de RanGTP con importina- β , de manera que el factor de ensamblaje del huso se libera y se activa alrededor de los cromosomas (figura 10). Un gran número de estos factores que funcionan como dianas de RanGTP han sido identificados (revisado en (Clarke and Zhang, 2008)). Entre ellos, un factor importante es TPX2, que se asocia y activa a la quinasa mitótica Aurora A en el huso mitótico (Tsai et al., 2003); y HURP, que tiene un papel en la estabilización y captura de los microtúbulos por el cinetocoro (Sillje et al., 2006). También se ha descrito recientemente que la quinasa CDK11, de una manera dependiente de RanGTP, promueve la nucleación de los microtúbulos en extractos de huevos de *X. laevis* (Yokoyama et al., 2008).

Figura 10. Regulación del ensamblaje del huso mitótico por RanGTP. La generación de RanGTP por RCC1 en los cromosomas produce una “nube” de RanGTP en torno a los cromosomas. RanGTP, mediante su interacción con RanGAP1 (lejos de los cromosomas) produce RanGDP, generándose un gradiente de concentración de RanGTP. RanGTP produce la liberación de factores de ensamblaje del huso (SAF) en las proximidades de los cromosomas, que forman complejos inhibitorios a través de la interacción de sus señales NLS (señal de localización nuclear) con importina- α e importina- β . Adaptado de (Clarke and Zhang, 2008).

Las importinas pueden funcionar como proteínas reclutadoras de dianas de RanGTP. CAS e importina- β se localizan en el huso durante mitosis (Ciciarello et al., 2004; Scherf et al., 1996), por tanto mediante su interacción con las señales NLS reclutan a proteínas al huso mitótico, donde serán liberadas, y por tanto activadas, por RanGTP (Clarke and Zhang, 2008).

Otro efector de RanGTP importante en mitosis es CRM1, que se localiza específicamente en los cinetocoros, donde recluta a RanBP2 y RanGAP1 durante la metafase (Arnaoutov et al., 2005; Joseph et al., 2002). El complejo RanBP2-RanGAP1 tiene una función en la interacción microtúbulos-cinetocoro (Joseph et al., 2004), y debe generar una hidrólisis de RanGTP en esa precisa localización. CRM1, por su parte, tiene un papel en la localización de proteínas del complejo CPC (*Chromosome Passenger Complex*), como Aurora B, a las regiones centroméricas de los cromosomas, a través de su interacción con survivina (Knauer et al., 2006). En otros estudios, Ran, RanBP1 y CRM1 han sido localizados en los centrosomas, donde RanGTP podría tener un papel en la función del centrosoma durante mitosis (Wang et al., 2005). Al igual que las importinas, CRM1 debe funcionar como proteína reclutadora de proteínas citosólicas con una señal NES a sitios específicos, como los cinetocoros o los centrosomas, en colaboración con RanGTP (Clarke and Zhang, 2008).

2.6 Regulación de la actividad de RCC1

2.6.1. Regulación de la interacción de RCC1 con la cromatina

Como ya hemos comentado anteriormente, la estructura β -*propeller* de RCC1 confiere a la proteína un aspecto de *donut*, del cual, además, sobresale una cola amino terminal flexible constituida por los aminoácidos 1 al 20 (Renault et al., 1998). Esta cola, que contiene una señal de localización nuclear (NLS), participa en la unión directa de RCC1 al ADN (Chen et al., 2007; Seino et al., 1992). Sin embargo, no es el único sitio de unión de RCC1 al ADN, ya que éste puede unirse a la cromatina a través de las histonas H2A y H2B (Nemergut et al., 2001); esta unión se produce a través de una de las caras de la estructura tipo *donut*, opuesta a la cara implicada en el intercambio de nucleótido e interacción con Ran (Renault et al., 1998), y produce una estimulación de la actividad de RCC1 (Nemergut et al., 2001).

La interacción de RCC1 con la cromatina es dinámica, es decir, la interacción es transitoria y continuamente existe una asociación y disociación de RCC1 a la cromatina. Además, la interacción de RCC1 con la cromatina está regulada por Ran (Chen et al., 2007) y se acopla con la producción de RanGTP en la proximidad de la cromatina. La mutación en RCC1 del residuo aspártico 182 evita su interacción con Ran, y muestra una asociación con la cromatina reducida (Moore et al., 2002). Ran y RCC1 forman un complejo binario *in vivo*, intermediario de la reacción de intercambio de nucleótido, que se une a la cromatina establemente, ya que la unión de Ran a RCC1 aumenta la interacción de éste con la cromatina (Li et al., 2003). La formación de RanGTP por RCC1 disocia el complejo Ran-RCC1 y la unión estable de RCC1 a la cromatina (figura 11). Este mecanismo de intercambio de nucleótido acoplado a los cromosomas genera RanGTP *in vivo* en los cromosomas mitóticos (Li et al.,

2003). Ran también se asocia a la cromatina a través de su interacción con las histonas H3 y H4, además de asociarse indirectamente a través de su interacción con RCC1 (Bilbao-Cortes et al., 2002).

Figura 11. La interacción dinámica de RCC1 con la cromatina es regulada por Ran, y está asociada a la producción de RanGTP en la vecindad de los cromosomas. RCC1 interacciona transitoriamente con la cromatina y a su vez intercambia el nucleótido en Ran. El complejo intermediario Ran-RCC1 se une establemente a la cromatina, debido al cambio conformacional que ejerce Ran sobre la cola amino terminal de RCC1. Cuando RanGTP es generado, el complejo se disocia, y la unión de RCC1 a la cromatina se relaja. Me, metilación.

El papel de la cola amino terminal de RCC1 es, además de participar en la interacción directa con el ADN, la de regular la interacción de RCC1 con las histonas. La asociación de la cola amino terminal con la cromatina es facilitada por una modificación postraducciona en RCC1 bastante inusual, en la cual el residuo de metionina inicial es eliminado, y el residuo adyacente (serina en primates y prolina en otros vertebrados) es tri o dimetilado en el grupo amino alfa (Chen et al., 2007). La delección de la cola, o mutaciones en RCC1 que bloquean la metilación, conllevan una interacción más débil con la cromatina, produciendo defectos mitóticos (Chen et al., 2007; Moore et al., 2002). Por otro lado, recientemente se ha descrito el mecanismo por el cual Ran, cuando está unido a RCC1 formando el complejo intermediario de la reacción de intercambio, incrementa la unión de RCC1 a la cromatina (figura 11). La unión de Ran (sin nucleótido) a RCC1, produce cambios conformacionales en la cola amino terminal, que producen una mayor unión de RCC1 al ADN y a las histonas, debido posiblemente a que el cambio conformacional en la cola expone mejor la cara de unión de RCC1 a las histonas, y facilita a su vez la unión de la cola (positivamente cargada) al ADN (Hao and Macara, 2008).

2.6.2. Regulación de RCC1 en mitosis mediante la fosforilación de su señal de localización nuclear

La unión de RCC1 a los cromosomas mitóticos es esencial para la generación del gradiente de RanGTP en torno a los cromosomas, y por tanto, para el correcto ensamblaje del huso mitótico y progresión de la mitosis. Como hemos visto, la cola amino terminal de RCC1 juega un papel importante en la interacción de RCC1 con la cromatina. Sin embargo, la metilación no es la única modificación postraduccional descrita en esta región. La cola amino terminal presenta una señal de localización nuclear (NLS), gracias a la cual RCC1 es transportada al núcleo (Talcott and Moore, 2000). En mitosis, al no existir la envuelta nuclear, RCC1 está expuesto a altas concentraciones de importina- α , que reconoce y se une a la señal NLS de RCC1. Esta unión bloquea la interacción de RCC1 con los cromosomas, que se traduce en la imposibilidad de formarse el gradiente de RanGTP (figura 12). La quinasa mitótica cdc2 (CDK1/ciclina B) fosforila dos residuos de la cola amino terminal de RCC1, uno de ellos en la señal NLS y otro cercano a ella. Estas fosforilaciones bloquean la unión de importina- α junto con importina- β a la señal NLS, permitiendo la interacción dinámica de RCC1 con los cromosomas (a través de la cola amino terminal y de una de las caras de la estructura β -propeller) y de esta manera generar RanGTP en la vecindad de los cromosomas mitóticos, asegurando la correcta progresión de la mitosis (Hutchins et al., 2004; Li and Zheng, 2004a).

Figura 12. La fosforilación de RCC1 en mitosis es necesaria para su unión a los cromosomas y la formación de un gradiente de RanGTP. La quinasa mitótica cdc2 fosforila la cola amino terminal de RCC1, impidiendo la unión inhibitoria de importina- α (α) e importina- β (β), y permitiendo la interacción de RCC1 con los cromosomas mitóticos para la correcta generación del gradiente de RanGTP. Adaptado de (Li and Zheng, 2004a).

3. LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN

El mantenimiento de la integridad del genoma es esencial para la supervivencia de todos los organismos. La integridad del ADN celular se puede ver alterada por distintas agresiones causadas por agentes genotóxicos, tanto exógenos como endógenos, por fallos en la incorporación de nucleótidos durante la replicación del ADN, o por la propia inestabilidad intrínseca del ADN. Todas estas lesiones o alteraciones en el ADN, si no son reparadas o eliminadas, pueden provocar bloqueos en la transcripción y la replicación, mutagénesis, citotoxicidad, y en humanos, envejecimiento y cáncer (Finkel and Holbrook, 2000; Hoeijmakers, 2001; Norbury and Hickson, 2001). Por lo tanto, no sorprende que cualquier tipo de daño en el ADN que introduzca una discontinuidad en la doble hélice provoque una rápida reacción celular. La vía de señalización, evolutivamente muy conservada (desde organismos unicelulares a mamíferos), que detecta el daño en el ADN y transmite esta información a toda la célula es conocida como la respuesta al daño en el ADN o DDR (*DNA Damage Response*) (Harper and Elledge, 2007; McGowan and Russell, 2004). Esta respuesta tiene dos funciones finales distintas, pero a la vez coordinadas: activar el arresto del ciclo celular (o *checkpoints*) para impedir la propagación de la información genética alterada, y coordinar la reparación del ADN dañado para mantener la integridad del genoma. Si el daño en el ADN generado en células en proliferación es reparado apropiadamente de manera rápida, las células reanudan la proliferación normal. Por el contrario, cuando el daño en el ADN es particularmente severo, y no puede ser reparado, se puede desencadenar una muerte celular programada o apoptosis. También es factible que en estos casos la respuesta al daño en el ADN desencadene senescencia celular, o arresto irreversible del ciclo celular. La elección entre apoptosis o senescencia depende del tipo celular, y de la intensidad, duración y naturaleza del daño (d'Adda di Fagagna, 2008). Defectos genéticos en partes cruciales de la respuesta al daño en el ADN pueden conducir a un grupo de desórdenes genéticos humanos conocidos como “síndromes de inestabilidad genética”. Estas enfermedades se caracterizan por la degeneración de tejidos específicos, sensibilidad a agentes genotóxicos, inestabilidad cromosómica y una marcada predisposición a cáncer (Moses, 2001). Los estudios realizados para entender las bases moleculares de estas enfermedades han conducido a la identificación de muchos de los componentes de la respuesta al daño en el ADN (O'Driscoll and Jeggo, 2006).

La respuesta al daño en el ADN se compone de tres aspectos fundamentales: el reconocimiento o detección del daño por las moléculas sensores (o detectores), la transducción y amplificación de la señal, llevada a cabo por moléculas mediadoras (o adaptadoras) y transductoras, y la resolución de la respuesta: inducción por las moléculas efectoras de parada

de ciclo, reparación y/o apoptosis o senescencia (Kastan and Bartek, 2004; McGowan and Russell, 2004) (figura 13).

Figura 13. Esquema de la respuesta al daño en el ADN. Representación esquemática de los participantes en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN. El daño es detectado por las proteínas sensores: histona H2AX, complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1) y las quinasas PIKK (ATM, ATR). La señal es transmitida a las quinasas transductoras Chk1, Chk2 y PIKKs, facilitado por las proteínas mediadoras/adaptadoras, como MDC1, 53BP1 o BRCA1. Las quinasas transductoras fosforilan proteínas efectoras, como p53 y Cdc25, que desencadenan la respuesta adecuada.

3.1. Tipos de daño en el ADN

Tanto agentes internos (moléculas oxidantes procedentes del metabolismo o errores durante la síntesis del ADN), como agentes externos (radiación ionizante o ultravioleta) pueden causar distintas alteraciones en la estructura del ADN: roturas de una cadena del ADN, roturas de las dos cadenas, modificaciones en las bases como alquilaciones u oxidaciones, o *crosslinks* (unión covalente de moléculas o átomos adyacentes), los cuales pueden darse entre distintas cadenas o dentro de una misma cadena como los dímeros de pirimidina. También puede producirse la introducción de bases erróneas, deleciones o inserciones de bases, debido a errores durante la replicación. Todas estas alteraciones, como consecuencia, activan la respuesta al daño en el ADN. Así mismo, las paradas de replicación, que pueden ser causadas por daños en el ADN, u otro tipo de dificultades que impiden el movimiento de la horquilla de replicación durante la fase de síntesis del ADN, también activan las vías de respuesta al daño en el ADN (Cimprich and Cortez, 2008; Harper and Elledge, 2007).

3.2. Las quinasas PIKK: moléculas centrales en la respuesta al daño en el ADN

Las moléculas esenciales en la respuesta al daño en el ADN, con un papel central, y consideradas tanto sensores del daño, como las transductoras primarias de la señal, son las

quinasas ATM (*Ataxia-Telangiectasia mutated*) y ATR (*ATM and Rad3-related*). ATM y ATR son consideradas las moléculas apicales de toda la respuesta al daño. Las lesiones en el ADN producen una rápida activación de estas quinasas, que fosforilan residuos de serina y treonina seguidos de glutamina (S/TQ), fosforilando multitud de sustratos de todas las etapas de la respuesta al daño (Shiloh, 2006). ATM y ATR pertenecen a la familia de quinasas PIKK, o quinasas relacionadas con PI3K (fosfoinosítido-3-quinasa), una familia de quinasas de alto peso molecular, poco convencionales, y con motivos típicos de la quinasa lipídica PI3K. En mamíferos, existen dos miembros más en la familia implicados en la respuesta al daño en el ADN: DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*) y hSMG-1, aunque de esta última existen pocos datos acerca de su función (Abraham, 2004).

Tanto ATM como DNA-PK responden a roturas de doble cadena en el ADN (DSB, *Double Strand Break*), aunque tienen funciones distintas: DNA-PK juega un papel principalmente en la reparación de las roturas de doble cadena en la vía de reparación NHEJ (*Nonhomologous End-Joining*), mientras que ATM esencialmente actúa como molécula detectora y transductora del daño (Shiloh, 2006). Por el contrario, ATR principalmente se activa y transduce la señal procedente de paradas en la replicación causadas por bloqueos en la horquilla de replicación, así como de lesiones causadas por luz ultravioleta (la cual produce principalmente dímeros de pirimidina) y de roturas de una sola hebra del ADN. Esta activación de ATR es independiente de ATM y constituye una vía de señalización distinta a la de ATM en respuesta a DSB, en la que participan distintos componentes, aunque el resultado final es el mismo: activación de los *checkpoints* y de la reparación del daño (Cimprich and Cortez, 2008).

Sin embargo, ATR también se activa en respuesta a roturas de doble cadena, y muestra dianas de fosforilación comunes con las de ATM (Cimprich and Cortez, 2008), aunque su activación es más lenta que la de ATM, y se da predominantemente durante las fases del ciclo S y G2 (Jazayeri et al., 2006). Con lo cual, la función de ATR en respuesta a DSB sería cooperar con ATM en el mantenimiento de la fosforilación de los distintos sustratos (Cimprich and Cortez, 2008). En estas situaciones, parece que ATM podría estar por encima de ATR en la señalización, ya que ATM es necesaria para el reclutamiento de ATR a los puntos de rotura de doble cadena, a través de la inducción de regiones de una sola hebra de ADN a partir de las roturas de doble cadena (Adams et al., 2006; Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006); además, ATM activa a ATR a través de la fosforilación del activador de ATR, TopBP1 (Yoo et al., 2007).

3.2.1. Interconexiones entre ATM y ATR en la respuesta al daño en el ADN

La mayoría de los sustratos diana de ATM que han sido examinados para ATR han resultado ser también dianas de ésta, como los supresores de tumores p53 y BRCA1 (Tibbetts et al., 1999; Tibbetts et al., 2000). Sin embargo, existen evidencias de algunas especificidades en

cuanto a sustratos. En particular, las quinasas Chk1 y Chk2 (*Checkpoint kinase 1 y 2*) son sustratos específicos de ATR y ATM respectivamente (Cimprich and Cortez, 2008). Aun así, también han sido descritas fosforilaciones cruzadas al nivel de las quinasas Chk, como la fosforilación de Chk1 por ATM en respuesta a roturas de doble cadena (Gatei et al., 2003). Sin embargo, esta fosforilación puede ser debida a una interconversión de las lesiones DSB en roturas de hebra simple, que activan a ATR, la cual sería realmente la responsable de la fosforilación de Chk1. También se ha descrito la activación de ATM en respuesta a paradas de replicación (Brown and Baltimore, 2003), pero como consecuencia de la formación de DSB en las horquillas bloqueadas, ya que las endonucleasas pueden cortar las roturas de hebra simple dando lugar a DSB que activan a ATM (Cimprich and Cortez, 2008).

En resumen, ATM y ATR presentan muchas similitudes, tanto bioquímicas como funcionales. Sin embargo, ATR juega un papel más específico durante la fase S del ciclo celular, regulando la progresión de la replicación del ADN (Shechter et al., 2004), lo que hace que ATR sea un gen indispensable para la viabilidad celular, al contrario que ATM, que no es un gen esencial, y que presenta redundancia en funciones con ATR (Cimprich and Cortez, 2008).

3.2.2. Fosforilaciones en la respuesta al daño en el ADN

Dada la importancia de las quinasas en la respuesta a las lesiones en el ADN, parece evidente que la fosforilación de proteínas juega un papel crucial en esta vía de señalización. De hecho, en un reciente estudio proteómico a gran escala, se identificaron más de 700 proteínas que son fosforiladas en respuesta al daño en el ADN (Matsuoka et al., 2007), revelando que una gran red de proteínas es regulada por esta modificación postraduccional. Aunque no se conoce la relevancia funcional de la gran mayoría de estas fosforilaciones, es probable que una gran proporción de ellas sirvan como interruptores para regular interacciones proteína-proteína (Huen and Chen, 2008). Muchas proteínas implicadas en la respuesta al daño presentan motivos de unión a fosfopéptidos, conformando dominios denominados BRCT (BRCA1 C-Terminal) (Manke et al., 2003; Yu et al., 2003) y FHA (*Forkhead-Associated*) (Durocher et al., 1999). Estos dominios juegan un papel importante tanto en el reconocimiento del daño en el ADN, como en el ensamblaje de gran cantidad de complejos proteicos que participan en la respuesta al daño en el ADN (Huen and Chen, 2008).

3.3. La vía de señalización de ATM: respuesta a roturas de doble cadena en el ADN

Las roturas de doble cadena en el ADN o DSB son especialmente citotóxicas. Éstas pueden ser causadas por agentes exógenos como radiación ionizante (rayos X y rayos gamma) y

agentes químicos radiomiméticos, o por agentes endógenos como radicales de oxígeno formados en el metabolismo. Además, las roturas de doble cadena también pueden aparecer tras las paradas de replicación y formar parte de transiciones genómicas normales, como la recombinación meiótica y la maduración de los genes del sistema inmune vía recombinación V(D)J (Bassing and Alt, 2004). Así mismo, el desgaste de los telómeros, o su desprotección también induce la respuesta típica a DSB, ya que la célula no puede diferenciar los extremos teloméricos disfuncionales de las roturas de doble cadena (Palm and de Lange, 2008). Una reparación incorrecta de las roturas de doble cadena puede desencadenar deleciones, inversiones, translocaciones, fusiones o pérdidas de cromosomas (Jonnalagadda et al., 2005; Karlsson et al., 2003). Esta pérdida de integridad del genoma puede, por tanto, resultar en muerte celular o transformación y oncogénesis.

3.3.1. Visión general de la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN

En la detección más temprana de las roturas de doble cadena en el ADN están implicados el complejo MRN (formado por las proteínas Mre11, Rad50 y NBS1) y la quinasa ATM, que se activa rápidamente tras el daño, y va a producir la fosforilación inmediata de la histona H2AX (una variante de la histona nucleosomal H2A) en la serina 139 (Celeste et al., 2002; Rogakou et al., 1999), un evento clave en el desarrollo de la respuesta. Tras este primer paso inicial, una serie de proteínas mediadoras se reclutan a los puntos del ADN dañado, entre las que se incluyen la proteína multifuncional y supresor de tumores BRCA1, p53-*Binding Protein* (53BP1), y MDC1 (*Mediator of DNA-Damage Checkpoint 1*), todas ellas con dominios BRCT típicos de unión a fosfoproteínas, y sustratos de ATM (Lavin, 2008) (figura 14). Todas estas proteínas, junto con la histona H2AX fosforilada, se localizan en el sitio del ADN dañado, y se extienden varios cientos de kilobases a lo largo de la cromatina que flanquea el ADN dañado (Lavin, 2008; Mochan et al., 2004; Shiloh, 2006). La retención de estas proteínas en los puntos del ADN dañado resulta en la formación de focos nucleares citológicamente detectables, que contienen múltiples copias de la misma proteína. Las dimensiones de los focos varían entre 0,6 y 1,6 μm , y crecen de tamaño con el tiempo (Yamauchi et al., 2008), pasando de ser focos de señalización a focos de reparación del daño. Cada foco de respuesta al daño (DDR *focus*) representa una única lesión en el ADN, donde se consiguen altas concentraciones de factores para favorecer las interacciones proteína-proteína y reacciones enzimáticas, y establecer *loops* de retroalimentación (d'Adda di Fagagna, 2008).

H2AX fosforilada en serina 139 (conocida como γH2AX) es necesaria para el reclutamiento a los puntos del ADN dañado de mediadores como MDC1 (Stucki et al., 2005), 53BP1 (Ward et al., 2003), e incluso para el de ATM; con esta última establece un *loop* de retroalimentación. En este *loop*, γH2AX recluta a ATM activada, y ésta aumenta la extensión de H2AX fosforilada a lo largo de la cromatina que rodea el ADN dañado. Sin embargo, γH2AX

parece no ser necesaria para el reclutamiento inicial de ATM o 53BP1 y sí para el mantenimiento de éstas en los focos de respuesta a daño (Celeste et al., 2003; Celeste et al., 2002). A su vez, proteínas mediadoras, como MDC1, facilitan el reclutamiento de ATM y MRN por γ H2AX (Bekker-Jensen et al., 2005; Lou et al., 2006; Lukas et al., 2004; Stucki et al., 2005). Las proteínas mediadoras 53BP1, MDC1 y BRCA1, junto con NBS1 del complejo MRN, participan en el mantenimiento de la activación de ATM, y la transducción de la señal, actuando como plataformas para el reclutamiento de otras proteínas, como Chk2 y factores de reparación (Cann and Hicks, 2007; d'Adda di Fagagna, 2008; Li and Zou, 2005). La fosforilación de la histona H2AX actúa como un marcador del daño, de manera que su desfosforilación, llevada a cabo por la fosfatasa PP2A (Keogh et al., 2006), es una señal para la reanudación del ciclo celular (Downey and Durocher, 2006).

Figura 14. Respuesta a roturas de doble cadena en el ADN. Se representan los principales componentes de esta vía. Proteínas sensores, mediadoras y transductoras (como ATM) se reclutan a los puntos del ADN dañado. ATM, junto con Chk2, activan los distintos efectores que producen arresto de ciclo celular, apoptosis o senescencia. ATR es activada por ATM y coopera con ésta en la activación de los efectores. El arresto del ciclo celular da tiempo a que se dé lugar la reparación del daño, activada por los componentes de los focos de respuesta al daño, y por DNA-PK (no mostrado).

Como ya hemos dicho, ATM es la molécula central en la respuesta a DSB, y su activación es necesaria para la fosforilación de gran parte de las proteínas mediadoras, así como de la quinasa transductora Chk2 y los distintos efectores (Shiloh, 2006). La quinasa Chk2 es activada por fosforilación por ATM, y difunde libremente por el nucleoplasma para extender la señal y fosforilar sus sustratos por todo el espacio nuclear (Lukas et al., 2003). La activación de los *checkpoints* es llevada a cabo principalmente por p53 y Cdc25A y C (figura 14). Como este

tipo de daño puede darse lugar en cualquier momento del ciclo, la respuesta puede activar el *checkpoint* de G1/S, y el de la fase de síntesis, para regular la transición a la fase S y la progresión de ésta, y el *checkpoint* de G2/M, para regular la entrada en mitosis tras la producción del daño en el ADN (Sancar et al., 2004). La degradación de Cdc25 inducida por el daño a través de Chk2 (y Chk1) causa un rápido arresto del ciclo celular (Mailand et al., 2000). Por el contrario, la respuesta dependiente de p53 es más lenta, y su activación y acumulación es causada por su fosforilación por distintas quinasas de la respuesta al daño (Turenne et al., 2001). p53 induce la transcripción de p21, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (Deng et al., 1995), lo que resulta en un arresto del ciclo celular estable.

Así mismo, una de las principales funciones de la respuesta al daño es activar los mecanismos de reparación. En el caso de DSB, los mecanismos principales son NHEJ, un mecanismo de ligación “propenso a errores” (*error-prone*) que actúa a lo largo de todo el ciclo celular (Liebe, M.R. et al 2004), y un proceso de alta fidelidad basado en la recombinación homóloga (HR) entre cromátidas hermanas, que es funcional en la fase de síntesis tardía y en G2 (Wyman, C. et al 2004).

3.3.2. Ensamblaje de los focos de respuesta al daño y activación de ATM

Como hemos visto, en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN, un gran número de proteínas encargadas del reconocimiento del daño y de su transducción son rápidamente reclutadas a los puntos del ADN dañado (Harper and Elledge, 2007). Sin embargo, el orden en que estas proteínas se ensamblan es un tema controvertido, que en parte ha sido resuelto mediante el uso de tecnología de imagen *in vivo* (Bekker-Jensen et al., 2006).

El complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1) es el primero en unirse a los puntos del ADN dañado (de Jager et al., 2001), y lo hace de manera independiente de ATM (Mirzoeva and Petrini, 2003), a través de la nucleasa Mre11, que se une a los extremos del ADN dañado. La retención y acumulación posterior del complejo MRN, a su vez, depende de la interacción de NBS1 con γ H2AX (Rupnik et al., 2008).

ATM también llega en primer lugar al sitio del ADN dañado, inicialmente asociándose con el ADN que flanquea el punto de rotura, y seguidamente, asociándose al complejo MRN a través de NBS1 (Lavin, 2008). El reclutamiento inicial de ATM parece independiente de MRN, y es probable que ATM se active, al menos parcialmente, a través de su unión a los extremos del ADN roto (Bakkenist and Kastan, 2003; Berkovich et al., 2007; You et al., 2007), por un mecanismo aún sin identificar. Sin embargo, su unión a NBS1 produce una activación sustancial, lo que además provoca su retención en los focos de respuesta al daño (Falck et al., 2005; Lee and Paull, 2005; Uziel et al., 2003). La activación de ATM implica el paso de un estado en forma de dímero inactivo a monómero activo, a través de una autofosforilación en la serina 1981 (Bakkenist and Kastan, 2003). MDC1 también contribuye al mantenimiento de

ATM en los focos, a través de su interacción directa con ATM, y una posible mediación en la interacción entre ATM y γ H2AX, necesaria para el mantenimiento de ATM en los focos y la fosforilación mantenida de γ H2AX (Lavin, 2008). Sin embargo, sólo parte de ATM se localiza en los focos de respuesta al daño (Bakkenist and Kastan, 2003), mientras que el resto se reparte por el nucleoplasma, donde se piensa que debe fosforilar a proteínas que no forman parte de los focos, como p53 (Bekker-Jensen et al., 2006).

Seguidamente, tras ATM y MRN, se produce el reclutamiento de MDC1. MDC1 interacciona con γ H2AX mediante sus dominios BRCT, y de esta manera se recluta a la cromatina dañada (Lukas et al., 2004). Aunque MDC1 es fosforilado por ATM, su retención en la cromatina no depende de esta fosforilación (Lavin, 2008). Por otro lado, MDC1 es necesario para la unión sostenida del complejo MRN a la cromatina dañada. La fosforilación de MDC1 por caseína quinasa 2 (CK2) estimula la interacción de MDC1 fosforilado con dominios BRCT y FHA de NBS1, reteniendo de esta manera la interacción del complejo MRN con los extremos del ADN dañado (Chapman and Jackson, 2008; Melander et al., 2008).

A continuación, se reclutan 53BP1 (Bekker-Jensen et al., 2005) y BRCA1. El mecanismo de ensamblaje de 53BP1 es discutido en el siguiente apartado. BRCA1 se ensambla en los focos de respuesta al daño mediante un mecanismo más complejo que implica su unión a diferentes proteínas adaptadoras (Abraxas, Bach1/Brip1/FANCI y CTIP), formando al menos tres complejos distintos (Wang and Elledge, 2007; Wang et al., 2007; Yu and Chen, 2004).

La proteína ubiquitina ligasa RNF8 también se ensambla en las roturas de doble cadena a través de la interacción de sus dominios FHA con sitios de MDC1 fosforilados por ATM (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). RNF8 ubiquitina H2AX, facilitando la acumulación de BRCA1 y 53BP1 en los puntos del ADN dañado.

3.3.3. 53BP1 en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN

53BP1 es uno de los participantes en la respuesta temprana a roturas de doble cadena en el ADN (Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000), inicialmente identificado como una proteína que interacciona con p53 y estimula su actividad (Iwabuchi et al., 1994; Iwabuchi et al., 1998). 53BP1 no tiene actividad enzimática, y su principal función en la respuesta al daño, conjuntamente con MDC1 y BRCA1 (también proteínas mediadoras), es la de facilitar la señalización entre los sensores del daño y las quinasas transductoras, amplificando la señal, y servir de anclajes para el reclutamiento de otras proteínas de la respuesta al daño (FitzGerald et al., 2009).

El reclutamiento de 53BP1 a los puntos del ADN dañado y su mantenimiento dependen de distintos factores y modificaciones postraduccionales. 53BP1 presenta dos dominios BRCT en su parte más carboxilo terminal, precedidos por dos dominios tudor consecutivos o en tándem (figura 15). Los dominios tudor, tras producirse el daño en el ADN, son capaces de

interaccionar con las lisinas metiladas 79 y 20 de histona H3 y H4 respectivamente (Botuyan et al., 2006; Huyen et al., 2004). Estas modificaciones postraduccionales existen en ausencia de daño, por lo que se postula que los cambios conformacionales de la cromatina tras el daño exponen estas metilaciones a las cuales se une el dominio tudor de 53BP1 (Huyen et al., 2004). Éste debe ser el mecanismo por el cual inicialmente 53BP1 reconoce el daño, y se une al punto del ADN dañado. Para su mantenimiento en los focos es necesaria su interacción con γ H2AX, por tanto, depende de la fosforilación de H2AX por ATM (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Ward et al., 2003). Además, γ H2AX regula indirectamente el reclutamiento de 53BP1 a los focos de respuesta al daño. MDC1 se une a γ H2AX a través de sus dominios BRCT (Lukas et al., 2004), es fosforilado por ATM, y recluta la ubiquitina ligasa RNF8, que cataliza varias ubiquitinaciones, entre ellas, la de la lisina 119 de H2AX (Ikura et al., 2007). Esta ubiquitinación es necesaria para mantener la interacción de 53BP1 con γ H2AX por un mecanismo todavía no identificado (Kolas et al., 2007; Wang and Elledge, 2007).

Figura 15. Dominios y regiones funcionalmente significativas de 53BP1. Se indica la posición de los dominios BRCT y tudor, la señal NLS, la región de interacción con γ H2AX, la región implicada en el reclutamiento a los focos de respuesta al daño, y dentro de ella, el dominio de oligomerización (OD), así como los sitios S/TQ (consenso de PIKK) que han sido descritos fosforilados en respuesta a DSB. H3-K79me, histona H3 metilada en lisina 79. H4-K20me, histona H4 metilada en lisina 20.

Varios trabajos han determinado una zona de 53BP1 necesaria para su reclutamiento a los focos de respuesta al daño, o que por sí sola puede reclutarse eficientemente (Mochan et al., 2004; Ward et al., 2006; Zgheib et al., 2009), denominada “región de formación de focos”, que incluye parte de la zona por la que 53BP1 interacciona con γ H2AX, un dominio de oligomerización (Zgheib et al., 2009), y los dominios tudor (figura 15). Recientemente, ha sido identificada una zona de interacción con MDC1 (aa 1288-1409) (Eliezer et al., 2009), al parecer también necesaria para el mantenimiento de 53BP1 en los focos, y además, se ha descrito que una nueva proteína mediadora de la respuesta al daño, PTIP (Jowsey et al., 2004), interacciona con 53BP1 y es necesaria para su reclutamiento a los focos de respuesta al daño (Wu et al., 2009). Los dominios BRCT no son requeridos para la unión de 53BP1 a los focos (Morales et al., 2003), y su función aún no está definida.

El reclutamiento de 53BP1 a los puntos del ADN dañado es necesario para facilitar las funciones de *checkpoint* y reparación de la respuesta al daño en el ADN (Anderson et al., 2001; Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000; Xia et al., 2001). Uno de los aspectos mejor demostrados acerca de la participación de 53BP1 en el desarrollo de la respuesta al daño en el ADN es que éste es necesario para una fosforilación (y por tanto activación) eficiente de Chk2, y como consecuencia, 53BP1 es necesario para la activación de los *checkpoints* de las fases G2 y S (DiTullio et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002; Wang et al., 2002; Watrin and Peters, 2009). 53BP1 podría servir como proteína de anclaje para facilitar la fosforilación de Chk2 por ATM en los puntos del ADN dañado. Además, también se ha comprobado que 53BP1 es necesario para una activación eficiente de ATM (Mochan et al., 2003; Wilson and Stern, 2008).

Tras la producción de roturas de doble cadena en el ADN, 53BP1 se redistribuye rápidamente a los puntos dañados, y es hiperfosforilado (Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000; Ward et al., 2003). 53BP1 presenta multitud de residuos de serina y treonina por toda su secuencia (370 sitios, representando un 19% de la secuencia de la proteína). Sin embargo, sólo han sido identificados, en respuesta a DSB, la fosforilación de sitios serina o treonina seguidos de glutamina (S/TQ), es decir, dianas de fosforilación de quinasas PIKK (Jowsey et al., 2007; Lee et al., 2009; Ward et al., 2003). De un total de 32 sitios S/TQ, ha sido confirmada la fosforilación en respuesta a radiación ionizante de once de ellos, la mayoría en la parte amino terminal de la proteína (figura 15). Varios estudios han tratado de dilucidar cuál es la función de estas fosforilaciones, sin lograr encontrar una implicación directa en la regulación del reclutamiento o mantenimiento de 53BP1 en los focos de respuesta al daño, ni en su función como proteína mediadora, aunque la fosforilación de hasta 15 sitios conservados en la zona amino terminal (aa 1-892) sí parece necesaria para la reparación del daño (Ward et al., 2006; Ward et al., 2003). Sin embargo, recientemente, se ha encontrado que la fosforilación de la serina 1219 por ATM tras radiación ionizante es necesaria para una correcta señalización del daño y arresto en G2/M (Lee et al., 2009), y que la fosforilación en serina 25 por ATM tras el daño participa en la interacción entre 53BP1 y PTIP, y es necesaria para que se produzca una total fosforilación y activación de Chk2 (Munoz et al., 2007).

En conclusión, la complejidad en la regulación de los distintos componentes de la respuesta al daño en el ADN y el gran número de modificaciones postraduccionales que son necesarias para el correcto desarrollo de la respuesta (Huen and Chen, 2008), hacen pensar que deben existir elementos aún no identificados que participan en las distintas etapas de la respuesta al daño en el ADN. Dentro de estos elementos, y dada la gran magnitud de fosforilaciones encontradas en la respuesta al daño en el ADN (Matsuoka et al., 2007), las quinasas nucleares, como VRK1, pueden ser candidatas idóneas a participar en esta vía de señalización.

OBJETIVOS

- 1. Identificar proteínas que interaccionan con la quinasa VRK1, con el fin de encontrar nuevos reguladores de ésta, o posicionar a la quinasa en vías de señalización celular.**
- 2. Analizar la respuesta de VRK1 a estrés genotóxico e investigar su posible papel en la respuesta al daño en el ADN.**

Resultados

*Identificación de proteínas que interaccionan con la quinasa
humana VRK1 mediante técnicas proteómicas*

y

análisis de la interacción de la quinasa VRK1 con la GTPasa Ran

1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LA QUINASA HUMANA VRK1 MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

1.1. Diseño experimental de la identificación de proteínas que interaccionan con VRK1

Dentro de la familia de quinasas humanas VRK, los miembros que mayor homología comparten entre sí son VRK1 y VRK2 (Nezu et al., 1997; Nichols and Traktman, 2004). Además, la isoforma VRK2B presenta una redundancia en funciones con VRK1, y podría reemplazar funcionalmente a VRK1 en aquellos tipos celulares en los que la localización de VRK1 es citoplasmática (Blanco et al., 2006). Por eso decidimos utilizar en el estudio tanto VRK1 como VRK2B, ya que dada la similitud en funciones y estructura que existe entre las dos quinasas, los resultados obtenidos con VRK2B podrían servir para confirmar y afianzar los resultados obtenidos con VRK1, o para obtener un mayor número de proteínas candidatas a interaccionar con VRK1. Por otro lado, dado que ha sido postulada una función reguladora para la región carboxilo terminal de VRK1 (Lopez-Borges and Lazo, 2000), decidimos incluir también en el estudio una construcción que comprende exclusivamente la región carboxilo terminal de VRK1 (aa 267-396), por ser ésta una región candidata a interaccionar con proteínas reguladoras o *upstream* de VRK1. De esta manera, podríamos confirmar resultados obtenidos con VRK1 completa (con lo cual indicaría que esas proteínas interaccionan por la región carboxilo terminal), o encontrar un mayor número de proteínas candidatas.

Para identificar nuevas proteínas que puedan interaccionar con las quinasas VRK1, VRK2B y la región carboxilo terminal de VRK1 (VRK1-C) se llevó a cabo una aproximación experimental basada en la purificación de complejos de proteínas mediante cromatografía de afinidad, e identificación de las proteínas por espectrometría de masas (Monti et al., 2005). En la figura 16 se representa el esquema de esta aproximación experimental. Las proteínas VRK se clonaron en el vector de expresión eucariota pCEFL-GST, que expresa las proteínas fusionadas a GST. Cada plásmido se transfectó transitoriamente en células HEK-293T, se lisaron las células, y se aisló la proteína GST-VRK, junto con todas las proteínas que pueden interaccionar con ella directa o indirectamente, mediante la adición a los lisados de la resina Glutación Sefarosa, que tiene afinidad por la GST en la proteína de fusión. Una vez aislados los complejos proteicos mediante la precipitación con Glutación Sefarosa (*pull-down*), las proteínas se resolvieron por electroforesis bidimensional mediante isoelectroenfoque y SDS-PAGE. De esta manera se obtiene una resolución mayor en la separación de la mezcla de proteínas, de forma que se separan en forma de puntos o *spots*.

Para cada gel bidimensional de un *pulldown* de GST-VRK, se realizó de forma paralela un gel bidimensional control de un *pulldown* de GST solo. Así, se seleccionaron aquellos *spots* que aparecían inequívocamente en el gel del *pulldown* de GST-VRK y no en el gel del *pulldown* de GST. Los *spots* seleccionados, candidatos a ser proteínas asociadas específicamente con la proteína VRK, bien directa o indirectamente, se identificaron mediante el análisis de su huella peptídica por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF. En la sección de Material y Métodos se encuentra detallada toda la metodología llevada a cabo para la identificación de las proteínas seleccionadas.

Figura 16. Diseño experimental para la identificación de proteínas que interactúan con la quinasa VRK1. 1. Transfección de los plásmidos pCEFL-GST-VRK o pCEFL-GST como control en células HEK-293T. 2. Aislamiento de los complejos de proteínas mediante precipitación con Glutatión Sefarosa (*pulldown*). 3. Separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque y SDS-PAGE. Para cada gel de GST-VRK se realiza de forma paralela un gel del *pulldown* control con GST, para poder seleccionar los *spots* que aparecen en el gel GST-VRK y no en el gel GST. 4. Escisión de los *spots*, digestión con tripsina y análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.2. Identificación de proteínas que interactúan con VRK2B

1.2.1. Electroforesis bidimensional del *pulldown* a gran escala de GST-VRK2B y selección de *spots*

Se realizó un *pulldown* a gran escala con GST-VRK2B y otro control con GST solo. Células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-GST-VRK2B (Blanco et al., 2006) o pCEFL-GST. A las 48 horas se prepararon los lisados y se comprobó la expresión de las proteínas sobreexpresadas en los extractos celulares mediante *Western blot* (fig. 17A, izquierda). A continuación, los lisados se incubaron con la resina Glutatión Sefarosa para precipitar GST-VRK2B y GST con todas sus proteínas asociadas. Una pequeña alícuota de los precipitados se visualizó por tinción con Coomassie (fig. 17A, derecha)

para comprobar la concentración de proteína en los precipitados. Se utilizó la misma cantidad de proteína precipitada total en los dos casos para realizar las electroforesis bidimensionales. En estas condiciones, la concentración molar de GST es mayor que la de GST-VRK2B, lo que va a favorecer nuestro control.

Para realizar las electroforesis bidimensionales se utilizaron tiras de IPG (gradiente de pH inmovilizado) con un gradiente de pH no lineal 3-10 en la primera dimensión, y un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida en la segunda dimensión, condiciones con las que se pretendía cubrir un amplio rango de proteínas. Las proteínas se visualizaron con tinción fluorescente, de manera que se comparó la imagen del gel GST-VRK2B con la del gel control GST, seleccionándose aquellos *spots* en el gel GST-VRK2B que de manera inequívoca no aparecían en el gel control. Los *spots* seleccionados, un total de 19, se pueden ver redondeados en rojo en la figura 17B. Estos *spots* se escindieron automáticamente con un robot, se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos de cada *spot* se procesaron para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Figura 17. A. Precipitación de GST-VRK2B y GST control. $5 \cdot 10^7$ células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-GST-VRK2B o pCEFL-GST. 48 horas después se prepararon lisados celulares y se comprobó la expresión de las proteínas por *Western blot* con un anticuerpo anti-GST (izq.). Los lisados se incubaron con la resina Glutathión Sefarosa toda la noche. 10 μ L de las resinas precipitadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE unidimensional para comprobar la concentración de proteína (dcha.). **B, C. Electroforesis bidimensional y selección de *spots*.** Para cada electroforesis bidimensional se utilizó 40 μ g de proteína en las resinas. Cada *pulldown* se resolvió en un rango de pH de 3-10 y en geles de poliacrilamida al 10% de 16x14 cm (GST-VRK1, fig. 17B; GST, fig. 17C). Los geles se tiñeron con tinción fluorescente Sypro Ruby. Los *spots* seleccionados (en rojo) fueron analizados por espectrometría de masas.

Figura 17 (Continuación)

1.2.2. Análisis de los *spots* seleccionados del gel GST-VRK2B

Los péptidos resultantes de la tripsinización de cada proteína se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF, obteniéndose para cada proteína tripsinizada una serie de valores de m/z (masa/carga) correspondientes a los péptidos ionizados, lo que se conoce como huella peptídica.

La identificación de proteínas por su huella peptídica consiste en la comparación de los valores de peso molecular de los péptidos, obtenidos mediante MALDI-TOF, con valores de peso molecular de péptidos de una base de datos, lo cual se lleva a cabo mediante motores de búsqueda. En nuestro caso, utilizamos el motor de búsqueda MASCOT (Perkins et al., 1999). Para cada proteína analizada, el motor de búsqueda asigna una lista de proteínas posibles, a cada una de las cuales le da una puntuación (*score*) basada en la probabilidad de que la asignación de una secuencia de proteína a los valores de masas experimentales sea al azar. Según los parámetros de la búsqueda, el programa establece un *score* mínimo para considerar una asignación estadísticamente significativa. Generalmente, para cada proteína analizada se obtiene una asignación con un *score* por encima de ese punto de corte. En estos casos, a mayor *score*, mayor probabilidad de que la asignación sea cierta. En otras ocasiones, por el contrario, no se obtiene ninguna asignación con un *score* por encima del punto de corte, por lo que no se puede determinar la identificación de la proteína de manera estadísticamente significativa. En la sección de Material y métodos (apartado 11, página 173) se puede encontrar una explicación más extensa del fundamento de la identificación de proteínas por su huella peptídica.

Las listas de masas de los péptidos obtenidas para cada uno de los 19 *spots* seleccionados fueron analizadas con el servidor “Mascot Server”. Los parámetros utilizados para las búsquedas (Material y métodos, apartado 12.4., página 176) establecieron un *score* mínimo de 54 para considerar una asignación estadísticamente significativa.

Cabe destacar que la especificación de los datos de los parámetros de búsqueda, junto con los datos del aparato MALDI-TOF (Material y métodos, apartado 12.4), así como más datos que se especificarán más adelante sobre los espectros de masas y las asignaciones (apartado 2.1.1., página 88), están en consonancia con los requerimientos de la *Proteomics Standards Initiative* de HUPO (*Human Proteome Organisation*). Esta iniciativa establece unos estándares a seguir para la especificación de la información sobre un resultado obtenido con técnicas proteómicas, lo que se conoce como MIAPE (*Minimum Information About a Proteomics Experiment*) (Taylor et al., 2007). Con ello se pretende aportar suficiente información para apoyar la interpretación adecuada y la validez de un experimento proteómico.

De los 19 *spots* seleccionados, sólo en 9 de ellos se obtuvo una asignación con un *score* mayor de 54. Estas 9 proteínas identificadas están reflejadas en la tabla 1, donde se indica el *spot*, la proteína asignada junto con su entrada en la base de datos UniProt (base de datos de entradas revisadas de Swiss-Prot y TrEMBL) (Apweiler et al., 2004), el *score* de la asignación,

su peso molecular teórico y una breve descripción de su función o naturaleza. Todas las asignaciones tienen un *score* alto, que puede dar una fiabilidad prácticamente total de la identificación (con un *score* mayor de 75, la asignación es altamente fiable). Todas las proteínas, además, tienen un peso molecular teórico que se corresponde con el peso molecular aparente que se observa en el gel, según los marcadores de peso molecular utilizados. La comprobación del peso molecular parece algo trivial, pero puede revelar errores en las asignaciones, sobre todo cuando estas tienen *scores* bajos (por debajo de 75, y hasta el punto de corte). Como control positivo, se seleccionó un *spot*, el número 7, que por tamaño y abundancia podría corresponder a GST-VRK2B; de hecho, ésta fue la identificación obtenida, con un *score* de 215, lo que apoya los resultados obtenidos. Por lo tanto, el resto de identificaciones deben corresponder a proteínas que forman complejos con VRK2B, al menos bajo las condiciones experimentales establecidas. Ninguna de estas proteínas se había descrito con anterioridad que interaccionan con VRK2B, y tampoco existía ninguna evidencia en el laboratorio, por lo que pueden significar nuevas proteínas candidatas a interaccionar con VRK2B, y por homología y redundancia en funciones, con VRK1.

Tabla 1
Spots del gel pCEFL-GST-VRK2B identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK2B						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM^a teórico (KDa)	Descripción	Otros nombres
5	TER-ATPasa	P55072	97	89,32	ATPasa del Retículo Endoplasmático Transicional	p97/VCP (Valosin-containing protein)
6	Glicina-ARNt sintetasa	P41250	131	83,14	Aminoacil-ARNt-sintetasa	Glicina-ARNt ligasa
7	VRK2	Q86Y07	215	45,03	Vaccinia-related kinase 2	
9	TCP-1	P17987	228	60,34	Tailles Complex Protein 1 (chaperona)	TCP-1- α
10	ATP sintasa α	P25705	171	59,75	Cadena alfa (subunidad reguladora) de la ATP sintasa mitocondrial	
12	ATP sintasa α	P25705	207	59,75	Cadena alfa (subunidad reguladora) de la ATP sintasa mitocondrial	
13	SET	Q01105	85	33,49	Inhibidor de la fosfatasa 2A, isoforma 2	I2PP2A
18	GTPasa Ran	P62826	170	24,42	GTPasa nuclear de la familia Ras (Ras-related nuclear)	Ran/TC4
19	Subunidad p28 reguladora del proteasoma 26S	O75832	83	24,43	Subunidad 10 del complejo regulatorio 19S del proteasoma 26S	Gankyrin, p28(GANK), PSMD10

^a PM, Peso Molecular

Tabla 2

Clasificación de las proteínas que interactúan con VRK2B identificadas por MS^a

Función^b / Referencia UniProt	Proteína	Score
Traducción		
P41250	Glicina-ARNt sintetasa	131
Proteasoma dependiente de ubiquitinación		
P55072	TER ATPasa (p97/VCP)	97
O75832	Subunidad p28 reguladora del proteasoma 26S	83
Plegamiento de proteínas (chaperonas)		
P17987	TCP-1	228
Actividad catalítica		
P25705	ATP sintasa α	207
Señalización celular		
Q01105	SET	85
P62826	GTPasa Ran	170

^a Proteínas identificadas con score significativo; MS, espectrometría de masas

^b Clasificación según grupos funcionales de Gene Ontology

En la tabla 2 se muestra una clasificación de las proteínas identificadas según su principal función. En muchos casos es prácticamente imposible asignar una única función a una proteína, por lo que la búsqueda bibliográfica ayudó a inclinarnos hacia una de sus funciones como la principal. Por otro lado, con el ánimo de estandarizar esta clasificación, se hizo uso de la base de datos de Gene Ontology (Ashburner et al., 2000), un proyecto desarrollado para unificar y estandarizar términos usados en Biología, de manera que las funciones asignadas a las proteínas son alguno de los grupos funcionales pertenecientes a alguna ontología (“componente celular”, “proceso biológico” o “función molecular”) de esta base de datos. Como se puede ver en la tabla 2, las proteínas identificadas tienen diversas funciones: elongación en la traducción, degradación de proteínas por el proteasoma, plegamiento de proteínas (chaperonas), síntesis de ATP y señalización celular, encontrándose en este último grupo el inhibidor de la fosfatasa 2A, SET, y la GTPasa nuclear Ran.

1.3. Identificación de proteínas que interaccionan con VRK1 y VRK1-C

1.3.1. Electroforesis bidimensionales de los *pulldowns* a gran escala de GST-VRK1 y GST-VRK1-C (geles pH 3-10) y selección de *spots*

La secuencia codificante completa de VRK1, y la región carboxilo terminal de VRK1 (aa 267-396) fueron clonados en el plásmido pCEFL-GST para dar lugar a las construcciones pCEFL-GST-VRK1 y pCEFL-GST-VRK1-C. Se realizaron *pulldowns* a gran escala de manera similar a como se realizaron para VRK2B. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-GST-VRK1, pCEFL-GST-VRK1-C o pCEFL-GST. A las 48 horas se prepararon los lisados y se comprobó la expresión de las proteínas mediante *Western blot* (fig. 18A, izquierda). Las proteínas se precipitaron con Glutación Sefarosa y se analizó la concentración de proteína en los precipitados visualizando una pequeña alícuota de estos por tinción con Coomassie (fig. 18A, derecha).

Figura 18. A. Precipitación de GST-VRK1, GST-VRK1-C y GST control. Para cada electroforesis bidimensional, $5 \cdot 10^7$ células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-GSTVRK1, pCEFL-GSTVRK1-C o pCEFL-GST. 48 horas después se prepararon lisados celulares y se comprobó la expresión de las proteínas por *Western blot* (izq.). Los lisados se incubaron con la resina Glutación Sefarosa toda la noche. 1,5 μ g de las resinas precipitadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE unidimensional y tinción con Coomassie para comprobar la concentración de proteína de las resinas por comparación con la banda de BSA (dcha.). **B, C, D. Electroforesis bidimensional y selección de *spots*.** 40 μ g de proteína en las resinas fueron utilizados para cada electroforesis bidimensional. Cada *pulldown* se resolvió en un rango de pH de 3-10 y en geles de poliacrilamida al 10% de 16x14 cm (GST-VRK1, fig. 18B; GST-VRK1-C, fig. 18C; GST, fig. 18D). Los geles se tiñeron con tinción fluorescente Sypro Ruby. Los *spots* seleccionados (en rojo) fueron analizados por espectrometría de masas.

Figura 18 (continuación)

pCEFL-GST-VRK1

pCEFL-GST-VRK1-C

Figura 18 (continuación)

Para realizar las electroforesis bidimensionales, de nuevo se usaron tiras de IPG con un gradiente de pH no lineal 3-10 en la primera dimensión, y un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida en la segunda dimensión. Se compararon los *spots* de los geles GST-VRK1 y GST-VRK1-C con los del gel control GST, seleccionándose aquellos que de manera inequívoca no aparecían en el gel control. En el gel GST-VRK1 se seleccionaron 37 *spots* (fig. 18B) y en el gel GST-VRK1-C tan sólo 2 (fig. 18C), debido a la gran abundancia tanto de GST-VRK1-C, como de GST en el gel control, que impidieron en gran medida la comparación de los geles; además, el efecto de *streaking* o rayado vertical en el gel GST-VRK1-C (efecto debido a la presencia de sales en la muestra) también enmascaró la visualización correcta de los *spots*.

1.3.2. Análisis de los *spots* seleccionados de los geles GST-VRK1 y GST-VRK1-C (pH 3-10)

Los 37 *spots* seleccionados del gel GST-VRK1 (fig. 18B, redondeados en rojo) se escindieron del gel con un sistema robotizado, se digirieron con tripsina y se procesaron para su posterior análisis por espectrometría de masas con MALDI-TOF. Se hizo lo mismo con los dos *spots* seleccionados del gel GST-VRK1-C (fig. 18C).

Las listas de masas de los péptidos se analizaron con el servidor “Mascot Server”, obteniéndose de nuevo, con los parámetros utilizados para las búsquedas (Material y métodos, apartado 12.4, página 176), un *score* mínimo de 54 para considerar una asignación estadísticamente significativa.

En esta ocasión, de los 37 *spots* seleccionados del gel GST-VRK1, sólo se obtuvieron asignaciones con valores de *score* por debajo de 54 en dos de ellos (*spots* 7 y 9); para las 35 restantes se obtuvieron asignaciones con *score* por encima de 54. Estas 35 identificaciones estadísticamente significativas están reflejadas en la tabla 3. Como control, se seleccionó un *spot*, indicado como CI (control interno), que por su movilidad y abundancia debería corresponder a GST-VRK1, obteniéndose de hecho VRK1 como identificación (no mostrado).

Llama la atención que en algunos casos se asigna la misma proteína a dos o tres *spots* diferenciados. Este es el caso de C1-THF sintasa (*spots* 1, 2 y 3), fenilalanil-ARNt sintetasa, cadena alfa (*spots* 10 y 12), piruvato quinasa, isoenzima M2 (*spots* 13 y 14) y ATP sintasa subunidad alfa (*spots* 15 y 16). Esto puede ser debido a que puede detectarse la proteína modificada postraduccionalmente, lo que produce un cambio en su punto isoeléctrico, y por tanto *spots* con distinta movilidad en la primera dimensión; éste podría ser el caso de la C1-THF, fenilalanina-ARNt-sintetasa, o piruvato quinasa. Otra opción es que no se trate de la misma proteína, debido a que el motor de búsqueda a veces no es capaz de diferenciar entre distintas isoformas de una proteína. En el caso de la piruvato quinasa, la isoenzima M1 es muy similar a la isoenzima M2, compartiendo las dos incluso la misma entrada en UniProt, con lo cual los dos *spots* podrían ser cada una de las dos isoformas. Los dos *spots* identificados como ATP sintasa α (los dos con un altísimo *score*) tienen distinta movilidad en el rango de pH y además distinto peso molecular. El análisis detallado de los espectros de masa reveló la presencia de dos péptidos acetilados en el *spot* 15, uno correspondiente a una acetilación amino terminal, y otro en una lisina. Recientes estudios demuestran que un 80% de las proteínas humanas están acetiladas en el extremo N-terminal (Arnesen et al., 2009). Esta modificación postraducciona produce una diferencia de masa de 84 Da, que es lo que se aprecia en el gel, y también puede producir una diferencia en la carga de la proteína, de ahí su distinta movilidad en el rango de pH. En el gel GST-VRK2B ocurre exactamente lo mismo con los *spots* 10 y 12 (fig. 17B): ambos se identifican como ATP sintasa alfa, y en este caso, es el *spot* 10 el que presenta dos acetilaciones.

Tabla 3
Spots del gel pCEFL-GST-VRK1 pH 3-10 identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK1 pH 3-10						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM ^a teórico (kDa)	Descripción	Otros nombres
1	C1-THF sintasa	P11586	132	101,56	C-1-tetrahidrofolato sintasa	
2	C1-THF sintasa	P11586	91	101,56	C-1-tetrahidrofolato sintasa	
3	C1-THF sintasa	P11586	107	101,56	C-1-tetrahidrofolato sintasa	
4	USP25	Q9UHP3	75	125,75	Peptidasa específica de ubiquitina 25	USP21, enzima de desubiquitinación 25, ubiquitin tiolesterasa 25, ubiquitin carboxilo-terminal hidrolasa 25
5	EF-2	P13639	161	95,34	Factor de elongación 2	
6	TCP-1-zeta	P40227	261	58,02	Chaperonin containing TCP-1, subunidad zeta (familia TCP-1 de chaperonas)	CCCT-zeta
8	Fascin	Q16658	137	54,53	Proteína formadora de haces de actina	
10	Fenilalanil-ARNt sintetasa, cadena α	Q9Y285	75	57,56	Aminoacil-ARNt-sintetasa	Fenilalanina-ARNt ligasa
11	IPPK	Q9H8X2	55	56,02	Inositol-pentaquisfosfato 2-quinasa	InsP5 2-quinasa
12	Fenilalanil-ARNt sintetasa, cadena α	Q9Y285	129	57,56	Aminoacil-ARNt-sintetasa	Fenilalanina-ARNt ligasa
13	Piruvato quinasa isoenzima M2	P14618	379	57,94	Enzima de glicolisis	
14	Piruvato quinasa isoenzima M2	P14618	209	57,94	Enzima de glicolisis	
15	ATP sintasa α	P25705	380	59,75	Cadena alfa (subunidad reguladora) de la ATP sintasa mitocondrial	
16	ATP sintasa α	P25705	329	59,75	Cadena alfa (subunidad reguladora) de la ATP sintasa mitocondrial	
17	EF-1-alfa-1	P68104	96	50,14	Factor de elongación 1-alfa 1	eEF1A-1
18	TFP-beta	P55084	257	51,29	Enzima trifuncional, subunidad beta (oxidación beta mitocondrial de ácidos grasos)	
19	hnRNP H	P31943	221	49,23	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear H	
20	EF-1-gamma	P26641	256	50,12	Factor de elongación 1-gamma	

^a PM, Peso Molecular

Tabla 3 (Continuación)

Spots del gel pCEFL-GST-VRK1 pH 3-10 identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK1 pH 3-10						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM ^a teórico (KDa)	Descripción	Otros nombres
21	eIF4A-3	P38919	58	46,87	Factor eucariota de iniciación de la traducción 4A, isoforma 3	Helicasa de ARN ATP-dependiente DDX48, DEAD-box protein 48
22	EF-Tu	P49411	218	49,54	Factor de elongación Tu	
23	Alfa-enolasa	P06733	232	47,17	Enzima glicolítica	
24	ATPasa 5 del proteasoma 26S	P62195	203	45,63	ATPasa de la subunidad reguladora 19S del proteasoma 26S	
25	Hsp40-4	P31689	134	44,87	Heat shock 40 KDa, proteína 4	
26	B-CK	P12277	335	42,64	Creatina quinasa tipo B	Creatina fosfoquinasa, fosfocreatina quinasa
27	RACK1	P63244	240	35,08	Receptor for activated kinase C 1	
28	Prohibitin (PHB)	P35232	309	29,80	Prohibitin	
29	GST	P21266	209	26,56	Glutathion S-transferasa clase Mu, 3	
30	Anhidrasa carbónica 2	P00918	211	29,25	Metaloenzima	Carbonato dehidratasa 2
31	GST	P28161	236	25,75	Glutathion S-transferasa clase Mu, 2	
32	GST	P28161	228	25,75	Glutathion S-transferasa clase Mu, 2	
33	GST	P08515	96	25,50	Glutathion S-transferasa clase Mu, isoenzima de 26 KDa	Antígeno Sj26
34	GST	P08515	116	25,50	Glutathion S-transferasa clase Mu, isoenzima de 26 KDa	Antígeno Sj26
35	GST	P08515	78	25,50	Glutathion S-transferasa clase Mu, isoenzima de 26 KDa	Antígeno Sj26
36	GTPasa Ran	P62826	229	24,42	GTPasa nuclear de la familia Ras (Ras-related nuclear)	Ran/TC4
37	GST	P09211	78	23,36	Glutathion S-transferasa clase Pi	

^a PM, Peso Molecular

La mayoría de las proteínas identificadas tienen un peso molecular que se corresponde con el peso molecular aparente que se observa en el gel; sin embargo, algunas proteínas migran más o menos de lo esperado. Hay un caso especialmente llamativo, el de USP25 (*spot* 4), con un peso molecular teórico de 126 KDa, que migra igual que EF-2 (*spot* 5), de 95 KDa. USP25 tiene dos isoformas, pero de un peso molecular muy similar (125 y 122 KDa), por lo que no puede tratarse de una isoforma de USP25 de unos 95 KDa. Por tanto, la migración observada de este *spot* hace dudar de la validez de la identificación. Por un lado podría decirse que la asignación es acertada, por tener un *score* moderadamente elevado de 75 y aceptar que la proteína presenta una migración en el gel más rápida de lo esperado. Por otro lado, podría considerarse alguna otra asignación no estadísticamente significativa que el buscador MASCOT ejecuta para la lista de péptidos (con *score* por debajo de 54), pero con un valor de masa de la proteína más ajustado al observado en el gel. Una candidata sería la glucógeno fosforilasa B (referencia de UniProt: P11216), de 96 KDa de peso molecular teórico, asignada con un *score* de 42. En el caso de que en sucesivos estudios se comprobara que USP25 no forma complejos con VRK1, sería conveniente considerar la glucógeno fosforilasa B como posible candidata a interactuar con VRK1.

Por otro lado, tres *spots* (33, 34 y 35) fueron asignados con una forma de la GST procedente de un vector de expresión (P08515). En estos casos la búsqueda se realizó frente a entradas de todos los organismos, ya que limitando a entradas sólo de *H. sapiens*, no se obtenían asignaciones. Además, otros cuatro *spots* se identificaron como alguna forma de la Glutación S-transferasa humana (29, 31, 32, 37). Esto puede significar que junto a VRK1 coprecipitan distintas clases e isoformas de esta proteína. Sin embargo, queda la duda de que éstas hayan sido precipitadas directamente por afinidad a la resina Glutación Sefarosa, o que estos *spots* sean GST procedente del vector de expresión pCEFL-GST, de forma que el buscador en algunos casos asigna GST humana y en otros no.

En la tabla 4 se recogen las dos identificaciones del gel GST-VRK1-C. En ambas se obtuvo GST como asignación estadísticamente significativa. En el caso del *spot* 1, la búsqueda ampliada a todos los organismos asignó GST procedente de un vector de expresión. Por el peso molecular que presenta debe tratarse de la propia GST-VRK1-C, como resultado de un efecto de *streaking* horizontal debido a una mala solubilización de la proteína por su gran abundancia en la muestra. Seguramente, los péptidos obtenidos de la región carboxilo terminal de VRK1 no son suficientes para que se obtenga como resultado VRK1 entera, obteniéndose sólo GST. El *spot* 2, que se identifica como GST humana, podría tratarse de GST procedente del vector de expresión, al igual que pasó con los *spots* del gel de VRK1 completa.

Tabla 4

Spots del gel pCEFL-GST-VRK1-C pH 3-10 identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK1-C pH 3-10						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM ^a teórico (KDa)	Descripción	Otros nombres
1	GST	P08515	203	26	Glutathión S-transferasa clase Mu, isoenzima de 26 KDa	Antígeno Sj26
2	GST	O15217	166	24	Glutathión S-transferasa clase alfa, 4	

^a PM, Peso Molecular

1.3.3. Electroforesis bidimensionales con rango de pH estrecho de *pulldowns* a gran escala de GST-VRK1 y GST-VRK1-C y análisis de spots

Como se observa en las figuras 18B y 18C, hay zonas en la primera dimensión en las que apenas aparecen proteínas (sobre todo a pH más ácido), mientras que en la zona central del gel se acumulan la mayoría de ellas. Para intentar resolver mejor esa zona decidimos realizar electroforesis bidimensionales con un rango de pH más pequeño, entre 4 y 7, de *pulldowns* a gran escala de GST-VRK1, GST-VRK1-C, y de GST como control.

Se realizaron de nuevo *pulldowns* transfectando transitoriamente los plásmidos pCEFL-GST-VRK1, pCEFL-GST-VRK1-C o pCEFL-GST en células HEK-293T, y en este caso, las electroforesis bidimensionales se realizaron en tiras de IPG con un gradiente de pH no lineal 4-7 y un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida en la segunda dimensión (figura 19). Los spots señalados en rojo en las figuras 19A y 19B fueron los seleccionados para el análisis por espectrometría de masas. Los parámetros utilizados en la búsqueda fueron los mismos que para los análisis del apartado 1.3.2.

En la tabla 5 se recogen las 15 identificaciones estadísticamente significativas resultantes de los 26 spots seleccionados del gel GST-VRK1 (score superior a 54).

Sólo aparecen dos proteínas que se identificaron también en el gel de gradiente de pH 3-10, hnRNP H y EF-1-gamma. Son los spots 14 y 20 (fig. 19A, tabla 5), que se corresponden con los spots 19 y 20 del gel de pH 3-10 (fig. 18B, tabla 3). Esto indica que hemos conseguido ampliar esa zona de pH, resolver mejor las proteínas y por tanto ser capaces de seleccionar e identificar nuevas proteínas. Debido seguramente a la menor abundancia de proteína en este gel, se identificaron de manera estadísticamente significativa menos proteínas, y las asignaciones se obtuvieron con scores más bajos que las del gel de pH 3-10.

Figura 19

Figura 19 (continuación)

Figura 19. Electroforesis bidimensionales con rangos de pH 4-7 de *pulldowns* de GST-VRK1 (A), GST-VRK1-C (B) y GST control (C). Los *pulldowns* se realizaron como se indica en la figura 18. Las electroforesis bidimensionales se realizaron en tiras IPG de 13 cm con un gradiente de pH 4-7, y geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida de 16x14 cm. Los geles GST-VRK1 y GST-VRK1-C se tiñeron con tinción fluorescente Sypro Ruby, y el gel control GST con tinción de plata. Los *spots* seleccionados (en rojo) fueron analizados por espectrometría de masas.

En cuanto a los pesos moleculares, hay tres proteínas identificadas cuyo peso molecular teórico no se ajusta al peso molecular visto en el gel. Una de ellas, glicina-ARNt sintetasa (*spot* 5), migra bastante más de lo esperado; sin embargo, esto también ocurre (aunque en menor medida) en el gel GST-VRK2B, en el cual también se identifica esta proteína (figura 17B, *spot* 6). Parece, por tanto, que esta proteína presenta un peso molecular aparente más bajo que el teórico. Otro de los casos es el factor eIF3, subunidad f (*spot* 23), que tiene un peso molecular teórico de 37,56 KDa; sin embargo, esta proteína se conoce como subunidad p47 del factor eIF3, con lo cual debe presentar un peso molecular aparente de 47 KDa, que es el que presenta en el gel.

Tabla 5
Spots del gel pCEFL-GST-VRK1 pH 4-7 identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK1 pH 4-7						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM ^a teórico (KDa)	Descripción	Otros nombres
1	TER-ATPasa	P55072	133	89,32	ATPasa del Retículo Endoplasmático Transicional	p97/VCP (Valosin-Containing Protein)
2	p110/SART-3	Q15020	69	109,94	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 (ribonucleoproteína pequeña nuclear, snRNP)	U6- p110 recycling factor
3	GPDH-M	P43304	56	80,83	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	
4	MCM7	P33993	219	81,31	Complejo de mantenimiento del minicromosoma, proteína 7	
5	Glicina-ARNt sintetasa	P41250	86	83,14	Aminoacil-ARNt sintetasa	Glicina-ARNt ligasa
7	TCP-1-epsilon	P48643	138	59,67	T-complex protein 1, subunidad epsilon	
11	6PF-2-K/Fru-2,6-P2asa	P16118	81	54,68	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa	
14	hnRNP H	P31943	116	49,23	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear H	
15	P2RX7	Q7Z771	67	49,11	Receptor purinérgico P2X, 7	
17	ATPasa 2 del proteasoma 26S	P35998	277	48,63	ATPasa de la subunidad reguladora 19S del proteasoma 26S	
18	Adenosilhomocisteinasa	P23526	165	47,72	S-Adenosil-L-homocisteína hidrolasa	SAH hidrolasa
20	EF-1-gamma	P26641	176	50,12	Factor de elongación 1-gamma	
23	eIF3f	O00303	113	37,56	Factor eucariota de iniciación de la traducción 3 subunidad epsilon	eIF3 subunidad p47
24	Proteína ácida ribosomal P0	P05388	214	34,27	Proteína estructural del ribosoma 60S	L10E
26	GST	P28161	306	25,75	Glutathion S-transferasa clase Mu, 2	

^a PM, Peso Molecular

La identificación más dudosa, aunque por encima del punto de corte, es GPDH-M (*spot* 3), con *score* 56 y con un peso molecular aparente bastante por encima de lo esperado, en comparación con la migración de MCM7 (*spot* 4), con *score* 219 y con un peso molecular teórico similar al de GPDH-M. En este caso, debería considerarse alguna otra asignación no estadísticamente significativa que dé el buscador MASCOT, pero que pudiera aceptarse por ajustarse mejor al peso molecular observado, o por algún otro criterio; sin embargo, no se encuentra una proteína de estas características en el resultado de la búsqueda de MASCOT, lo que hace que la identificación más probable, aunque con dudas, sea GPDH-M.

En la tabla 6 se muestran las identificaciones correspondientes al gel GST-VRK1-C, con pH 4-7 (figura 19B). Al realizar el gel bidimensional en un pH 4-7, conseguimos resolver una zona en la que prácticamente no aparece nada de GST-VRK1-C, consiguiendo seleccionar numerosos *spots*, al contrario de lo que ocurrió con el gel de pH 3-10 (figura 18C). Sin embargo, al igual que con GST-VRK1, la baja abundancia de proteína en el gel no permitió la identificación estadísticamente significativa de un mayor número de proteínas. Se obtuvieron sólo 6 asignaciones con *score* mayor de 54 de los 22 *spots* seleccionados en total, de las cuales además una de ellas es GST (en este caso parece claro que este *spot* corresponde a GST-VRK1-C por el peso molecular, y que se ha generado por un efecto de *streaking* horizontal).

Tabla 6
Spots del gel pCEFL-GST-VRK1-C pH 4-7 identificados con score significativo

Gel pCEFL-GST-VRK1-C pH 4-7						
Spot n°	Identificación	Referencia UniProt	Score	PM^a teórico (KDa)	Descripción	Otros nombres
1	Glicoproteína-P	Q2M3G0	119	89,83	Transportador de membrana tipo ABC (ATP binding cassette), subfamilia B, miembro 5	ABCB5 P-gp
5	Cdc25B	P30305	57	65	Cdc25B tirosina fosfatasa, inductora de mitosis	
10	ASML3a	Q92484	59	51,26	Esfingomielinasa fosfodiesterasa 3a	
11	SDHB	P21912	62	31,63	Succinato deshidrogenasa, subunidad B	
12	Hsp70-1	P08107	169	70,05	Heat shock 70 KDa, proteína 1	
22	GST	P08515	92	25,50	Glutación S-transferasa clase Mu, isoenzima de 26 KDa	Antígeno Sj26

^a PM, Peso Molecular

Curiosamente, ninguna de las proteínas identificadas en *pulldowns* de VRK1 completa es alguna de estas 5 proteínas identificadas en el *pulldown* de la región carboxilo terminal de VRK1. Esto indica que el uso de esta construcción (VRK1-C) no ha servido para confirmar la zona de interacción de proteínas identificadas para VRK1 completa; sin embargo, sí ha servido para identificar un mayor número de proteínas que interaccionan con VRK1, que además podemos decir que lo hacen con su región carboxilo terminal, la cual probablemente tenga una función reguladora de la quinasa (Lopez-Borges and Lazo, 2000).

En cuanto a los pesos moleculares, hay dos proteínas cuyo peso molecular teórico no se ajusta al peso molecular visto en el gel, Hsp70 (*spot* 12) y SDHB (*spot* 11). Hsp70 tiene un *score* muy elevado; sin embargo, el *score* más bajo de SDHB (62), hace dudar de la validez de esta identificación. Esta identificación se acepta por estar estadísticamente por encima del punto de corte, pero con dudas.

Por otro lado, la identificación del *spot* 4 se descartó aun obteniéndose una asignación con un *score* de 61. Esta asignación era la proteína Liprin-alfa-2, que tiene un peso molecular teórico de 143 KDa, lo que hace prácticamente imposible que sea el *spot* 4, puesto que éste presenta una migración en torno a 66 KDa. En el resto de asignaciones que dio el buscador para este *spot*, con *score* por debajo del punto de corte, no se obtuvo ninguna que correspondiera a alguna proteína de 66 KDa, con lo cual la identificación de este *spot* fue desechada.

1.3.4. Clasificación de las proteínas identificadas en los *pulldowns* de GST-VRK1 y GST-VRK1-C

Tras la realización de los *pulldowns* con VRK1 y VRK1-C, y después de los análisis de las identificaciones por espectrometría de masas, se obtuvo un total de 40 identificaciones netas a partir de un total de 87 *spots* seleccionados, teniendo en cuenta que dos proteínas se identificaron por duplicado (EF-1-gamma y hnRNP H, para VRK1, en el gel de pH 3-10 y en el de pH 4-7). Las otras 47 proteínas, bien no se identificaron de manera estadísticamente significativa, o bien se identificaron como GST, desechándose por poder ser procedentes de la GST del vector de expresión. En la tabla 7 se muestra la clasificación, según su principal función, de las 40 proteínas identificadas candidatas a ser proteínas que interaccionan con VRK1.

Tabla 7

Clasificación de las proteínas que interaccionan con VRK1 identificadas por MS^a

Función ^b / Referencia UniProt	Proteína	Score
Traducción		
Elongación		
P13639	Factor de elongación 2 (EF-2)	161
P68104	Factor de elongación 1-alfa 1 (EF-1-alfa-1)	96
P26641	Factor de elongación 1-gamma (EF-1-gamma)	256/176
P49411	Factor de elongación Tu (EF-Tu)	218
P41250	Glicina-ARNt sintetasa	86
Q9Y285	Fenilalanil-ARNt sintetasa, cadena α	129
P05388	Proteína ácida ribosomal P0	214
Iniciación		
O00303	Factor de iniciación de la traducción 3- ϵ (eIF3f)	113
P38919	Factor de iniciación de la traducción 4A, 3 (eIF4A-3)	58
Plegamiento de proteínas (chaperonas)		
P48643	TCP-1-epsilon	138
P40227	TCP-1-zeta	261
P31689	Heat shock 40 kDa, proteína 4 (Hsp40-4)	134
P08107	Heat shock 70 KDa, proteína 1 (Hsp70-1)	169
Actividad catalítica		
P12277	Creatina quinasa tipo B (B-CK)	335
P00918	Anhidrasa carbónica 2	211
P23526	Adenosilhomocisteinasa	165
Q92484	Esfingomielinasa fosfodiesterasa 3a (ASML3a)	59
Q9H8X2	Inositol-pentaquisfosfato 2-quinasa (IPPK)	55
Proceso metabólico celular		
P11586	C-1-tetrahidrofolato sintasa (C1-THF sintasa)	132
P14618	Piruvato quinasa, isoenzima M2	379
P16118	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa	81
P06733	Alfa-enolasa	232
P25705	ATP sintasa α	380
P55084	TFP-beta (Enzima trifuncional, subunidad beta)	257
P43304	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH-M)	56
P21912	Succinato deshidrogenasa, subunidad B (SDHB)	62
Proteasoma dependiente de ubiquitinación		
Q9UHP3	Peptidasa específica de ubiquitina 25 (USP25)	75
P62195	ATPasa 5 del proteasoma 26S	203
P35998	ATPasa 2 del proteasoma 26S	277
P55072	TER ATPasa (p97/VCP)	133
Procesamiento de ARN		
P31943	hnRNP H (Ribonucleoproteína heterogénea nuclear H)	221/116
Q15020	p110/SART-3	69
Regulación del ciclo celular		
Mitosis		
P30305	Cdc25B tirosina fosfatasa	57
Replicación ADN		
P33993	MCM7 (<i>Minichromosome maintenance complex</i> , 7)	219
Señalización celular		
P62826	GTPasa Ran	229
P35232	Prohibitin	309
P63244	RACK1 (<i>Receptor for activated kinase C</i>)	240
Q16658	Fascin	137
Proteínas transmembrana		
Q7Z771	Receptor purinérgico P2X, 7 (P2RX7)	67
Q2M3G0	Glicoproteína-P (ABCB5)	119

^a Proteínas identificadas con score significativo, ignorando las identificadas como GST^b Clasificación según grupos funcionales de Gene Ontology

Las funciones asignadas a las proteínas son alguno de los grupos funcionales de Gene Ontology (Ashburner et al., 2000). Las proteínas identificadas tienen diversas funciones: hay 9 proteínas implicadas en la traducción (por tanto ribosomales), 4 proteínas chaperonas implicadas en el plegamiento de proteínas; un total de 13 enzimas que catalizan diversas reacciones específicas, incluidas de metabolismo, principalmente citoplasmáticas y también mitocondriales; 2 proteínas transmembrana; y 4 proteínas del proteasoma implicadas en la degradación de proteínas. Además, también se encuentran proteínas nucleares, dos de ellas localizadas en los *spliceosomas* (hnRNP H y p110/SART-3), de unión al ARN y con un papel en el procesamiento del ARN o *splicing*, y una helicasa que participa en la replicación del ADN (MCM7). Finalmente, también se identificó una importante proteína reguladora del ciclo celular, la fosfatasa Cdc25B, implicada en el inicio de mitosis y varias proteínas implicadas en señalización celular, entre las que se encuentran RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase 1*), Prohibitin, Fascin y la GTPasa nuclear Ran.

Ninguna de estas proteínas se había descrito con anterioridad que interaccionaran con VRK1, y tampoco existía ninguna evidencia en el laboratorio, por lo que estos resultados pueden significar la identificación de nuevas proteínas candidatas a interaccionar con VRK1.

1.4. Proteínas identificadas para VRK1 y VRK2B

Para VRK1 se obtuvieron cuarenta proteínas identificadas con un valor de *score* estadísticamente significativo, que se representan agrupadas según sus funciones en la tabla 7. Para VRK2B se obtuvo un total de siete proteínas con *score* estadísticamente significativo (tabla 1), cuyas funciones pueden verse en la tabla 2. De estas siete proteínas, cuatro fueron identificadas también para VRK1: Glicina-ARNt sintetasa (tabla 5), TER ATPasa (p97/VCP) (tabla 5), ATP sintasa α (tabla 3) y GTPasa Ran (tabla 3). Las otras tres proteínas identificadas para VRK2B tienen funciones similares a algunas de las identificadas para VRK1, de forma que se pueden agrupar dentro de los mismos grupos funcionales.

Por lo tanto, tenemos cuatro proteínas que han sido identificadas en dos experimentos independientes, lo que apoya el resultado, ya que significa que es reproducible. Además, estas cuatro proteínas podrían interaccionar con dos proteínas de la familia VRK con alta homología en funciones y en estructura entre sí (VRK1 y VRK2B), lo que indica que estas interacciones puedan tener una mayor relevancia biológica que el resto de las encontradas. En la tabla 8 se representan las cuatro proteínas en cuestión y se refleja el *score* de la asignación en cada caso.

Tabla 8
Proteínas identificadas por MS^a para VRK1 y VRK2B

Referencia UniProt	Proteína	Score VRK1	Score VRK2B
P41250	Glicina-ARNt sintetasa	86	131
P55072	TER ATPasa (p97/VCP)	133	97
P25705	ATP sintasa α	380	207
P62826	GTPasa Ran	229	170

^aMS, espectrometría de masas

p97/VCP es una chaperona ATP-dependiente que se localiza principalmente en el retículo endoplasmático, donde participa en la retrotranslocación al citoplasma de proteínas mal plegadas del lumen o de la membrana del retículo endoplasmático (Halawani and Latterich, 2006; Wang et al., 2004), facilitando su transporte al proteasoma dependiente de ubiquitinación. p97/VCP también está implicada en otros procesos, como transporte de vesículas y fragmentación y reensamblaje de las cisternas del aparato de Golgi durante la mitosis (Wang et al., 2004). ATP sintasa se localiza en la membrana interna de la mitocondria, produciendo ATP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana durante la fosforilación oxidativa (Elston et al., 1998). La subunidad alfa es una de las cinco subunidades del núcleo catalítico (Wang et al., 2001). Glicina-ARNt sintetasa reconoce y activa al aminoácido glicina para unirlo al ARN de transferencia específico, generando un glicil-ARNt (Arnez et al., 1999; Freist et al., 1996; Shiba et al., 1994), participando así en la biosíntesis de proteínas. La GTPasa Ran pertenece a la superfamilia de GTPasas Ras, y es la única de las cuatro proteínas con una localización nuclear, y un papel en la regulación de la señalización celular mediante la regulación del transporte de macromoléculas entre núcleo y citoplasma (Melchior et al., 1993; Moore and Blobel, 1993) y su participación en distintas fases de la mitosis y la división celular (Carazo-Salas et al., 1999; Hetzer et al., 2000; Wilde and Zheng, 1999; Zhang and Clarke, 2000). Dentro de estas cuatro proteínas seleccionadas por haber sido identificadas en dos experimentos independientes, que podrían interaccionar tanto con VRK1 como con VRK2B, una de ellas, la GTPasa Ran parece ser la más indicada para profundizar en su estudio dada su localización subcelular y sus funciones en la regulación de diversos procesos celulares.

2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA QUINASA VRK1 CON LA GTPasa RAN

2.1. Caracterización de la interacción de VRK1 con Ran

Puesto que el objetivo que nos planteamos fue encontrar posibles proteínas reguladoras o *upstream* de VRK1, y dadas las funciones conocidas hasta el momento de VRK1 y su localización principalmente nuclear (Valbuena et al., 2007a), decidimos centrarnos en el estudio de la interacción Ran-VRK1, ya que era la identificación que reunía los mejores requisitos: fue identificada en dos experimentos independientes, y podría interaccionar tanto con VRK1 como con VRK2B, dos quinasas dentro de la familia VRK con alta homología en estructura y funciones entre sí. De todas las identificaciones que reunían estos dos requisitos, Ran era la única con un papel en señalización celular y con una localización nuclear.

2.1.1. *Minimum information about a proteomics experiment (MIAPE)* de las identificaciones de Ran

En la sección de Material y Métodos (apartado 12.4, página 176) se encuentra detallada la información necesaria requerida por la HUPO para presentar un experimento proteómico, lo que se conoce como MIAPE (*Minimum Information About a Proteomics Experiment*). La información requerida se consultó en los módulos *Mass spectrometry* y *Mass spectrometry Informatics*, disponibles en el sitio web de la PSI (*Proteomics Standards Initiative*): <http://www.psides.info/miape> (Taylor et al., 2007). Únicamente falta completar la información acerca de las dos identificaciones en las que vamos a centrar nuestro estudio. Para ello, en la figura 20 se muestra, en primer lugar, el espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos resultantes de los dos *spots* identificados como Ran (fig. 20A y 20B). En el caso del *spot* 36 del gel pCEFL-GST-VRK1 pH 3-10, (fig. 20, izquierda) se utilizaron para la búsqueda un total de 23 valores experimentales de m/z (masa/carga) de toda la lista de valores de m/z obtenidos. De estos 23 valores, 15 fueron asignados a valores de masa de péptidos teóricos de Ran. En el espectro (fig. 20A) están señalados a qué picos corresponden los 15 valores de m/z asignados. En la figura 20C se indica el valor m/z experimental de los péptidos asignados, la secuencia de aminoácidos de los péptidos teóricos a los que se ha asignado estos valores de masa, y su posición en la secuencia de Ran. Los péptidos asignados cubren un 59% de la secuencia de aminoácidos de Ran, y lo hacen a lo largo de toda ella. Para esta asignación se obtuvo un *score* de 229. Para la identificación del *spot* 18 del gel pCEFL-GST-VRK2B (fig. 20, derecha), fueron utilizados para la búsqueda un total de 21 valores de m/z de la lista experimental obtenida. De estos 21, 12 fueron asignados a péptidos teóricos de Ran. En el espectro de la figura 20B están

señalados los picos correspondientes a las 12 masas asignadas, y debajo (fig. 20D) se indica el valor m/z experimental de estos picos, la secuencia de aminoácidos a la que se asignan y su posición en la secuencia de Ran. El porcentaje de cobertura de la secuencia fue en este caso de un 39%. El *score* de la asignación fue de 170.

Figura 20. Espectros de masas, péptidos asignados y cobertura de la secuencia de Ran para las dos identificaciones. A, B. Los espectros obtenidos se cargaron con el programa Bio Tools 2.1 (Bruker Daltonics) y se procesaron y analizaron con el programa Xtof 5.1.1. (Bruker Daltonics). La lista de picos experimental se introdujo en el buscador MASCOT (versión 2.0, Enero 2004). Los péptidos señalados en los espectros fueron asignados a péptidos teóricos de Ran. **C, D.** Valor m/z experimental de los péptidos asignados, secuencia de aminoácidos de los péptidos y su posición en la secuencia de Ran. Debajo se indica la cobertura de la secuencia de Ran (subrayado, negrita) que dan los péptidos asignados. Int. Abs., intensidad absoluta. m/z, masa/carga.

2.1.2. Validación de la interacción de Ran con VRK1 y VRK2B

Consideramos que antes de iniciar la caracterización de la interacción de VRK1 con la GTPasa Ran encontrada por métodos proteómicos, era necesario confirmar o validar esta interacción. Los datos proteómicos obtenidos para la identificación de la GTPasa Ran indican con una alta confianza que puede ser una proteína que interacciona directa o indirectamente con VRK1 y VRK2B en las condiciones llevadas a cabo en esos ensayos. Una manera inequívoca de confirmar estas interacciones es realizar de nuevo experimentos de *pulldown* en los cuales reconocemos las proteínas en cuestión con anticuerpos específicos mediante *Western blot*.

Realizamos ensayos de *pulldown* variando las condiciones respecto a las usadas para la identificación con espectrometría de masas. Además, se utilizó tanto la proteína Ran silvestre (wt) como los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E). El mutante Ran(T24N) es un mutante “defectivo en función” o “dominante negativo”. No puede unir nucleótidos, por lo que forma un complejo inhibitorio estable con RCC1 (Klebe et al., 1995a). Tiene una conformación inactiva que mimetiza el estado de unión a GDP (Albee et al., 2006). Ran(L43E), por el contrario, es un mutante constitutivamente activo, que mimetiza la conformación de Ran unida a GTP (Albee et al., 2006; Lounsbury et al., 1996).

Figura 21. Validación de la interacción de VRK1 y VRK2B con Ran. Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1 (A) o pCEFL-HA-VRK2B (B). Se usó 1 mg de cada extracto para cada incubación con las proteínas de fusión GST-Ran wt, GST-Ran(T24N), GST-Ran(L43E), o con GST sólo, unidas a la resina Glutación Sefarosa. Las proteínas precipitadas se analizaron por *Western blot* con anticuerpos específicos para el epítipo HA y la proteína GST. La expresión de VRK1-HA y de VRK2B-HA se detectó en los extractos totales por *Western blot* con el anticuerpo anti-HA.

Para realizar los ensayos de *pulldown*, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1 o pCEFL-HA-VRK2B, que expresan las correspondientes proteínas humanas fusionadas con el epítipo HA. Se comprobó la correcta expresión de las proteínas sobreexpresadas en los extractos celulares (fig. 21, panel superior). Los extractos se

incubaron con las proteínas purificadas Ran wt, Ran(T24N) y Ran(L43E) fusionadas a GST, y unidas a la resina Glutación Sefarosa. Se utilizó la proteína GST sola unida a la resina Glutación Sefarosa como control negativo. Se realizó un *Western blot* con un anticuerpo anti-HA para detectar la presencia de VRK1-HA y VRK2B-HA en los precipitados de Glutación Sefarosa. Tanto VRK1-HA, como VRK2B-HA se detectaron en el precipitado de GST-Ran wt, y no en el de GST, (fig. 21, panel inferior) indicando que VRK1 y VRK2B interaccionan establemente con Ran wt. Este resultado nos confirmó los datos obtenidos por los métodos proteómicos. Además el grado de interacción de VRK1 y VRK2B con los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E) es prácticamente el mismo que con Ran wt.

2.1.3. Los otros miembros de la familia VRK también interaccionan con Ran

Figura 22. VRK2A y VRK3 también interaccionan con Ran. Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCEFL-HA-VRK2A (A) o pCEFL-HA-VRK3 (B). Se usó 1 mg de cada extracto para cada incubación con las proteínas de fusión GST-Ran wt, GST-Ran(T24N), GST-Ran(L43E), o con GST sólo, unidas a la resina Glutación Sefarosa. Las proteínas precipitadas se analizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-HA y anti-GST. La expresión de VRK2A-HA y de VRK3-HA se detectó en los extractos totales por *Western blot* con el anticuerpo anti-HA.

Dado que dos miembros de la familia VRK pueden interaccionar establemente con la GTPasa Ran (VRK1 y VRK2B), quisimos comprobar si el resto de miembros de esta familia también era capaz de interaccionar con Ran. VRK1 y VRK2 son los miembros que comparten mayor homología entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos (44%) (Nichols and Traktman, 2004). La isoforma VRK2B es una forma truncada de la isoforma larga VRK2A (Blanco et al., 2006), con lo cual cabría esperar que VRK2A también interaccione con Ran. VRK3, sin embargo, es el miembro más divergente de la familia, presentando una homología en secuencia de aminoácidos con VRK1 del 33% y con VRK2 del 23% (Nichols and Traktman, 2004). Se realizó un experimento de *pulldown* similar al descrito en el apartado anterior: se transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCEFL-HA-VRK2A o el plásmido pCEFL-HA-VRK3, y los extractos se incubaron con las proteínas purificadas GST-Ran wt, GST-Ran(T24N), GST-

Ran(L43E) o GST sola unidas a la resina Glutación Sefarosa. Al igual que ocurrió con VRK1 y VRK2B, tanto VRK2A-HA, como VRK3-HA se detectaron en el precipitado de GST-Ran wt, y no en el de GST, (fig. 22) indicando que VRK2A y VRK3 interaccionan establemente con Ran wt. Por tanto, los cuatro miembros de la familia VRK son capaces de interaccionar con Ran. También se comprobó que la interacción de VRK2A y VRK3 con los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E) se da prácticamente en el mismo grado que con GST-Ran wt.

2.1.4. VRK1 no interacciona con otras GTPasas

Dado que la GTPasa Ran puede unirse a todos los miembros de la familia VRK, quisimos evaluar la especificidad de la interacción VRK1-Ran analizando si VRK1 era capaz de unirse a otras GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras, como cdc42 y Rac (pertenecientes a la subfamilia de GTPasas Rho). Para ello se realizó un ensayo de *pulldown* similar al realizado en los experimentos anteriores (fig. 21 y 22). Se observó que VRK1-HA sí interacciona con Ran wt, pero no lo hace con la forma activa de cdc42, cdc42(Q61L), ni con Rac wt (fig. 23). Por tanto, aunque Ran no restringe su unión a un solo miembro de la familia VRK, VRK1 parece interaccionar específicamente con la GTPasa Ran y no con otras GTPasas de la familia Ras.

Figura 23. VRK1 no interacciona con otras GTPasas pequeñas relacionadas con Ran. Se transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCEFL-HA-VRK1. Se usó 1 mg de extracto para cada incubación con las proteínas de fusión GST-Ran wt, GST-cdc42(Q61L), GST-Rac wt o GST solo unidas a la resina Glutación Sefarosa. VRK1-HA se detectó en el precipitado, así como en los extractos totales con un anticuerpo anti-HA. Las proteínas de fusión en los precipitados se detectaron por tinción Ponceau.

2.1.5. La interacción de Ran con VRK1 es directa y no requiere proteínas adicionales

Las proteínas identificadas en los *pulldowns* a gran escala pueden interaccionar con VRK1 bien directamente, o bien formar parte de complejos de proteínas en los cuales no todas tienen por qué interaccionar directamente con VRK1. Por lo tanto, nos planteamos comprobar si la interacción de Ran con VRK1 era directa.

En principio, el resultado obtenido en el experimento realizado para la validación de la interacción de Ran con VRK1 (figura 21A) sugiere que la interacción es directa, ya que la interacción se detectó en un sistema en el que Ran y VRK1 están muy por exceso de cualquier otra u otras proteínas que pudieran actuar como puente.

Figura 24. VRK1 interacciona de manera directa con Ran. Se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* utilizando una concentración fija de GST-Ran (80 nM) y concentraciones crecientes de VRK1-His. Las incubaciones se llevaron a cabo en el tampón MgCl_2 durante 2h a 4°C . GST-Ran se precipitó añadiendo resina Glutación Sefarosa a la mezcla. Se detectó la presencia de VRK1-His en los precipitados por *Western blot* con un anticuerpo anti-VRK1, y GST-Ran con un anticuerpo frente a GST.

Para determinar sin lugar a dudas si la interacción Ran-VRK1 era directa, se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* utilizando las dos proteínas purificadas expresadas en *E. coli* con los epítomos adecuados. Si se detecta la interacción entre las dos proteínas, y si además, la cantidad de complejo formado depende de las concentraciones de las proteínas de partida, la interacción entre Ran y VRK1 debe ser directa y no depender de la presencia de alguna otra proteína o cofactor. Se utilizó Ran wt fusionada al epítomo GST a una concentración fija y en exceso, y VRK1 fusionada al epítomo 6xHis (VRK1-His) en concentraciones crecientes pero a la vez limitantes (por encontrarse muy por defecto con respecto a la concentración de GST-Ran en cada punto). La mezcla de proteínas se incubó en tampón MgCl_2 y se precipitó GST-Ran mediante la adición de resina Glutación Sefarosa a la mezcla. VRK1 fue detectada en los precipitados de GST-Ran, y no en el de GST; además la cantidad de VRK1 que coprecipita con GST-Ran aumenta de manera proporcional al aumentar la concentración de partida de VRK1 (fig. 24). Este resultado indica que existe una interacción directa entre VRK1 y Ran, e implica que esta interacción debe tener una función distinta (o adicional) a una supuesta importación de VRK1 al núcleo a través del sistema controlado por Ran, ya que en este caso, VRK1 no interaccionaría directamente con Ran, sino a través de alguna importina (Stewart, 2007).

2.1.6. VRK1 interacciona *in vitro* con distintas conformaciones de Ran

La conformación, o el estado de unión a nucleótido GDP o GTP, de Ran, determina su afinidad por sus distintos reguladores o efectores. Por ejemplo, las importinas y exportinas interaccionan sólo con RanGTP, (Scheffzek et al., 1995; Vetter et al., 1999a; Vetter et al., 1999b), así como las proteínas RanBP, que presentan dominios de unión a RanGTP (RanBD) (Yokoyama et al., 1995). Otras proteínas que interaccionan con Ran, como el factor de transporte nuclear NTF2, interaccionan preferentemente con RanGDP (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). También existen proteínas efectoras (de unión a RanGTP), capaces de unirse a la forma RanGTP a través de dominios distintos a los dominios RanBD: la proteína de *X. laevis* XMog es capaz de unirse preferentemente a RanGTP, sin presentar estos dominios tipo

(Nicolas et al., 2001), y también survivina presenta preferencias por la unión a RanGTP (Xia et al., 2008).

Figura 25. VRK1 interacciona con Ran independientemente del nucleótido unido a Ran. Se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* utilizando las proteínas purificadas VRK1-His y GST-Ran wt sin nucleótido (carril 3), GST-Ran wt unida a GTP (carril 1) GST-Ran wt unida a GDP (carril 2), GST-Ran(L43E) unida a GTP (carril 4), GST-Ran(T24N) (carril 5) o GST solo, a las concentraciones indicadas, en un volumen final de 250 μ L de tampón $MgCl_2$. La incubación se llevó a cabo durante 2h a 4°C, tras lo cual se añadió resina Glutación Sefarosa para precipitar las proteínas con GST. Se detectó la presencia de VRK1-His en los precipitados por *Western blot* con un anticuerpo anti-VRK1, y la cantidad de proteínas GST-Ran precipitadas con un anticuerpo frente a GST.

Sin embargo, el resultado de la figura 21A parece indicar que VRK1 es capaz de unirse a la GTPasa en sus dos conformaciones, puesto que puede interaccionar tanto con el mutante Ran(T24N) (mimético de la conformación RanGDP), como con Ran(L43E) (mimético de la conformación RanGTP). Para confirmarlo, comprobamos esta capacidad de unión en ensayos de interacción *in vitro* con proteínas recombinantes expresadas en *E.coli* y purificadas. Se comparó la capacidad de unión de VRK1-His a GST-Ran wt sin nucleótido o unida a GDP o GTP. En disolución, Ran puede unirse a cualquiera de los dos nucleótidos (Klebe et al., 1995a). Para cargar Ran con GDP o GTP, se incubó la proteína con el nucleótido a una concentración de éste en exceso. El nucleótido unido se estabilizó diluyendo la mezcla con tampón $MgCl_2$. Para llevar a cabo el ensayo de interacción *in vitro*, se añadió VRK1-His quedando a una concentración limitante (0,07 μ M frente a 2 μ M de GST-Ran). De forma paralela, también se utilizaron los mutantes GST-Ran(T24N) y GST-Ran(L43E) para comprobar su capacidad de unión a VRK1-His bajo las condiciones establecidas para este experimento. Como se puede ver en la figura 25, VRK1-His es capaz de interaccionar con Ran tanto unida a GDP, como unida a GTP; por lo tanto, podemos decir que VRK1 interacciona con Ran independientemente de su conformación activa (RanGTP) o inactiva (RanGDP). Así mismo, en estas condiciones, VRK1-His también es capaz de unirse al mutante Ran(L43E), y se observa que la interacción entre VRK1-His y el

mutante Ran(T24N) es más estable, es decir, debe existir una menor disociación del complejo en estos casos.

2.1.7. La interacción VRK1-Ran ocurre *in vivo*

El siguiente paso para analizar la interacción VRK1-Ran consistió en comprobar si la interacción se detectaba con las proteínas endógenas, utilizando la línea celular HEK-293T.

En primer lugar se incubó la proteína purificada GST-Ran wt unida a la resina Glutación Sefarosa con extracto de células HEK-293T. Se utilizó la proteína GST sola como control, que se incubó con la misma cantidad de extracto de HEK-293T. Previamente se detectó la expresión de VRK1 endógena en los extractos celulares por *Western blot* (figura 26A, panel superior) y posteriormente se detectó su presencia en el precipitado de GST-Ran wt y de GST solo. Observamos que VRK1 endógena coprecipita con GST-Ran wt, y no con GST, indicando que GST-Ran wt interacciona específicamente con VRK1 endógena (figura 26A, abajo).

Figura 26. Interacción de GST-Ran con VRK1 endógena y de GST-VRK1 con Ran endógena. A. $5 \cdot 10^7$ células HEK-293T se lisaron y los extractos se incubaron con las proteínas purificadas GST-Ran wt o GST solo unidas a la resina Glutación Sefarosa, 2 horas a 4°C . Se detectó la presencia de VRK1 endógena en los precipitados mediante *Western blot* con el anticuerpo monoclonal 1F6, específico para VRK1. Este mismo anticuerpo se usó para detectar VRK1 endógena en los lisados. **B.** Como en A, salvo que esta vez se incluyeron los mutantes de Ran(L43E) y Ran(T24N) en el ensayo. **C.** Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCEFL-GST-VRK1 ($8\mu\text{g}$) o pCEFL-GST ($2\mu\text{g}$). 48 horas después se prepararon los lisados celulares. 2 mg de extracto total se mezclaron con $40\mu\text{L}$ de resina Glutación Sefarosa y se incubó varias horas a 4°C . Se detectó la presencia de Ran y RCC1 endógenos en el precipitado, así como en los extractos totales, con anticuerpos específicos. Se utilizó un anticuerpo anti-GST para detectar la cantidad de GST-VRK1 y GST tanto en el precipitado como en los lisados.

Una vez detectada la interacción de GST-Ran wt con VRK1 endógena quisimos analizar si la conformación de Ran podía afectar a su unión con VRK1 endógena. Para ello se

compararon los niveles de interacción de VRK1 con Ran wt, Ran(T24N) y Ran(L43E). Ran wt, cuando se expresa exógenamente, o se incuba con extracto celular, queda unido preferentemente a GDP (en extractos de células normales, y debido a la hidrólisis de GTP producida durante las inmunoprecipitaciones, la mayoría de Ran wt sobreexpresado se queda unido a GDP) (Lounsbury et al., 1996). Ran(T24N) no se asocia a nucleótido y mantiene una conformación inactiva mimética del estado de unión a GDP, mientras que Ran(L43E) mimetiza la conformación activa de unión a GTP. Se realizó un ensayo similar al anterior, solo que incluyendo los mutantes GST-Ran(T24N) y GST-Ran(L43E). Como se puede ver en la figura 26B, VRK1 endógena es capaz de interaccionar con las tres formas de Ran, con lo cual, VRK1 interacciona con Ran independientemente de su conformación, confirmándose lo observado en los ensayos *in vitro*.

Por último se realizó el experimento inverso, pero en lugar de utilizar GST-VRK1 purificada, se transfectó el plásmido pCEFL-GST-VRK1 en células HEK-293T, de manera que se obtiene GST-VRK1 sobreexpresada en la célula. Como control se transfectó el plásmido vacío, pCEFL-GST. Los lisados se incubaron con Glutatió Sefarosa y en los precipitados se detectó la presencia de Ran endógena con un anticuerpo específico. Ran interacciona específicamente con GST-VRK1 sobreexpresada, ya que se detecta claramente en el precipitado de GST-VRK1 y no en el de GST (figura 26C). Así mismo, se quiso comprobar si RCC1, el GEF nuclear de Ran, formaba parte de este complejo. Para ello se determinó la presencia de RCC1 por *Western blot* en este mismo precipitado con un anticuerpo específico para RCC1. Se obtuvo una banda débil correspondiente a RCC1 en el precipitado de GST-VRK1, lo que indica que las tres proteínas, Ran, VRK1 y RCC1 pueden formar parte del mismo complejo.

2.1.8. VRK1 y RCC1 se detectan en el mismo complejo *in vivo* pero no interaccionan directamente

Como se puede ver en la figura 26C, RCC1 fue detectado en un precipitado de GST-VRK1, lo que indicaba que podría interaccionar con ésta. Ya hemos analizado que Ran y VRK1 interaccionan directamente. A la vista de este resultado, quisimos comprobar si VRK1 y RCC1 interaccionan directamente, o bien si forman parte del mismo complejo pero sin darse una interacción directa entre ambas proteínas.

Para ello se transfectaron células HEK-293T con GST-VRK1 y GFP-RCC1 en las combinaciones que se pueden observar en la figura 27A (panel superior). GFP-RCC1 no se detectó en el precipitado de GST-VRK1 (carril 2), sin embargo sí se detectaron tanto Ran endógena como RCC1 endógena (reproduciéndose el resultado de la figura 26C). Parece que RCC1 necesita de alguna proteína puente para coprecipitar junto con VRK1, con lo cual GFP-RCC1 sobreexpresado, y en exceso, no es capaz de coprecipitar con VRK1 puesto que no debe haber suficiente “proteína puente” en los extractos; además, este RCC1 exógeno no desplaza a

RCC1 endógeno del complejo VRK1-RCC1. Sin embargo, sí parece capturar algo de Ran endógeno, puesto que en el carril 2 hay menos Ran endógeno precipitado con VRK1. Ran y su GEF RCC1 interaccionan a través de una de las caras de la estructura tipo *donut* de RCC1, (Renault et al., 2001) permitiendo por un lado el intercambio de nucleótido, y por otro regulando la interacción de RCC1 con la cromatina (Hutchins et al., 2004; Li et al., 2003; Li and Zheng, 2004a; Moore et al., 2002). Por tanto una posibilidad sería que VRK1, Ran y RCC1 formaran un trímero, actuando Ran como puente entre VRK1 y RCC1.

Figura 27. VRK1 no interacciona directamente con RCC1. **A.** Células HEK-293T fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-GST-VRK1 (5 μg) ó pCEFL-GST (1 μg) y pGFP-RCC1 (2 μg). Se prepararon lisados 48 horas después de la transfección, y se comprobó la expresión de las proteínas transfectadas y endógenas con anticuerpos anti-GST, anti-RCC1 y anti-Ran. Los lisados se incubaron con resina Glutación Sefarosa y las proteínas precipitadas se analizaron por *Western blot* con anticuerpos específicos para RCC1, Ran y GST. **B.** Se realizaron ensayos de interacción con las proteínas purificadas RCC1-His (concentración limitante) y GST-VRK1 o GST-Ran (en exceso) en tampón MgCl₂, incubándose 2 horas a 4°C. Se detectaron las proteínas en los precipitados con los anticuerpos anti-RCC1 y anti-GST. endog., endógena

Para dilucidar inequívocamente si RCC1 y VRK1 no interaccionan directamente, se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* con las dos proteínas purificadas, utilizando GST-VRK1 como “cebo” y RCC1-His en cantidades limitantes. Como control negativo, se utilizó GST solo, y como control positivo, se detectó la interacción entre GST-Ran wt y RCC1-His. En estas condiciones, sí que fuimos capaces de detectar la interacción entre RCC1 y Ran, pero no se detectó interacción alguna entre RCC1 y VRK1 (figura 27B), indicando que ambas proteínas no interaccionan directamente.

2.1.9. Interacción y colocalización de VRK1 y Ran endógenas

La localización subcelular de VRK1 es principalmente nuclear, aunque existe también alguna subpoblación en el citoplasma. Esta subpoblación se detecta dependiendo del anticuerpo

utilizado (Valbuena et al., 2007a). Así mismo, en condiciones de interfase, Ran se concentra principalmente en el núcleo a través de su importación por el factor NTF2 (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). Diferentes estudios han demostrado la localización nuclear en interfase de Ran en diferentes líneas celulares: NIH3T3 (células somáticas embrionarias de ratón) (Guarguaglini et al., 2000), HeLa (Ren et al., 1993), o células somáticas de *X. laevis* (Zhang et al., 1999). Durante mitosis, Ran se detecta redistribuida hacia el citoplasma, excluida de la cromatina condensada (Guarguaglini et al., 2000), pero localizándose también en el huso mitótico en metafase. Además, un gradiente de RanGTP es generado en torno a los cromosomas (Kalab et al., 2006; Li and Zheng, 2004a).

Decidimos analizar la localización subcelular de Ran y VRK1 conjuntamente, para comprobar si existía colocalización de las dos proteínas, utilizando la línea celular HEK-293T. Analizamos la localización de VRK1 endógena con un anticuerpo policlonal con el que se detecta la población mayoritaria nuclear (Valbuena et al., 2007a). Ran se detectó con un anticuerpo monoclonal, con el cual se detecta principalmente Ran nuclear tras una fijación con paraformaldehído. En la figura 28A se aprecia que las dos proteínas colocalizan en el núcleo en condiciones de interfase. En la figura, la flecha señala una célula en metafase, en la que se observa cómo las señales de Ran y VRK1 solapan: ambas están excluidas de la cromatina condensada y distribuidas por todo el citoplasma mitótico.

También quisimos analizar la colocalización de VRK2 con Ran. La línea HEK-293T expresa las dos isoformas de VRK2 (Blanco et al., 2006), sin embargo el anticuerpo policlonal utilizado para detectar VRK2 no discrimina entre ellas. De esta manera, se obtiene una señal citoplasmática (que corresponde a VRK2A y B), y también nuclear, que debe ser VRK2B. Se obtiene un solapamiento de la señal de esta isoforma con Ran en el núcleo. Aunque también se detecta Ran en el citoplasma, esta señal apenas solapa con la de VRK2 (fig. 28B).

Por último quisimos confirmar la interacción de VRK1 y Ran mediante coimmunoprecipitación de las proteínas endógenas (fig. 28C). Se utilizaron extractos de HEK-293T para inmunoprecipitar Ran (fig. 28C, izq.) o VRK1 (fig. 28C, dcha.). En ambos casos se realizó como control una inmunoprecipitación en paralelo con un anticuerpo del mismo isotipo sin ninguna diana endógena. VRK1 se detectó mediante *Western blot* en el precipitado de Ran pero no en el precipitado control con el anticuerpo anti-AU5. Así mismo, Ran se detectó en el precipitado de VRK1, pero no en el control con el anticuerpo anti-FLAG. Como control positivo, se realizó de manera paralela y bajo las mismas condiciones una inmunoprecipitación de Ran en la que se detectó la presencia de su GEF, RCC1 (fig. 28D). Por lo tanto, somos capaces de detectar la interacción de las proteínas endógenas Ran y su GEF RCC1, y bajo las mismas condiciones experimentales, también la de Ran y VRK1 endógenas.

Figura 28. Localización subcelular de VRK1 y Ran endógenas, y detección de su interacción por inmunoprecipitaciones recíprocas. A. Colocalización de VRK1 y Ran endógenas. VRK1 se detectó con el anticuerpo policlonal VE (rojo). Ran se detectó en el núcleo con un anticuerpo monoclonal (clon 20, BD Biosciences) (verde) tras fijación con paraformaldehído al 3%. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La barra indica 20 μ m. **B.** Colocalización de VRK2 y Ran endógenas. Igual que en (A), salvo que se utilizó un anticuerpo policlonal para VRK2, que no discrimina entre las dos isoformas (rojo). **C.** Se lisaron $2 \cdot 10^8$ células HEK-293T y se comprobó la expresión de Ran y VRK1 endógenas por *Western blot* (arriba). La mitad del extracto se usó para la inmunoprecipitación de Ran endógeno con el anticuerpo anti-Ran monoclonal y su correspondiente inmunoprecipitación control con un anticuerpo monoclonal inespecífico (anti-AU5) (izq.). Se detectó VRK1 en el precipitado con un anticuerpo policlonal (VE) y Ran con el anticuerpo monoclonal. La otra mitad del extracto se usó para la inmunoprecipitación de VRK1 endógeno con una mezcla de anticuerpos policlones (VE + VC) y la inmunoprecipitación control con un anticuerpo policlonal inespecífico (anti-FLAG). Ran y VRK1 se detectaron en el precipitado con anticuerpos monoclonales. **D.** De forma paralela a la inmunoprecipitación de Ran (C, izq.) y con las mismas condiciones experimentales, se inmunoprecipitó Ran y se detectó RCC1 en el precipitado con un anticuerpo policlonal de cabra.

2.1.10. Ran interacciona con la región carboxilo terminal de VRK1, VRK2A y VRK2B

Figura 29. Identificación de la zona de VRK1 y VRK2 que interacciona con Ran. **A.** Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-VRK1-HA (VRK1 entera), pcDNA-VRK1-N-myc (VRK1 aa 1-332), pEGFP-VRK1-C (VRK1 aa 267-396) o pCDNA-VRK1(K179E)-myc (VRK1 quinasa inactiva), y los extractos se incubaron con GST-Ran wt unida a resina Glutación Sefarosa. Las proteínas VRK1 se detectaron en los lisados y en los precipitados de GST-Ran con el anticuerpo policlonal VE. **B.** Esquema de las construcciones utilizadas en (A) y zona de interacción delimitada. **C.** Representación de los niveles relativos de interacción de cada proteína de (A) con Ran. **D.** Células HEK-293T fueron transfectadas con plásmidos que codifican distintas construcciones de VRK2 fusionadas a GST: pCEFL-GST-VRK2-N (aa 1-320 de VRK2A y B), pCEFL-GST-VRK2A-C1 (aa 256-508 de VRK2A), pCEFL-GST-VRK2A-C2 (aa 364-508 de VRK2A) y pCEFL-GST-VRK2B-C (aa 256-397 de VRK2B). Ran endógeno se detectó en los precipitados con un anticuerpo anti-Ran, y las construcciones de VRK2 con un anticuerpo anti-GST. **E.** Esquema de las construcciones utilizadas en (D) y zona de interacción delimitada. **F.** Se realizó un ensayo como en (A), comparando la interacción de Ran wt y Ran(L43E) con las regiones amino y carboxilo de VRK1. P, tinción Ponceau.

A continuación quisimos identificar la región de VRK1 implicada en la interacción con Ran. Para ello se realizó un ensayo de *pull-down* similar al de la figura 21A (página 90), pero utilizando plásmidos de VRK1 que codifican distintas regiones de la proteína: VRK1 completa (VRK1-HA) (aa 1-396), VRK1 amino (VRK1-N-myc) (aa 1-332, que comprende el dominio quinasa más una zona adyacente hasta el residuo en el que se pierde la homología con CK1) y VRK1 carboxilo (GFP-VRK1-C) (aa 267-396, región carboxilo terminal, más los 9 últimos residuos del dominio quinasa). También se incluyó la quinasa inactiva, VRK1(K179E)-myc. Se utilizó GST-Ran wt purificada y unida a la resina Glutación Sefarosa, que se incubó con cada extracto. En el precipitado se determinó la presencia de las construcciones de VRK1 con el anticuerpo policlonal VE que reconoce epítomos por toda la secuencia de la proteína (Valbuena et al., 2007a). Se observó que las cuatro construcciones son capaces de interaccionar con GST-Ran wt (fig. 29A). El nivel de interacción de cada una, representado como la cantidad de proteína detectada en el precipitado, normalizado frente a la cantidad en el extracto y la cantidad de GST-Ran en el precipitado, se representa en la figura 29C. VRK1 completa es la que mejor interacciona, pero hay una pérdida significativa de interacción con las construcciones amino y carboxilo, indicando que quizás la zona de interacción esté cerca de la parte truncada en las construcciones. La zona de VRK1 común a las tres construcciones, que comprende los aminoácidos 267 al 332, sería la zona candidata a interaccionar con Ran, (fig. 29B) pero el resultado no descarta que pueda haber más zonas de interacción. La interacción de Ran con VRK1(K179E) es también más débil que con VRK1 silvestre (VRK1-HA), seguramente debido a la inestabilidad de esta proteína, que carece de autofosforilación (Valbuena et al., 2008b), y sugiriendo que la autofosforilación de VRK1 es un factor importante para su interacción con Ran.

Se procedió también a delimitar la región de interacción de VRK2 con Ran. Para ello se transfectaron plásmidos en células HEK-293T que codifican distintas regiones de VRK2A y VRK2B fusionadas a GST: GST-VRK2-N (aa 1-320) (región amino terminal común para las dos isoformas); GST-VRK2A-C1 (aa 256-508) y GST-VRK2A-C2 (aa 364-508) (dos construcciones solapantes de la región carboxilo terminal de VRK2A); y GST-VRK2B-C (aa 256-397) (región carboxilo terminal de la isoforma VRK2B). Estas proteínas se precipitaron mediante la adición de resina Glutación Sefarosa a los extractos y se determinó la cantidad de Ran endógena que interacciona con cada proteína mediante *Western blot*. Se comprobó que Ran interacciona con tres de las cuatro construcciones, las cuales solapan en una zona que va del residuo 256 al 320, común para las dos isoformas (fig. 29D y E), por lo que ésta podría ser la zona de interacción con Ran.

Tanto VRK1 como VRK2A y VRK2B interaccionan con total seguridad con Ran por su región carboxilo terminal, fuera del dominio quinasa (aa 267-397 en VRK1; 256-364 en VRK2A y B). En esta región carboxilo terminal se predice una estructura flexible y

Figura 30. Alineamiento de las quinasas VRK y competencia por la interacción con Ran entre VRK1 y VRK3. **A.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las regiones adyacentes a los dominios catalíticos de las cuatro quinasas VRK, realizado con ClustalW. En rojo se indican residuos pertenecientes al dominio catalítico y en sombreado la zona de interacción única delimitada para VRK1 (aa 267-332) y VRK2A y B (aa 256-320). Se señala la señal de localización nuclear en VRK1 (azul). *, residuos idénticos; ., residuos conservados. **B.** Se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* utilizando VRK1-His y combinaciones de GST-Ran y GST-VRK3 a las concentraciones indicadas. VRK1-His se precipitó con la adición de resina de afinidad a histidinas (BD Talon). GST-Ran y GST-VRK3 se detectaron a la vez en los precipitados con un anticuerpo anti-GST. VRK1-His se detectó mediante tinción de la membrana con Ponceau.

Hemos encontrado que la región carboxilo terminal de VRK1 (267-396) y VRK2 (256-364) está implicada en la interacción con Ran. Además, la zona candidata sería en VRK1, aa 267-332 y en VRK2, aa 256-320. Al hacer un alineamiento de secuencias de la región carboxilo terminal de VRK1, VRK2A y B, junto con la secuencia correspondiente de VRK3, observamos que las zonas candidatas de interacción con Ran delimitadas en VRK1 y VRK2 (fig. 30A, sombreado), son las zonas que más homología guardan entre sí, considerando las cuatro quinasas. En ellas aparecen varios aminoácidos conservados, que por tanto serían candidatos a participar en la interacción. Además, la conservación de esta zona de interacción entre las proteínas VRK sugiere que pueden tener afinidades similares por Ran y competir entre ellas por la unión con Ran.

Se comprobó esta hipótesis con VRK1 y VRK3. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* con proteínas purificadas, utilizando VRK1-His en exceso, y VRK3 y Ran fusionadas a GST y en cantidades limitantes. VRK1-His se precipitó con la adición de resina de afinidad a histidinas. En el precipitado se detectó VRK3 y Ran conjuntamente con un anticuerpo anti-GST. VRK3 no interacciona con VRK1, como se ve en el carril 2 de la figura 30B. Sin embargo, VRK3 secuestra parcialmente a Ran, ya que hay menos Ran interaccionando con VRK1 en presencia de VRK3, lo que indica que VRK1 y VRK3 sí compiten por interaccionar con Ran. Además, deben interaccionar por la misma región de Ran, puesto que no se detecta un complejo VRK1-Ran-VRK3.

2.1.12. Mutaciones de VRK1 en la zona de interacción con Ran afectan a su afinidad por Ran

Dentro de la zona candidata delimitada en VRK1 y VRK2 a interaccionar con Ran, (fig. 30A, sombreado azul) existe una zona en la que hay una serie de residuos bastante conservados en las cuatro quinasas VRK. Esta zona está representada en la figura 31A. La conservación de estos residuos hace que se puedan considerar candidatos a participar en la interacción con Ran. Se eligieron los residuos E313 y K314 como los mejores candidatos por tener grupos cargados que podrían participar en una interacción electrostática con otros residuos de Ran. Se realizaron dos mutantes, uno en el que se mutó el glutámico 313 a glicina (E313G), y otro en el que además se mutó la lisina 314 a isoleucina (E313G/K314I). En ambos casos se cambió un aminoácido cargado por otro neutro. Estos plásmidos, junto con VRK1 silvestre (VRK1-HA), se transfectaron en células HEK-293T y los extractos se incubaron con GST-Ran unida a la resina Glutación Sefarosa. De esta manera analizamos la capacidad de los mutantes de VRK1 de interaccionar con Ran, en comparación con la de VRK1 silvestre. Como se ve en la figura 31B, VRK1(E313G) tiene más afinidad por Ran que VRK1, sin embargo esta ganancia se pierde al introducir la segunda mutación en la lisina 314. A la vista del resultado, podría decirse que el residuo E313 no participa en la interacción, y que al cambiarse por un residuo más pequeño, se

facilita la interacción, o bien la proteína adquiere otra conformación que hace más accesible la zona de interacción. Sin embargo, la lisina 314 sí debe participar en la interacción, ya que el grado de interacción con Ran del doble mutante VRK1(E313G/K314I) es menor que el del mutante simple VRK1(E313G). Sin embargo, no debe ser el único residuo implicado puesto que sigue detectándose la interacción. Estos resultados, sobre todo el hecho de que la interacción disminuya al introducir la mutación en la lisina 314, confirman que VRK1 interacciona con Ran por su región carboxilo terminal.

2.2. Análisis de la función de la interacción de VRK1 con Ran

2.2.1. Ran no es sustrato de fosforilación de VRK1 ni de VRK2B *in vitro*

Una posible función de la interacción VRK1-Ran podría ser la formación de un complejo enzima-sustrato, donde Ran sería diana de fosforilación de VRK1. Sin embargo, las interacciones entre quinasas y sustratos son transitorias, mientras que la interacción VRK1-Ran parece ser estable y de alta afinidad. Además, hasta el momento no ha sido descrita ningún tipo de modificación postraduccional en la GTPasa Ran. Aun así, quisimos comprobar si Ran podía ser sustrato de fosforilación de VRK1, y por similitud en funciones, también de VRK2B. Se llevaron a cabo ensayos quinasas *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, utilizando proteínas purificadas unidas a GST. Se incluyeron tanto Ran wt, como los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E), ya que podrían comportarse de diferente manera como sustratos de VRK1 o

VRK2B. En las autorradiografías se detectó únicamente la autofosforilación de las quinasas (fig. 32), con lo cual Ran parece no ser sustrato de fosforilación de VRK1 ni VRK2B.

Figura 32. VRK1 (A) y VRK2B (B) no fosforilan a Ran. Se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, utilizando como sustratos las proteínas purificadas Ran wt, Ran(T24N) o Ran(L43E) fusionadas a GST y como quinasas GST-VRK1 (A) o GST-VRK2B (B). Como control positivo sirvió la autofosforilación de las quinasas. A la izquierda se muestra la tinción con azul de Coomassie y a la derecha la incorporación de la radiactividad.

2.2.2. VRK1 no afecta a la interacción de Ran con RCC1 *in vitro*

Ran interacciona con RCC1 por la cara opuesta a la de unión de RCC1 con la cromatina (Renault et al., 2001). La unión de RCC1 a la cromatina es dinámica y está regulada por Ran. Ran y RCC1 forman un complejo binario *in vivo*, intermediario de la reacción de intercambio de nucleótido, que se une a la cromatina establemente (Li et al., 2003), ya que la unión de Ran a RCC1 produce un cambio conformacional en la cola amino terminal de éste que favorece su unión a la cromatina (Hao and Macara, 2008). La formación de RanGTP por RCC1 disocia el complejo Ran-RCC1 y la unión de RCC1 a la cromatina. La unión dinámica de RCC1 a la cromatina, regulada por Ran, genera un mecanismo de intercambio acoplado a los cromosomas, necesario para producir RanGTP *in vivo* en los cromosomas mitóticos (Li et al., 2003).

Puesto que la interacción de Ran con RCC1 juega un importante papel en la unión dinámica de RCC1 a los cromosomas en mitosis, quisimos comprobar si la unión de VRK1 a Ran podría afectar a su interacción con RCC1. Para ello se llevaron a cabo ensayos de interacción *in vitro*, en los cuales se analizó la capacidad de unión de Ran a RCC1 en presencia de VRK1, utilizando proteínas purificadas. Se utilizó el mutante Ran(T24N), que forma un complejo inhibitorio estable con RCC1. *In vivo*, el mutante Ran(T24N) se une y atrapa a RCC1 en un complejo binario, debido a la ausencia de intercambio de nucleótido (Dasso et al., 1994; Klebe et al., 1995a; Lounsbury et al., 1996). Además, Ran(T24N) inmoviliza RCC1 en la cromatina debido a la formación de complejos Ran-RCC1 que se unen a los cromosomas establemente (Li et al., 2003). Así mismo, como hemos comprobado anteriormente, VRK1 también forma un complejo estable con este mutante de Ran.

En primer lugar usamos cantidades limitantes de GST-Ran(T24N), y exceso de GST-VRK1 y RCC1-His (fig. 33A), condiciones en las que Ran debe interactuar con las dos por

separado. Precipitamos RCC1-His con la adición de resina de afinidad a histidinas, y vimos que la cantidad de Ran(T24N) unida a RCC1 permanecía igual en presencia de un exceso de VRK1. Por tanto, VRK1 no parece impedir ni favorecer la interacción Ran-RCC1. Podría decirse que VRK1 no tiene una mayor afinidad por Ran que RCC1, o al menos no compite con RCC1 por Ran. También este resultado indica que, *in vitro*, las tres proteínas forman un complejo ternario RCC1-Ran-VRK1, y por tanto RCC1 y VRK1 deben interaccionar por distintos sitios de Ran.

Figura 33. Efecto de VRK1 en la interacción Ran-RCC1. **A.** Se realizaron ensayos de interacción con las proteínas purificadas GST-Ran(T24N) a una concentración limitante, y RCC1-His y GST-VRK1 en exceso. Las incubaciones se llevaron a cabo en tampón MgCl_2 , 2 horas a 4°C . Se añadió resina de afinidad a histidinas para precipitar RCC1-His, incluido al punto control sin RCC1-His. GST-VRK1 y GST-Ran se detectaron en los precipitados a la vez con un anticuerpo anti-GST. RCC1-His se detectó con tinción Ponceau. **B.** Se utilizaron GST-Ran(T24N), VRK1-His y RCC1-His en cantidades equimolares para realizar ensayos de interacción, que se realizaron en tampón MgCl_2 , 2 horas a 4°C . Se utilizaron cantidades crecientes de RCC1-His. GST-Ran(T24N) se precipitó mediante la adición de resina Glutación Sefarosa. VRK1 y RCC1 se detectaron en los precipitados con anticuerpos específicos para cada uno, y GST-Ran(T24N) con un anticuerpo anti-GST.

Para afianzar este resultado, realizamos otro ensayo de interacción *in vitro* en el cual se precipitó GST-Ran(T24N), en presencia de VRK1-His y RCC1-His, que se añadieron en cantidades que no estaban en exceso con respecto a la de GST-Ran(T24N). De esta manera se quiso determinar la competencia entre las dos proteínas por Ran. Observamos que las dos proteínas, RCC1 y VRK1, interaccionan con Ran en las condiciones establecidas (fig. 33B) y que podríamos estar detectando complejos Ran-RCC1, Ran-VRK1 y RCC1-Ran-VRK1 a la vez. Esto indica que VRK1 y RCC1 deben tener afinidades parecidas por Ran. Además se observa que al aumentar la concentración de RCC1 en los ensayos, aumenta la cantidad de RCC1 interaccionando con Ran (lo que es de esperar), pero también se detecta más VRK1 en los precipitados. Esto indicaría que cuando Ran se une a RCC1, aumenta la afinidad de Ran por VRK1, facilitando la incorporación de VRK1 para formar un complejo RCC1-Ran-VRK1, algo similar a lo que ocurre entre RanBP1, RanGTP y RanGAP1: la interacción de RanBP1 con RanGTP hace más accesible la unión de RanGAP1 a RanGTP (Lounsbury and Macara, 1997; Macara, 2001).

2.2.3. VRK1 no fosforila directamente a RCC1 *in vitro*, ni a través de un complejo VRK1-Ran-RCC1

No hay descrita ninguna modificación postraducciona en Ran, pero sí está descrita la fosforilación, además de otras modificaciones como la metilación, de RCC1 en su cola amino terminal (Chen et al., 2007; Hutchins et al., 2004; Li and Zheng, 2004a). La quinasa mitótica cdc2 (CDK1/ciclina B) fosforila residuos en esta cola en mitosis, impidiendo la asociación inhibitoria de RCC1 a importina alfa y por tanto permitiendo la asociación dinámica de RCC1 a la cromatina y la formación de RanGTP en torno a los cromosomas mitóticos. VRK1 tiene varias dianas nucleares conocidas, y dado que VRK1 y RCC1 se detectan en el mismo complejo *in vivo*, analizamos si RCC1 podía ser diana de fosforilación de VRK1. Para ello realizamos ensayos quinasa con proteínas purificadas en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, utilizando GST-VRK1 y RCC1-His como sustrato. Como control negativo se realizó un ensayo con la quinasa inactiva (GST-VRK1(K179E)), y como control positivo, se llevó a cabo la fosforilación por VRK1 de un sustrato conocido, como p53 (aa 1-85). Como se puede ver en la autorradiografía (fig. 34A, dcha.), se detecta la autofosforilación de la quinasa activa, y la fosforilación de p53, pero no se observa fosforilación de RCC1-His (carril 1), aun tratándose de una exposición de tiempo largo. Este resultado indica que VRK1 no fosforila a RCC1 directamente.

Dado este resultado, quisimos comprobar, ya que VRK1, Ran y RCC1 pueden formar trímeros en solución, si VRK1 podría fosforilar a RCC1 en ese complejo, actuando Ran como puente. Realizamos ensayos quinasa en presencia de VRK1, RCC1 y Ran, utilizando tanto Ran wt como Ran(T24N) y Ran(L43E) (figura 34B). En ninguno de los tres casos se detectó fosforilación de alguna de las proteínas, detectándose sólo la autofosforilación de la quinasa.

Figura 34. VRK1 no fosforila a RCC1. A. Se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ con las proteínas purificadas RCC1-His y GST-VRK1 wt (activa). Como control negativo se añadió un punto utilizando GST-VRK1 inactiva (K179E), y como control positivo se realizó la fosforilación de p53 por VRK1. **B.** RCC1-His más la adición de GST-Ran wt, GST-Ran(T24N), o GST-Ran(L43E) fueron incubados con GST-VRK1 wt en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. A la izquierda se muestra la tinción con azul de Coomassie y a la derecha la incorporación de la radiactividad.

2.2.4. Efecto de VRK1 sobre el intercambio de nucleótido en Ran

En el núcleo, RCC1 media el intercambio de GDP por GTP en Ran (Klebe et al., 1995b). Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar, RCC1 se une a RanGDP, produciéndose la salida de GDP y formándose un complejo intermedio de unión entre RCC1 y Ran sin nucleótido. Después se produce la entrada de GTP, formándose RanGTP-RCC1 y produciéndose la salida de RCC1 (Klebe et al., 1995a; Klebe et al., 1995b) (figura 8, pág. 39). VRK1 tiene una localización nuclear y es capaz de unirse a RanGDP, Ran sin nucleótido y RanGTP, por tanto puede unirse a Ran en todos los pasos de la reacción. Por ello quisimos comprobar si la unión previa de VRK1 a Ran podía afectar tanto a la salida de GDP, como a la entrada de GTP, catalizadas por RCC1, llevando a cabo ensayos de intercambio de nucleótido *in vitro* con proteínas purificadas.

2.2.4.a. La interacción de VRK1 con RanGDP no afecta a la disociación de GDP catalizada por RCC1

Para comprobar si VRK1 podía afectar a la liberación de GDP catalizada por RCC1, Ran fue cargada con GDP marcado con tritio (^3H), y se midió la cantidad de GDP que permanece unido a Ran al incubarla con GTP y distintas concentraciones de RCC1 a un tiempo fijo, en presencia o ausencia de VRK1. RCC1 induce una disociación de GDP de manera dosis-dependiente (fig. 35A). Se consigue prácticamente una total disociación del nucleótido con 10 pmoles de RCC1. Se analizó la disociación de GDP en presencia de dos cantidades distintas de VRK1 que en ambos casos, se encontraban en exceso con respecto a la cantidad de Ran en la reacción (50 pmoles). Previamente RanGDP y VRK1 se incubaron para permitir su asociación, y a continuación se realizó la reacción de intercambio añadiendo RCC1 y GTP. Se comprobó que VRK1, claramente, no impide la disociación de GDP, y prácticamente tampoco la facilita, ya que aunque en casi todos los puntos hay mayor disociación en presencia de VRK1, no hay una dependencia clara de la dosis de VRK1, y las diferencias no son significativas (fig. 35A). Alternativamente, se quiso analizar si VRK1 por sí sola producía disociación de GDP. Para ello se incubó Ran[^3H]GDP (fig. 35B, línea azul) con cantidades crecientes (y en el orden de picomoles) de VRK1, y se añadió una cantidad fija de RCC1 (50 fmoles) (fig. 35B, ■), o se realizó en ausencia de RCC1 (fig. 35B, Δ). Como se puede observar, VRK1 por sí sola no promueve la disociación de GDP, puesto que en ausencia de RCC1 no hay prácticamente disociación de GDP dependiente de la dosis de VRK1. Así mismo, se confirma que VRK1 no dificulta ni facilita la disociación de GDP catalizada por RCC1 (a una dosis subóptima de 50 fmoles), al no haber diferencias en el grado de liberación de GDP dependientes de la dosis de VRK1. Como control negativo se realizaron ensayos en ausencia de Ran, obteniéndose valores basales de actividad (fig. 35B, línea verde).

Figura 35. Efecto de VRK1 en el intercambio de nucleótido en Ran. A, B. Efecto de VRK1 en la disociación de GDP unido a Ran. Ran (50 pmoles para cada reacción) se cargó con [^3H]GDP, y se incubó con las cantidades indicadas de RCC1 y GTP 1 mM durante 5 minutos. Se midió la cantidad de [^3H]GDP que permanece unido a Ran por conteo de centelleo. En los casos indicados, Ran[^3H]GDP se incubó previamente con la cantidad correspondiente de VRK1. Se representa la media de tres mediciones por cada punto, con la desviación estándar. C. Efecto de VRK1 en la carga de Ran con GTP. Ran (50 pmoles para cada reacción) fue cargada con GDP sin marcar, e incubada con [^{35}S]GTP γ S durante los tiempos y cantidad de RCC1 indicados, con o sin la incubación previa de RanGDP con 250 pmoles de VRK1. Se midió la cantidad de [^{35}S]GTP γ S incorporado por conteo de centelleo. Se representa la media de dos mediciones por cada punto, con la desviación estándar.

2.2.4.b. La interacción de VRK1 con RanGDP no afecta a la incorporación de GTP catalizada por RCC1

También quisimos analizar si la interacción de VRK1 con Ran afectaba a la carga de Ran con GTP catalizada por RCC1. Para ello utilizamos un GTP no hidrolizable (por la sustitución de un oxígeno por un grupo tio en el fosfato gamma) y marcado con el isótopo radiactivo ^{35}S , de manera que podíamos medir la cantidad de GTP incorporado en Ran a distintos tiempos de reacción. Ran se cargó con GDP, y se añadió una concentración fija de RCC1 y de [^{35}S]GTP γ S. La cantidad de GTP incorporado aumenta con el tiempo de incubación y con la cantidad de RCC1 utilizada (fig. 35C). La incubación previa de RanGDP con VRK1 en una cantidad 5 veces en exceso sobre la cantidad de Ran no afecta en ningún caso a la incorporación de GTP catalizada por RCC1.

En conclusión, podemos decir que la interacción de VRK1 con Ran no afecta al intercambio de nucleótido GDP por GTP catalizado por RCC1.

2.2.5. La interacción de Ran wt o Ran(T24N), pero no la de Ran(L43E), con VRK1 produce la inhibición de su actividad quinasa *in vitro*

Una posible función de la interacción de una GTPasa con una quinasa es la regulación de la actividad de la quinasa. De hecho, la activación de quinasas por *small* GTPasas en el citoplasma es un mecanismo muy bien establecido (Dhillon et al., 2007; McKay and Morrison, 2007). Sin embargo, para la GTPasa Ran no se conoce la modulación de ninguna quinasa por interacción directa, aunque sí se ha descrito la activación de Aurora A y de cdc2 (CDK1/ciclinaB) por mecanismos indirectos (Clarke et al., 1995; Tsai et al., 2003). De todas formas, quisimos comprobar si la actividad de VRK1 podía afectarse por su interacción con Ran, y si además podía depender de la conformación de la GTPasa.

Para ello, hicimos ensayos quinasa *in vitro* con proteínas purificadas, en los que analizamos si la autofosforilación de VRK1 o la fosforilación de su sustrato conocido histona H3 se veían afectados en presencia de Ran wt, el mutante Ran(T24N), o Ran(L43E). Ambos mutantes, de manera independiente del nucleótido, son estructuralmente miméticos de las conformaciones de Ran unida a GDP y Ran unida a GTP, respectivamente (Porter et al., 2006). Como la cinética de fosforilación es más rápida que la de interacción, previamente se incubaron Ran y VRK1 antes de realizar los ensayos de fosforilación para permitir la unión de las dos proteínas. Los niveles de autofosforilación de VRK1 y de fosforilación de histona H3 se vieron disminuidos en presencia de Ran wt y del mutante Ran(T24N), mientras que prácticamente no variaron en presencia del mutante Ran(L43E), en comparación con el punto control sin la GTPasa (fig. 36A). En la figura 36B se representa la cuantificación de las bandas de fosforilación (^{32}P), normalizadas con respecto a la cantidad de cada proteína en el gel (bandas de la tinción con Coomassie); de esta manera se aprecia que el mutante Ran(L43E) no llega a estimular la autofosforilación de VRK1 ni la fosforilación de histona H3, sino que deja de ejercer una inhibición en la actividad. El ensayo también se realizó con Ran(L43E) cargado con GTP, obteniéndose el mismo resultado que con Ran(L43E) (no mostrado). Por lo tanto, a la vista de este resultado, podemos decir que sólo la forma Ran wt, y la forma inactiva Ran(T24N), son capaces de ejercer una inhibición de la actividad quinasa de VRK1.

VRK1 fosforila a histona H3 en los residuos treonina 3 y serina 10 (Kang et al., 2007). Se llevó a cabo un ensayo quinasa en el que se detectaron los residuos treonina 3 y serina 10 de histona H3 fosforilados por VRK1 mediante *Western blot* con anticuerpos fosfoespecíficos, en presencia y ausencia de Ran wt. La fosforilación en treonina 3 es más notable que la de serina 10, pero cuando la quinasa interacciona con Ran wt, la fosforilación que produce en ambos residuos es menor (fig. 36C, carril 3). Según este resultado, en los complejos en los que VRK1

está interaccionando con Ran, VRK1 tiene una actividad quinasa reducida, manifestado por una menor autofosforilación y menor fosforilación de su diana específica H3, en los residuos treonina 3 y serina 10.

Figura 36. Efecto de Ran en la actividad quinasa de VRK1 *in vitro*. **A.** Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, en los que se detectaron la autofosforilación de GST-VRK1 y la fosforilación de histona H3 recombinante en ausencia o presencia de GST-Ran wt, GST-Ran(T24N) o GST-Ran(L43E). Previamente se incubaron GST-VRK1 y GST-Ran en el tampón de la reacción de fosforilación a 4°C durante 1 hora, condiciones en las que ocurre interacción entre las dos proteínas, y después se añadió el sustrato y el ATP. En el panel superior se muestra la incorporación de la radiactividad y en el inferior la tinción con azul de Coomassie. **B.** Representación de la incorporación de ^{32}P normalizado frente a la cantidad de proteína total, para la autofosforilación de VRK1 (azul) y la fosforilación de histona H3 (morado). **C.** La fosforilación específica de histona H3 por VRK1 en los residuos treonina 3 (p-H3 T3) y serina 10 (p-H3 S10) es inhibida por Ran. Se llevaron a cabo ensayos quinasa igual que en (A) pero utilizando ATP frío. Las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana y se detectaron los residuos treonina 3 y serina 10 de histona H3 fosforilados por VRK1 mediante *Western blot* con anticuerpos específicos para esos residuos fosforilados. Histona H3 total, GST-VRK1 y GST-Ran se detectaron por tinción Ponceau.

2.2.6. La inhibición de la actividad de VRK1 por Ran es dosis-dependiente

A continuación quisimos comprobar si el efecto de la inhibición de la actividad de VRK1 por su interacción con Ran wt era dependiente de la dosis de Ran. Para ello realizamos ensayos de fosforilación con VRK1 e histona H3 recombinantes utilizando dosis crecientes de VRK1, y a la dosis más alta de VRK1, añadimos Ran a distintas concentraciones. Como se

puede ver en la figura 37, la autofosforilación de VRK1 y la fosforilación de histona H3 son dependientes de la cantidad de VRK1 (a mayor cantidad de quinasa, mayor grado de fosforilación). La adición de cantidades crecientes de Ran produce una inhibición de la autofosforilación de VRK1 y de la fosforilación de histona H3 dependiente de la dosis de Ran. Al aumentar la cantidad de Ran se favorece la formación de un mayor número de complejos Ran-VRK1, por lo que se observa una mayor inhibición de la actividad de VRK1.

Figura 37. Inhibición de la actividad de VRK1 dependiente de la dosis de Ran. Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, con cantidades crecientes de GST-VRK1 y de GST-Ran silvestre, en las combinaciones y cantidades indicadas en la figura. Se detectaron la autofosforilación de GST-VRK1 y la fosforilación de histona H3, que aumentan con la dosis de GST-VRK1 y disminuyen con la dosis de GST-Ran wt. En el panel superior se muestra la incorporación de ATP radiactivo, y en el inferior la tinción de las proteínas totales con Coomassie.

2.2.7. La actividad de VRK1 endógena es inhibida por su interacción con Ran

Hasta ahora hemos analizado la inhibición de la actividad de VRK1 recombinante por su interacción con Ran wt y Ran(T24N). Decidimos comprobar si también se detectaba esta inhibición en la actividad de VRK1 endógena por su interacción con Ran wt. Para ello, se inmunoprecipitó VRK1 endógena con un anticuerpo monoclonal específico a partir de células HEK-293T no sincronizadas o de células bloqueadas en la fase G2/M con nocodazol. Anteriormente había sido descrita una mayor actividad de VRK1 en la fase G2/M del ciclo celular (Kang et al., 2007), con lo cual parecía interesante comprobar este dato y analizar qué ocurría al interaccionar VRK1 en condiciones de mayor actividad con Ran. Como control negativo se llevó a cabo una inmunoprecipitación en paralelo con un anticuerpo monoclonal sin ninguna diana endógena (anti-HA). Los inmunoprecipitados de VRK1 de células asincrónicas o de células mitóticas, bien se incubaron con Ran wt purificada, o bien se dejaron sin incubación y a continuación se realizó el ensayo quinasa añadiendo el sustrato histona H3 recombinante y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. El resultado fue que, efectivamente, sí se detectó una mayor actividad de VRK1 en las células bloqueadas en G2/M, manifestado por una mayor autofosforilación y una fosforilación mucho más elevada de histona H3 recombinante. Así mismo se comprobó que Ran wt, al interaccionar con VRK1 endógena, era capaz de inhibir su autofosforilación y la fosforilación de la histona, efecto mucho más evidente en el caso de la quinasa inmunoprecipitada de extractos mitóticos (figura 38, panel superior). En la figura se muestra la cantidad de VRK1

inmunoprecipitada que se usó en el ensayo, detectada con un anticuerpo policlonal, y la cantidad de sustrato (histona H3) y Ran wt añadidos al ensayo quinasa (figura 38, panel inferior).

Figura 38. Inhibición de la actividad de VRK1 endógena por Ran. Se inmunoprecipitó VRK1 endógena de extractos de células HEK-293T en condiciones de crecimiento normales (carriles 2 y 3), o de extractos mitóticos (carriles 4 y 5, M=mitosis). Como control se realizó una inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo inespecífico (αHA). VRK1 inmunoprecipitada se incubó con 4 µg de GST-Ran wt purificada 1 hora a 4°C, en tampón de reacción de fosforilación (carriles 3 y 5) o con tampón sólo (carriles 2 y 4). Esta VRK1 se usó en ensayos quinasa junto con histona H3 recombinante y [γ-³²P]ATP. Las proteínas del ensayo quinasa fueron transferidas a una membrana. En el panel superior se muestra la incorporación de radiactividad. En el panel inferior se muestran las proteínas totales. VRK1 se detectó con un anticuerpo específico policlonal; GST-Ran con un anticuerpo anti-Ran, e histona H3 se detectó en el gel por tinción con Coomassie.

2.2.8. La interacción de Ran con VRK2A y VRK2B también inhibe su actividad quinasa *in vitro*

Hemos comprobado que los otros miembros de la familia VRK (las dos isoformas de VRK2, y VRK3) también interaccionan con Ran. VRK2A y B son los otros miembros activos de la familia, además de VRK1. Su dominio quinasa tiene una alta homología con el de VRK1, por lo que decidimos comprobar si Ran también inhibía su actividad. La fosforilación de histona H3 por VRK2A o B no estaba descrita hasta el momento. Sin embargo, dado que muchos de los sustratos que conocemos de VRK1 lo son también de VRK2A y VRK2B (al menos *in vitro*) (Blanco et al., 2006 y datos del laboratorio), comprobamos si dichas quinasas eran capaces de fosforilar a histona H3 *in vitro*. Realizamos ensayos quinasa con las proteínas recombinantes, en ausencia o presencia de Ran wt, el cual se incubó previamente con las quinasas para permitir su interacción. Comprobamos que las dos isoformas de VRK2 son capaces de fosforilar a la histona H3 *in vitro* (fig. 39 A y B). Esta fosforilación de H3, y también la autofosforilación de las quinasas, se veía disminuida en presencia de Ran wt, indicando que Ran también ejerce un efecto de inhibición de la actividad de los otros miembros de la familia VRK por interacción directa.

VRK3 tiene un dominio quinasa degenerado, por lo que no presenta actividad *in vitro*. Sin embargo, otros autores han detectado actividad de VRK3 recombinante al incubarla con extractos celulares, sugiriendo que su interacción con una proteína desconocida debe

proporcionar actividad a la quinasa (Kang and Kim, 2006). Por tanto, quisimos comprobar si Ran pudiera ser la proteína candidata, puesto que ejerce un efecto sobre la actividad de los otros miembros de la familia (aunque en esos casos es de inhibición). Se realizaron ensayos quinasa con VRK3 e histona H3 recombinantes, en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y de Ran wt, o los mutantes Ran(T24N) y Ran(L43E). Como en otros casos, VRK3 se preincubó con Ran o las formas mutantes para permitir la interacción. Como era de esperar, VRK3 recombinante por sí sola no presenta actividad, ya que no se detecta autofosforilación. Sin embargo, la interacción con Ran wt no produjo una recuperación de la actividad de VRK3, ya que no se detectó autofosforilación de la quinasa ni fosforilación de un sustrato potencial como histona H3. Lo mismo ocurrió con la interacción con el mutante inactivo Ran(T24N) y el mutante Ran(L43E), mimético de la conformación RanGTP (fig. 39C).

Figura 39. Ran también inhibe la actividad de otros miembros de la familia VRK. **A.** Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, en los que se detectaron la autofosforilación de GST-VRK2A (**A**) o GST-VRK2B (**B**) y la fosforilación de histona H3 recombinante en ausencia o presencia de GST-Ran wt. Previamente se incubaron GST-VRK2A o GST-VRK2B y GST-Ran en el tampón de la reacción de fosforilación a 4°C durante 1 hora para permitir la interacción de Ran con la quinasa. Después se añadió histona H3 recombinante como sustrato, y ATP radiactivo. En el panel superior se muestra la incorporación de la radiactividad y en el inferior la tinción con azul de Coomassie. **C.** Se comprobó que el miembro de la familia VRK inactivo, VRK3, no recupera su actividad al ser incubado con Ran wt, Ran(T24N) ni Ran(L43E). Se realizó un ensayo similar al de la figura 36A, pero utilizando GST-VRK3 como quinasa.

Implicación de VRK1 en la Respuesta al Daño en el ADN

3. IMPLICACIÓN DE VRK1 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN

La función de VRK1 mejor caracterizada es su efecto en la activación del factor de transcripción p53 (Vega et al., 2004). La fosforilación de p53 en treonina 18 por VRK1 produce la acumulación de p53 y la estimulación de su actividad transcripcional (Lopez-Borges and Lazo, 2000; Vega et al., 2004). Por otro lado, p53 es estabilizado y activado en respuesta a multitud de agentes causantes de daño en el ADN (Lakin and Jackson, 1999; Saito et al., 2003), constituyendo el elemento central en el mantenimiento de la integridad del genoma (Romer et al., 2006; Sengupta and Harris, 2005). De esta manera, si VRK1 está implicada en la activación de p53, es factible pensar que el daño genotóxico sea uno de los estímulos que activen a VRK1 (figura 5, pág. 27). Consecuentemente, VRK1 podría estar participando en la respuesta al daño en el ADN. Por lo tanto, decidimos comprobar ambas hipótesis, en primer lugar si VRK1 se activa en respuesta al daño en el ADN, y si es así, analizar su implicación en la respuesta al daño en el ADN.

3.1. El daño en el ADN produce un aumento de la actividad quinasa de VRK1

3.1.1. Regulación de la actividad de VRK1 en respuesta a suero

Antes de analizar la respuesta de VRK1 al daño en el ADN, decidimos analizar la variación de la actividad de VRK1 en función del suero, ya que este factor podría afectar a los estudios sobre la activación de VRK1 en respuesta a estrés genotóxico.

El gen de VRK1 es regulado transcripcionalmente por factores de crecimiento presentes en el suero. La retirada prolongada de suero a fibroblastos normales en cultivo produce una bajada de los niveles de ARN mensajero de VRK1, así como una bajada en la activación del promotor del gen de VRK1. Así mismo, la adición de suero a células paradas en G0 por privación de suero, aumenta los niveles de ARN mensajero de VRK1 y la actividad del promotor del gen (Valbuena et al., 2008b). Esta regulación de la expresión del gen de VRK1 en respuesta al suero incita a pensar que a su vez, la actividad de la quinasa pueda ser regulada de la misma manera.

Para estudiar la regulación de la actividad quinasa de VRK1 en respuesta a la retirada prolongada y la readición de suero, se realizaron ensayos quinasa utilizando VRK1 endógena inmunoprecipitada de células MCF7, en distintas condiciones de crecimiento. Se utilizó esta línea celular de adenocarcinoma de mama por responder muy bien a los estímulos de factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino. Una privación de suero de 48 horas produce una clara parada del ciclo celular en G0, detectado por tinción con ioduro de propidio y análisis por

citometría de flujo (fig. 40A). La adición de suero durante 15 horas a células así paradas produce una entrada de nuevo en el ciclo. Bajo estas mismas condiciones de crecimiento se ensayó la actividad de VRK1 endógena. Para ello se inmunoprecipitó VRK1 con un anticuerpo monoclonal específico (1F6) de células en crecimiento normal con medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), de células privadas de suero durante 48 horas, y de células privadas de suero durante 48 horas, a las que seguidamente se les añadió 20% de FBS durante 15 horas. Se realizó un ensayo quinasas añadiendo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y un sustrato conocido de VRK1 *in vitro* como es el fragmento amino terminal (aa 1-85) de la proteína p53 murina (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Comprobamos que mientras que los niveles de VRK1 inmunoprecipitada en los tres casos son iguales, su actividad decae cuando las células han entrado en parada en G0 y se recupera cuando vuelven a entrar en el ciclo celular, efecto que se observa tanto en su autofosforilación como en la fosforilación de su sustrato p53 (figura 40B).

Figura 40. Regulación de la actividad de VRK1 en respuesta a suero. **A.** Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN de células MCF7 en condiciones de crecimiento normales (10% FBS), células mantenidas con 0,2% FBS durante 48 horas, y células con 0,2% de FBS 48 horas más 15 horas con 20% de FBS. **B.** Inmunoprecipitación de VRK1 de células MCF7 en condiciones de crecimiento como en (A) y ensayo quinasas *in vitro* con VRK1 inmunoprecipitada, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y GST-p53 (aa 1-85) (fragmento amino terminal de p53 murino recombinante fusionado a GST). La incorporación de la radiactividad se muestra en los paneles indicados con ^{32}P . VRK1 se detectó en los inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal (VC). p53 se detectó mediante tinción Ponceau. Arriba se muestran los niveles de VRK1 en los lisados, junto con el control de carga (β-actina).

A la vista de estos resultados podemos decir que VRK1 es activa en células que están dividiéndose o en condiciones de crecimiento normales, pero su actividad decae cuando las células están paradas como consecuencia de una retirada prolongada de suero.

Dado este comportamiento de VRK1, también quisimos comprobar si los factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino producían una respuesta rápida en su actividad, de manera similar a la que producen en las quinasas activadas por mitógenos o MAP quinasas (Chang and Karin, 2001). Para ello analizamos si se producían cambios en la actividad de VRK1 tras pocas horas de retirada y readición de suero. VRK1 endógena fue inmunoprecipitada de células MCF7 en condiciones de crecimiento normal (10% FBS), de células privadas de suero durante 2 horas, o de células privadas de suero 2 horas a las que se les añadió posteriormente 10% de FBS durante 3 horas. A continuación se realizó un ensayo quinasas en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y p53 (aa 1-85) como sustrato. Como se aprecia en la figura 41, tanto la autofosforilación de VRK1 como la fosforilación de p53 decaen tras la retirada de suero, y se vuelven a recuperar tras su readición, a niveles incluso superiores que los que se observan para células con 10% de FBS. Este resultado indica que la actividad de VRK1 es regulada de manera rápida en respuesta a factores de crecimiento presentes en el suero.

Figura 41. Respuesta rápida de la actividad de VRK1 a estímulos de suero. Se inmunoprecipitó VRK1 de células MCF7 en condiciones normales de crecimiento (10% FBS), células mantenidas con 0,2% de FBS 2 horas y células con 0,2% de FBS 2 horas más la adición de 10% de FBS 3 horas. Se realizó un ensayo quinasas con VRK1 inmunoprecipitada, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y GST-p53 (aa 1-85). La incorporación de la radiactividad se muestra en los paneles indicados con ^{32}P . VRK1 se detectó en los inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal (VC). p53 se detectó mediante tinción Ponceau. Arriba se muestran los niveles de VRK1 en los lisados, junto con el control de carga (β -actina).

3.1.2. Activación de VRK1 en respuesta a distintos tipos de daño en el ADN

Los datos existentes acerca de la estabilización de p53 por VRK1 (Valbuena et al., 2009 (enviado); Valbuena et al., 2006; Vega et al., 2004) hacían pensar que VRK1 podría activarse en respuesta al daño en el ADN, y participar en los mecanismos de respuesta a este tipo de estímulo. Por ello, en primer lugar, comprobamos si la actividad de VRK1 aumentaba en respuesta a distintos tipos de daño en el ADN.

Figura 42. VRK1 es activada por distintos tipos de daño en el ADN. **A.** VRK1 endógena fue inmunoprecipitada de células MCF7 privadas de suero durante 48 horas, estimuladas con luz ultravioleta (UV) (20 J/m² y 30 minutos de recuperación), o con bleomicina 20 µg/mL durante 1 hora, o dejadas sin estimular. Se realizó un ensayo quinasa con VRK1 inmunoprecipitada, [γ-³²P]ATP, y GST-p53 (aa 1-85). **B.** VRK1 endógena fue inmunoprecipitada de células MCF7 en condiciones normales de crecimiento (10% FBS), células privadas de suero durante 2 horas, que bien se dejaron sin estimular, o se estimularon con 2 Gy de radiación gamma (IR) (dejando 30 minutos de recuperación), con 1 µM de doxorubicina 1 hora o con 50 µM de etopósido 1 hora. Se realizó un ensayo quinasa igual que en A. En ambos casos, la incorporación de la radiactividad se muestra en los paneles indicados con ³²P. VRK1 se detectó en los inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal (VC). p53 se detectó mediante tinción Ponceau o con un anticuerpo anti-GST. Arriba se muestran los niveles de VRK1 en los lisados, junto con el control de carga (β-actina).

Para ello analizamos la actividad de VRK1 en respuesta a dos tipos distintos de modificaciones en la estructura del ADN: producción de roturas de doble cadena en el ADN por el agente bleomicina, y formación de dímeros de pirimidina y *crosslinks* por radiación ultravioleta. El primer tipo de daño activa la vía de ATM y el segundo, principalmente la de ATR, además de que por sus distintas características son reparados por mecanismos diferentes: el primero por recombinación homóloga o NHEJ, y el segundo por escisión de nucleótido (NER) (Sengupta and Harris, 2005). Para poder detectar mejor cambios en la actividad de VRK1 específicos a los estímulos de daño en el ADN, los estímulos se produjeron en ausencia de suero, de manera que VRK1 no estuviera siendo activada a la vez por factores de crecimiento presentes en el suero. Para ello, células MCF7 fueron mantenidas durante 48 horas con medio de cultivo con 0,2% de FBS, y en estas condiciones, fueron estimuladas con 20 µg/mL de bleomicina durante 1 hora, o irradiadas con una dosis de 20 J/m² de luz ultravioleta (UV) (dejándolas recuperar 30 minutos), o bien dejadas sin estimular. VRK1 fue inmunoprecipitada

con un anticuerpo monoclonal específico (1F6) y a continuación se realizó un ensayo quinasas en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, con el fragmento amino terminal de p53 como sustrato. Como se puede ver en la figura 42A, hay una clara estimulación de la actividad de VRK1 en respuesta a la irradiación con luz ultravioleta, en comparación con los niveles de actividad en ausencia de estímulo. Con bleomicina, sin embargo, se aprecia un aumento de la actividad, pero no tan elevada como tras la irradiación con luz ultravioleta (fig. 42A). Estos resultados indican que daños en el ADN de distinta naturaleza pueden estimular la actividad de VRK1.

El agente radiomimético bleomicina no es capaz de penetrar eficientemente en la membrana plasmática, por lo que sólo un porcentaje pequeño de células deben ser estimuladas (Tounekti et al., 1993). Puede ser por esto que sólo se vea una pequeña activación de VRK1 en respuesta a bleomicina. Por ello quisimos comprobar si al producir un daño homogéneo en todas las células mediante una irradiación con una fuente de rayos gamma (Cesio-137), que produce roturas de doble cadena en el ADN, se veía una mayor activación de VRK1. Así mismo, también utilizamos dos agentes usados frecuentemente en clínica como fármacos citotóxicos, como son doxorubicina (o adriamicina), y etopósido, los cuales estimulan la respuesta al daño en el ADN (Kurz et al., 2004; Tanaka et al., 2007). Ambos fármacos bloquean a la topoisomerasa II, produciendo roturas estables de doble cadena en el ADN en los puntos donde está actuando esta enzima. La topoisomerasa II participa en el mantenimiento de la estructura de la cromatina, en la replicación del ADN y en la transcripción (Burden and Osherooff, 1998; Muslimovic et al., 2009).

Realizamos un experimento similar al anterior, aunque esta vez sólo se retiró el suero durante 2 horas (lo que también produce una bajada drástica de la actividad de VRK1) y a continuación se estimularon las células con radiación ionizante (IR), o con los fármacos. Se observó que la radiación ionizante estimula en gran medida la actividad de VRK1 y que también se da una activación, aunque menor, en respuesta a doxorubicina y etopósido (fig. 42B). Seguramente los fármacos producen un número menor de roturas de doble cadena en comparación con la radiación ionizante, lo que explica la menor activación de VRK1, ya que su acción depende de su penetración en la célula y su interacción con la topoisomerasa II. En los tres casos, la actividad de VRK1 es mayor que la observada en células asincrónicas en crecimiento normal (10% FBS).

3.2. El estado de fosforilación de VRK1 influye en su actividad

3.2.1. Fosforilaciones en VRK1 son necesarias para su actividad

VRK1 presenta una fuerte autofosforilación *in vitro* (Barcia et al., 2002; Lopez-Borges and Lazo, 2000); sin embargo, hasta el momento no se ha determinado en qué manera la

autofosforilación regula la actividad de la quinasa, tanto *in vitro* como *in vivo*. Aparte de una posible regulación de la actividad de VRK1 mediante su autofosforilación, cabría esperar que los estímulos que incrementan la actividad de VRK1, como el suero o el daño en el ADN, desencadenen alguna fosforilación en algún residuo que no sea de autofosforilación, que la haga más activa. Dado la ausencia de datos acerca de la regulación de la actividad de VRK1 por fosforilaciones, decidimos comprobar si VRK1 endógena requiere de fosforilaciones para su actividad. Para ello, se inmunoprecipitó VRK1 de células MCF7 asincrónicas en condiciones de crecimiento normales (10% FBS), condiciones en las que VRK1 es activa, se trató con fosfatasa alcalina y se realizó un ensayo quinasa para comprobar su actividad una vez desfosforilada. Previamente, para asegurarnos de que la fosfatasa alcalina desfosforilaba residuos en VRK1, VRK1 se inmunoprecipitó de células MCF7, se añadió $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, se incubó para permitir la autofosforilación, y a continuación se incubó con fosfatasa alcalina. Como se ve en la figura 43A, la señal radiactiva de autofosforilación de VRK1 se pierde tras la incubación con la fosfatasa, lo que indica que ésta sí es capaz de desfosforilar residuos de VRK1 (al menos de autofosforilación).

Figura 43. VRK1 requiere de fosforilaciones para su actividad. **A.** La fosfatasa alcalina (CIAP) desfosforila residuos de autofosforilación de VRK1. Se inmunoprecipitó VRK1 de células MCF7 creciendo en medio con 10% de FBS, se realizó un ensayo quinasa con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y seguidamente VRK1 autofosforilada se incubó con fosfatasa alcalina, o sólo con tampón de desfosforilación. **B.** VRK1 se inmunoprecipitó de células MCF7 creciendo con 10% FBS, y se incubó con fosfatasa alcalina, con tampón de desfosforilación sólo o se dejó sin tratar. La fosfatasa se eliminó por lavados y a continuación se añadió $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, GST-p53 (aa 1-85) como sustrato, y el tampón adecuado para el ensayo quinasa. La incorporación de la radiactividad se muestra en los paneles indicados con ^{32}P . VRK1 total se detectó con el anticuerpo VC. p53 se detectó con un anticuerpo anti-GST.

Al tratar con fosfatasa alcalina a VRK1 inmunoprecipitada de células creciendo en 10% FBS, se ve una reducción de su actividad (figura 43B), manifestado por una menor autofosforilación y fosforilación de su sustrato p53, en comparación con la actividad de VRK1 inmunoprecipitada y tratada sólo con tampón de desfosforilación (el tratamiento a 37°C por sí solo debe afectar a la conformación de la proteína y disminuir su actividad). Por tanto, este resultado indica que VRK1 debe estar fosforilada en condiciones de crecimiento normales, y

que estas fosforilaciones son necesarias para a su actividad. Sin embargo, con este método no podemos discernir si es la autofosforilación de la quinasa, o alguna fosforilación por otra quinasa, o ambas, las responsables de su actividad, puesto que asumimos que la fosfatasa puede estar desfosforilando cualquier residuo fosforilado en VRK1.

3.2.2. El aumento de la actividad de VRK1 en respuesta a daño por luz ultravioleta depende de alguna fosforilación en la quinasa

A continuación quisimos comprobar si el aumento de actividad que se observa en VRK1 en respuesta al daño en el ADN, dependía también de alguna fosforilación en la quinasa. Para ello realizamos un experimento similar al anterior, en el que células MCF7 creciendo en medio con 10% de FBS, fueron estimuladas con luz ultravioleta (UV), o dejadas sin estimular. En ambos casos se inmunoprecipitó VRK1 endógena y se incubó con fosfatasa alcalina, o sólo con tampón, y a continuación se realizó un ensayo quinasa con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y p53 como sustrato para analizar la actividad de VRK1. Se observó que VRK1 aumenta su actividad en respuesta a la luz ultravioleta (fig. 44, carril 3 vs. carril 1), y que esta activación se pierde al desfosforilar VRK1 con la fosfatasa alcalina (fig. 44, carril 4), quedando su actividad al nivel de la de VRK1 sin estimular y desfosforilada (fig. 44, carril 2). Este resultado indica que la estimulación con luz ultravioleta está produciendo un aumento de la actividad de VRK1 dependiente de alguna fosforilación en la quinasa, puesto que si no fuera así, al desfosforilar VRK1 estimulada con luz ultravioleta, debería observarse una actividad mayor a la de VRK1 sin estimular y desfosforilada.

Figura 44. La activación de VRK1 por luz ultravioleta se pierde al ser tratada con fosfatasa alcalina. VRK1 fue inmunoprecipitada de células creciendo en medio con 10% FBS, o de células con 10% FBS estimuladas con luz ultravioleta (UV) (20 J/m² más 30 minutos de recuperación). En ambos casos VRK1 inmunoprecipitada se incubó con fosfatasa alcalina (CIAP) o con tampón de desfosforilación sólo. La fosfatasa se eliminó por lavados y a continuación se añadió $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, GST-p53 (aa 1-85) como sustrato, y el tampón adecuado para el ensayo quinasa. La incorporación de la radiactividad se muestra en los paneles indicados con ³²P. VRK1 total se detectó con el anticuerpo VC. p53 se detectó con tinción Ponceau.

3.3. VRK1 es necesaria en la respuesta al daño en el ADN

Una vez confirmado que VRK1 se activa en respuesta a distintos tipos de daño en el ADN, pasamos a analizar si VRK1 podría estar participando en la respuesta al daño en el ADN. Dada su activación inmediata tras producirse el daño en el ADN, pensamos en investigar si podría estar participando en las primeras etapas de la respuesta, es decir, en la detección del daño y transducción de la señal.

3.3.1. 53BP1 es diana de fosforilación de VRK1

Un incremento rápido en la activación de VRK1 en respuesta al daño en el ADN obliga a pensar que VRK1 podría tener alguna diana de fosforilación entre alguna de las proteínas implicadas en la detección del daño (sensores) o propagación de la señal (mediadores y transductores). 53BP1 es una proteína que participa de manera temprana en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN. Tras la exposición de células a radiación ionizante (IR), 53BP1 se redistribuye rápidamente a los sitios de rotura de doble cadena, y es hiperfosforilada (Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000). No se conocen la totalidad de los residuos de 53BP1 que son fosforilados tras daño en el ADN. Hasta el momento, estas fosforilaciones han sido atribuidas a ATM; sin embargo, es esperable que otras quinasas puedan fosforilar a 53BP1 en residuos aún no identificados (Jowsey et al., 2007; Ward et al., 2003). Por tanto pensamos que 53BP1 podía presentar residuos serina o treonina susceptibles de ser fosforilados por VRK1.

Como una primera aproximación para dilucidar si 53BP1 era diana de fosforilación de VRK1, realizamos un ensayo quinasa *in vitro* utilizando como sustratos seis fragmentos de 53BP1 fusionados a GST, que cubren toda la secuencia de la proteína (1972 aa), solapándose entre sí (fig. 45A). Observamos que los tres primeros fragmentos, que corresponden a la zona amino terminal de 53BP1 (residuos 1-962) son fosforilados por VRK1, siendo el más amino terminal (aa 1-346) el que presenta un mayor grado de fosforilación. Este es exactamente el mismo patrón de fosforilación que se obtiene con ATM (Rappold et al., 2001). Se han determinado varios residuos en estos fragmentos que son fosforilados *in vivo* por ATM (Ward et al., 2003). Sin embargo, también se han descrito sitios de fosforilación por ATM *in vivo* en regiones que no pertenecen a los tres fragmentos amino terminales (Jowsey et al., 2007), lo que indicaría que la conformación de 53BP1 *in vivo* puede favorecer un mayor número de fosforilaciones. Por tanto, este resultado no descarta que VRK1 pueda fosforilar a 53BP1 *in vivo* en alguna otra región de la proteína. Para afianzar el resultado, comprobamos si VRK1 podía fosforilar a 53BP1 completa, mediante un ensayo quinasa en el cual utilizamos como sustrato la proteína entera. Para ello sobreexpresamos en células HEK-293T 53BP1 fusionado al epítipo HA. 53BP1-HA se inmunoprecipitó y se utilizó en un ensayo quinasa con VRK1 purificada. Vimos que VRK1 sí es capaz de fosforilar a 53BP1 completa (figura 45B).

Figura 45. 53BP1 es diana de fosforilación de VRK1. **A.** Se llevó a cabo un ensayo quinasas *in vitro* con VRK1-His purificada y seis fragmentos de 53BP1 que cubren toda la secuencia de la proteína, fusionados a GST, en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Arriba se muestra la incorporación de la radiactividad y abajo la tinción con azul de Coomassie. **B.** Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido pCMH6K-53BP1 o con vector vacío. 53BP1-HA fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-HA, y usado en un ensayo quinasas como sustrato, en presencia de GST-VRK1 purificada y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. 53BP1-HA fue detectado en los lisados y en el inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-HA. GST-VRK1 fue detectada con tinción Ponceau. La radiactividad incorporada se muestra en los paneles indicados con ³²P. **C.** Se llevó a cabo la fosforilación del fragmento GST-53BP1 (aa 1-346) por GST-VRK1 o ATM-HA mediante un ensayo quinasas con ATP frío. Se detectó la fosforilación de los residuos serina 25 y serina 29 conjuntamente con un anticuerpo que reconoce los dos residuos fosforilados (P-S25/29).

Puesto que el patrón de fosforilación de 53BP1 *in vitro* por VRK1 o por ATM es idéntico, pensamos que quizás ambas quinasas, además, podían compartir residuos de fosforilación en 53BP1. Para comprobar esto, se llevó a cabo un ensayo quinasas *in vitro* con el fragmento más amino terminal de 53BP1 (aa 1-346), que se fosforiló por VRK1 purificada y por ATM (esta última se sobreexpresó en células HEK-293T fusionada al epítipo HA, y se inmunoprecipitó). Se detectó mediante *Western blot* la fosforilación en los residuos serina 25 y serina 29 de 53BP1, con un anticuerpo que reconoce específicamente ambos residuos fosforilados, dos residuos diana de ATM *in vivo* (Ward et al., 2003). Se observó que efectivamente, ATM fosforila a 53BP1 en esos dos residuos, y que VRK1 es también capaz de fosforilarlos en el mismo grado que ATM (fig. 45C).

3.3.2. VRK1 colocaliza parcialmente con 53BP1 en los focos de respuesta al daño

La fosforilación *in vitro* de 53BP1 por VRK1 nos llevó a centrarnos en el posible papel de VRK1 en la respuesta a roturas de doble cadena (DSB) en el ADN, en la que está implicada 53BP1 (Zgheib et al., 2005). Tras la formación de DSB en el ADN, una serie de complejos proteicos se ensamblan en los puntos de rotura, formados por proteínas como Mre11-Rad50-NBS1 (complejo MRN), MDC1, BRCA1 o 53BP1, formando focos de señalización del daño; el mantenimiento de las proteínas en los focos, a su vez, depende en primera instancia de la fosforilación de la histona H2AX por ATM en los puntos del ADN dañado (Shiloh, 2006). La localización de 53BP1 en los focos de respuesta al daño tras pocos minutos después de la exposición de células a radiación ionizante es fácilmente detectable por microscopía de fluorescencia indirecta (Anderson et al., 2001; Bekker-Jensen et al., 2005; Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000; Xia et al., 2001). Por tanto, decidimos estudiar la localización subcelular de VRK1 en respuesta a DSB causadas por radiación ionizante, y comprobar si existía colocalización con 53BP1.

Para ello, se irradiaron células A549 o HEK-293T con una dosis de 3 Gy de radiación ionizante, se dejaron 30 minutos de recuperación y se procedió a la fijación y tinción de las células. VRK1 se detectó con el anticuerpo monoclonal 1B5, que principalmente detecta VRK1 en el núcleo (Valbuena et al., 2007a), y 53BP1 con un anticuerpo policlonal. Comprobamos que, en ambas líneas celulares estudiadas, en ausencia de irradiación, 53BP1 presenta una localización difusa en el núcleo, y acúmulos en “cuerpos nucleares” (Bekker-Jensen et al., 2005; Mochan et al., 2004) y tras la irradiación se relocaliza a los puntos del ADN dañado, localizándose en focos discretos, tal como está descrito en la bibliografía (fig. 46A). Sin embargo, para VRK1 no se aprecia ningún cambio en su localización ya que antes y después del daño, VRK1 es detectada por todo el compartimento nuclear. Es decir, no se aprecia la formación de focos discretos de VRK1 tras las roturas de doble cadena en el ADN. Sin embargo, esto no es indicativo de que VRK1 no interaccione o forme parte de los focos de respuesta al daño; de hecho, se aprecia una señal amarilla en los focos de 53BP1 (fig. 46A, “mezcla”), indicativo de la existencia de colocalización de 53BP1 con VRK1 en los focos. Este comportamiento de VRK1 no es extraño si lo comparamos con el de las quinasas ATM y Chk2. ATM se activa por autofosforilación tras el daño en el ADN, y parte de este ATM activado interacciona con H2AX fosforilada, 53BP1, NBS1 o MDC1, por lo que forma parte de los focos de señalización; sin embargo, ATM se detecta también localizada por todo el núcleo para poder transducir la señal a proteínas que no forman parte de los focos, como p53 (Bakkenist and Kastan, 2003; Bekker-Jensen et al., 2006). Chk2, por el contrario, no forma focos discernibles y sólo interacciona transitoriamente con los focos de respuesta al daño, debido a que su función consiste en conectar los puntos de DSB con el resto del núcleo (Bekker-Jensen et al., 2006). Por

tanto, este resultado indicaría que VRK1, en cuanto a su localización tras el daño en el ADN, se comporta como las quinasas ATM y Chk2.

Figura 46. Localización subcelular de VRK1 y 53BP1 endógenas en ausencia de daño y tras radiación ionizante. A. Se utilizaron células A549 y HEK-293T, que bien se dejaron sin irradiar (0 Gy), o se irradiaron con una dosis de 3 Gy de rayos gamma (IR 3Gy). Las células se fijaron 30 minutos después de la irradiación. VRK1 se detectó con el anticuerpo monoclonal 1B5 (rojo). 53BP1 se detectó con un anticuerpo policlonal (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La barra blanca indica 20 μm. B. Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de VRK1 endógena en A549 y HEK-293T en ausencia o presencia de IR (3 Gy).

Por otro lado, la radiación ionizante debe producir un cambio en la conformación de VRK1 (seguramente provocado por alguna fosforilación, que hace que cambie a una conformación más activa), ya que la señal obtenida con el anticuerpo 1B5 en la inmunofluorescencia es mucho más intensa tras la irradiación (fig. 46A); seguramente, este

probable cambio en la conformación de VRK1 expone mejor el epítipo que reconoce el anticuerpo, situado en la región carboxilo terminal (Valbuena et al., 2007a). Este efecto sólo se observa en inmunofluorescencia, puesto que en *Western blot* (fig. 46B) no se aprecian diferencias en la detección de VRK1 por el anticuerpo, debido seguramente a la desnaturalización de la proteína durante la electroforesis.

3.3.3. VRK1 interacciona con 53BP1 y lo fosforila en respuesta a radiación ionizante

El análisis de la localización subcelular de VRK1 tras las roturas de doble cadena indica que parte de VRK1 podría estar interaccionando con los focos de repuesta al daño. Para discernir si esta interacción es estable (como la de ATM) o transitoria (como la de Chk2), decidimos analizar si VRK1 interaccionaba establemente con 53BP1 tras radiación ionizante (IR), de igual manera que 53BP1 interacciona con ATM tras IR (DiTullio et al., 2002).

Para ello células A549 fueron irradiadas con una dosis de 3 Gy de rayos gamma, o dejadas sin irradiar. Tras 30 minutos de recuperación, 53BP1 endógeno fue inmunoprecipitado, y se detectó la presencia de VRK1 endógena en los inmunoprecipitados. Como control se realizaron inmunoprecipitaciones paralelas con un anticuerpo sin diana endógena. Se observó que VRK1 coimmunoprecipita con 53BP1 únicamente tras la irradiación, sugiriendo que existe una interacción estable entre VRK1 y 53BP1 tras el daño en el ADN, y que por tanto, parte de VRK1 interacciona establemente con los focos de señalización del daño (figura 47A).

Figura 47. La radiación ionizante induce la activación de VRK1 y su interacción con 53BP1. **A.** Células A549 fueron irradiadas con rayos gamma (IR 3Gy), o dejadas sin irradiar. 30 minutos tras la irradiación se prepararon extractos celulares con el tampón de lisis NETN. 53BP1 se inmunoprecipitó con un anticuerpo policlonal. Como control negativo, se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal sin diana endógena (α FLAG, indicado con “-”). VRK1 se detectó con el anticuerpo monoclonal 1B5. 53BP1 se detectó en el inmunoprecipitado con el anticuerpo policlonal, pero no así en los lisados por falta de sensibilidad en la detección. **B.** VRK1 endógena fue inmunoprecipitada de células A549 sin estimular o tras 30 minutos de la irradiación con 3 Gy. Se realizó un ensayo quinasa con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y GST-53BP1 (aa 1-346). VRK1 se detectó con un anticuerpo policlonal (VC) y 53BP1 mediante tinción Ponceau. Arriba se muestran los niveles de VRK1 en los lisados, junto con el control de carga (β -actina).

Así mismo, quisimos comprobar cuál era el estado de activación de VRK1 bajo las condiciones en las que detectamos la interacción de VRK1 con 53BP1. Para ello, VRK1 fue inmunoprecipitada de células A549 30 minutos después de la estimulación con radiación ionizante (3 Gy), o de células sin estimular. VRK1 inmunoprecipitada se utilizó en un ensayo quinasas en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y del fragmento amino terminal de 53BP1 (aa 1-346) que es fosforilado *in vitro* por GST-VRK1 (fig. 45A). Como se aprecia en la figura 47B, la actividad de VRK1 aumenta tras la irradiación, en comparación con su actividad en células sin estimular, aumento que es reflejado de manera evidente por un mayor grado de fosforilación del fragmento amino terminal de 53BP1. El aumento en el grado de autofosforilación es menos notable.

En conjunto, estos resultados indican que VRK1 puede formar parte de los focos de señalización de roturas de doble cadena en el ADN, mediante su interacción con 53BP1, y en ese complejo, VRK1 es más activa y es capaz de fosforilar *in vitro* el fragmento amino terminal de 53BP1.

3.3.4. Determinación de la zona de interacción de 53BP1 con VRK1

Figura 48. VRK1 interacciona con la región de 53BP1 implicada en la interacción con γH2AX y el reclutamiento a los focos de respuesta a daño. A. Se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* con VRK1-His purificada y seis fragmentos de 53BP1 fusionados a GST. Los fragmentos se precipitaron con resina Glutación Sefarosa y se detectaron con un anticuerpo anti-GST. VRK1-His se detectó con el anticuerpo 1F6. B. Esquema de los dominios estructurales de 53BP1.

A continuación decidimos determinar cuál era la zona de interacción de 53BP1 con VRK1. 53BP1 presenta dos dominios BRCT en la zona carboxilo terminal (aa 1714-1972) y aguas arriba, una señal de localización nuclear y dos dominios tudor (aa 1477-1632) (fig. 48B). Muchos autores coinciden en apuntar que la región aguas arriba de los dominios BRCT está implicada en el reclutamiento de 53BP1 a los focos inducidos por IR, o focos de respuesta al

daño. Unos autores mantienen que la región 1052-1632 es necesaria para la localización de 53BP1 en los sitios de DSB en el ADN (Ward et al., 2006), mientras que otros inciden en que la región 1220-1711 se recluta a los focos inducidos por IR tan eficientemente como la proteína completa (Zgheib et al., 2009). Además, la zona delimitada de unión de 53BP1 con H2AX fosforilada en la serina 139 (γ H2AX) comprende la región 956-1354, que está dentro de la zona necesaria para el reclutamiento a los focos (Ward et al., 2003) (fig. 48B).

Realizamos un ensayo de interacción *in vitro* en el cual se incubó VRK1-His con seis fragmentos de 53BP1 fusionados a GST. Se comprobó que VRK1-His era capaz de unirse únicamente al fragmento correspondiente a los residuos 956-1354 (fig. 48A), justamente la zona delimitada de unión de 53BP1 con γ H2AX. Por lo tanto, VRK1 interacciona con 53BP1 por una zona implicada en su interacción con γ H2AX y su reclutamiento a los sitios del ADN dañado.

3.3.5. VRK1 es necesaria para la localización de 53BP1 en focos inducidos por IR

Dados los resultados obtenidos acerca de la interacción y fosforilación de 53BP1 por VRK1, a continuación decidimos analizar si la supresión de la expresión de VRK1 con ARN de interferencia producía algún efecto sobre la localización de 53BP1 en los focos inducidos por radiación ionizante.

Para ello, células A549 fueron transfectadas con oligonucleótidos de ARN de interferencia específicos para VRK1 (siVRK1), o con oligos sin diana específica como control negativo (siControl). La eficacia de los oligos de ARN de interferencia para VRK1 había sido demostrada previamente (Valbuena et al., 2008b; Vega et al., 2004). En la línea A549 se obtiene una bajada drástica de los niveles de proteína VRK1 48 horas después de la transfección (fig. 49C). Por lo tanto, las células fueron irradiadas 48 horas después de la transfección con una dosis de 3 Gy, y se fijaron a los 30 minutos. Se observó que 53BP1 se relocizaba de manera eficiente a los puntos del ADN dañado, localizándose en focos discretos, tanto en las células sin transfectar (NT) como en las células transfectadas con siControl. Sin embargo, en las células deficientes en VRK1, 53BP1 no era capaz de localizarse en los focos de respuesta al ADN dañado eficientemente (fig. 49A y 49B).

Figura 49. La localización de 53BP1 en focos inducidos por IR se ve impedida en células deficientes en VRK1. **A.** Detección de 53BP1 por inmunofluorescencia en células A549 sin irradiar (0 Gy) o en células irradiadas (IR 3Gy 30 minutos) 48 h después de la transfección con siControl, o con siVRK1, sin transfectar (NT) o mantenidas 48 horas con 0,2% FBS. 53BP1 se detectó en verde con un anticuerpo policlonal, y VRK1 con el anticuerpo 1B5 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La barra indica 20 μ m. **B.** Igual que en (A), detalle de una célula. La barra indica 5 μ m. **C.** Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de VRK1 correspondientes a las células fijadas en (A). Debajo se muestra el control de carga (β -actina). **D.** Análisis del perfil de ciclo de células A549 asincrónicas (NT), tras 48 horas de la transfección con siControl, o con siVRK1, y de células mantenidas 48 horas con 0,2% FBS. **E.** En torno a 100 células por cada punto del apartado (A) fueron analizadas con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), con el cual se obtuvo el número de focos de 53BP1 en cada célula, y el diámetro medio del foco en cada célula. Se detallan los valores numéricos de las medias y desviaciones estándar de las medidas. **F.** Representación gráfica de los datos en (E) correspondientes al número de focos de 53BP1 por célula. siV, siVRK1; siC, siControl.

Figura 49

A modo de control, se analizó la localización de 53BP1 tras la irradiación de células que habían sido mantenidas sin suero durante 48 horas, puesto que la supresión de la expresión de VRK1 en las células A549 tiene el mismo efecto sobre el ciclo celular que la retirada de suero durante 48 horas: una parada significativa de células en G0 (fig. 49D) (Valbuena et al., 2008b). El objetivo era descartar que una parada en el ciclo de división celular pudiera afectar al comportamiento de 53BP1. Como se observa en la figura 49A y B, la localización de 53BP1 tras la irradiación de las células mantenidas sin suero 48 horas es la misma que en células asincrónicas (NT). Por tanto, podemos decir que la parada en el ciclo celular causada por la supresión de VRK1 no afecta a la formación de focos de 53BP1 en respuesta a IR.

Para analizar más en profundidad el efecto de la supresión de VRK1 sobre la localización de 53BP1, se procedió a la cuantificación del número de focos de 53BP1 por célula tras IR, de células en las distintas condiciones de la figura 49A. En torno a unas 100 células por punto fueron analizadas con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), con el cual se contó el número de focos en cada célula analizada, y se analizó el tamaño medio de los focos de cada célula (fig. 49E). Se obtuvo una media del número de focos por célula bastante similar para las células sin transfectar (NT), las transfectadas con siControl, y las mantenidas sin suero 48 horas, en torno a 32 focos por célula (representado en fig. 49F). Sin embargo, las células transfectadas con siVRK1 presentan, de media, una reducción del 55% en el número de focos (15 focos por célula). Así mismo, el tamaño de los focos también parece disminuir en células deficientes en VRK1. El programa ImageJ calcula el área media de los focos de cada célula, obteniéndose para las células sin transfectar, las transfectadas con siControl y las mantenidas sin suero 48 horas un diámetro medio de los focos de unas 2 micras (fig. 49E); sin embargo, hay una reducción del 24% en el diámetro en células transfectadas con siVRK1. Este resultado indica que en las células con menor expresión de VRK1, 53BP1 no se recluta a todos los puntos del ADN dañado, puesto que disminuye el número de focos detectados, y en los puntos donde sí se recluta, hay menos cantidad de 53BP1 comparado con las células que tienen niveles normales de VRK1.

3.3.6. VRK1 es necesaria para una total fosforilación de H2AX en serina 139 en respuesta a IR

La interacción del dominio tudor de 53BP1 con histonas H3 y H4 metiladas es crucial para el reconocimiento inicial de las roturas de doble cadena por 53BP1 (Huyen et al., 2004). Sin embargo, un reclutamiento eficiente de 53BP1 en las DSB requiere de interacciones adicionales. De hecho, la interacción de 53BP1 con γ H2AX (H2AX fosforilada en serina 139) es necesaria para el reclutamiento y mantenimiento de 53BP1 en los focos (Ward et al., 2003), reclutamiento que además es regulado de manera indirecta por γ H2AX mediante la inducción de ubiquitinaciones en histonas (Kolas et al., 2007). Sin embargo, factores adicionales aún por

identificar podrían influir en la interacción inicial de 53BP1 con el ADN dañado, y en el mantenimiento de esa interacción.

La falta de VRK1 impide la localización correcta de 53BP1 en los focos inducidos por radiación ionizante. Como ya hemos dicho, la retención de 53BP1 es, en parte, directamente dependiente de la fosforilación de H2AX por ATM en la serina 139 (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Ward et al., 2003). Sin embargo, las quinasas relacionadas con PI3K (ATM, ATR y DNA-PK) no son las únicas que pueden fosforilar a H2AX en ese residuo. H2AX es fosforilada en serina 139 por MAP quinasas como JNK y p38 tras diversos estímulos para inducir apoptosis (Lu et al., 2008; Lu et al., 2006). Por otro lado VRK1, fosforila a otras histonas del nucleosoma, como a H3 en mitosis (Kang et al., 2007), y a H2B *in vitro* (Lopez-Borges and Lazo, 2000). También la quinasa VRK de *D. melanogaster*, NHK-1, fosforila a la histona H2A en Thr119 en mitosis (Aihara et al., 2004). Dados estos datos, quisimos comprobar si VRK1 podría fosforilar a H2AX, lo que podría ser uno de los factores a través de los cuales VRK1 contribuye a regular la localización de 53BP1 en los focos de respuesta al daño.

Para ello se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* con H2AX recombinante y GST-VRK1, en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. A modo de control positivo, se realizó de forma paralela la fosforilación de la histona H3 por VRK1. Se observó que VRK1 era capaz de fosforilar a H2AX, aunque en un grado menor que a histona H3 (fig. 50). Histona H3 es fosforilada por VRK1 en treonina 3 y serina 10, por lo que este mayor grado de fosforilación puede ser debido a que es fosforilada en más de un residuo.

Figura 50. La histona H2AX es diana de fosforilación de VRK1. Se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* con GST-VRK1 purificada y H2AX recombinante humana en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Como control positivo se realizó de forma paralela la fosforilación de histona H3 por VRK1. Arriba se muestra la incorporación de la radiactividad y abajo la tinción con azul de Coomassie.

Dado este resultado, decidimos determinar la evidencia de esta fosforilación por VRK1 *in vivo*. El residuo candidato es la serina 139, por similitud con ATM (al igual que ocurrió con 53BP1), y con las otras MAP quinasas que también fosforilan a H2AX en serina 139. Por tanto, decidimos comprobar si el nivel de fosforilación de H2AX en serina 139 (γH2AX) se veía comprometido al silenciar la expresión de VRK1. La detección de γH2AX se realizó mediante inmunofluorescencia. Células A549 fueron transfectadas con siVRK1, o con siControl, e irradiadas con 3 Gy 48 horas después de la transfección, o dejadas sin irradiar. Las células se fijaron a los 15 minutos, puesto que la fosforilación de H2AX en los puntos del ADN dañado se

detecta inmediatamente tras la radiación ionizante (Paull et al., 2000; Rogakou et al., 1999). También se comprobó la fosforilación de H2AX tras irradiación en células mantenidas sin suero durante 48 horas, y en células sin transfectar (NT).

Figura 51. Los niveles de γ H2AX disminuyen al silenciar la expresión de VRK1. Detección de γ H2AX por inmunofluorescencia en células A549 sin irradiar (0 Gy) o células irradiadas (IR 3Gy 15 minutos) 48 h después de la transfección con siControl, o con siVRK1, sin transfectar (NT) o mantenidas 48 horas con 0,2% FBS. γ H2AX se detectó en verde con un anticuerpo monoclonal que detecta la serina 139 fosforilada, y VRK1 con el anticuerpo policlonal VE (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La barra indica 20 μ m. A la derecha se muestra una ampliación de las células señaladas con un marco gris.

Se observó que en ausencia de irradiación, apenas se detecta γ H2AX, sin embargo, en células irradiadas, bien sin transfectar, transfectadas con siControl, o mantenidas sin suero 48 horas, se detecta γ H2AX en los puntos de rotura del ADN, tal como se describe en la bibliografía (fig. 51). Sin embargo, en células transfectadas con siVRK1, en las que se produce una bajada sustancial de los niveles de VRK1, la cantidad de γ H2AX detectada es menor. En la mayoría de las células, sobre todo las que presentan menores niveles de VRK1, se aprecia una bajada en la intensidad de la fluorescencia correspondiente a γ H2AX (fig. 51). Este resultado indica que VRK1 podría participar en la fosforilación de H2AX en serina 139 tras la radiación

ionizante, posiblemente a través de una fosforilación directa, ya que H2AX es diana de VRK1 *in vitro*, aunque no se puede descartar una participación indirecta a través de una influencia de VRK1 en el estado de activación de ATM u otras quinasas PIKK.

Este resultado indica que la fosforilación de H2AX por VRK1 podría influir en la regulación de la localización de 53BP1 en los focos. Sin embargo, cabe destacar que el menor grado de fosforilación de H2AX en células con expresión reducida de VRK1 es un efecto menos drástico que el que la falta de VRK1 produce sobre la localización de 53BP1 en los focos. Es decir, a la vista del resultado de la figura 51, esta menor fosforilación de H2AX parece no explicar por completo la incapacidad de 53BP1 para localizarse correctamente en los focos en ausencia de VRK1 (fig. 49A). Por tanto, podría decirse que VRK1 podría estar regulando la localización de 53BP1 no sólo mediante su contribución en la fosforilación de H2AX, sino a través de otros mecanismos independientes de γ H2AX que podrían afectar, por ejemplo, a la interacción directa de 53BP1 con el ADN.

3.3.7. La activación de VRK1 en respuesta a IR es independiente de ATM

La activación de la quinasa ATM es inmediata tras el daño en el ADN y juega un papel principal en la transducción de la señal a las moléculas efectoras (Shiloh, 2006). Tras la formación de roturas de doble cadena, ATM pasa de estar asociado en dímeros a formar monómeros activos a través de su autofosforilación en la serina 1981 (Bakkenist and Kastan, 2003). Su reclutamiento y activación en los puntos del ADN dañado depende además de su interacción con el complejo MRN (Lee and Paull, 2005). La activación de ATM conlleva la fosforilación de múltiples proteínas de la respuesta al daño en el ADN, tanto sensores, como mediadores y efectores, entre las que se encuentran H2AX y 53BP1. Como hemos visto hasta ahora, VRK1 responde al daño causado en el ADN por radiación ionizante aumentando rápidamente su actividad, interaccionando con 53BP1 en los focos de señalización del daño, y fosforilando a 53BP1 y H2AX. Estos resultados colocan a VRK1 en el ápice de la respuesta al daño en el ADN, conjuntamente con ATM. Por tanto consideramos necesario analizar si VRK1 se encuentra por debajo de ATM en la cascada de señalización, y por tanto su activación depende de ella, o si por el contrario, constituye una vía independiente y paralela a ATM.

Para abordar este análisis, decidimos, por un lado, analizar la actividad de VRK1 en respuesta a radiación ionizante en una línea celular ATM^{-/-}, y por otro lado, comprobar si VRK1 era diana directa de fosforilación de ATM.

3.3.7.a. Análisis de la actividad de VRK1 en la línea celular HT-144 (ATM^{-/-})

VRK1 fue inmunoprecipitada de células HT-144 (ATM^{-/-}) 30 minutos después de la estimulación con radiación ionizante (3 Gy), o de células sin estimular. VRK1 inmunoprecipitada se utilizó en un ensayo quinasa en presencia de [γ -³²P]ATP, y del fragmento

amino terminal de 53BP1 (aa 1-346). Como se aprecia en la figura 52A, la actividad de VRK1 es mayor tras la irradiación, en comparación con su actividad en células sin estimular, ya que hay una mayor fosforilación del fragmento amino terminal de 53BP1 y una mayor autofosforilación de VRK1. A la vista de este resultado, la activación de VRK1 en respuesta a IR parece ser independiente de ATM, ya que este resultado es similar al que se obtiene en células ATM+/+.

Figura 52. VRK1 se activa en respuesta a IR en la línea HT-144 (ATM^{-/-}). **A.** VRK1 endógena fue inmunoprecipitada de células HT-144 sin estimular o tras 30 minutos de la irradiación con 3 Gy. Se realizó un ensayo quinaso con [γ-³²P]ATP y GST-53BP1 (aa 1-346). VRK1 se detectó con el anticuerpo VC. **B.** Detección de la fosforilación de p53 en treonina 18 tras IR en la línea HT-144. Las células fueron transfectadas con siControl, con siVRK1 o dejadas sin transfectar (NT). 8 horas después de la transfección se añadió 0,2% FBS. 48 h después de la transfección se irradiaron con 10 Gy, o se dejaron sin irradiar. Se prepararon lisados 1 hora después de la irradiación. La fosforilación en treonina 18 de p53 se detectó con un anticuerpo específico para ese residuo fosforilado (P-Thr18-p53).

Otro sustrato conocido de VRK1 es p53, fosforilado por VRK1 únicamente en treonina 18. La fosforilación de p53 en treonina 18 en respuesta a IR ha sido descrita por otros autores (Saito et al., 2003), es detectada tras pocos minutos después del daño, y recientemente ha sido atribuida a CK1 (Alsheich-Bartok et al., 2008). Sin embargo, el trabajo de estos autores no descarta que otras quinasas como VRK1 puedan estar contribuyendo a la fosforilación *in vivo* de p53 en treonina 18 tras IR. Es por eso que quisimos comprobar si la fosforilación de p53 en treonina 18 tras IR era en parte dependiente de VRK1, analizando si los niveles de treonina 18 fosforilada tras IR disminuían al reducir los niveles de VRK1 con ARN de interferencia específico. Para ello, células HT-144 se transfectaron con siVRK1, siControl o se dejaron sin transfectar (NT). Las células se mantuvieron con 0,2% de suero durante 40 horas, y posteriormente se irradiaron con una dosis de 10 Gy, con el objetivo de que VRK1 se activara sólo por IR, ya que está descrito que VRK1 fosforila a p53 en treonina 18 en condiciones basales (con suero) (Vega et al., 2004). La fosforilación de p53 en treonina 18 se detectó en los lisados, preparados 1 hora después de la irradiación, con un anticuerpo fosfoespecífico. Se

observó que la fosforilación en treonina 18 aumenta en respuesta a la radiación ionizante, y este aumento se pierde en las células con menor expresión de VRK1 (fig. 52B). Este resultado parece indicar que la fosforilación de p53 en treonina 18 en respuesta a IR es dependiente de VRK1. Además, este resultado apoya que VRK1 se esté activando independientemente de ATM, ya que esta fosforilación de p53 en treonina 18 dependiente de VRK1 se detectó en células ATM^{-/-}. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, parece que VRK1 se activa en respuesta a IR de manera independiente de ATM, y fosforila específicamente a p53 en treonina 18, un residuo esencial para regular su interacción con Mdm2 (Schon et al., 2002), y por tanto esencial para su acumulación y activación (Teufel et al., 2009).

3.3.7.b. VRK1 no es diana directa de fosforilación de ATM

Por último, se quiso comprobar si VRK1 era diana directa de fosforilación de ATM. Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con ATM-HA, y este ATM sobreexpresado se inmunoprecipitó para realizar un ensayo quinasas en presencia de [γ -³²P]ATP, utilizando como sustrato GST-VRK1(K179E) (quinasa inactiva), que no presenta autofosforilación *in vitro*. Como control positivo, se llevó a cabo la fosforilación de p53 por ATM (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998), y como control negativo, se realizó de manera paralela la inmunoprecipitación y ensayo quinasas con ATM inactiva (KD). Se observó que mientras que ATM silvestre era capaz de fosforilar a p53 bajo estas condiciones experimentales (fig. 53A), no se detectó fosforilación alguna en VRK1 inactiva, indicando que VRK1 no es diana directa de fosforilación de ATM.

Figura 53. VRK1 no es diana directa de fosforilación de ATM ni de ATR. **A.** Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pBJ-HA-ATM, o pBJ-HA-ATM KD. ATM sobreexpresado se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA, y se usó en un ensayo quinasas con [γ -³²P]ATP y GST-VRK1(K179E) (quinasa inactiva) como sustrato. La radiactividad incorporada se muestra en los paneles indicados con ³²P. Como control positivo se detectó la fosforilación de GST-p53(aa 1-85) por ATM-HA. **B.** Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pcDNA3-FLAG-ATR o pcDNA3-FLAG-ATR KD. ATR sobreexpresado se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-FLAG, y se usó en un ensayo quinasas con [γ -³²P]ATP y GST-VRK1(K179E) (quinasa inactiva) como sustrato. La radiactividad incorporada se muestra en los paneles indicados con ³²P. Como control positivo se detectó la fosforilación de GST-p53(aa 1-85) y la autofosforilación de ATR.

También se quiso comprobar si ATR podía fosforilar a VRK1. Aunque ATR juega un papel principal en la respuesta al estrés en la replicación, ATR también participa conjuntamente con ATM en la respuesta a DSB, contribuyendo a la activación sostenida de la respuesta y compartiendo sustratos con ATM (Cimprich and Cortez, 2008). Se procedió de igual manera que con ATM y se observó que ATR era capaz de fosforilar el fragmento amino terminal de p53, tal como estaba descrito (Tibbetts et al., 1999), pero no a VRK1 (fig. 53B). Este resultado nos elimina la posibilidad de que en un fondo ATM^{-/-}, la causante de la activación de VRK1 sea ATR, la cual puede sustituir la función de ATM cuando ésta está mutada o ausente (Tomimatsu et al., 2009).

3.3.8. La falta de VRK1 produce una respuesta al daño en el ADN incompleta

El reclutamiento y mantenimiento de 53BP1 en los focos de respuesta a roturas de doble cadena es necesario para el correcto desarrollo de la respuesta al daño en el ADN (Zgheib et al., 2005). 53BP1 es necesario para la completa activación de ATM en los puntos del ADN dañado (DiTullio et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002; Mochan et al., 2003; Wu et al., 2009); además, 53BP1 actúa como una proteína adaptadora que facilita la fosforilación de los sustratos de ATM (Wang et al., 2002). En concreto, parece relevante su participación en la fosforilación de Chk2 en treonina 68 por ATM (Peng and Chen, 2003; Wang et al., 2002), fosforilación necesaria para la activación de Chk2 en respuesta a IR (Ahn et al., 2000; Matsuoka et al., 2000; Melchionna et al., 2000). Puesto que VRK1 es necesaria para un correcto reclutamiento de 53BP1 en los focos de respuesta al daño, decidimos comprobar si la falta de VRK1 podía a su vez comprometer la activación de ATM y la de Chk2.

Células A549 fueron transfectadas con siControl, siVRK1 o dejadas sin transfectar. 48 horas después, las células fueron irradiadas con una dosis de 10 Gy, o dejadas sin irradiar, y se prepararon extractos celulares 1 hora después. La activación de Chk2 se comprobó mediante la detección de su fosforilación en treonina 68 con un anticuerpo fosfoespecífico mediante *Western blot*. El grado de activación de ATM se comprobó mediante la detección de su autofosforilación en el residuo serina 1981, esencial para su activación (Bakkenist and Kastan, 2003). Debido al gran tamaño de la proteína, para aumentar la sensibilidad en la detección, ATM fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico, y la fosforilación en serina 1981 fue detectada por *Western blot* con un anticuerpo fosfoespecífico en los inmunoprecipitados. Así mismo, una activación reducida de ATM puede llevar a una menor fosforilación de p53 en serina 15, otra diana de fosforilación de ATM, de tal manera que también se comprobó la fosforilación de p53 en serina 15 con un anticuerpo fosfoespecífico mediante *Western blot*.

Figura 54. La falta de VRK1 produce una activación incompleta de ATM, Chk2 y p53 en respuesta a IR. **A.** Células A549 fueron transfectadas con siVRK1, siControl, o dejadas sin transfectar. 48 horas después se irradiaron con 10 Gy, y se dejaron recuperar 1 hora. Se utilizaron 400 µg de extracto por punto para inmunoprecipitar ATM endógeno con un anticuerpo específico. Chk2, p53 y VRK1 se detectaron directamente en los lisados. La fosforilación en treonina 68 de Chk2 (P-Thr68-Chk2), la de p53 en serina 15 (P-Ser15-p53) y la de ATM en serina 1981 (P-Ser1981-ATM) se detectaron con anticuerpos fosfoespecíficos. Como control de carga se detectó β-actina. **B.** Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV-FLAG-Chk2(A347) (B) o pBJ-1-HA-ATM KD (C). Las proteínas sobreexpresadas se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-FLAG o anti-HA, y se usaron en un ensayo quinasas como sustratos con [γ - 32 P]ATP y GST-VRK1 silvestre. En (B) se realizó como control positivo la fosforilación de p53 (aa 1-85) por VRK1. La radiactividad incorporada se muestra en los paneles indicados con 32 P.

En la figura 54A se puede ver cómo el nivel de fosforilación de Chk2 en treonina 68 aumenta tras la irradiación, tanto en células sin transfectar, como en células transfectadas con siControl, mientras que los niveles totales de Chk2 se mantienen prácticamente sin cambios. En el caso de ATM, en células sin irradiar no se detecta la autofosforilación de ATM, pero tras la irradiación se detecta una fosforilación significativa en la serina 1981, tanto en células sin transfectar como transfectadas con siControl. Sin embargo, se puede apreciar que en las células irradiadas y transfectadas con siVRK1, con niveles notablemente inferiores de VRK1, la fosforilación de Chk2 en treonina 68 disminuye hasta unos niveles similares a los de las células sin irradiar. Así mismo, la autofosforilación de ATM en serina 1981 se ve reducida al haber menor cantidad de proteína VRK1. En el caso de p53, se observa un aumento de los niveles de p53 tras la irradiación, significativo de que la proteína está empezando a acumularse y activarse.

Además, tras la irradiación se detecta la fosforilación de p53 en serina 15. Esta fosforilación se ve ligeramente disminuida en las células con menor expresión de VRK1.

El único residuo en p53 fosforilado por VRK1 es la treonina 18 (Lopez-Borges and Lazo, 2000; Vega et al., 2004), por lo que esta bajada en la fosforilación de serina 15 debe ser debido a un efecto indirecto dependiente de VRK1 (posiblemente por la menor activación de ATM en ausencia de VRK1). Así mismo, para descartar totalmente que la reducción en los niveles de fosforilación de Chk2 en treonina 68, y ATM en serina 1981 en ausencia de VRK1, no se debía a un efecto directo, comprobamos si Chk2 y ATM eran dianas directas de fosforilación de VRK1. Para ello se realizaron ensayos quinasa con VRK1 purificada y ATM inactiva (ATM KD) (fig. 54C) y Chk2 inactiva (Chk2(A347)) (fig. 54B) como sustratos. Se observó que ni ATM ni Chk2 eran dianas de fosforilación de VRK1. Por tanto, podemos concluir que VRK1 es necesaria para una completa activación de ATM y Chk2 en respuesta a radiación ionizante; sin embargo, como ambas quinasas no son dianas directas de VRK1, la regulación de su activación por VRK1 debe ser un efecto indirecto, seguramente a través de la regulación de la localización de 53BP1 tras IR.

Discusión

1. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON VRK1

Un gran número de proteínas se encuentran formando parte de complejos proteicos, por lo que entender la función celular de una proteína dada implica necesariamente la identificación de sus interacciones proteína-proteína (Pawson and Scott, 1997). Además, la elucidación de los componentes de una vía de señalización requiere la identificación de interacciones proteína-proteína específicas, lo que puede significar la identificación de pasos consecutivos en la vía, o de elementos regulatorios de los componentes de la vía de señalización.

En el momento de iniciar nuestro estudio, existía información acerca de las funciones de VRK1, principalmente acerca de sus dianas de fosforilación y su implicación en la progresión del ciclo celular. Sin embargo, no existían apenas datos acerca de la regulación de la quinasa, acerca de qué elementos se encuentran por encima en las vías de señalización en las que VRK1 está implicada (vías de respuesta a estrés, y control del ciclo de división celular), y no se conocía ninguna interacción proteína-proteína de VRK1, salvo las detectadas con sus factores de transcripción diana c-Jun y ATF2 (Sevilla et al., 2004a; Sevilla et al., 2004b), y las que se detectaron más adelante con CREB y su diana mitótica histona H3 (Kang et al., 2007; Kang et al., 2008). Por tanto consideramos que identificar nuevas interacciones proteína-proteína de la quinasa VRK1 podría contribuir al entendimiento de su función, a posicionarla dentro de las vías de señalización, o encontrar reguladores de su función, que bien podrían afectar a la actividad enzimática de VRK1 o a su especificidad.

Una contribución clave a la identificación de interacciones de proteínas en complejos estables en sistemas celulares es el uso de sistemas de afinidad. La proteína de interés, con un epítipo o *tag* apropiado, se utiliza como “cebo” en la incubación con extractos celulares y así se consigue “atrapar” a sus moléculas interactuantes (Monti et al., 2005). La purificación de los complejos se puede lograr haciendo uso de los sistemas anti-*tags* que se encuentran inmovilizados en soportes de agarosa-sefarosa y que presentan gran eficiencia de unión a los *tags* (Terpe, 2003). En nuestro caso, además, hicimos una modificación de este procedimiento básico que consistió en sobreexpresar la proteína de interés (VRK1, VRK2B y VRK1-C) fusionada a GST, obteniéndola directamente en el extracto celular, precipitarla a través de la GST y así coprecipitar conjuntamente las proteínas interactuantes.

En este trabajo, mediante el uso de técnicas proteómicas, se han identificado cuarenta proteínas candidatas a ser proteínas que forman complejos con VRK1. Del análisis de la interacción de VRK1 con una de ellas, la GTPasa Ran, se ha encontrado que Ran interacciona establemente con VRK1, y que la función de la interacción consiste en la modulación de la actividad de VRK1.

De las cuarenta proteínas identificadas, cuatro de ellas fueron también identificadas para VRK2B. VRK1 y VRK2B presentan una alta homología en su secuencia de aminoácidos (un

44%), ambas tienen una localización predominantemente nuclear y además comparten sustratos de fosforilación, como p53, además de presentar redundancia en sus funciones (Blanco et al., 2006). Por tanto, no es de extrañar que también puedan compartir dianas de interacción y presentar afinidades semejantes por los mismos motivos de interacción en éstas. El hecho de que estas cuatro proteínas hayan sido identificadas, de manera independiente (lo que implica reproducibilidad en el resultado), como proteínas candidatas a interactuar con VRK1 y VRK2B, las sitúa como las candidatas con mayor probabilidad de formar interacciones relevantes *in vivo* con estas quinasas, con una función concreta en la célula. De ellas, la GTPasa Ran tiene papeles importantes en la regulación de procesos celulares como el transporte de moléculas entre núcleo y citoplasma, y la mitosis, además de una localización principalmente nuclear, lo que la situó como candidata idónea para ser una proteína reguladora de VRK1 y VRK2B. Las otras tres proteínas identificadas para VRK1 y VRK2B tienen una localización citoplasmática, por lo que parece necesario confirmar la existencia de la interacción *in vivo* de estas proteínas con las quinasas. Por otro lado, en el caso de p97/VCP, aunque su principal función es la de funcionar como chaperona para proteínas ubiquitinadas en el citoplasma (Wang et al., 2004), también se ha descrito una localización nuclear para ella, en la cual puede tener un papel en la respuesta al daño en el ADN, ya que interactúa con la helicasa RecQ (Partridge et al., 2003) y con BRCA1 (Zhang et al., 2000), y es fosforilada por DNA-PK, localizándose en los focos de respuesta al daño en el ADN (Livingstone et al., 2005). Por tanto, sería interesante analizar la interacción de VRK1 y p97/VCP en el contexto de la respuesta al daño en el ADN.

De las cuarenta proteínas identificadas para VRK1, hay tres cuya identificación genera dudas (USP25, GPDH-M y SDHB). Como norma general, un *score* por encima de 75 da plena confianza acerca de la veracidad de una asignación. También, el número de péptidos utilizados en la asignación (como mínimo deben utilizarse cuatro), y la cobertura de la secuencia de la proteína por esos péptidos, son factores que se tienen en cuenta para evaluar una asignación (Taylor et al., 2007). Generalmente, a mayor número de péptidos utilizados para la asignación, mayor *score*. En algunos casos, la baja abundancia de proteína de partida provoca que en el análisis con MALDI-TOF se obtengan pocos péptidos, lo que da lugar a un *score* bajo en la asignación, pero pudiendo ser una identificación inequívoca. En otros casos, el *score* es bajo porque hay una menor probabilidad de que la asignación sea correcta, aun utilizando un número alto de péptidos. Por tanto, en el caso de *scores* bajos, la constatación de otros datos, como que el peso molecular o el punto isoeléctrico teóricos concuerden con los experimentales, contribuyen a valorar la veracidad de la asignación. Esta es la razón por la que tenemos asignaciones con *scores* cercanos al punto de corte, de las que no se ha dudado de su veracidad (por ejemplo cdc25B), sin embargo de otras sí, al no concordar el peso molecular de la proteína asignada con la que se observa en el gel (USP25, GPDH-M y SDHB).

Aparte de evaluar el acierto en las asignaciones de las proteínas identificadas, hay que evaluar si realmente estas cuarenta proteínas constituyen proteínas que pueden formar complejos con VRK1 en la célula. Existen numerosos estudios proteómicos a gran escala dedicados a la identificación del “interactoma” de una proteína en concreto (Miles et al., 2005; Paul et al., 2009; Yang et al., 2009), o incluso a la identificación y descripción de la red de interacciones binarias de un organismo completo (Gavin et al., 2006; Li et al., 2004). En ellos se dan por válidas las identificaciones de interacciones proteína-proteína encontradas por purificación de complejos de proteínas e identificación por métodos proteómicos. En nuestro caso, nuestro trabajo ha llevado a la identificación de un pequeño “interactoma” de VRK1, con un total de cuarenta proteínas que podrían formar complejos con VRK1. Sin embargo, dos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar estos datos.

En primer lugar, la validez de la identificación de una nueva interacción proteína-proteína aumenta cuanto mayor y más variado sea el número de experimentos que la confirmen (Orchard et al., 2007), de forma que la identificación de una interacción por métodos proteómicos no es más que un primer paso; además, la asociación de esta interacción a una función biológica determina por completo la relevancia y la fiabilidad de la interacción encontrada. En nuestro caso, nos hemos centrado en la validación de la identificación de la interacción de VRK1 y Ran, de forma que ha sido demostrada mediante diversos experimentos que comprenden ensayos de interacción *in vitro*, *pulldowns*, y coinmunoprecipitaciones de las proteínas endógenas, además de haberle sido asignada una función biológica relevante como es la regulación de la actividad quinasa de VRK1. De ahí que el resto de proteínas identificadas, las consideremos proteínas candidatas a ser proteínas que forman complejos con VRK1, con lo que queremos decir que es necesaria la realización de más experimentos para confirmar que realmente lo son, y que tienen una función concreta en la célula.

El segundo factor a tener en cuenta es que los métodos de purificación de complejos celulares estables no mantienen la compartimentalización celular ni las condiciones nativas de concentración de las proteínas. Es decir, se asume que la purificación permite el aislamiento de proteínas que están formando realmente complejos *in vivo*, pero las condiciones experimentales pueden conducir a un cambio en las concentraciones locales de las proteínas, que pueden desplazar los equilibrios; y lo más importante, la ausencia de membranas, y por tanto de orgánulos, pueden dar lugar a interacciones entre moléculas de distintos compartimentos celulares que *in vivo* no podrían darse (dando lugar a falsos positivos) (Edwards et al., 2002; Kemmeren et al., 2002). Visto de esta manera, no parece tan extraño que proteínas típicamente citosólicas, mitocondriales, del retículo, o transmembrana, puedan haber sido identificadas como candidatas a ser proteínas que interaccionan con VRK1. La localización de VRK1 es principalmente nuclear, aunque también presenta una subpoblación citoplasmática (Valbuena et al., 2007a). Por tanto, si bien estas proteínas podrían interaccionar con la subpoblación

citoplasmática de VRK1, quizás sería también conveniente considerar que VRK1 puede asociarse a esa batería de proteínas citosólicas por presentar dominios o motivos por los que VRK1 tiene afinidad, y a las que ha podido asociarse durante el proceso de purificación de complejos. Otra posibilidad totalmente válida es que muchas de estas proteínas no se asocien directamente con VRK1, sino que lo hagan indirectamente a través de otras proteínas.

En este contexto, también podría contemplarse la posibilidad de que estas proteínas citosólicas fueran dianas de interacción de VRK2A, que es el miembro de la familia VRK con una localización predominantemente citosólica, y que se asocia a orgánulos como mitocondria y retículo endoplasmático (Blanco et al., 2006; Blanco et al., 2008). VRK2A y VRK2B presentan la misma homología en secuencia de aminoácidos con VRK1, por lo que al igual que con VRK2B, VRK1 podría compartir dianas de interacción con VRK2A. Igualmente, ambas proteínas comparten dianas de fosforilación *in vitro*, como p53 (Blanco et al., 2006), BAF (Nichols and Traktman, 2004) e histona H3 (este trabajo), pero la localización de VRK2A hace que estas fosforilaciones no tengan una función *in vivo*. Por tanto, VRK1 y VRK2A podrían compartir dianas de interacción citosólicas *in vitro*, pero sólo la interacción con VRK2A tendría una relevancia funcional en la célula. De hecho, hemos comprobado que Prohibitin y RACK1, dos proteínas citosólicas implicadas en señalización celular identificadas en este estudio, interaccionan con VRK1, pero lo hacen en mayor grado con VRK2A, y existe una colocalización de éstas con VRK2A en el citoplasma (datos no mostrados).

2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE VRK1 CON LA GTPasa RAN

La GTPasa Ran fue identificada a partir de un *spot* de 25 KDa, que fue seleccionado tanto en un *pulldown* de VRK1 como de VRK2B, al no detectarse en el correspondiente *pulldown* control con GST. En ambos casos, los parámetros de la asignación (alto *score*, número elevado de péptidos utilizados, cobertura amplia de la secuencia de la proteína) indican con alta confianza que se trata de la GTPasa Ran. Además, la reproducibilidad en la identificación de Ran elimina la posibilidad de que se trate de un falso positivo (Edwards et al., 2002; Li et al., 2004).

Análisis posteriores, realizados mediante ensayos de *pulldown* y reconocimiento de las proteínas con anticuerpos específicos, confirmaron y validaron la interacción de Ran con VRK1 y VRK2B. Así mismo, se observó que Ran también puede interaccionar con el resto de proteínas de la familia VRK, VRK2A y VRK3. Por tanto, Ran no parece presentar especificidad en su unión a las proteínas VRK. Sin embargo, VRK1 sí se une específicamente a Ran, y no a otras GTPasas de la familia Ras, como cdc42(Q61L) y Rac, las cuales pertenecen a la subfamilia Rho. Por tanto, parece que Ran no presenta especificidad por las quinasas de la

familia VRK, mientras que VRK1 sí presenta especificidad por la GTPasa Ran dentro de la superfamilia de GTPasas Ras. La GTPasa Ran es el miembro más divergente y forma por sí sola una familia dentro de la superfamilia de GTPasas Ras, y aunque se relaciona en secuencia con las GTPasas Rab, presenta características que la diferencian del resto de las GTPasas (Wennerberg et al., 2005).

Las proteínas que hemos identificado mediante técnicas proteómicas como candidatas a formar complejos estables con VRK1, pueden interaccionar directamente con VRK1, o formar parte de estos complejos sin interaccionar directamente con ella. En el caso de la GTPasa Ran, mediante la realización de un ensayo de interacción *in vitro* en presencia únicamente de las dos proteínas purificadas, hemos observado que existe una interacción directa entre VRK1 y Ran. Esto implica que esta interacción directa debe tener una función distinta (o adicional) a una supuesta importación de VRK1 al núcleo a través del sistema regulado por Ran. VRK1 tiene una señal de localización nuclear (Lopez-Borges and Lazo, 2000) en la región carboxilo terminal que hace que su localización subcelular sea principalmente nuclear, aunque en algunos casos se encuentre también en el citoplasma y en particular en el aparato de Golgi (Lopez-Sanchez et al., 2009; Valbuena et al., 2007a). Por lo tanto, es lógico pensar que a través de su señal de localización nuclear, VRK1 sea importada al núcleo mediante el mecanismo de importación de macromoléculas regulado por la GTPasa Ran (Gorlich and Kutay, 1999; Mattaj and Englmeier, 1998). En este mecanismo, los sustratos a importar interaccionan en el citoplasma a través de su señal de localización nuclear con importinas, el complejo se transloca al núcleo a través del poro nuclear, y se disocia tras la unión de RanGTP a la importina, liberándose el sustrato importado. La función de Ran consiste en controlar el desensamblaje de los complejos de importación, y en ningún momento interacciona con el sustrato importado (Stewart, 2007). Por tanto, aunque es probable que se dé una interacción indirecta entre VRK1 y Ran para permitir la importación de VRK1 al núcleo, la interacción directa entre VRK1 y Ran identificada debe tener algún significado funcional diferente.

La unión de GDP o GTP a Ran produce cambios en la conformación de la GTPasa que determinan su interacción con sus reguladores y efectores (Scheffzek et al., 1995; Vetter et al., 1999a; Vetter et al., 1999b). Sin embargo, nosotros hemos observado que VRK1 puede interaccionar con Ran independientemente del nucleótido unido. Por tanto, VRK1 puede interaccionar tanto con la conformación inactiva RanGDP, como con la conformación activa RanGTP, lo que es confirmado además por el hecho de que VRK1 también es capaz de interaccionar tanto con el mutante Ran(T24N), con una conformación inactiva que mimetiza el estado de unión a RanGDP, y con el mutante Ran(L43E), mimético de la conformación RanGTP. Sin embargo, el efecto que producen sobre VRK1 es distinto. Ran(T24N) y Ran sin nucleótido, al interaccionar con VRK1, producen una inhibición de la actividad de VRK1, efecto observado sobre su autofosforilación y sobre la fosforilación de su sustrato histona H3.

Sin embargo, la interacción de Ran(L43E) con VRK1 no produce esta inhibición de la actividad de VRK1. El hecho de que Ran(T24N) y Ran produzcan *in vitro* la inhibición de la actividad de VRK1, hace pensar que *in vivo*, RanGDP debe producir ese efecto sobre VRK1, mientras que RanGTP no, ya que el mutante Ran(L43E) no inhibe a VRK1 *in vitro*. Por lo tanto, Ran, dependiendo de su conformación, es capaz de regular la actividad quinasa de VRK1.

La regulación de la actividad de quinasas por *small* GTPasas es un mecanismo bien conocido, por ejemplo, la activación de la MAP quinasa Raf por Ras (Dhillon et al., 2007; McKay and Morrison, 2007), o las quinasas PAK por GTPasas Rho (Eswaran et al., 2008). En los dos casos, la GTPasa se une al dominio regulador de la quinasa, produciendo un cambio conformacional en éste, de manera que el dominio quinasa se libera de la autoinhibición que ejerce el dominio regulatorio, permitiendo que se den lugar fosforilaciones en el dominio quinasa, con su consecuente activación. Las interacciones quinasa-GTPasa funcionan como interruptores de vías de señalización implicadas en distintos procesos biológicos que deben ser coordinados. En el caso de la GTPasa Ran, se ha descrito la modulación de la actividad de algunas quinasas mitóticas por Ran, como cdc2, Aurora A o CDK11, pero mediante un efecto indirecto. En ningún caso se produce por la interacción directa de Ran con la quinasa, y no hay descrita ninguna interacción de este tipo para Ran. En el caso de Aurora A y CDK11, el efecto indirecto implica la liberación de CDK11 y de TPX2 (el cual interacciona con Aurora A y la activa) de su interacción inhibitoria con importina- α/β por RanGTP (Tsai et al., 2003; Yokoyama et al., 2008). En el caso de cdc2, el mecanismo de modulación de su actividad no ha sido definido (Clarke et al., 1995; Kornbluth et al., 1994). Sin embargo, se conocen multitud de ejemplos en los cuales, la unión de Ran a proteínas reguladoras o a efectores, produce un cambio conformacional en la proteína, desencadenando un efecto concreto. Por ejemplo, la unión de RanGTP a importina- β hace que deje de exponer su sitio de interacción a importina- α (Lee et al., 2005), y como consecuencia, en mitosis, se liberen y se activen sustratos unidos a importina- α necesarios para la progresión de la mitosis; la unión de RanGDP a RCC1 aumenta la afinidad de éste por la cromatina (Hutchins et al., 2004; Zhang et al., 2002) al producirle un cambio conformacional en su cola amino terminal (Hao and Macara, 2008).

Por lo tanto, la identificación de la interacción Ran-VRK1, y el efecto que produce sobre la actividad quinasa de VRK1, constituye el primer ejemplo de cómo Ran puede modular la actividad de una quinasa por una interacción directa, lo que debe suponer algún efecto “interruptor” sobre las vías de señalización en las que está implicada VRK1, de una manera que recuerda a la regulación de otras quinasas por *small* GTPasas. Constituye así mismo, la identificación del primer regulador de la actividad quinasa de VRK1. La proteína VRK1 es una proteína muy estable, de larga vida media (Valbuena et al., 2008b), que se expresa con niveles relativamente altos en células que están continuamente dividiéndose, y en continuo crecimiento (Santos et al., 2006). Sin embargo, su actividad no tiene por qué ser siempre necesaria, por lo

que VRK1 es susceptible de estar regulada tanto espacial como temporalmente. La inhibición de la actividad de VRK1 por la forma inactiva de Ran sugiere que la actividad quinasa de VRK1 pueda estar regulada en el tiempo y en el espacio, un papel establecido para Ran en el control de distintos procesos mitóticos, en los que distintos factores implicados en la progresión de la mitosis son regulados por Ran de una manera espacio-temporal dependiente (Clarke and Zhang, 2008).

La falta de información acerca de la estructura de VRK1 hace difícil desentrañar cuál puede ser el mecanismo de esta inhibición de la actividad de VRK1 por Ran. Para intentar aproximarnos, se ha determinado la zona de VRK1 con la que interacciona Ran.

La interacción de Ran wt (unida mayoritariamente a GDP) con VRK1 se produce, al menos, con la región carboxilo terminal de VRK1, región de la cual se predice una estructura flexible, y que se ha postulado que pueda tener un papel en la regulación de la actividad quinasa (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Dentro de la región carboxilo terminal se ha delimitado una zona candidata a participar en la interacción con Ran, y la sustitución en esa zona de aminoácidos conservados afecta a la afinidad de la interacción de VRK1 con Ran, lo que apoya que la región carboxilo terminal está implicada en la interacción con RanGDP.

No sabemos cuál es el mecanismo por el cual Ran wt y Ran(T24N) pueden inducir la reducción en la actividad de VRK1 al interactuar con ésta, mientras que Ran(L43E) no es capaz de inducir este efecto. En principio, Ran(L43E) también interacciona con la región carboxilo terminal de VRK1, al igual que RanGDP. Podemos hacer una aproximación de cómo es la estructura del dominio catalítico de VRK1 a partir de las estructuras existentes de los dominios catalíticos de VRK2 y VRK3. Estas estructuras sugieren que las quinasas pueden tener una conformación constitutivamente activa (Scheeff et al., 2009), por lo que la región carboxilo terminal de VRK2 (y por analogía, de VRK1), puede tener un papel importante en la modulación de la actividad del dominio catalítico, de forma que podría ejercer una función autoinhibitoria de la actividad. A su vez, la región carboxilo terminal podría ser regulada por fosforilación o por la interacción con otras proteínas. En las quinasas CK1 δ y ϵ , la autofosforilación del dominio carboxilo terminal (dominio regulador) conduce a la inhibición de la actividad de la quinasa (Knippschild et al., 2005). Una posibilidad es que la GTPasa Ran podría inducir un cambio en la conformación de la región carboxilo de VRK1 al interactuar con ella, de manera que éste produjera un efecto de autoinhibición, y luego mantener estable esa conformación por interacción. Ran(L43E), aunque también interacciona con la región carboxilo, puede ser que no produzca ese cambio en la conformación, o no pueda mantener estable una conformación inactiva porque tenga un mayor *ratio* de disociación. Otra posibilidad es que la interacción de Ran inactiva impida la fosforilación de la región carboxilo terminal, o la interacción de ésta con otras proteínas, necesarias para la actividad de la quinasa. Ran podría estar actuando con VRK1 como el dímero 14-3-3 con Raf, el cual interacciona con Raf,

impidiendo la unión de Ras, y favoreciendo el estado de autoinhibición que ejerce el dominio regulatorio sobre el dominio catalítico de Raf (Dhillon and Kolch, 2002), efecto revertido por la desfosforilación de los residuos de Raf a los que se une 14-3-3 (Ory et al., 2003). Al igual que 14-3-3, Ran podría unirse a VRK1 estabilizando una forma inactiva de la quinasa. En este caso, sería la conversión de RanGDP a RanGTP lo que liberaría esta inhibición, haciendo a la quinasa activa.

La localización subcelular de los reguladores de Ran, que generan una distribución asimétrica de RanGDP/RanGTP en la célula (Kalab et al., 2006; Kalab et al., 2002), hace pensar que deben existir zonas en la célula con distinta actividad de VRK1. Los distintos complejos de proteínas que implican una regulación de la actividad de VRK1 están resumidos en la figura 55. En las zonas en las que VRK1 interacciona con RanGDP, la actividad debe estar inhibida. Sin embargo, cuando VRK1 interacciona con RanGTP, o cuando está libre, la quinasa debe ser activa. Las diferentes proporciones de estos complejos en las distintas localizaciones subcelulares determinarán el efecto local de VRK1.

Figura 55. Modelo de los distintos complejos que afectan a la actividad quinasa de VRK1. La actividad quinasa de VRK1 se modula dependiendo de los componentes del complejo de proteínas en el que se encuentre. La actividad de VRK1 es inhibida cuando se une a RanGDP. Su actividad se recupera si está libre, o unida a Ran en su conformación activa (RanGTP), una vez activada por RCC1. En mitosis, la membrana nuclear (línea punteada) desaparece. Act, activa; Inact., inactiva; T3-P, treonina 3 fosforilada; S10-P, serina 10 fosforilada.

Así, en el citoplasma durante interfase, VRK1 debe interaccionar principalmente con RanGDP, por lo que la actividad de VRK1 debe estar inhibida. Por otro lado, es posible que la inhibición de la actividad de VRK1 por RanGDP sea necesaria para su importación al núcleo. En el citoplasma, la interacción entre VRK2A y Ran tiene mayor probabilidad de tener un papel más relevante, pero hace falta caracterizar más en profundidad la interacción entre las dos proteínas *in vivo*.

Aunque existe una distribución homogénea de VRK1 en el núcleo, esto no implica una distribución similar de su actividad quinasa. En el núcleo en interfase, RCC1 convierte RanGDP

en RanGTP. Este intercambio está asociado a la interacción dinámica de RCC1 con la cromatina, generando complejos intermedios Ran-RCC1 sin nucleótido (Li et al., 2003; Moore et al., 2002). Como hemos visto, VRK1 puede interaccionar establemente con este complejo, en el cual su actividad estaría inhibida. En mitosis, la unión dinámica de RCC1 a la cromatina genera la producción de RanGTP en torno a los cromosomas, de manera que RanGTP debe difundir una distancia corta hasta ser reconvertida a RanGDP bajo la influencia de RanGAP1 (Kalab et al., 2006; Li and Zheng, 2004b). Por lo tanto se pueden generar áreas con distinta actividad quinasa de VRK1, lo que puede ser importante para su papel en mitosis, en relación a la fosforilación de histona H3 y BAF, cuya fosforilación debe estar regulada espacial y temporalmente (Crosio et al., 2002; Nichols et al., 2006). Además del gradiente de RanGTP en torno a los cromosomas mitóticos, se ha detectado la localización de RanGTP en los propios cromosomas, los microtúbulos del huso mitótico, y los centrosomas (Di Fiore et al., 2004; Keryer et al., 2003; Moore et al., 2002), localizaciones donde VRK1 debe ser activa. La fosforilación de histona H3 en treonina 3 ha sido descrita en la región central de los cromosomas en mitosis, y la fosforilación en serina 10, en la periferia de los cromosomas en profase y metafase, y asociada a los microtúbulos del huso en anafase (Li et al., 2005; Polioudaki et al., 2004), aunque la localización exacta donde VRK1 fosforila a histona H3 aún no ha sido determinada.

Por otro lado, RanGAP1 y RanBP2 se localizan específicamente en los cinetocoros en la mitosis (Joseph et al., 2002), lo que sugiere que debe haber un ciclo localizado de conversión GTP-GDP (Clarke and Zhang, 2008) en esos puntos. RanGTP se localiza en torno a los cromosomas debido a la distribución de RCC1 sobre los cromosomas mitóticos (Moore et al., 2002), pero no específicamente en los cinetocoros (Kalab et al., 2006; Kalab et al., 2002). No se conoce cuál es la localización específica de VRK1 en las distintas fases de la mitosis, únicamente se ha detectado una colocación parcial con la cromatina (Kang et al., 2007). Si existe un ciclo localizado de conversión de RanGTP en RanGDP cerca de los cinetocoros, podría existir una variación de la actividad de VRK1 en esas regiones de la cromatina.

Las importinas CAS e importina- β han sido localizadas en sitios del huso mitótico (Ciciarello et al., 2004; Scherf et al., 1996), lo que hace pensar que puedan contribuir a la localización de dianas en esos sitios específicos, que serían liberados por RanGTP (Clarke and Zhang, 2008). Pero además, la interacción de las importinas con los sustratos es regulada por modificaciones postraduccionales del sustrato, a menudo por fosforilación, como ocurre con RCC1 (Clarke and Zhang, 2008; Hutchins et al., 2004; Li and Zheng, 2004a). Por lo tanto, la localización de actividad quinasa en sitios concretos, como el huso mitótico, puede funcionar para regular la interacción de importinas con los sustratos, como ocurre con RCC1 (Clarke and Zhang, 2008). Este es un mecanismo en el que podría estar implicado VRK1. VRK1 presenta una señal de localización nuclear, así que en mitosis podría formar un complejo inhibitorio con

importina- β , del cual sería liberado por RanGTP, que a su vez al interaccionar con VRK1 mantendría su conformación activa. Por tanto, podría servir para regular la interacción de otros sustratos con las importinas, en colaboración con RanGTP.

La regulación de la actividad de VRK1 por Ran, que implica la generación de una distribución asimétrica de la actividad de VRK1 en la célula, puede tener también un papel importante en la regulación por fosforilación de los factores de transcripción p53, ATF2, c-Jun o CREB, y por tanto, en la regulación de la transcripción génica.

La regulación de la actividad de VRK1 parece ser el único efecto de la interacción de Ran con VRK1. VRK1 es capaz de interaccionar simultáneamente con RCC1 y Ran, sin afectar a la interacción de Ran con RCC1. Trasladado a un contexto celular, si VRK1 regulara la interacción de Ran con RCC1, podría a su vez regular la interacción de RCC1 con la cromatina, y por tanto afectar a la producción de RanGTP en la vecindad de los cromosomas (Chen et al., 2007; Li et al., 2003; Moore et al., 2002). Sin embargo, no parece que VRK1 pueda afectar a este mecanismo. Esta posibilidad es menos factible si tenemos en cuenta que VRK1 no fosforila a RCC1, mecanismo que contribuye a favorecer la interacción de RCC1 con la cromatina (Hutchins et al., 2004; Li and Zheng, 2004a). Además, VRK1 por sí sola no estimula el intercambio de nucleótido en Ran, y tampoco coopera con RCC1 en el intercambio de GDP por GTP, ni lo dificulta. Por otro lado, la interacción de RCC1 con Ran, favorece la unión de VRK1 a Ran, efecto similar al que produce la interacción de RanBP1 con RanGTP, al favorecer la unión de RanGAP1 a Ran (Lounsbury and Macara, 1997). Este efecto, en el caso de VRK1-Ran-RCC1, al menos no se traduce en una mayor disociación de GDP, o incorporación de GTP, catalizado por RCC1. VRK1 no parece alterar el intercambio de nucleótido en Ran, por tanto no afecta al estado de unión a nucleótido de Ran. Sin embargo, aún no se ha determinado si la interacción de VRK1 con RanGTP podría alterar su interacción con importinas o exportinas, por tanto regulando de alguna manera el mecanismo de transporte núcleo-citoplasma durante interfase, y la activación por RanGTP de factores implicados en la regulación de diversos procesos mitóticos.

3. IMPLICACIÓN DE VRK1 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN

3.1. Regulación de la actividad de VRK1 en respuesta a distintos tipos de estímulos

Las primeras funciones descritas e identificadas para VRK1 fueron la regulación de la transcripción génica a través de la fosforilación y activación de diferentes factores de transcripción (c-Jun, ATF2 y p53) que responden a distintos estímulos (Sevilla et al., 2004a; Sevilla et al., 2004b; Vega et al., 2004). De esta manera, VRK1 juega un papel en la modulación

de la respuesta a distintos tipos de estrés, ya que coopera con otras quinasas, como JNK, en la regulación de estos factores de transcripción. Sin embargo, no se conoce el estímulo o estímulos concretos a los que puede responder VRK1. En este trabajo, hemos demostrado que VRK1 se activa de manera rápida en respuesta a distintos tipos de estímulos, como son agentes externos que producen daño en el ADN, y factores de crecimiento presentes en el suero.

Además de estas respuestas rápidas, hemos confirmado que la regulación de la actividad quinasa de VRK1 es paralela a la regulación de la expresión del ARN mensajero de VRK1 en respuesta a la entrada y salida del ciclo de división celular. Es decir, en células que no están dividiéndose, se produce una regulación negativa del gen de VRK1, reduciéndose los niveles de expresión del ARN mensajero de VRK1 (Valbuena et al., 2008b); en este trabajo hemos demostrado que bajo las mismas condiciones en las que se produce esta regulación negativa del ARN mensajero, se produce una bajada en la actividad quinasa de VRK1. Por tanto, en ausencia de división celular, tanto la expresión del gen de VRK1 (Valbuena et al., 2008b), como la actividad de la proteína son inactivados. La proteína VRK1 tiene una larga vida media, y tras la reducción de la expresión del gen por parada en la división celular, quedan unos niveles notables de proteína hasta que ésta es degradada por completo (Valbuena et al., 2008b). Nuestros resultados indican que esta proteína remanente tiene una reducida actividad quinasa. Además, las células paradas que reanudan el ciclo de división, activan la expresión *de novo* de VRK1 (Valbuena et al., 2008b), y la proteína recupera su actividad (este trabajo). Estos resultados indican que la actividad de VRK1 es necesaria para la división celular, y por tanto apoyan la teoría de la participación de VRK1 en el control de la progresión del ciclo celular y su papel en proliferación (Kang et al., 2008; Nezu et al., 1997; Santos et al., 2006; Valbuena et al., 2008b; Vega et al., 2004; Wiebe et al., 2009).

Tanto en el caso de la regulación de la expresión del gen de VRK1, como en la regulación de la actividad de la proteína en respuesta a la entrada o salida del ciclo de división celular, desconocemos cuáles son los mecanismos que producen estas regulaciones. En el caso de la actividad de VRK1, parece que la responsable de su regulación es alguna fosforilación en la quinasa. Esta afirmación viene demostrada por el hecho de que el tratamiento de VRK1 con fosfatasa alcalina, en condiciones de crecimiento normales en las que VRK1 es activa, reducen drásticamente la actividad de la quinasa. Por tanto, las fosforilaciones en la quinasa son necesarias para su actividad en condiciones normales de crecimiento. De esta manera, cuando las células están dividiéndose normalmente, debe producirse alguna fosforilación en VRK1 que la hace activa, bien causada por otra quinasa, o bien una autofosforilación. No tenemos evidencias acerca de si VRK1 se encuentra autofosforilada *in vivo*, pero VRK1 presenta una fuerte autofosforilación *in vitro* en múltiples residuos, uno de los cuales es la treonina 355 (Barcia et al., 2002). La región candidata a sufrir modificaciones postraduccionales es la región carboxilo terminal (Lopez-Borges and Lazo, 2000); sin embargo, existen dos treoninas

conservadas dentro del segmento de activación de VRK1 (treonina 224 y 228) que las hacen candidatas idóneas a ser sitios de fosforilación que regulen la actividad de VRK1 (ver figura 4, página 24).

Por otro lado, también hemos observado que VRK1 responde de manera rápida a la presencia o ausencia de suero, de forma que su actividad se reduce tras pocas horas de la retirada de suero, y se recupera tras la estimulación de tres horas con suero. Es decir, parece que es necesaria una activación rápida de VRK1 en respuesta a factores de crecimiento presentes en el suero. Las principales vías de señalización que responden a estímulos de factores de crecimiento son las vías de MAP quinasas, que principalmente van a activar una respuesta transcripcional para regular el crecimiento, diferenciación o desarrollo (Chang and Karin, 2001). Existen ejemplos de quinasas nucleares que son activadas por MAP quinasas en respuesta a estímulos mitogénicos, como MSK1 y MSK2 (*Mitogen- and Stress-activated Kinase*), que son activadas por p38 y ERK, y regulan la transcripción de genes de respuesta temprana, como *fos*, a través de la fosforilación de CREB, ATF1 o histona H3 en serina 10 (Arthur, 2008; Darragh et al., 2005; McCoy et al., 2005). Por tanto, es factible pensar que VRK1, en respuesta a factores de crecimiento, pueda ser diana de MAP quinasas, y regular la transcripción génica. Habría que demostrar si la fosforilación de alguno de sus sustratos conocidos, como c-Jun, ATF2 o CREB, e incluso la fosforilación de la histona H3, puede responder a este tipo de estímulo.

Por último, nuestros resultados indican que VRK1 también se activa en respuesta a distintas clases de daño en el ADN, causado por agentes externos como la radiación ionizante y ultravioleta, agentes radiomiméticos (bleomicina) y agentes intercalantes en el ADN (doxorubicina), o el inhibidor de la topoisomerasa II, etopósido. La activación de VRK1 en respuesta al daño en el ADN es más evidente en ausencia de suero, el cual de por sí produce una activación de VRK1. Pensamos que tanto los factores de crecimiento presentes en el suero, como la generación de algún tipo de daño en el ADN deben provocar distintas fosforilaciones que activen (o liberen) el dominio catalítico. El tratamiento de VRK1 con fosfatasa alcalina anula su activación tanto por suero como por radiación ultravioleta. Además, también hemos observado un cambio en la capacidad de reconocimiento de VRK1 por el anticuerpo 1B5, cuyo epítipo está situado en la región carboxilo terminal de la proteína (Valbuena et al., 2007a), cuando las células son irradiadas con radiación ionizante en presencia de suero. La producción de roturas de doble cadena en el ADN debe producir una modificación postraduccional adicional en la región carboxilo terminal de VRK1, que haga que cambie su conformación, de forma que el anticuerpo 1B5 reconoce mejor el epítipo. Además, hemos observado que este hipotético cambio conformacional es paralelo a la activación de la quinasa en respuesta a radiación ionizante. Hace falta comprobar si otros tipos de daño en el ADN, como el provocado por radiación ultravioleta, que activa la respuesta dependiente de ATR (Cimprich and Cortez,

2008), produce este mismo efecto, lo que significaría que se produce una modificación postraducciona similar en respuesta a distintos tipos de daño.

Además, no hay que olvidar que de manera adicional a la regulación de la actividad de VRK1 por suero y daño génico, la interacción local de VRK1 con Ran puede regular a su vez la actividad de VRK1, por tanto aportando un grado más de complejidad en la regulación de su actividad.

El hecho de que p53 fuera uno de los sustratos conocidos de VRK1 (Valbuena et al., 2006; Vega et al., 2004), el cual es estabilizado y activado en respuesta al daño en el ADN por diversas quinasas, como ATM, ATR, CK2, Chk1 o Chk2 (Toledo and Wahl, 2006), nos hizo pensar que VRK1 podría verse activada en respuesta a este tipo de estímulos. La confirmación de esta hipótesis nos indujo a pensar que VRK1 podría tener un papel adicional en la respuesta al daño en el ADN, además de una posible contribución a la fosforilación de p53 en respuesta a este tipo de estímulo.

3.2. VRK1 y su papel en la regulación de la respuesta al daño en el ADN

Como ya hemos comentado, las fosforilaciones de proteínas juegan un papel importante en la regulación de la respuesta al daño en el ADN, controlando las interacciones proteína-proteína y la activación de distintos elementos de la respuesta (Huen and Chen, 2008). Las quinasas centrales en la respuesta al daño en el ADN son las quinasas PIKK, ATM y ATR, capaces de fosforilar residuos de serina/treonina seguidos de glutamina (Shiloh, 2006). Un gran número de proteínas son reguladas por estas modificaciones (Matsuoka et al., 2007); sin embargo, otro tipo de quinasas, con secuencias consenso de fosforilación diferentes, también contribuyen a este entramado de fosforilaciones, como CK2, cuya fosforilación de MDC1 en sitios serina-aspartato-treonina regula su interacción con NBS1 (Chapman and Jackson, 2008; Melander et al., 2008). También se han encontrado cuatro sitios fosforilados en 53BP1 que son secuencias consenso de MAP quinasas y quinasas dependientes de ciclina (CDK) (serina/treonina seguidas de prolina) (Jowsey et al., 2007). Por lo tanto, es factible que otras quinasas, aparte de ATM, fosforilen a 53BP1, y contribuyan a mantener a 53BP1 hiperfosforilada tras el daño en el ADN (FitzGerald et al., 2009).

En este trabajo, hemos demostrado que 53BP1 es una nueva diana de fosforilación de VRK1. Los resultados indican que el patrón de fosforilación de 53BP1 por VRK1 es similar al de ATM (Rappold et al., 2001; Ward et al., 2003). Además, hemos comprobado que al menos uno de los residuos fosforilados por ATM (Ward et al., 2003) también es fosforilado por VRK1 (serina 25 o 29). Este dato, en conjunto con el hecho de que VRK1 se activa de manera rápida en respuesta a roturas de doble cadena inducidas por radiación ionizante, respuesta en la que

está implicada 53BP1 (FitzGerald et al., 2009), indica que VRK1 podría tener un papel similar al de ATM en la respuesta al daño, ya que ésta también se activa de forma rápida en respuesta a roturas de doble cadena, fosforilando sustratos entre los que se encuentra 53BP1 (Lavin, 2008).

En respuesta a radiación ionizante, 53BP1 es rápidamente reclutado a los focos de respuesta al daño (Rappold et al., 2001; Schultz et al., 2000). Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de VRK1 con ARN de interferencia específico impide un correcto reclutamiento de 53BP1 a los focos de respuesta a radiación ionizante. No sólo se observa un número menor de focos de 53BP1, sino que además, en los focos que sí llegan a formarse, hay una menor cantidad de 53BP1, ya que el tamaño de los focos de 53BP1 en células con bajos niveles de VRK1 es menor que en células con niveles normales de VRK1. Cada foco de respuesta al daño representa una única lesión en el ADN, en el cual, en condiciones normales, se reclutan múltiples copias de 53BP1 (Mochan et al., 2004). Es de gran importancia resaltar que este resultado es similar al que se obtiene al analizar la formación de focos de 53BP1 en ausencia de proteínas como ATM (DiTullio et al., 2002; Rappold et al., 2001), MDC1 (Bekker-Jensen et al., 2005; Eliezer et al., 2009) o H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Ward et al., 2003), las cuales está establecido que regulan el reclutamiento de 53BP1. El reclutamiento de 53BP1 a los sitios de rotura de doble cadena en el ADN depende de varios factores. 53BP1 interacciona en primera instancia con la cromatina dañada a través de su interacción con las lisinas metiladas H3 y H4 (Huyen et al., 2004). Después, su interacción con H2AX fosforilada por ATM en serina 139 (γ H2AX) contribuye a su mantenimiento en los focos (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Ward et al., 2003). Además, MDC1, junto con γ H2AX, también regula de manera indirecta el reclutamiento de 53BP1. MDC1 interacciona con γ H2AX y recluta a la ubiquitina ligasa RNF8; la ubiquitinación de H2AX por RNF8 contribuye al mantenimiento de 53BP1 en los focos, por un mecanismo todavía no establecido (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). Tanto la falta de ATM, como la de H2AX, así como de MDC1, por separado, comprometen el reclutamiento de 53BP1 a los focos. Por tanto, el hecho de que niveles reducidos de VRK1 también comprometa la formación de focos de 53BP1, indica que VRK1 debe contribuir, de manera directa o indirecta, al reclutamiento de 53BP1 a los puntos del ADN dañado, y cooperar con el resto de proteínas implicadas en el reclutamiento y mantenimiento de 53BP1 en los focos de respuesta al daño.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, es difícil establecer cuál puede ser el mecanismo por el cual VRK1 contribuye a la regulación de la localización de 53BP1 a los focos de respuesta al daño. Hemos observado que VRK1, en respuesta a radiación ionizante, no se localiza exclusivamente en los focos de respuesta al daño, de manera que no se comporta como MDC1 o γ H2AX, las cuales una vez producido el daño, presentan una localización exclusiva en los focos (Bekker-Jensen et al., 2006). Sin embargo, sí hemos observado que la radiación ionizante induce una interacción entre VRK1 y 53BP1, lo que sugiere que al menos una

subpoblación de VRK1 está formando parte de los focos, e interacciona con ellos de manera estable, un comportamiento que sí es semejante al de ATM (Bakkenist and Kastan, 2003; DiTullio et al., 2002). La interacción de VRK1 con 53BP1 se produce por una zona implicada en la interacción de 53BP1 con γ H2AX y su reclutamiento a los sitios del ADN dañado (Mochan et al., 2004; Ward et al., 2003). Debido a la importancia de la fosforilación de H2AX en el mantenimiento de 53BP1 en los focos, y dado el paralelismo en funciones encontrado hasta el momento entre VRK1 y ATM, decidimos comprobar si H2AX era también diana de fosforilación de VRK1. Encontramos que, efectivamente, H2AX es fosforilada *in vitro* por VRK1, y que los niveles de fosforilación en la serina 139 se ven comprometidos al disminuir los niveles de proteína VRK1, indicando la posibilidad de que *in vivo*, VRK1 fosfore a H2AX en ese residuo. Por tanto, una posibilidad sería que VRK1, a través de su interacción con 53BP1 por una zona implicada en el reclutamiento de 53BP1 a los focos, y a través de su participación en la fosforilación de H2AX, puede contribuir a potenciar la interacción de 53BP1 con la cromatina dañada, y por tanto, al reclutamiento y/o mantenimiento de 53BP1 en los focos.

Si bien hemos detectado que, en respuesta a radiación ionizante, VRK1 aumenta su actividad y es capaz de fosforilar a 53BP1 en su parte amino terminal, no podemos afirmar si esta fosforilación es determinante para el reclutamiento de 53BP1 a los focos. Hemos confirmado que VRK1 fosforila a 53BP1 en la serina 25 o 29, residuos también fosforilados por ATM (Jowsey et al., 2007; Ward et al., 2003). La función de las numerosas fosforilaciones detectadas en 53BP1 en respuesta al daño no está bien definida, aunque recientemente se ha descrito que la fosforilación en serina 25 por ATM compromete la activación de Chk2 (Munoz et al., 2007); por tanto, esta fosforilación podría estar implicada en la regulación del reclutamiento de 53BP1 a los focos, factor necesario para una correcta activación de Chk2 (Wang et al., 2002). Sería importante, por tanto, realizar más estudios para analizar la contribución de VRK1 a la fosforilación de la serina 25 de 53BP1, y determinar de manera más precisa cuáles son todos los residuos fosforilados por VRK1, y si pueden afectar a la localización de 53BP1 en los focos de respuesta a daño.

Una de las consecuencias de la falta de 53BP1, o de la desregulación de su localización en respuesta al daño, es que no se llega a producir una activación completa tanto de Chk2 (DiTullio et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002; Wang et al., 2002; Watrin and Peters, 2009) como de ATM (Mochan et al., 2003; Wilson and Stern, 2008). Se ha propuesto que 53BP1 puede funcionar como proteína de anclaje para que se produzca la fosforilación de Chk2 por ATM en los puntos de daño en el ADN; la interacción entre 53BP1 y Chk2 en respuesta al daño es transitoria, pero sirve para facilitar la activación de Chk2 por ATM (Wang et al., 2002). En el caso de ATM, no se ha establecido por qué mecanismo concreto 53BP1 es necesario para la activación de ATM (FitzGerald et al., 2009). Nuestros resultados indican que niveles reducidos de proteína VRK1 provocan una menor activación de Chk2 y ATM en respuesta a

radiación ionizante. Como ninguna de estas proteínas ha resultado ser diana directa de fosforilación de VRK1, todo apunta a que VRK1, a través de la regulación de la localización de 53BP1 en los focos, contribuye a una correcta activación de ATM y Chk2, y por tanto a la respuesta al daño en el ADN. Estos resultados, en conjunto, indican que VRK1 juega un papel importante en la respuesta temprana a roturas de doble cadena en el ADN, ya que contribuye a que las quinasas ATM y Chk2, encargadas de la transducción de la señal y la activación de efectores de la respuesta, sean correctamente activadas.

Muchos de los resultados obtenidos para VRK1 implican funciones de VRK1 redundantes con funciones establecidas para ATM. Sin embargo, no es el único caso de una redundancia funcional entre ATM y otra quinasa. De hecho, ATM presenta una redundancia en funciones con ATR en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN (Cimprich and Cortez, 2008; Shiloh, 2006), en la que la función de ATR sería la de cooperar con ATM en el mantenimiento de la fosforilación de los distintos sustratos que comparten. ATM activa a ATR a través de la transformación, mediada por Mre11, de las roturas de doble cadena en roturas de cadena simple, que activan a ATR (Jazayeri et al., 2006). Sin embargo, el caso de VRK1 es diferente al de ATR, ya que hemos comprobado que VRK1 es capaz de activarse en respuesta a radiación ionizante tanto en presencia como en ausencia de ATM. Además, VRK1 no es diana directa de fosforilación de ATM. Por tanto, estos resultados apuntan a que la activación de VRK1 en respuesta a roturas de doble cadena en el ADN es independiente de ATM, y consecuentemente, debe conformar una vía paralela a ATM. En conclusión, VRK1 representa una vía alternativa a ATM, de forma que podría cooperar con ATM en la regulación de la respuesta al daño en el ADN.

Por último, también hemos observado que VRK1 es capaz de fosforilar a p53 en treonina 18 tras la estimulación de células con radiación ionizante. VRK1 es necesaria para la proliferación celular normal, ya que su falta produce un crecimiento más lento de lo normal y finalmente parada del ciclo celular (Valbuena et al., 2008b; Vega et al., 2004). Además, VRK1 tiene un papel en la regulación de p53, que hasta ahora se había enmarcado dentro de un papel en la regulación de la proliferación normal (Vega et al., 2004). Sin embargo, la caracterización de la estimulación de la actividad de VRK1 en respuesta a estrés genotóxico, y el hecho de que VRK1 fosforile específicamente a p53 en treonina 18 tras la irradiación con radiación ionizante, propone un papel adicional de VRK1 en el control de la proliferación, esto es, la protección de la célula frente al daño en el genoma a través de la activación de p53, además de su contribución en la activación de Chk2 y ATM en respuesta al daño en el ADN.

CONCLUSIONES

1. El uso de técnicas proteómicas ha llevado a la identificación de la interacción de la GTPasa Ran con la quinasa humana VRK1.
2. VRK1 interacciona establemente con Ran y esta interacción no se ve afectada por el nucleótido unido a Ran, GDP o GTP. Es decir, VRK1 interacciona tanto con la conformación activa de Ran como con la inactiva.
3. Ran, dependiendo de su conformación, es capaz de regular la actividad quinasa de VRK1. La interacción de la forma inactiva RanGDP con VRK1 produce una inhibición de la actividad de VRK1. Sin embargo, esta inhibición no se produce cuando VRK1 interacciona con la forma activa RanGTP.
4. La regulación de la actividad de VRK1 por Ran implica que puede generarse una distribución asimétrica de la actividad quinasa de VRK1 en la célula.
5. La producción de daño en el ADN de distinta naturaleza estimula notablemente la actividad quinasa de VRK1.
6. 53BP1 es una nueva diana de fosforilación de VRK1. El estrés genotóxico causado por radiación ionizante induce la interacción de VRK1 con 53BP1, y por tanto, la localización parcial de VRK1 en los focos de respuesta al daño en los que se localiza 53BP1.
7. VRK1 es necesaria para un reclutamiento eficiente de 53BP1 en los focos de respuesta al daño, y para una completa activación de ATM y Chk2.
8. La activación de VRK1 en respuesta a roturas de doble cadena en el ADN es independiente de ATM, por lo que VRK1 podría constituir una vía paralela a ATM en la respuesta al daño en el ADN.

Material y métodos

1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

El método utilizado con mayor frecuencia para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala, a partir de *E. coli*, fue el método de la lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979) (Birnboim and Doly, 1979). Para obtener un mayor grado de pureza, el ADN obtenido por este método se purificó mediante lavados con fenol/cloroformo seguido de cloroformo y precipitación con etanol y sales a baja temperatura. La obtención de ADN plasmídico de alta calidad a pequeña escala se realizó utilizando el sistema comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche). Para la obtención de ADN a gran escala se usó el sistema comercial “JETStar endotoxin-free maxiprep kit” (GENOMED GmbH). En todos los casos se siguieron las especificaciones del fabricante. La concentración de ADN plasmídico se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro “U-2001 UV/Visible” (Hitachi) y considerando la relación de absorbancia 260/280 nm o bien comparando la intensidad de las bandas de ADN frente a una muestra control de concentración conocida en un gel de agarosa.

1.2. Electroforesis de ADN

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa preparados a la concentración adecuada al tamaño de los fragmentos a separar (entre 0,7 y 1,5% m/v de agarosa), a voltaje constante (60-100 V) en tampón de carrera TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Como marcador de tamaño se utilizó bien “ADN Ladder 1 Kb” (Promega) o ADN de fago λ cortado con la endonucleasa Hind III (Invitrogen). Para visualizar la migración del ADN en el gel utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xilenocianol, que en un gel de agarosa al 0,8% migra aproximadamente con los fragmentos de 5 Kb, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0,5 Kb. Al tampón de carrera se le añadió bromuro de etidio (0,5 μ g/mL), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta, para poder visualizar así los fragmentos de ADN. Las imágenes se captaron con una cámara digital acoplada al analizador de imagen “Gel Doc TM 2000” (Bio-Rad) y se imprimieron en papel térmico.

1.3. Generación de vectores de ADN recombinantes

Las construcciones de ADN usadas en este estudio están detalladas en la tabla 10. Las construcciones diseñadas en el laboratorio se generaron insertando una secuencia de ADN codificante amplificada por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en el correspondiente vector mediante reacciones de digestión de fragmentos con endonucleasas de restricción (Promega) y posterior ligación con la enzima “T4 ADN-Ligasa” (Promega) según protocolo

estándar (Sambrook and Russell, 2001). En algunos casos se utilizaron plásmidos ya existentes en el laboratorio con la secuencia de ADN codificante de interés insertada para extraerla con reacciones de digestión con enzimas de restricción e insertarla en el plásmido de interés con reacciones de ligación. Las construcciones así obtenidas en cualquiera de los dos casos se transformaron en cepas de *E. coli* competentes DH5 α o BL21DE3. Para seleccionar las colonias transformadas se utilizó medio de cultivo LB con el antibiótico al que confiere resistencia cada vector. Se comprobó la presencia de la construcción correcta mediante análisis de restricción y posterior electroforesis y secuenciación. Las colonias positivas se guardaron en medio de cultivo con antibiótico y glicerol al 30% (v/v) como crioprotector a -80°C.

1.4. Transformación de plásmidos en bacterias *E. coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas para transformar plásmidos fueron DH5 α o BL21DE3. La cepa DH5 α se utilizó para la conservación de plásmidos o purificación de ADN plasmídico. La cepa BL21DE3 se usó para la expresión de proteínas recombinantes, puesto que carece de dos proteasas, lo que permite obtener mayor cantidad de proteína recombinante intacta. Las células competentes se incubaron durante 30 minutos a 4°C con 100 ng de ADN plasmídico en solución, y se sometieron a un choque térmico de 30 segundos a 42°C. Se volvieron a colocar en hielo y se añadió 1 mL de medio de cultivo LB para incubarlas a 37°C en agitación durante al menos 1 hora. Finalmente las células se sembraron en placas Petri con LB-agar y el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido para seleccionar las bacterias transformadas. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C hasta obtener colonias de cultivo puro con el plásmido transformado.

1.5. Secuenciación de ADN

Los vectores de ADN recombinantes generados para este trabajo se comprobaron por secuenciación. La secuenciación del ADN plasmídico se llevó a cabo de forma automática utilizando un secuenciador “ABI prism 377” (Perkin Elmer). La reacción de extensión del ADN a secuenciar tiene lugar mediante un marcaje de fluorescencia incorporada a los diferentes deoxinucleótidos. Cuatro colores diferentes de fluorescencia identificaron a cada uno de los nucleótidos (A, T, C o G). Los cromatogramas se analizaron con el programa Chromas y las secuencias se analizaron con los programas ClustalW y DSGene1.5 (Accelrys, 2003).

1.6. Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones en nucleótidos puntuales, se procedió según el método recomendado por el sistema comercial “QuickChange Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene). Se utilizó como sustrato 10 ng del plásmido donde se iba a insertar la mutación, y se llevó a

cabo una reacción de PCR con las siguientes condiciones: 125 ng de cada oligonucleótido, 0,2 mM dNTPs (Roche), tampón de PCR (KCl 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,8, MgSO_4 20 mM, 1% Tritón X-100, BSA 1 mg/mL) y una unidad de la enzima “Pfu Turbo ADN polimerasa” (Stratagene), en un volumen de 50 μL . Los oligonucleótidos usados se detallan en la tabla 12. Antes de añadir la polimerasa, la mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar las hebras de ADN. A continuación se llevó a cabo un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, seguido de 16 ciclos consistentes en 30 segundos a 95°C, seguido de 1 minuto a 55°C y una elongación a 68°C durante 22 minutos para plásmidos de un tamaño aproximadamente de 5 Kb. El ADN parental fue eliminado mediante la incubación del producto de PCR con la endonucleasa *DpnI*, con acción específica sobre secuencias metiladas y hemimetiladas, resultando así seleccionadas sólo las copias amplificadas. El producto de PCR se transformó en cepas DH5 α de *E. coli* competentes seleccionando las colonias transformantes con la resistencia específica para cada vector. Los plásmidos transformados se analizaron por secuenciación para confirmar la presencia del nucleótido mutado.

2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

2.1. Purificación de proteínas de fusión unidas a GST (Glutación-S-Transferasa)

El sistema de fusión de proteínas con GST permite una rápida y fácil purificación de proteínas sobreexpresadas en *E. coli*. Los clones con los plásmidos correspondientes se crecieron toda la noche a 37°C en medio selectivo (LB + antibiótico). Al día siguiente se hizo una dilución 1:10 del preinóculo en medio fresco selectivo y se incubó 1-2 h a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de entre 0,6 y 0,8 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. En este momento, cuando el cultivo está en fase exponencial, se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 0,1-0,3 mM y se incubó a 37°C durante 2-4 h. Tras este tiempo el cultivo se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón de lisis (PBS frío + 1% Triton X-100, 0,2 $\mu\text{g/mL}$ lisozima, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina y 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina). La suspensión se sonicó con 2 pulsos de 30 segundos separados por 30 segundos sin sonicar, a 4°C y baja potencia, en un sonicador “Misonic XL2010” y se centrifugó a 15000 r.p.m. 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante contiene las proteínas solubles, entre las que se encuentra de forma mayoritaria la proteína de fusión expresada. Esta fracción soluble se incubó con la resina Glutación Sefarosa “Glutathion Sepharose 4B beads” (GE Healthcare) durante 2-12 h a 4°C en agitación suave. Una vez unida la proteína de fusión a la resina, se lavó varias veces con tampón de lavado (PBS + 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina y 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina), y posteriormente la proteína fusionada a

GST se eluyó en una solución 10 mM de glutatión reducido en 50 mM Tris-HCl pH 8,0 a 4°C durante 1 hora en agitación orbital. Tras una breve centrifugación de 2 minutos a 2000 r.p.m. se recogió el sobrenadante con la proteína eluida y se comprobó la purificación de la proteína mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie o *Western blot*. Finalmente la solución de elución se dializó mediante membranas de diálisis (Serva) frente a PBS + 5% glicerol y se concentró en un “centricon Amicon Ultra” (Millipore). La concentración proteica se determinó por colorimetría mediante “BIO-RAD protein assay” (Bio-Rad), empleando BSA para establecer una recta patrón.

Algunas proteínas unidas a la resina Glutatión Sefarosa se separaron de su epítipo GST por digestión con trombina (GE Healthcare) (10 unidades/mg proteína de fusión) durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 2000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante, correspondiente a la proteína purificada.

2.2. Purificación de proteínas de fusión unidas al epítipo 6xHis

Este tipo de purificación se basa en la unión reversible entre varias cadenas de aminoácidos (en este caso histidinas) e iones metálicos inmovilizados en una resina. La resina usada en este caso fue “BD TALON Metal Affinity Resin” (BD Biosciences), que contiene iones Co^{2+} inmovilizados a través de un ligando quelato tetradentado, dejando libre dos enlaces de coordinación accesibles a proteínas fusionadas con epítopos de polihistidina (Bush et al., 1991). El protocolo seguido fue el mismo que para la expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST, salvo que en el tampón de lisis, así como en el de lavado, se eliminó el DTT y se añadió imidazol (Merck) a una concentración de 5 a 15 mM en el tampón de lisis, y de 40 a 50 mM en el tampón de lavado. Para la elución de las proteínas de la resina se utilizó PBS con imidazol en concentraciones crecientes desde 100 mM hasta 500 mM. Los eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie, y se unieron todos aquellos que contenían la proteína purificada en cuestión; a continuación se dializaron, concentraron y cuantificaron como se ha descrito en el anterior apartado.

2.3. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

La separación de proteínas en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis vertical en geles SDS-PAGE (“Sodium Dodecylsulfate-Polyacrlamide Gel Electrophoresis”). El SDS, un detergente aniónico, desnaturaliza las proteínas y se une a ellas, enmascarando su carga y creando una distribución uniforme de carga negativa en las proteínas debido a los grupos sulfato del SDS. Así, todas las proteínas tienen una relación carga:masa uniforme, de manera que las proteínas con menor masa migran más rápido a través del poro del gel. El tamaño del poro depende de la concentración de acrilamida del gel. Los geles se

prepararon con un porcentaje de acrilamida en función al tamaño de las proteínas a separar o visualizar (5-15% acrilamida, 0,13-0,4% bis-acrilamida), en un tampón 0,375 M Tris-HCl, con pH 8,8 y 3,5 mM SDS. Para mejorar la resolución de las proteínas, encima de este gel “resolving” se preparó un gel “stacking”, que contiene una menor concentración de acrilamida, por tanto un tamaño de poro mayor y menor pH, lo que permite concentrar todas las proteínas en una banda estrecha antes de entrar en el gel de carrera o “resolving”, produciendo una mejor separación y más finas bandas de proteína. El gel “stacking” se preparó al 4,8% acrilamida, 0,128% bis-acrilamida en tampón 0,125M Tris-HCl, pH 6,8 y SDS 3,5 mM. Para la solidificación de los geles se utilizó persulfato de amonio (0,06%) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina) (0,3%) como catalizador de la formación de radicales libres.

Las muestras de proteína se procesaron con tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2,3% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 5% β-mercaptoetanol), llevándolas a un volumen final de 25-50 µL y se hirvieron durante 5 minutos. El gel se corrió en condiciones desnaturalizantes en el tampón de carrera 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicina y 0,05% SDS, según (Laemmli, 1970). Como marcadores de masa molecular se utilizaron marcadores preteñidos “Precision Plus Protein™ Standards Dual Color” de Bio-Rad.

2.4. Tinción con azul de Coomassie

Para visualizar las proteínas separadas en geles de poliacrilamida por electroforesis SDS-PAGE, los geles se fijaron y tiñeron mediante tinción con azul de Coomassie. La tinción azul de Coomassie es una disolución compuesta de 0,5 % “Coomassie brilliant blue R-250” (Merck), 50% metanol y 10% ácido acético glacial. Los geles se sumergieron e incubaron en esta solución de tinción unos 5 minutos. Posteriormente, se destiñeron con solución de distinción (50% metanol, 10% ácido acético glacial) en agitación hasta la correcta visualización de las bandas de proteína de interés. Finalmente, los geles se transfirieron a papel “Whatman 3M” y se secaron en un secador de geles (Bio-Rad) durante 2 h a 80°C. Para evitar la rotura de los geles durante el secado, previamente se incubaron 5 minutos con una solución de glicerol al 10%.

2.5. Transferencia húmeda, Western blot, y tinción Ponceau

Las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE se transfirieron del gel a una membrana PVDF “Immobilon-P” (Millipore) mediante transferencia húmeda según (Towbin, 1979), para la realización de *Western blot* o detección de las proteínas con anticuerpos específicos. El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicina y 10-20% metanol. La concentración de metanol se varió en función del tamaño de las proteínas de interés a transferir (a mayor tamaño, menor concentración).

Para llevar a cabo el *Western blot* la membrana se bloqueó durante 1h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación en 5% de leche en polvo desnatada en el tampón TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl y 0,1% Tween-20). Para evitar en mayor medida la unión inespecífica de los anticuerpos, y sobre todo cuando se usaron anticuerpos que reconocen residuos específicos fosforilados (anticuerpos fosfoespecíficos), la membrana se bloqueó con BSA al 5% en el tampón TBS-T. A continuación, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario, a la dilución adecuada (tabla 9), durante 1-2 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, seguido de varios lavados con TBS-T en agitación durante 30 minutos. Después, la membrana se incubó con la dilución adecuada del anticuerpo secundario correspondiente (tabla 9) conjugado con peroxidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó varias veces en agitación durante 30 minutos, y a continuación se detectó la luminiscencia, tras la incubación de la membrana con el reactivo “ECL Western Blotting Detection Reagents” (GE Healthcare). La luminiscencia emitida se detectó exponiendo las membranas a películas de rayos X.

En algunos casos, las proteínas transferidas a las membranas de PVDF se visualizaron con tinción con rojo Ponceau. Para ello las membranas se incubaron unos 5 minutos con la solución de tinción Ponceau compuesta de 0,2% Ponceau S (ácido 3-Hidroxi-4[2-sulfo-4-(4-sulfo-fenilazo)fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico), 3% ácido sulfosalicílico, 3% ácido trifluoroacético y 1% ácido acético, y a continuación se destiñeron con agua hasta la visualización de las bandas de interés.

3. CULTIVO CELULAR

Se utilizaron líneas celulares adherentes humanas (tabla 11), que se cultivaron en *flasks* o placas para cultivo celular en monocapa, en un incubador a 37°C y con una atmósfera al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los medios de cultivo DMEM, RPMI o McCoy's fueron suplementados con 10% de FBS, 2 mM de L-Glutamina, 50 unidades/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin. Los pases se realizaron levantando las células con Tripsina-EDTA. Todos los medios y suplementos fueron obtenidos de GIBCO (Invitrogen). Las células en cultivo se observaron con un microscopio óptico invertido “Zeiss Axiovert 25”.

4. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO MONOCAPA

En todos los experimentos de sobreexpresión de proteínas en células eucariotas se hicieron transfecciones transitorias de células en cultivo monocapa. Para lo cual, 24 h antes de la transfección, las células fueron sembradas a una densidad adecuada para que llegaran a un 60-80% de confluencia en el momento de la transfección. El ADN para las transfecciones se

preparó con el sistema comercial “JETStar endotoxin-free maxiprep kit” (GENOMED GmbH). Las células se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas en cada experimento con uno de los siguientes métodos de transfección, dependiendo de la línea celular y la eficiencia de transfección deseada:

- Precipitación con fosfato cálcico para HEK-293T: se mezcló el ADN a una concentración final de 20 µg/mL con CaCl_2 a 0,25 M. Por otro lado, se preparó una disolución 50 mM Hepes, 280 mM NaCl y 0,021% (m/v) de NaHPO_4 y se añadió rápidamente a la solución de ADN en una relación 1:1. La mezcla resultante se mezcló por inversión, se burbujó con vortex 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente 15 minutos. A continuación, se añadió la disolución a las células gota a gota rápidamente. En algunos casos, para aumentar la eficiencia de transfección, se añadió cloroquina (Sigma) a cada placa cinco minutos antes de la transfección (con una concentración final de 25 µM), retirando el medio de cultivo tres horas después de la transfección debido a la toxicidad de la cloroquina.

- Lipofección con “JetPEI™ Cationic polymer transfection reagent” (Polyplus Transfection). Se diluyeron por separado el ADN y el reactivo JetPEI en un volumen determinado de NaCl 150 mM en una proporción N/P (número de residuos de nitrógeno del reactivo por fosfato del ADN) de 5 (1 µg ADN / 2 µL JetPEI) según recomendación del fabricante. A continuación se añadió la solución de JetPEI sobre la solución de ADN, se agitó con vortex y se incubó a temperatura ambiente unos 15-30 minutos. Posteriormente la mezcla se añadió a las células y se homogeneizó con el medio de cultivo.

- Lipofección con “Lipofectamine 2000 Reagent” (Invitrogen): Se diluyeron por separado el ADN y el reactivo Lipofectamine en un volumen determinado de Opti-MEM (GIBCO, Invitrogen). La relación µg ADN / µL Lipofectamine se fijó en 1/3, según las recomendaciones del fabricante. Se agitó cada una de las mezclas, y tras 5 minutos se añadió la solución de Lipofectamine a la solución de ADN, se agitó con vortex, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió a las células y se homogeneizó con el medio de cultivo sin antibióticos, en el que previamente se habían sembrado las células. A partir de las 4 horas tras la transfección, se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco con antibióticos.

En cada ensayo, la concentración final de ADN en cada punto se mantuvo constante mediante la adición de los microgramos necesarios de un vector vacío. Como control de la eficiencia de la transfección, se añadió un punto con un vector para expresión eucariota constitutiva de la proteína fluorescente verde GFP en cantidad y condiciones iguales a las de las construcciones transfectadas para el ensayo.

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS EN CULTIVO Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ENDÓGENAS O SOBREEXPRESADAS

Para la obtención de extractos proteicos totales de células en cultivo, las células se lavaron con PBS frío y en todos los casos se recogieron directamente en tampón de lisis. El tampón de lisis normalmente utilizado fue: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM NaF y 5 mM EDTA más inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, 1mM ortovanadato de sodio). Los extractos obtenidos se incubaron 20 minutos en hielo y a continuación se centrifugaron durante 20 minutos a 16.000 x g, a una temperatura de 4°C. Se descartó el “pellet”, y el sobrenadante, que contiene las proteínas celulares, se cuantificó para medir la cantidad total de proteína en los extractos. La cuantificación se realizó por medida de la absorbancia de los sobrenadantes tras la adición del reactivo “BIORAD protein assay” (Bio-Rad). Para hacer la recta patrón se utilizó una disolución patrón de BSA (Bio-Rad).

En la mayoría de los casos, la expresión de las proteínas de interés, tanto endógenas como sobreexpresadas, se comprobó de la siguiente manera: una cantidad igual de extracto proteico (25-50 µg) para cada punto del ensayo se resolvió mediante electroforesis vertical en un gel SDS-PAGE, preparado con un porcentaje de acrilamida adecuado al tamaño de la proteína a analizar (5-12,5%). Las proteínas se transfirieron y detectaron por *Western blot* como se detalla en el apartado 2.5, utilizando anticuerpos adecuados para cada proteína o epítipo a detectar.

6. ENSAYOS DE *PULLDOWN*

Los ensayos de *pulldown* se llevaron a cabo para detectar proteínas endógenas o sobreexpresadas que interaccionan con otras proteínas usadas como “cebo” y fusionadas a GST.

Las células se recogieron 48 horas después de la transfección, en el caso de querer detectar proteínas sobreexpresadas, o 48-72 horas después del sembrado de células, en el caso de querer detectar proteínas endógenas. Las células se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM NaF y 5 mM EDTA), con 1 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas. Se utilizó entre 1 y 2 mg de extracto por punto. En primer lugar, y a modo de “preclearing” (evita la unión inespecífica de proteínas a la resina), los extractos se incubaron 2 horas a 4°C con 10 µg de proteína GST sola unida a unos 30 µL de resina Glutación Sefarosa (GE Healthcare). A continuación, cada extracto se incubó con 10 µg de la proteína fusionada a GST correspondiente a cada ensayo o punto, también embebida en 30 µL de resina Glutación sefarosa, 2 horas a 4°C. Las proteínas se precipitaron por centrifugación suave, y se lavaron extensamente con tampón de lisis varias veces. Finalmente se

procesaron añadiendo tampón de carga, y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE, tras lo cual se detectaron con anticuerpos específicos mediante *Western blot*.

Una variante de este ensayo consistió en expresar las proteínas fusionadas a GST en células eucariotas. De esta manera, las células se recogieron 48 horas después de la transfección y se lisaron en tampón de lisis. Se utilizó 1-1,5 mg de extracto proteico total para cada punto. Para precipitar las proteínas de fusión con GST, los extractos se incubaron con 40 μ L de resina Glutathión Sefarosa durante 4-12 h a 4°C en agitación suave. Tras este tiempo, se recogió la resina por centrifugación suave y se lavó con el tampón de lisis varias veces, tras lo cual se añadió tampón de muestra y se analizaron las proteínas así precipitadas con anticuerpos específicos mediante electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*.

7. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo a partir de 1-1,5 mg de extracto proteico total. En este caso los extractos se lisaron con el tampón indicado para cada experimento. Para evitar uniones inespecíficas, el extracto se preincubó con 30 μ L de resina “GammaBind Plus Sepharose” (GE Healthcare) equilibrada en el tampón en el que se hicieron los extractos proteicos, durante 1 hora a 4°C en agitación orbital. Posteriormente, se retiró la resina y se incubó el extracto total con el anticuerpo concreto a la concentración adecuada durante 2-3 horas. A continuación se añadieron 40 μ L de resina bloqueada previamente con seroalbúmina bovina al 1%. Se incubó esta mezcla durante 2-3 h más o bien toda la noche a 4°C con agitación. Tras este tiempo, se recogió la resina por centrifugación suave y se lavó con el tampón de lisis varias veces antes de ser procesada con tampón de carga. Por último, las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*. Las coinmunoprecipitaciones de Ran y VRK1 endógenas se llevaron a cabo con una cantidad de extracto mayor (4 mg) utilizando el tampón de lisis: 50 mM Hepes, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 1% Tritón X-100, 10% glicerol, 1mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas. Las inmunoprecipitaciones de 53BP1 se realizaron con el tampón de lisis NETN (Rappold et al., 2001): 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% NP-40, 1 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas. ATM se inmunoprecipitó con el tampón de lisis de ATM (Bakkenist and Kastan, 2003): 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 0,5% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas. ATR se inmunoprecipitó con el tampón de lisis de ATR (Tibbetts et al., 1999): 25 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 50 mM β -glicerofosfato, 0,5% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas.

8. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Con el objetivo de detectar y localizar mediante microscopía confocal proteínas endógenas en células en cultivo se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio estériles; en algunos casos, especialmente cuando se usó la línea celular HEK-293T, los cubreobjetos se trataron previamente con una disolución de poli-L-lisina (Sigma) al 0,01% para mejorar la adhesión de las células al cristal. Una vez crecidas, las células fueron lavadas con tampón PBS frío y fijadas con paraformaldehído al 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los grupos aldehído que pueden quedar tras la fijación reaccionan con aminas y proteínas generando productos fluorescentes; para evitarlo, se incluyó un lavado con glicina al 0,2 M, que reduce estos grupos aldehído eliminando este efecto. Posteriormente, las células se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 30 minutos. En algunos casos, la fijación y permeabilizado se llevaron a cabo con un tratamiento de 10 minutos a -20°C con metanol/acetona (1:1) frío. A continuación, las células se bloquearon con 1% de BSA en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. En la mayoría de los casos, se detectaron dos proteínas a la vez. Para ello, se realizó de manera secuencial la incubación con los dos anticuerpos primarios, que se diluyeron a la concentración adecuada en el tampón de bloqueo, y se incubaron cada uno 1 hora a temperatura ambiente. Después las células se lavaron con PBS, incubando 5 minutos cada lavado. Los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos de cianina cy2 y cy3, se mezclaron y diluyeron en tampón de bloqueo incubándose a la vez durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otros 3 lavados de cinco minutos cada uno con PBS, los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados más con PBS, y uno último con agua destilada, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con MOWIOL[®] 4-88 (Calbiochem). La localización subcelular de los antígenos se analizó mediante microscopía confocal en un microscopio confocal Zeiss LSM510. Las imágenes adquiridas se analizaron con el programa LSM Image Examiner de Zeiss.

9. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar el perfil del ciclo celular se realizó un análisis del contenido de ADN celular mediante marcaje con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Las células se levantaron con Tripsina-EDTA (GIBCO) y se lavaron varias veces con PBS y centrifugaciones de 5 minutos a 1500 r.p.m. El precipitado de células se resuspendió en 700 μL de 70% de etanol frío, manteniéndose así a 4°C durante al menos 4 horas. Tras la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en la solución de marcaje con yoduro de propidio (5 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio y 200 $\mu\text{g/mL}$ de ARNasa procedente de una disolución reciente en PBS, pH 7,4). A continuación las células se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Por último las células marcadas se analizaron en un

citómetro “FACScalibur” (Becton-Dickinson) midiendo la fluorescencia del ioduro de propidio asociado al ADN. La adquisición de los datos se llevó a cabo mediante el programa Cell Quest (Becton-Dickinson). Los datos se analizaron con los programas Paint-a-Gate y ModFit (Becton-Dickinson).

10. SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA

Para silenciar específicamente el gen de VRK1 se usaron los dúplex de ARN de interferencia (siRNA) indicados en la tabla 12, que fueron diseñados usando el algoritmo “SMARTselection” (DHARMACON RNA Technologies). En el texto se indican como siVRK1. En todos los experimentos se realizó un control negativo (indicado como siControl) usando un ARN de interferencia funcional sin diana en células humanas: “ON-TARGETplus siCONTROL Non-targeting siRNA” (DHARMACON). Como control de la eficiencia de transfección se usó el ARN de interferencia “siGLO RISC-free siRNA” (DHARMACON) marcado con fluorescencia roja.

Las células se transfectaron transitoriamente con los oligonucleótidos de ARN de interferencia a una concentración de 100-200 nM utilizando el reactivo “Lipofectamine 2000 Reagent” (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la transfección se esperaron las horas indicadas en cada experimento y se procedió al procesamiento de las células.

11. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR SU HUELLA PEPTÍDICA

La identificación de una proteína por su huella peptídica consiste, en primer lugar, en el análisis mediante espectrometría de masas del peso molecular de los péptidos resultantes de la digestión de la proteína con una proteasa (generalmente tripsina), y en segundo lugar, en la comparación de los valores experimentales de los pesos moleculares de los péptidos, con valores reales de pesos moleculares de péptidos teóricos de las bases de datos, de todas las proteínas existentes. La lista de valores experimentales de masa/carga (m/z) de los péptidos es lo que se conoce como huella peptídica de una proteína. La comparación de los datos experimentales con los datos teóricos de las bases de datos se lleva a cabo mediante motores de búsqueda.

El primer motor de búsqueda y comparación que fue desarrollado se conoce como MOWSE (*MOlecular Weight SEarch*) (Pappin et al., 1993). La base de datos MOWSE se generó a partir de la base de datos de secuencias de proteína OWL (cuya base de datos prioritaria es Swiss-Prot), compuesta por pesos moleculares calculados de todos los fragmentos peptídicos que se generan aplicando las reglas de digestión específica por un tipo de enzima o reactivo (por ejemplo, para tripsina, corta en C-terminal de una lisina o arginina) para todas las

proteínas. Los únicos parámetros que usa este programa para la búsqueda y comparación en la base de datos son los valores de masa experimentales de los péptidos, el reactivo utilizado para la digestión y el peso molecular de la proteína intacta. El programa da un resultado de una lista de las cincuenta mejores proteínas que pueden concordar con los datos experimentales de masa, clasificadas según una puntuación o *score*. Para obtener esta puntuación, el programa hace uso de la distribución de la frecuencia o abundancia relativa de las masas de péptidos teóricos en la base de datos. Los péptidos experimentales se asignan a péptidos teóricos; cada péptido teórico tiene asignado un valor de frecuencia con el cual se calcula el *score* o puntuación de la identificación, que además tiene en cuenta el tamaño de la proteína. Sin embargo, MOWSE no da una medida de la confianza de la predicción. Debido a esto, unos años después se desarrolló MASCOT (Perkins et al., 1999), un método de identificación de proteínas basado en probabilidad, también referido como “puntuación MOWSE basada en probabilidad”.

MASCOT es un motor de búsqueda que utiliza algoritmos que dan lugar a una puntuación basada en probabilidad: proporciona un valor de probabilidad a cada ion o péptido, dando lugar al *score*, según la relación $S = -10 \cdot \log(P)$, donde S es el *score* y P es la probabilidad de que una asignación de un valor de masa experimental a una secuencia de proteína sea un proceso al azar. De esta manera, una asignación correcta, lo cual no sería un proceso al azar, tiene una probabilidad muy baja. La significancia de la asignación depende del tamaño de la base de datos de secuencias teóricas; MASCOT utiliza un nivel de significancia de $p < 0,05$. A partir de los *scores* de los péptidos, se calcula el *score* de cada proteína asignada a la lista de péptidos. Para calcular este *score*, el programa tiene en cuenta más parámetros, como el error típico de las medidas, la longitud del péptido, y variables como sitios de corte perdidos, o modificaciones covalentes de los péptidos (glicosilación, fosforilación, etc).

En resumen, con el motor de búsqueda se comparan los datos de masas experimentales con datos teóricos; se obtiene una lista de posibles proteínas, a cada una de las cuales se le da una puntuación o *score* basada en la probabilidad de que la asignación de una secuencia de proteína a los valores de masas experimentales sea al azar. Con los parámetros de búsqueda se establece un punto de corte, o un *score* mínimo (derivado del nivel de significancia $p < 0,05$), con el cual se establece que una proteína identificada con un *score* por encima de ese punto es una identificación estadísticamente significativa.

12. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

12.1. *Pulldown* a gran escala para la purificación e identificación de proteínas asociadas a las proteínas VRK

Para cada transfección, un total de 5×10^7 células HEK-293T se sembraron en placas de 10 cm y 24 horas después se transfectaron con un plásmido que expresa la proteína VRK correspondiente fusionada con GST. 48 horas después de la transfección las células se lavaron

con PBS y se lisaron con un tampón compuesto de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sodio, 1mM NaF e inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL leupeptina). Los lisados se incubaron 30 minutos en hielo y la parte insoluble se separó por centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 13200 r.p.m. A continuación fueron incubados toda la noche con 200-300 µL de resina Glutathión Sefarosa (GE Healthcare) a 4°C. Al día siguiente la resina se separó por centrifugación a 2000 r.p.m. y se lavó extensamente con el tampón de lisis. Una pequeña alícuota de la resina bien se cuantificó con el reactivo “Bio-Rad DC protein assay” (Bio-Rad) o bien se procesó con tampón de carga y se comprobó la concentración en gel SDS-PAGE. El resto de la resina se congeló a -20 °C hasta el momento de la electroforesis bidimensional.

12.2. Electroforesis bidimensional

Para eluir las proteínas de la resina procedente del *pulldown*, la resina se mezcló con 250 µL de tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1,2% “DeStreak Reagent” (GE Healthcare) -previene la oxidación no específica de proteínas y evita el rayado (*streaking*) de los geles bidimensionales, mejorando así la reproducibilidad- 0,5% “IPG buffer” (GE Healthcare) -mezcla de anfólitos que mejora la solubilidad y separación de las proteínas-, 50 mM DTT y 5 mM TCEP), se agitó con vórtex, se incubó 30 minutos a 30°C, y se centrifugó 2 minutos a 15000 r.p.m. Se separó el sobrenadante obteniendo así las proteínas eluidas. A continuación, la muestra se limpió de impurezas y contaminantes que interfieren en la electroforesis bidimensional: los ácidos nucleicos se separaron mediante centrifugación 1 hora a 45000 x g y temperatura ambiente, quedando en el precipitado; las sales y lípidos se separaron de la solución de proteínas mediante precipitación de éstas por el método metanol/cloroformo. En el último paso, el precipitado de proteínas se resuspendió en 250 µL de tampón de rehidratación. La máxima cantidad de proteína usada para cada electroforesis fue de 250-300µg.

Las muestras fueron cargadas en tiras IPG (gradiente de pH inmovilizado) de 13 cm con un gradiente de pH no lineal 3-10, o de 7 cm y pH 4-7 (GE Helthcare). El isoelectroenfoque establece una diferencia de potencial y un gradiente de pH en el cual se separan las proteínas según su punto isoeléctrico, siempre que esté dentro del rango de pH establecido. El isoelectroenfoque se llevó a cabo de la siguiente manera: 12 horas a 50 V, 1 hora a 500 V, 1 hora a 1000 V, 30 minutos con gradiente de voltaje entre 1000 y 8000 V y 5 horas hasta que el voltaje alcanzó 35000 V. Las tiras fueron a continuación tratadas con tampón de equilibrado con SDS (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 20 % glicerol, 2 % SDS) más 2% DTT durante 15 minutos para reducir los puentes disulfuro y desnaturalizar del todo las proteínas, y a continuación con tampón de equilibrado más iodoacetamina al 2,5% para llevar a cabo una alquilación y evitar la oxidación de nuevo de las cisteínas. La segunda dimensión se llevó a cabo cargando las tiras en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida de un tamaño adecuado a

éstas. Las proteínas se tiñeron con la tinción fluorescente “Sypro Ruby Protein Gel Staining” (Invitrogen) y se visualizaron con el escáner FLA-3000 (Fuji Film), usando un láser “Blue” (473 nm de longitud de onda) y un filtro #0580. En algunos casos, los geles control se tiñeron con tinción de plata (tinción no compatible con el análisis por MALDI-TOF) y se secaron en un secador de geles (Bio-Rad).

12.3. Digestión triptica de *spots*

Una vez visualizadas las proteínas con el escáner FLA-3000, los geles se transfirieron al sistema robotizado o *spot-picker* “Proteineer spII” (Bruker-Daltonics). Las proteínas o *spots* de interés fueron seleccionadas y recortadas de los geles automáticamente con el *spot-picker*. Las digestiones de las proteínas se llevaron a cabo manualmente, utilizando en todos los casos tripsina, siguiendo el protocolo previamente descrito (Shevchenko et al., 1996) con algunas variaciones: los fragmentos de gel o *spots* recortados se lavaron con 25 mM de bicarbonato de amonio y acetonitrilo, y después fueron tratados primero con 20 mM DTT en 25 mM de bicarbonato de amonio y luego con iodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 25 mM. A continuación se lavaron con 50 mM de bicarbonato de amonio con acetonitrilo y se dejaron secar. Se añadió tripsina porcina modificada (Promega) en 25 mM de bicarbonato de amonio a una concentración final de 12 ng/μL a cada fragmento de gel seco y se incubó 16 horas a 37°C. Los péptidos tripticos obtenidos se secaron en un sistema de vacío “speed vacuum system” y se resuspendieron con 0,1% de ácido trifluoroacético y 50% de acetonitrilo en un volumen final de 5 μL por *spot*.

12.4. Determinación de las masas de los péptidos tripticos con MALDI-TOF e identificación de proteínas con MASCOT

Para determinar la huella peptídica por MALDI-TOF de cada *spot* seleccionado, una alícuota de 0,5 μL de solución matriz (5 g/L de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en 33% de acetonitrilo acuoso y 0,1% de ácido trifluoroacético) fue cargada manualmente en una placa “AnchorChip™ Target plate probe” (Bruker-Daltonics) de 400 μm de diámetro y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se añadió 1 μL de la solución de péptidos arriba descrita y de nuevo se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas “Bruker Ultraflex” MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz - analizador de tiempo de vuelo) (Bruker-Daltonics). El rango de adquisición de masas fue establecido entre 680 y 4000 Da. El equipo fue primero calibrado externamente utilizando señales de masas protonadas de una mezcla estándar de péptidos de calibración que contiene 7 péptidos: “Bruker Peptide Calibration Standard” #206196 (Bruker-Daltonics), cubriendo el rango m/z 1000-3200. Además, cada espectro fue calibrado internamente usando picos

específicos de la autoproteólisis de la tripsina (842,510 y 2211,105 Da), alcanzando un error típico de ± 30 ppm (la calibración del espectrómetro está directamente relacionada con la exactitud de las medidas de masa). Los espectros obtenidos fueron abiertos con el programa Bio Tools 2.1 (Bruker Daltonics) y procesados y analizados con el programa Xtof 5.1.1 utilizando los siguientes parámetros: umbral señal-ruido de 1, algoritmo “Savitsky Golay” para el nivel de ruido, algoritmo “Tangencial” para sustracción de la línea base y algoritmo “Controid” para la asignación del pico monoisotópico. En todos los casos, la resolución del aparato se estableció por encima de 9000. Todos los contaminantes conocidos (picos de autoproteólisis de la tripsina y de queratinas o contaminantes propios del laboratorio) fueron excluidos durante el proceso. Las listas de masas de picos generadas fueron copiadas al servidor “Mascot Server” (versión 2.0, Enero 2004) y se realizaron las búsquedas frente a la base de datos Swiss-Prot (22 Febrero 2006, 207132 entradas de secuencias para las búsquedas del apartado 1.2 de Resultados; 11 Octubre 2006, 234112 entradas de secuencias para las búsquedas del apartado 1.3 de Resultados). Los parámetros de búsqueda fueron establecidos de la siguiente manera: las búsquedas se restringieron a secuencias de *H. sapiens* (13484 secuencias para las búsquedas del apartado 1.2; 14780 para las búsquedas del apartado 1.3); como máximo 1 punto de corte de tripsina perdido; tolerancia de masa 100 ppm, masas monoisotópicas con una carga (MH^+), carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y oxidación de metioninas como modificación variable. Se consideraron identificaciones significativas ($p < 0,05$) aquellas con valores o *scores* mayor de 54.

13. ENSAYOS DE INTERACCIÓN *IN VITRO*

Los ensayos de interacción *in vitro* del apartado 2 de la sección de Resultados se llevaron a cabo con las proteínas purificadas y concentraciones indicadas en cada figura en 250 μL de tampón $MgCl_2$ (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,1% Triton X-100 y 10% glicerol (v/v)). En algunos ensayos, se realizó previamente una carga de la GTPasa Ran con nucleótidos (GDP o GTP) o EDTA. Para realizar la carga, Ran purificada se mezcló con GDP, GTP o EDTA 2 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en un volumen final de 50 μL en agua. Después las proteínas se llevaron a 250 μL con tampón $MgCl_2$. Para realizar el ensayo de interacción *in vitro*, las proteínas se incubaron 2 horas a 4°C. Las proteínas fusionadas a GST y sus proteínas interaccionantes se precipitaron añadiendo 30 μL de resina Glutathión Sefarosa; las proteínas con epítipo 6xHis se precipitaron añadiendo 30 μL de resina “Talon”. Los precipitados se lavaron extensamente cuatro veces con tampón $MgCl_2$, se procesaron con tampón de carga y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas “Immobilon-P” (Millipore) y se detectaron con anticuerpos adecuados por *Western blot*.

El ensayo de interacción *in vitro* entre VRK1-His y los fragmentos de 53BP1 se llevó a cabo en 250 μ L de tampón de interacción (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 2 mM DTT), incubando las proteínas 2 horas a 4°C. Los fragmentos fusionados a GST se precipitaron por adición de resina Glutathión Sefarosa, y se lavaron con tampón de interacción.

14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

La actividad serina/treonina quinasa *in vitro* de VRK1, VRK2A/B o VRK3 se analizó mediante ensayos de fosforilación utilizando las quinasas recombinantes expresadas en *E.coli*, en el tampón específico para caseína quinasas (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl), con 5 μ M de ATP y 5 μ Ci (0,1 μ M) de [γ - 32 P]ATP (PerkinElmer) en un volumen final de 30 μ L. Como sustratos se utilizaron también proteínas recombinantes, en las cantidades indicadas en cada ensayo. En todos los ensayos en los que se usó histona H3, se utilizó 1 μ g de histona recombinante de *X. laevis* (Upstate). Igualmente, histona H2AX recombinante humana se compró a Upstate. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo a 30°C durante 30 minutos (Barcia et al., 2002) en agitación con un “Thermomixer Compact” de Eppendorf. La actividad serina/treonina quinasa de VRK1 endógena se analizó con ensayos de fosforilación utilizando la quinasa inmunoprecipitada de la línea celular elegida. La quinasa se utilizó embebida en la resina de la inmunoprecipitación, y se usaron las mismas condiciones que las utilizadas para ensayar la actividad de la quinasa recombinante, salvo que se utilizaron volúmenes de reacción mayores (65 μ L).

Los ensayos de fosforilación con ATM y ATR se realizaron en el tampón: 10 mM Hepes pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MnCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 μ M de ATP y 5 μ Ci (0,1 μ M) de [γ - 32 P]ATP (Rappold et al., 2001). Los ensayos de fosforilación con Chk2 se realizaron en el tampón: 50 mM Hepes pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μ M de ATP y 5 μ Ci (0,1 μ M) de [γ - 32 P]ATP (Buscemi et al., 2004).

Las reacciones se pararon mediante la adición de tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2,3% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol) e incubación a 100°C 5 minutos. Las proteínas fosforiladas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con tinción de Coomassie y se secaron, o se transfirieron a membranas de PVDF “Immobilon-P” (Millipore). La radiactividad incorporada se detectó exponiendo los geles o membranas a películas de rayos X (Fujifilm), o usando un “Molecular Imager FX” de Bio-Rad. Como controles se utilizaron las bandas de proteínas teñidas con Coomassie o Ponceau, o detectadas específicamente por *Western blot* realizados sobre las membranas. La detección de residuos específicos fosforilados en los sustratos se realizó mediante la realización de *Western blot* con anticuerpos específicos para esos residuos fosforilados.

15. ENSAYOS DE INTERCAMBIO DE NUCLEÓTIDO *IN VITRO*

15.1. Ensayos de liberación de GDP

En primer lugar se realizó un stock de la GTPasa Ran cargada con GDP marcado con ^3H para varias reacciones. Para ello, 1 nmol de Ran fue incubado con 0,185 MBq [^3H]GDP (5 μCi) (GE Healthcare TRK 335) en un volumen final de 50 μL de tampón de carga (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 mM MgCl_2 y 6 mM EDTA) durante 30 minutos a 24°C. Para estabilizar el nucleótido unido, se añadieron 450 μL de tampón de carga y se ajustó la concentración de MgCl_2 a 20 mM. Esta dilución se guardó en hielo hasta el momento de la reacción de liberación de GDP. En cada reacción, 50 pmoles de Ran-[^3H]GDP (25 μL) se mezclaron con un volumen igual de mezcla de reacción. La mezcla de reacción contenía RCC1 y VRK1 en tampón de intercambio (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) en las cantidades necesarias para cada punto, y GTP (Sigma-Aldrich) libre y sin marcar radiativamente para la reacción de intercambio a una concentración de 2 mM en todos los casos (de esta forma la concentración final de GTP fue de 1 mM). Sin embargo, para asegurarnos de que la interacción entre VRK1 y Ran se estaba dando, en primer lugar se añadió la cantidad indicada en cada punto de VRK1 sobre los 50 pmoles de Ran-[^3H]GDP, siempre en el mismo volumen final y en tampón de intercambio, se incubó 15 minutos a 24°C, y a continuación se añadió RCC1 y GTP. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 24°C para dar lugar a la reacción de intercambio de nucleótidos. Para parar la reacción, se añadió 2 mL de tampón de parada (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl) sobre las muestras e inmediatamente se filtraron a través de un filtro de nitrocelulosa (Millipore). Los filtros se lavaron con 20 mL de tampón de parada, se transfirieron a viales de contador de centelleo y se disolvieron con 1 mL de 2-Metoxietanol (Sigma-Aldrich). La radiactividad permanente en los filtros se midió por conteo de centelleo líquido en un contador de centelleo (Beckman Coulter). Se añadieron 10 mL de líquido de centelleo (PerkinElmer) a cada filtro y se procedió al conteo.

15.2. Ensayos de unión de GTP

En estos ensayos se siguió el mismo protocolo que para los ensayos de liberación de GDP pero con las siguientes variaciones: Ran se cargó con 0,1 μmol (5 μM) de GDP libre y sin marcar (Sigma-Aldrich), y se utilizó 0,007 μM (0,35 μCi) de [^{35}S]GTPgammaS libre (GE Healthcare SJ-1320) en cada reacción para dar lugar al intercambio. En este caso se midió la radiactividad incorporada a los tiempos indicados en las figuras.

16. REACTIVOS Y ESTIMULACIONES

Todos los reactivos usados fueron obtenidos de las compañías Sigma o Merck.

La sincronización de las células HEK-293T en la fase G2/M se realizó añadiendo nocodazol a una concentración de 83 nM al medio de cultivo, y manteniéndolo durante 24 h.

La producción de daño en el ADN se realizó mediante la irradiación de células con radiación ultravioleta o ionizante, o mediante la adicción al medio de cultivo del agente radiomimético bleomicina a 20 µg/mL durante 1 h, doxorubicina 1µM durante 1 h, o etopósido 50 µM 1h.

La radiación ultravioleta se aplicó con un “Stratalinker” (Stratagene) directamente sobre las placas con las células a las que se les retiró previamente el medio de cultivo y la tapa.

La radiación ionizante se realizó introduciendo las placas con las células en cultivo en un irradiador de muestras biológicas modelo Gammacell 1000 Elite, que contiene una fuente de ¹³⁷Cs emisor de radiación gamma de E = 662 keV, capaz de suministrar una tasa de dosis absorbida de 2,43 Gy/minuto (en fecha 8/9/2006).

17. ANTICUERPOS USADOS

Tabla 9. Anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Dilución de uso	Casa comercial
VC	VRK1 humana (aa 267-396)	Policlonal conejo	WB 1:2000 IF 1:250 IP 1:500	Producción propia
VE	VRK1 humana	Policlonal conejo	WB 1:2000 IF 1:250 IP 1:500	Producción propia
1F6 (2mg/mL)	VRK1 humana (aa 333-396)	Monoclonal ratón	WB 1:10000 IF 1:1000 IP 1:500	Producción propia
1B5	VRK1 humana	Monoclonal ratón	WB 1:1000 IF 1:100	Producción propia
Anti-VRK2	VRK2 humana	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:100	Producción propia
β -actina (AC-15)	β -actina	Monoclonal ratón	WB 1:5000	Sigma
HA.11	Epítipo HA	Monoclonal ratón	WB 1:1000 IP 1:150	Covance
Anti-myc	Epítipo myc	Policlonal conejo	WB 1:1000 IP 1:150	Upstate
Anti-myc	Epítipo myc	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Upstate
Anti-AU5	Epítipo AU5	Monoclonal ratón	IP 1:150	Babco
Anti-FLAG	Epítipo FLAG	Policlonal conejo	IP 1:150	Sigma
GFP (B2)	GFP	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
GST (B-14)	GST	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
Ran (Clon 20)	Ran	Monoclonal ratón	WB 1:5000 IF 1:100	BD Biosciences-Pharmingen
RCC1 (N19)	RCC1	Policlonal cabra	WB 1:1000	Santa Cruz
Phospho-H3(Thr3)	P-Thr3-H3	Policlonal conejo	WB 1:5000	Upstate
Phospho-H3(Ser10) (MC463)	P-Ser10-H3	Policlonal conejo	WB 1:2000	Upstate
Phospho-53BP1 (Ser25/29)	P-Ser25/29-53BP1	Policlonal conejo	WB 1:1000	Cell Signaling

Tabla 9 (Continuación). Anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Dilución de uso	Casa comercial
53BP1 (H-300)	53BP1	Policlonal conejo	WB 1:400 IF 1:50 IP 1:100	Santa Cruz
γH2AX	P-Ser139-H2AX	Monoclonal ratón	IF: 2 μ g/mL	Upstate
Phospho-p53(Thr18)	P-Thr18-p53	Policlonal conejo	WB 1:500	Cell Signaling
Phospho-p53(Ser15)	P-Ser15-p53	Policlonal conejo	WB 1:750	Santa Cruz
p53 (DO-1)	p53 (aa 11-25)	Monoclonal ratón	WB 1:500	Santa Cruz
p53 (Pab-1801)	p53 (aa 32-79)	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
Phospho-Thr68-Chk2	P-Thr68-Chk2	Policlonal conejo	WB 1:1000	Cell Signaling
Chk2	Chk2	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Cell Signaling
Phospho-Ser1981-ATM	P-Ser1981-ATM	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Calbiochem
ATM	ATM	Policlonal conejo	WB 1:50 IP 1:20	Calbiochem
Anti-goat HRP	IgG de cabra	conejo	1:40000	Everest Biotech
Anti-mouse HRP	IgG de ratón	oveja	1:10000	Amersham
Anti-rabbit HRP	IgG de conejo	cabra	1:10000	Sigma
FluoroLinkCy2 anti-mouse (abs. 489 nm, em. 506 nm)	IgG de ratón	cabra	1:500	Amersham
FluoroLinkCy3 anti-mouse (abs. 550 nm, em. 570 nm)	IgG de ratón	cabra	1:500	Amersham
FluoroLinkCy2 anti-rabbit (abs. 489 nm, em. 506 nm)	IgG de conejo	cabra	1:500	Amersham
FluoroLinkCy3 anti-rabbit (abs. 550 nm, em. 570 nm)	IgG de conejo	Cabra	1:500	Amersham

18. CONSTRUCCIONES DE ADN RECOMBINANTE

Tabla 10. Construcciones de ADN recombinante

Construcción	Vector	Inserto	Uso	Procedencia
pCEFL-HA-VRK1	pCEFL-HA	VRK1	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Laboratorio
pCEFL-HA-VRK1(K179E)	pCEFL-HA	VRK1(K179E)(Quinasa inactiva)	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Laboratorio
pCEFL-HA-VRK1(E313G)	pCEFL-HA	VRK1(E313G)	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Este trabajo
pCEFL-HA-VRK1(E313G/K314I)	pCEFL-HA	VRK1(E313G/K314I)	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Este trabajo
pCDNA3.1-VRK1-myc	pCDNA3.1	VRK1	Expresión eucariota con epítipo myc en carboxilo	Laboratorio
pCDNA3.1-VRK1-N-myc	pCDNA3.1	VRK1-N (aa 1-332)	Expresión eucariota con epítipo myc en carboxilo	Laboratorio
pGFP-VRK1-C	pEGFP-C1	VRK1-C (aa 267-396)	Expresión eucariota fusionado a GFP en carboxilo	Laboratorio
pCEFL-HA-VRK2A	pCEFL-HA	VRK2A	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Laboratorio
pCEFL-HA-VRK2B	pCEFL-HA	VRK2B	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Laboratorio
pCEFL-HA-VRK3	pCEFL-HA	VRK3	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	Laboratorio
pCEFL-GST-VRK1	pCEFL-GST	VRK1	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Este trabajo
pCEFL-GST-VRK1-C	pCEFL-GST	VRK1-C (aa 267-396)	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Este trabajo
pCEFL-GST-VRK2B	pCEFL-GST	VRK2B	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Laboratorio
pCEFL-GST-VRK2-N	pCEFL-GST	VRK2-N (aa 1-320)	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Laboratorio
pCEFL-GST-VRK2A-C1	pCEFL-GST	VRK2A-C1 (aa 256-508)	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Laboratorio
pCEFL-GST-VRK2A-C2	pCEFL-GST	VRK2A-C2 (aa 364-508)	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Laboratorio
pCEFL-GST-VRK2B-C	pCEFL-GST	VRK2B-C (aa 256-397)	Expresión eucariota fusionado a GST en amino	Laboratorio

Tabla 10 (Continuación). Construcciones de ADN recombinante

Construcción	Vector	Inserto	Uso	Procedencia
GST-VRK1	pGEX-4T1	VRK1	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	Laboratorio
GST-VRK1(K179E)	pGEX-4T1	VRK1(K179E)(Quinasa inactiva)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	Laboratorio
VRK1-His	pET23A	VRK1	Expresión de proteína de fusión con epítipo 6xHis en carboxi en <i>E. coli</i>	Laboratorio
GST-VRK2B	pGEX-4T1	VRK2B	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	Laboratorio
GST-VRK3	pGEX-4T1	VRK3	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	Laboratorio
GST-Ran	pGEX-4T	Ran	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	C. Walczak (Indiana University, EEUU)
GST-Ran(T24N)	pGEX-4T	Ran(T24N)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	C. Walczak (Indiana University, EEUU)
GST-Ran(L43E)	pGEX-4T	Ran(L43E)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	C. Walczak (Indiana University, EEUU)
RCC1-His	pET15b	RCC1	Expresión de proteína de fusión con epítipo 6xHis en amino en <i>E. coli</i>	Y. Zheng (Howard Hughes Institute, Baltimore, EEUU)
GFP -RCC1	pEGFP-N3	RCC1	Expresión eucariota fusionado a GFP en amino	Y. Zheng (Howard Hughes Institute, Baltimore, EEUU)
GST-Rac	pGEX-4T	Rac	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	A. Castro (Lab. 2, CIC)
GST-cdc42(Q61L)	pGEX-4T	Cdc42(Q61L)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	A. Castro (Lab. 2, CIC)
GST-p53(1-85)	pGEX-2T	p53 (aa 1-85)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	DW Meek (Dundee, UK)
53BP1-HA	pCMH6K	53BP1	Expresión eucariota con epítipo HA en amino	K. Iwabuchi (Kanazawa Medical University, Japón)

Tabla 10 (Continuación). Construcciones de ADN recombinante

Construcción	Vector	Inserto	Uso	Procedencia
GST-53BP1 (1-346)	pGEX-3x	53BP1 (aa 1- 346)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
GST-53BP1 (339-671)	pGEX-3x	53BP1 (aa 339 - 671)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
GST-53BP1 (628 - 962)	pGEX-3x	53BP1 (aa 628 - 962)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
GST-53BP1 (956 - 1354)	pGEX-3x	53BP1 (aa 956 - 1354)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
GST-53BP1 (1331 - 1664)	pGEX-3x	53BP1 (aa 1331 - 1664)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
GST-53BP1 (1657 - 1972)	pGEX-3x	53BP1 (aa 1657 - 1972)	Expresión de proteína de fusión con GST en <i>E. coli</i>	J. Chen (Mayo Clinic, Rochester, EEUU)
ATM-HA	pBJ-1-HA	ATM	Expresión eucariota con epítipo HA	R. Nevins (Howard Hughes Institute, Durham, EEUU)
ATM-HA KD	pBJ-1-HA	ATM KD (Quinasa inactiva)	Expresión eucariota con epítipo HA	R. Nevins (Howard Hughes Institute, Durham, EEUU)
pCDNA3-FLAG-ATR	pCDNA3-FLAG	ATR	Expresión eucariota con epítipo FLAG	R.T. Abraham (Duke University, EEUU)
pCDNA3-FLAG-ATR KD	pCDNA3-FLAG	ATR(D2475A) (Quinasa inactiva)	Expresión eucariota con epítipo FLAG	R.T. Abraham (Duke University, EEUU)
Chk2(A347)-FLAG	pCMV-FLAG	Chk2(A347) (Quinasa inactiva)	Expresión eucariota con epítipo FLAG	T. Halazonetis (University of Pennsylvania, EEUU)

19. LÍNEAS CELULARES

Tabla 11. Líneas celulares

Línea	Organismo	Procedencia	Características	Medio cultivo
HEK-293T	Humano	Embrionarias de riñón	Contiene el antígeno T grande de SV40	DMEM + 10% FBS
MCF7	Humano	Adenocarcinoma de mama		RPMI + 10% FBS
HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix		DMEM + 10% FBS
A549	Humano	Carcinoma de pulmón		RPMI + 10% FBS
HT-144	Humano	Melanoma, tejido subcutáneo metastásico	ATM -/-	DMEM + 10% FBS

20. OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabla 12. Oligonucleótidos

Denominación	Secuencia (5'-3')	Uso
siVRK1-02 sense (Dharmacon)	CAAGGAACCUGGUGUUGAAUU	ARN de interferencia para VRK1 humana
siVRK1-02 antisense (Dharmacon)	UUCAACACCAGGUUCCUUGUU	ARN de interferencia para VRK1 humana
VRK1(E313G) forward	GGAAACAGTGAAATTACTAGACTACACTG GAAAACCTCTTTATGAAAATTTACGTGA	Mutagénesis VRK1(E313G)
VRK1(E313G) reverse	GTCACGTAAATTTTCATAAAGAGGTTTTCC AGTGTAGTCTAGTAATTTCACTGTTTC	Mutagénesis VRK1(E313G)
VRK1(E313G/K314I) forward	GGAAACAGTGAAATTACTAGACTACACTG GAATACCTCTTTATGAAAATTTACGTGA	Mutagénesis VRK1(E313G/K314I)
VRK1(E313G/K314I) reverse	GTCACGTAAATTTTCATAAAGAGGTATTC CAGTGTAGTCTAGTAATTTCACTGTTTC	Mutagénesis VRK1(E313G/K314I)

Abreviaturas (1)

53BP1: del inglés “p53 Binding Protein 1”
aa: aminoácido(s)
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AMP: del inglés “Adenosine MonoPhosphate”
ARN: Ácido RiboNucleico
ATF: del inglés “Activating Transcription Factor”
ATM: del inglés “Ataxia-Telangiectasia Mutated”
ATP: del inglés “Adenosine TriPhosphate”
ATR: del inglés “ATM and Rad3-related”
BAB: motivo básico-ácido-básico
BAF: del inglés “Barrier to Autointegration Factor”
BRCT: BRCA1 C-terminal
BSA: del inglés “Bovine Serum Albumin”
CAS: del inglés “Cellular Apoptosis Susceptibility”
CHAPS: del inglés “3-[(3-CHolamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate”
Chk: del inglés “Checkpoint kinase”
CIAP: del inglés “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase”
CK1: del inglés “Casein Kinase 1”
CK2: del inglés “Casein Kinase 2”
CREB: del inglés “cAMP-Response Element-Binding”
CRM1: del inglés “Chromosome-Region Maintenance protein-1”
Da: Dalton
DAPI: del inglés “4',6'-DiAmidino-2-Phenil Indol”
DDR: del inglés “DNA Damage Response”
DMEM: del inglés “Dubelco's modified- Minimum Essential Medium”
DNA-PK: del inglés “DNA-dependent Protein Kinase”
dpm: desintegraciones por minuto
DSB: del inglés “Double Strand Break”
DTT: Ditiotreitól
EDTA: del inglés “EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid”
EQ: Ensayo quinasa
ERK: del inglés “Extracellular signal-Regulated Kinase”
FBS: del inglés “Fetal Bovine Serum”
FHA: del inglés: dominio “Forkhead-Associated”
Fig.: figura
GAP: del inglés “GTPase-Activating Protein”
GDP: del inglés “Guanosine DiPhosphate”
GEF: del inglés “Guanine nucleotide Exchange Factor”
GFP: del inglés “Green Fluorescent Protein”
GST: Glutación-S-Transferasa
GTP: del inglés “Guanosine TriPhosphate”
Gy: Gray
HA: hemaglutinina
HEK-293T: del inglés “Human Embryonic Kidney-293T”
hSMG-1: del inglés “human Suppressor of Morphogenesis in Genitalia-1”
HUPO: del inglés “Human Proteome Organisation”
IB: inmunoblot o *Western blot*
IF: inmunofluorescencia
IP: inmunoprecipitación
IP+EQ: inmunoprecipitación más ensayo quinasa
IPG: del inglés “Immobilized pH Gradient”
IPTG: IsoPropil-β-D-TioGalactopiranósido

Abreviaturas (2)

IR: del inglés “Ionizing Radiation”, radiación ionizante
JNK: del inglés “c-Jun N-terminal Kinase”
Kb: Kilobase
KD: del inglés “kinase dead”, quinasa inactiva
KDa: Kilodalton
LB: medio “Luria bertani”
MALDI-TOF: del inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight”
MAP: del inglés “Mitogen-Activated Protein”
MBq: Megabequerelios
MDC1: del inglés “Mediator of DNA-damage Checkpoint protein-1”
mg: miligramo
mL: mililitro
mm: milímetro
M: molar
mM: milimolar
MS: del inglés “Mass Spectrometry”, espectrometría de masas
m/v: relación peso volumen
m/z: relación masa carga
NBS1: del inglés “Nijmegen Breakage Syndrome protein-1”
NER: del inglés “Nucleotide Excision Repair”
NES: del inglés “Nuclear Export Signal”
ng: nanogramo
NHEJ : del inglés “Nonhomologous End-Joining”
NHK-1 : del inglés “Nucleosomal Histone Kinase 1”
NLS: del inglés “Nuclear Localization Signal”
nM: nanomolar
nm: nanometro
nmol: nanomol
PBS: del inglés “Phosphate Buffer Salinum”
PCR: del inglés “Polimerase Chain Reaction”
PI3K: del inglés “Phosphatidyl Inositol 3-kinase”
PIKK: del inglés “PI3K-related Kinase”
pM: picomolar
pmol: picomol
PMSF: del inglés “Phenyl Methyl Sulfonyl Phluoride”
ppm: partes por millón
PVDF: del inglés “PolyVinyliDene Fluoride”
Ran: del inglés “Ras-related nuclear”
RanBD: del inglés “Ran Binding Domain”
RanBP: del inglés “Ran Binding Protein”
RCC1: del inglés “Regulator of Chromosome Condensation 1”
r.p.m.: revoluciones por minuto
RPMI: medio de cultivo, del inglés “Roswell Park Memorial Institute”
SDS: del inglés “Sodium Dodecyl Sulfate”
SDS-PAGE: del inglés “SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis”
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TBS-T: Tris Buffer Salino y Tween-20
TCEP: del inglés “Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine”
TopBP1: del inglés “Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1”
UV : radiación Ultravioleta
V: voltio
VRK: del inglés “*Vaccinia*-Related Kinase”

Abreviaturas (3)

v/v: relación volumen/volumen
wt: del inglés “wild type”, silvestre
x g: veces la fuerza de la gravedad
 γ H2AX: H2AX fosforilada en Ser139
 μ Ci: microcurio
 μ g : microgramo
 μ L: microlitro
 μ m: micrómetro
 μ M: micromolar
 $^{\circ}$ C: grado centígrado

Bases Nitrogenadas

A	adenina	C	citosa
U	uracilo	G	guanina
T	timidina		

Aminoácidos

alanina	ala	A	isoleucina	ile	I
arginina	arg	R	leucina	leu	L
asparragina	asn	N	lisina	lys	K
ácido aspártico	asp	D	metionina	met	M
cisteína	cys	C	prolina	pro	P
fenilalanina	phe	F	serina	ser	S
glicina	gly	G	tirosina	tyr	Y
glutamina	gln	Q	treonina	thr	T
ácido glutámico	glu	E	triptófano	try	W
histidina	his	H	valina	val	V

Bibliografía

- Abraham, R.T. (2004) PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 883-887.
- Adams, K.E., Medhurst, A.L., Dart, D.A. and Lakin, N.D. (2006) Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene*, **25**, 3894-3904.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H. and Canman, C.E. (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 5934-5936.
- Aihara, H., Nakagawa, T., Yasui, K., Ohta, T., Hirose, S., Dhomae, N., Takio, K., Kaneko, M., Takeshima, Y., Muramatsu, M. and Ito, T. (2004) Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev*, **18**, 877-888.
- Albee, A.J., Tao, W. and Wiese, C. (2006) Phosphorylation of maskin by Aurora-A is regulated by RanGTP and importin beta. *J Biol Chem*, **281**, 38293-38301.
- Alsheich-Bartok, O., Haupt, S., Alkalay-Snir, I., Saito, S., Appella, E. and Haupt, Y. (2008) PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage. *Oncogene*, **27**, 3653-3661.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. and Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, **433**, 77-83.
- Anderson, L., Henderson, C. and Adachi, Y. (2001) Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*, **21**, 1719-1729.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N. and Yeh, L.S. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, **32**, D115-119.
- Arnaoutov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J. and Dasso, M. (2005) Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol*, **7**, 626-632.
- Arnesen, T., Van Damme, P., Polevoda, B., Helsens, K., Evjenth, R., Colaert, N., Varhaug, J.E., Vandekerckhove, J., Lillehaug, J.R., Sherman, F. and Gevaert, K. (2009) Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8157-8162.
- Arnez, J.G., Dock-Bregeon, A.C. and Moras, D. (1999) Glycyl-tRNA synthetase uses a negatively charged pit for specific recognition and activation of glycine. *J Mol Biol*, **286**, 1449-1459.
- Arthur, J.S. (2008) MSK activation and physiological roles. *Front Biosci*, **13**, 5866-5879.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. and Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, **25**, 25-29.
- Ashman, K. and Villar, E.L. (2009) Phosphoproteomics and cancer research. *Clin Transl Oncol*, **11**, 356-362.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W. and Fornerod, M. (1999) RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6276-6285.
- Azuma, Y., Renault, L., Garcia-Ranea, J.A., Valencia, A., Nishimoto, T. and Wittinghofer, A. (1999) Model of the ran-RCC1 interaction using biochemical and docking experiments. *J Mol Biol*, **289**, 1119-1130.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499-506.
- Banham, A.H. and Smith, G.L. (1992) Vaccinia virus gene B1R encodes a 34-kDa serine/threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions. *Virology*, **191**, 803-812.

- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-1677.
- Barcia, R., Lopez-Borges, S., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2002) Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch Biochem Biophys*, **399**, 1-5.
- Bassing, C.H. and Alt, F.W. (2004) The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 781-796.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J. and Lukas, J. (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol*, **173**, 195-206.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J. and Lukas, J. (2005) Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J Cell Biol*, **170**, 201-211.
- Berger, S.L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**, 407-412.
- Berkovich, E., Monnat, R.J., Jr. and Kastan, M.B. (2007) Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol*, **9**, 683-690.
- Bhoomik, A. and Ronai, Z. (2008) ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle*, **7**, 2341-2345.
- Bilbao-Cortes, D., Hetzer, M., Langst, G., Becker, P.B. and Mattaj, I.W. (2002) Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms. *Curr Biol*, **12**, 1151-1156.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bischoff, F.R. and Gorlich, D. (1997) RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett*, **419**, 249-254.
- Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. and Ponstingl, H. (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2587-2591.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. and Ponstingl, H. (1995) Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *Embo J*, **14**, 705-715.
- Bischoff, F.R., Maier, G., Tilz, G. and Ponstingl, H. (1990) A 47-kDa human nuclear protein recognized by antikinetochore autoimmune sera is homologous with the protein encoded by RCC1, a gene implicated in onset of chromosome condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8617-8621.
- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. (1991a) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, **354**, 80-82.
- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. (1991b) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10830-10834.
- Blanco, S., Klimcakova, L., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2006) The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *Febs J*, **273**, 2487-2504.
- Blanco, S., Santos, C. and Lazo, P.A. (2007) Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol Cell Biol*, **27**, 7273-7283.
- Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Santos, C.R. and Lazo, P.A. (2008) Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS ONE*, **3**, e1660.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J. and Mer, G. (2006) Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, **127**, 1361-1373.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J. and Alessi, D.R. (2006) Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol*, **16**, 443-452.

- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Boyle, K.A. and Traktman, P. (2004) Members of a novel family of mammalian protein kinases complement the DNA-negative phenotype of a vaccinia virus ts mutant defective in the B1 kinase. *J Virol*, **78**, 1992-2005.
- Brown, E.J. and Baltimore, D. (2003) Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*, **17**, 615-628.
- Burden, D.A. and Osheroff, N. (1998) Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 139-154.
- Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Khanna, K. and Delia, D. (2004) Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*, **23**, 7691-7700.
- Bush, G.L., Tassin, A.M., Friden, H. and Meyer, D.I. (1991) Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *J Biol Chem*, **266**, 13811-13814.
- Cam, H. and Dynlacht, B.D. (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, **3**, 311-316.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, **281**, 1677-1679.
- Cann, K.L. and Hicks, G.G. (2007) Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol*, **85**, 663-674.
- Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E. and Mattaj, I.W. (1999) Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*, **400**, 178-181.
- Carey, K.L., Richards, S.A., Lounsbury, K.M. and Macara, I.G. (1996) Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid receptor chimera that the Ran/TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import. *J Cell Biol*, **133**, 985-996.
- Caudron, M., Bunt, G., Bastiaens, P. and Karsenti, E. (2005) Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*, **309**, 1373-1376.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, **5**, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C. and Nussenzweig, A. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Thibier, C., Guarguaglini, G., Marchetti, E., Di Fiore, B. and Lavia, P. (2004) Importin beta is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells. *J Cell Sci*, **117**, 6511-6522.
- Cimprich, K.A. and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 616-627.
- Clarke, P.R., Klebe, C., Wittinghofer, A. and Karsenti, E. (1995) Regulation of Cdc2/cyclin B activation by Ran, a Ras-related GTPase. *J Cell Sci*, **108** (Pt 3), 1217-1225.
- Clarke, P.R. and Zhang, C. (2008) Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 464-477.
- Clarkson, W.D., Kent, H.M. and Stewart, M. (1996) Separate binding sites on nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp1p. *J Mol Biol*, **263**, 517-524.
- Cohen, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, **268**, 5001-5010.
- Conti, E., Muller, C.W. and Stewart, M. (2006) Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 237-244.

- Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J.D., D'Eustachio, P. and Rush, M.G. (1993) Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature*, **366**, 585-587.
- Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2002) Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*, **22**, 874-885.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E. and Fernandez-Capetillo, O. (2006) ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med*, **203**, 297-303.
- Cullen, C.F., Brittle, A.L., Ito, T. and Ohkura, H. (2005) The conserved kinase NHK-1 is essential for mitotic progression and unifying acentrosomal meiotic spindles in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*, **171**, 593-602.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chapman, J.R. and Jackson, S.P. (2008) Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep*, **9**, 795-801.
- Chen, T., Muratore, T.L., Schaner-Tooley, C.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Macara, I.G. (2007) N-terminal alpha-methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis. *Nat Cell Biol*, **9**, 596-603.
- Cheung, P., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, **103**, 263-271.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer* **8**, 512-522.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S. and Higgins, J.M. (2005) The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev*, **19**, 472-488.
- Darragh, J., Soloaga, A., Beardmore, V.A., Wingate, A.D., Wiggin, G.R., Peggie, M. and Arthur, J.S. (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem J*, **390**, 749-759.
- Dasso, M., Nishitani, H., Kornbluth, S., Nishimoto, T. and Newport, J.W. (1992) RCC1, a regulator of mitosis, is essential for DNA replication. *Mol Cell Biol*, **12**, 3337-3345.
- Dasso, M., Seki, T., Azuma, Y., Ohba, T. and Nishimoto, T. (1994) A mutant form of the Ran/TC4 protein disrupts nuclear function in *Xenopus laevis* egg extracts by inhibiting the RCC1 protein, a regulator of chromosome condensation. *Embo J*, **13**, 5732-5744.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R. and Wyman, C. (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell*, **8**, 1129-1135.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, **26**, 3279-3290.
- Dhillon, A.S. and Kolch, W. (2002) Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys*, **404**, 3-9.
- Di Fiore, B., Ciciarello, M. and Lavia, P. (2004) Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle*, **3**, 305-313.
- DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J. and Halazonetis, T.D. (2002) 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol*, **4**, 998-1002.
- Downey, M. and Durocher, D. (2006) gammaH2AX as a checkpoint maintenance signal. *Cell Cycle*, **5**, 1376-1381.

- Drivas, G.T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, M.G. and D'Eustachio, P. (1990) Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol*, **10**, 1793-1798.
- Dunn, C., Wiltshire, C., MacLaren, A. and Gillespie, D.A. (2002) Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal*, **14**, 585-593.
- Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A.R. and Jackson, S.P. (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell*, **4**, 387-394.
- Edwards, A.M., Kus, B., Jansen, R., Greenbaum, D., Greenblatt, J. and Gerstein, M. (2002) Bridging structural biology and genomics: assessing protein interaction data with known complexes. *Trends Genet*, **18**, 529-536.
- Eliezer, Y., Argaman, L., Rhie, A., Doherty, A.J. and Goldberg, M. (2009) The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. *J Biol Chem*, **284**, 426-435.
- Elston, T., Wang, H. and Oster, G. (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, **391**, 510-513.
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F.R., Petosa, C., Mattaj, I.W. and Kutay, U. (2001) RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep*, **2**, 926-932.
- Englmeier, L., Olivo, J.C. and Mattaj, I.W. (1999) Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol*, **9**, 30-41.
- Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R. and Knapp, S. (2008) UnPAKing the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci*, **33**, 394-403.
- Falek, J., Coates, J. and Jackson, S.P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, **434**, 605-611.
- Farnsworth, C.L. and Feig, L.A. (1991) Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol*, **11**, 4822-4829.
- Fedorov, O., Marsden, B., Pogacic, V., Rellos, P., Muller, S., Bullock, A.N., Schwaller, J., Sundstrom, M. and Knapp, S. (2007) A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20523-20528.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., Carpenter, P.B., Bonner, W.M., Chen, J. and Nussenzweig, A. (2002) DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*, **4**, 993-997.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H. and Allis, C.D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, **438**, 1116-1122.
- FitzGerald, J.E., Grenon, M. and Lowndes, N.F. (2009) 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans*, **37**, 897-904.
- Fournier, M.V., Martin, K.J., Kenny, P.A., Khaja, K., Bosch, I., Yaswen, P. and Bissell, M.J. (2006) Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer Res*, **66**, 7095-7102.
- Freist, W., Logan, D.T. and Gauss, D.H. (1996) Glycyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **377**, 343-356.
- Frey, S., Richter, R.P. and Gorlich, D. (2006) FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science*, **314**, 815-817.
- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. and Stratton, M.R. (2004) A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*, **4**, 177-183.
- Gaestel, M., Mengel, A., Bothe, U. and Asadullah, K. (2007) Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation. *Curr Med Chem*, **14**, 2214-2234.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J. and Khanna, K.K. (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM)

- p and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation.
- J Biol Chem*
- ,
- 278**
- , 14806-14811.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B. and Superti-Furga, G. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, **440**, 631-636.
- Giamas, G., Stebbing, J., Vorgias, C.E. and Knippschild, U. (2007) Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics*, **8**, 1005-1016.
- Goldfinger, L.E. (2008) Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst*, **4**, 293-299.
- Gorjanacz, M., Klerkx, E.P., Galy, V., Santarella, R., Lopez-Iglesias, C., Askjaer, P. and Mattaj, I.W. (2007) Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *Embo J*, **26**, 132-143.
- Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. (1997) A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol*, **138**, 65-80.
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. and Prehn, S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*, **5**, 383-392.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-660.
- Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I.W. (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, **104**, 83-93.
- Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E. and Lavia, P. (2000) Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth Differ*, **11**, 455-465.
- Guermah, M., Palhan, V.B., Tackett, A.J., Chait, B.T. and Roeder, R.G. (2006) Synergistic functions of SII and p300 in productive activator-dependent transcription of chromatin templates. *Cell*, **125**, 275-286.
- Halawani, D. and Latterich, M. (2006) p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell*, **22**, 713-717.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.
- Hao, Y. and Macara, I.G. (2008) Regulation of chromatin binding by a conformational switch in the tail of the Ran exchange factor RCC1. *J Cell Biol*, **182**, 827-836.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K.K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K.L. and Hiraoka, Y. (2001) BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci*, **114**, 4575-4585.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, **28**, 739-745.
- Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, T.C., Gruss, O.J. and Mattaj, I.W. (2000) GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol Cell*, **5**, 1013-1024.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H. and Peters, J.M. (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, **438**, 1176-1180.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-374.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.

- Huen, M.S. and Chen, J. (2008) The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res*, **18**, 8-16.
- Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B. and Chen, J. (2007) RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*, **131**, 901-914.
- Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, **50**, 823-829.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.
- Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell*, **88**, 333-346.
- Hutchins, J.R., Moore, W.J., Hood, F.E., Wilson, J.S., Andrews, P.D., Swedlow, J.R. and Clarke, P.R. (2004) Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis. *Curr Biol*, **14**, 1099-1104.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, **432**, 406-411.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K. and Kamiya, K. (2007) DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol*, **27**, 7028-7040.
- Ivanovska, I., Khandan, T., Ito, T. and Orr-Weaver, T.L. (2005) A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. *Genes Dev*, **19**, 2571-2582.
- Iwabuchi, K., Bartel, P.L., Li, B., Marraccino, R. and Fields, S. (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6098-6102.
- Iwabuchi, K., Li, B., Massa, H.F., Trask, B.J., Date, T. and Fields, S. (1998) Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem*, **273**, 26061-26068.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Gorlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, **16**, 6535-6547.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **8**, 37-45.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P. and Moens, U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal*, **16**, 1211-1227.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S. and Wittinghofer, A. (1993) Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J Biol Chem*, **268**, 923-929.
- Jonnalagadda, V.S., Matsuguchi, T. and Engelward, B.P. (2005) Interstrand crosslink-induced homologous recombination carries an increased risk of deletions and insertions. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 594-605.
- Joseph, J., Liu, S.T., Jablonski, S.A., Yen, T.J. and Dasso, M. (2004) The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol*, **14**, 611-617.
- Joseph, J., Tan, S.H., Karpova, T.S., McNally, J.G. and Dasso, M. (2002) SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol*, **156**, 595-602.
- Jowsey, P., Morrice, N.A., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Toth, R. and Rouse, J. (2007) Characterisation of the sites of DNA damage-induced 53BP1 phosphorylation catalysed by ATM and ATR. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1536-1544.
- Jowsey, P.A., Doherty, A.J. and Rouse, J. (2004) Human PTIP facilitates ATM-mediated activation of p53 and promotes cellular resistance to ionizing radiation. *J Biol Chem*, **279**, 55562-55569.
- Kalab, P., Pralle, A., Isacoff, E.Y., Heald, R. and Weis, K. (2006) Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*, **440**, 697-701.

- Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. (2002) Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, **295**, 2452-2456.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231-237.
- Kang, T.H. and Kim, K.T. (2006) Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nat Cell Biol*, **8**, 863-869.
- Kang, T.H. and Kim, K.T. (2008) VRK3-mediated inactivation of ERK signaling in adult and embryonic rodent tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 49-58.
- Kang, T.H., Park, D.Y., Choi, Y.H., Kim, K.J., Yoon, H.S. and Kim, K.T. (2007) Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **27**, 8533-8546.
- Kang, T.H., Park, D.Y., Kim, W. and Kim, K.T. (2008) VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *J Cell Sci*, **121**, 3035-3041.
- Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J. and Felsher, D.W. (2003) Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9974-9979.
- Kastan, M.B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**, 316-323.
- Kemmeren, P., van Berkum, N.L., Vilo, J., Bijma, T., Donders, R., Brazma, A. and Holstege, F.C. (2002) Protein interaction verification and functional annotation by integrated analysis of genome-scale data. *Mol Cell*, **9**, 1133-1143.
- Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J.E., Durocher, D., Greenblatt, J.F. and Krogan, N.J. (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*, **439**, 497-501.
- Keryer, G., Di Fiore, B., Celati, C., Lechtreck, K.F., Mogensen, M., Delouree, A., Lavia, P., Bornens, M. and Tassin, A.M. (2003) Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell*, **14**, 4260-4271.
- Klebe, C., Bischoff, F.R., Ponstingl, H. and Wittinghofer, A. (1995a) Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry*, **34**, 639-647.
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. and Goody, R.S. (1995b) The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543-12552.
- Klerkx, E.P., Lazo, P.A. and Askjaer, P. (2009) Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family. *Histol Histopathol*, **24**, 749-759.
- Knauer, S.K., Bier, C., Habtemichael, N. and Stauber, R.H. (2006) The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep*, **7**, 1259-1265.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J. and Stoter, M. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, **17**, 675-689.
- Kobe, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, **6**, 388-397.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., Pelletier, L., Jackson, S.P. and Durocher, D. (2007) Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, **318**, 1637-1640.
- Kornbluth, S., Dasso, M. and Newport, J. (1994) Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J Cell Biol*, **125**, 705-719.
- Kurz, E.U., Douglas, P. and Lees-Miller, S.P. (2004) Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **279**, 53272-53281.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680.
- Lakin, N.D. and Jackson, S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-7655.
- Lamond, A.I. and Sleeman, J.E. (2003) Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol*, **13**, R825-828.
- Lancaster, O.M., Cullen, C.F. and Ohkura, H. (2007) NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the Drosophila oocyte nucleus. *J Cell Biol*, **179**, 817-824.
- Lavin, M.F. (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 759-769.
- Lee, H., Kwak, H.J., Cho, I.T., Park, S.H. and Lee, C.H. (2009) S1219 residue of 53BP1 is phosphorylated by ATM kinase upon DNA damage and required for proper execution of DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 32-36.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, **308**, 551-554.
- Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M. and Stewart, M. (2005) Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*, **435**, 693-696.
- Li, D.W., Yang, Q., Chen, J.T., Zhou, H., Liu, R.M. and Huang, X.T. (2005) Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell Res*, **15**, 120-126.
- Li, H.Y., Wirtz, D. and Zheng, Y. (2003) A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo. *J Cell Biol*, **160**, 635-644.
- Li, H.Y. and Zheng, Y. (2004a) Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. *Genes Dev*, **18**, 512-527.
- Li, H.Y. and Zheng, Y. (2004b) The production and localization of GTP-bound ran in mitotic mammalian tissue culture cells. *Cell Cycle*, **3**, 993-995.
- Li, L. and Zou, L. (2005) Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J Cell Biochem*, **94**, 298-306.
- Li, S., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D.S., Li, N., Martinez, M., Rual, J.F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S.L., Zhang, L.V., Berriz, G.F., Jacotot, L., Vaglio, P., Reboul, J., Hirozane-Kishikawa, T., Li, Q., Gabel, H.W., Elewa, A., Baumgartner, B., Rose, D.J., Yu, H., Bosak, S., Sequerra, R., Fraser, A., Mango, S.E., Saxton, W.M., Strome, S., Van Den Heuvel, S., Piano, F., Vandenhaute, J., Sardet, C., Gerstein, M., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K.C., Harper, J.W., Cusick, M.E., Roth, F.P., Hill, D.E. and Vidal, M. (2004) A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*, **303**, 540-543.
- Lin, S., Chen, W. and Broyles, S.S. (1992) The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase. *J Virol*, **66**, 2717-2723.
- Lindsay, M.E., Holaska, J.M., Welch, K., Paschal, B.M. and Macara, I.G. (2001) Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol*, **153**, 1391-1402.
- Livingstone, M., Ruan, H., Weiner, J., Clauser, K.R., Strack, P., Jin, S., Williams, A., Greulich, H., Gardner, J., Venere, M., Mochan, T.A., DiTullio, R.A., Jr., Moravcevic, K., Gorgoulis, V.G., Burkhardt, A. and Halazonetis, T.D. (2005) Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage. *Cancer Res*, **65**, 7533-7540.
- Lopez-Borges, S. and Lazo, P.A. (2000) The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*, **19**, 3656-3664.
- Lopez-Sanchez, I., Sanz-Garcia, M. and Lazo, P.A. (2009) Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Mol Cell Biol*, **29**, 1189-1201.

- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W. and Chen, J. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*, **21**, 187-200.
- Lounsbury, K.M. and Macara, I.G. (1997) Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces Ran GTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta. *J Biol Chem*, **272**, 551-555.
- Lounsbury, K.M., Richards, S.A., Carey, K.L. and Macara, I.G. (1996) Mutations within the Ran/TC4 GTPase. Effects on regulatory factor interactions and subcellular localization. *J Biol Chem*, **271**, 32834-32841.
- Lu, B. and Bishop, C.E. (2003) Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod*, **69**, 161-168.
- Lu, C., Shi, Y., Wang, Z., Song, Z., Zhu, M., Cai, Q. and Chen, T. (2008) Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. *FEBS Lett*, **582**, 2703-2708.
- Lu, C., Zhu, F., Cho, Y.Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W.Y., Bode, A.M. and Dong, Z. (2006) Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell*, **23**, 121-132.
- Lu, K.P. and Hunter, T. (1995) Evidence for a NIMA-like mitotic pathway in vertebrate cells. *Cell*, **81**, 413-424.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J. and Lukas, J. (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol*, **5**, 255-260.
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S.P., Bartek, J. and Lukas, J. (2004) Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *Embo J*, **23**, 2674-2683.
- Macara, I.G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-594, table of contents.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J. (2007) RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, **131**, 887-900.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-1429.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2007) Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **17**, 60-65.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A. and Yaffe, M.B. (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, **302**, 636-639.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Marshall, M.S. (1993) The effector interactions of p21ras. *Trends Biochem Sci*, **18**, 250-254.
- Martin, K.J., Patrick, D.R., Bissell, M.J. and Fournier, M.V. (2008) Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS One*, **3**, e2994.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P. and Elledge, S.J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316**, 1160-1166.

- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. and Elledge, S.J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10389-10394.
- Mattaj, I.W. and Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*, **67**, 265-306.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- McCoy, C.E., Campbell, D.G., Deak, M., Bloomberg, G.B. and Arthur, J.S. (2005) MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J*, **387**, 507-517.
- McGowan, C.H. and Russell, P. (2004) The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 629-633.
- McKay, M.M. and Morrison, D.K. (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, **26**, 3113-3121.
- Melander, F., Bekker-Jensen, S., Falck, J., Bartek, J., Mailand, N. and Lukas, J. (2008) Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *J Cell Biol*, **181**, 213-226.
- Melchionna, R., Chen, X.B., Blasina, A. and McGowan, C.H. (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, **2**, 762-765.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. and Gerace, L. (1993) Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol*, **123**, 1649-1659.
- Miles, R.R., Crockett, D.K., Lim, M.S. and Elenitoba-Johnson, K.S. (2005) Analysis of BCL6-interacting proteins by tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1898-1909.
- Mirzoeva, O.K. and Petrini, J.H. (2003) DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res*, **1**, 207-218.
- Mochan, T.A., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr. and Halazonetis, T.D. (2003) 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res*, **63**, 8586-8591.
- Mochan, T.A., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr. and Halazonetis, T.D. (2004) 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 945-952.
- Monti, M., Orru, S., Pagnozzi, D. and Pucci, P. (2005) Interaction proteomics. *Biosci Rep*, **25**, 45-56.
- Moore, M.S. and Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, **365**, 661-663.
- Moore, W., Zhang, C. and Clarke, P.R. (2002) Targeting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells. *Curr Biol*, **12**, 1442-1447.
- Morales, J.C., Xia, Z., Lu, T., Aldrich, M.B., Wang, B., Rosales, C., Kellems, R.E., Hittelman, W.N., Elledge, S.J. and Carpenter, P.B. (2003) Role for the BRCA1 C-terminal repeats (BRCT) protein 53BP1 in maintaining genomic stability. *J Biol Chem*, **278**, 14971-14977.
- Morrison, D.K. and Davis, R.J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 91-118.
- Moses, R.E. (2001) DNA damage processing defects and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**, 41-68.
- Munoz, I.M., Jowsey, P.A., Toth, R. and Rouse, J. (2007) Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5312-5322.
- Muslimovic, A., Nystrom, S., Gao, Y. and Hammarsten, O. (2009) Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PLoS One*, **4**, e5859.
- Myers, J.S. and Cortez, D. (2006) Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem*, **281**, 9346-9350.
- Nachury, M.V., Maresca, T.J., Salmon, W.C., Waterman-Storer, C.M., Heald, R. and Weis, K. (2001) Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*, **104**, 95-106.

- Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. and Macara, I.G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, **292**, 1540-1543.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M.H. and Shimane, M. (1997) Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, **45**, 327-331.
- Nicolas, F.J., Moore, W.J., Zhang, C. and Clarke, P.R. (2001) XMog1, a nuclear ran-binding protein in *Xenopus*, is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* mog1p that co-operates with RanBP1 to control generation of Ran-GTP. *J Cell Sci*, **114**, 3013-3023.
- Nichols, R.J. and Traktman, P. (2004) Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family. *J Biol Chem*, **279**, 7934-7946.
- Nichols, R.J., Wiebe, M.S. and Traktman, P. (2006) The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Mol Biol Cell*, **17**, 2451-2464.
- Nishijo, K., Chen, Q.R., Zhang, L., McCleish, A.T., Rodriguez, A., Cho, M.J., Prajapati, S.I., Gelfond, J.A., Chisholm, G.B., Michalek, J.E., Aronow, B.J., Barr, F.G., Randall, R.L., Ladanyi, M., Qualman, S.J., Rubin, B.P., LeGallo, R.D., Wang, C., Khan, J. and Keller, C. (2009) Credentialing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, **69**, 2902-2911.
- Nishimoto, T., Eilen, E. and Basilico, C. (1978) Premature of chromosome condensation in a ts DNA- mutant of BHK cells. *Cell*, **15**, 475-483.
- Nolen, B., Taylor, S. and Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*, **15**, 661-675.
- Norbury, C.J. and Hickson, I.D. (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 367-401.
- O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A. (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet*, **7**, 45-54.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. and Nishimoto, T. (1989) The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol*, **109**, 1389-1397.
- Orchard, S., Salwinski, L., Kerrien, S., Montecchi-Palazzi, L., Oesterheld, M., Stumpflen, V., Ceol, A., Chatr-aryamontri, A., Armstrong, J., Woollard, P., Salama, J.J., Moore, S., Wojcik, J., Bader, G.D., Vidal, M., Cusick, M.E., Gerstein, M., Gavin, A.C., Superti-Furga, G., Greenblatt, J., Bader, J., Uetz, P., Tyers, M., Legrain, P., Fields, S., Mulder, N., Gilson, M., Niepmann, M., Burgoon, L., De Las Rivas, J., Prieto, C., Perreau, V.M., Hogue, C., Mewes, H.W., Apweiler, R., Xenarios, I., Eisenberg, D., Cesareni, G. and Hermjakob, H. (2007) The minimum information required for reporting a molecular interaction experiment (MIMIx). *Nat Biotechnol*, **25**, 894-898.
- Ory, S., Zhou, M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D. and Morrison, D.K. (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*, **13**, 1356-1364.
- Palm, W. and de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, **42**, 301-334.
- Pappin, D.J., Hojrup, P. and Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*, **3**, 327-332.
- Partridge, J.J., Lopreiato, J.O., Jr., Latterich, M. and Indig, F.E. (2003) DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol Biol Cell*, **14**, 4221-4229.
- Paschal, B.M., Delphin, C. and Gerace, L. (1996) Nucleotide-specific interaction of Ran/TC4 with nuclear transport factors NTF2 and p97. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7679-7683.
- Paul, A.L., Liu, L., Laughner, B., McClung, S., Chen, S. and Ferl, R. (2009) Comparative Interactomics: Analysis of Arabidopsis 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. *J Proteome Res*.

- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, **10**, 886-895.
- Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Peng, A. and Chen, P.L. (2003) NFB1, like 53BP1, is an early and redundant transducer mediating Chk2 phosphorylation in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **278**, 8873-8876.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. and Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I.W. and Muller, C.W. (2004) Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell*, **16**, 761-775.
- Pike, A.C., Rellos, P., Niesen, F.H., Turnbull, A., Oliver, A.W., Parker, S.A., Turk, B.E., Pearl, L.H. and Knapp, S. (2008) Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *Embo J*, **27**, 704-714.
- Polioudaki, H., Markaki, Y., Kourmouli, N., Dialynas, G., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B. and Georgatos, S.D. (2004) Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett*, **560**, 39-44.
- Porter, F.W., Bochkov, Y.A., Albee, A.J., Wiese, C. and Palmenberg, A.C. (2006) A picornavirus protein interacts with Ran-GTPase and disrupts nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12417-12422.
- Prigent, C. and Dimitrov, S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*, **116**, 3677-3685.
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. and Chen, J. (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol*, **153**, 613-620.
- Ren, M., Coutavas, E., D'Eustachio, P. and Rush, M.G. (1994) Effects of mutant Ran/TC4 proteins on cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **14**, 4216-4224.
- Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P. and Rush, M.G. (1993) Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J Cell Biol*, **120**, 313-323.
- Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A. and Wittinghofer, A. (2001) Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell*, **105**, 245-255.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M. and Wittinghofer, A. (1998) The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature*, **392**, 97-101.
- Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., King, M.C. and Levy-Lahad, E. (2009) Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am J Hum Genet*, **85**, 281-289.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692.
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. and Gorlich, D. (1999) The translocation of transport-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol*, **9**, 47-50.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M. and Gorlich, D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J*, **17**, 6587-6598.
- Richards, S.A., Carey, K.L. and Macara, I.G. (1997) Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science*, **276**, 1842-1844.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.

- Romer, L., Klein, C., Dehner, A., Kessler, H. and Buchner, J. (2006) p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 6440-6460.
- Rupnik, A., Grenon, M. and Lowndes, N. (2008) The MRN complex. *Curr Biol*, **18**, R455-457.
- Saito, S., Yamaguchi, H., Higashimoto, Y., Chao, C., Xu, Y., Fornace, A.J., Jr., Appella, E. and Anderson, C.W. (2003) Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *J Biol Chem*, **278**, 37536-37544.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **73**, 39-85.
- Santos, C.R., Rodriguez-Pinilla, M., Vega, F.M., Rodriguez-Peralto, J.L., Blanco, S., Sevilla, A., Valbuena, A., Hernandez, T., van Wijnen, A.J., Li, F., de Alava, E., Sanchez-Céspedes, M. and Lazo, P.A. (2006) VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res*, **4**, 177-185.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. and Allis, C.D. (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, **285**, 886-891.
- Sazer, S. (1996) The search for the primary function of the Ran GTPase continues. *Trends Cell Biol*, **6**, 81-85.
- Sazer, S. (2005) The view from Awaji island: past, present, and future of RCC1 and the Ran GTPase system. *Dev Cell*, **9**, 729-733.
- Sazer, S. and Dasso, M. (2000) The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci*, **113** (Pt 7), 1111-1118.
- Scheeff, E.D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S. and Manning, G. (2009) Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure*, **17**, 128-138.
- Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W. and Wittinghofer, A. (1995) Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature*, **374**, 378-381.
- Scherf, U., Pastan, I., Willingham, M.C. and Brinkmann, U. (1996) The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2670-2674.
- Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M. and Fersht, A.R. (2002) Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol*, **323**, 491-501.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. and Eick, D. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*, **29**, 397-406.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A. and Halazonetis, T.D. (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, **151**, 1381-1390.
- Seino, H., Hisamoto, N., Uzawa, S., Sekiguchi, T. and Nishimoto, T. (1992) DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. *J Cell Sci*, **102** (Pt 3), 393-400.
- Semizarov, D., Kroeger, P. and Fesik, S. (2004) siRNA-mediated gene silencing: a global genome view. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3836-3845.
- Sengupta, S. and Harris, C.C. (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 44-55.
- Sevilla, A., Santos, C.R., Barcia, R., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2004a) c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene*, **23**, 8950-8958.

- Sevilla, A., Santos, C.R., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2004b) Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK. *J Biol Chem*, **279**, 27458-27465.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**, E131-136.
- Shechter, D., Costanzo, V. and Gautier, J. (2004) Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 901-908.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. and Noda, T. (1994) Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J Biol Chem*, **269**, 30049-30055.
- Shiio, Y., Eisenman, R.N., Yi, E.C., Donohoe, S., Goodlett, D.R. and Aebersold, R. (2003) Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J Am Soc Mass Spectrom*, **14**, 696-703.
- Shiloh, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci*, **31**, 402-410.
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R. and Wilson, K.L. (2001) LAP2 binds to BAF.DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *Embo J*, **20**, 1754-1764.
- Sillje, H.H., Nagel, S., Korner, R. and Nigg, E.A. (2006) HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Curr Biol*, **16**, 731-742.
- Smith, A., Brownawell, A. and Macara, I.G. (1998) Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol*, **8**, 1403-1406.
- Stewart, M. (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 195-208.
- Stokes, M.P., Rush, J., Macneill, J., Ren, J.M., Sprott, K., Nardone, J., Yang, V., Beausoleil, S.A., Gygi, S.P., Livingstone, M., Zhang, H., Polakiewicz, R.D. and Comb, M.J. (2007) Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19855-19860.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J. and Jackson, S.P. (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, **123**, 1213-1226.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.
- Talcott, B. and Moore, M.S. (2000) The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin alpha3/Qip. *J Biol Chem*, **275**, 10099-10104.
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A.P., Dai, W. and Darzynkiewicz, Z. (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, **71**, 648-661.
- Taylor, C.F., Paton, N.W., Lilley, K.S., Binz, P.A., Julian, R.K., Jr., Jones, A.R., Zhu, W., Apweiler, R., Aebersold, R., Deutsch, E.W., Dunn, M.J., Heck, A.J., Leitner, A., Macht, M., Mann, M., Martens, L., Neubert, T.A., Patterson, S.D., Ping, P., Seymour, S.L., Souda, P., Tsugita, A., Vandekerckhove, J., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., Wilkins, M.R., Xenarios, I., Yates, J.R., 3rd and Hermjakob, H. (2007) The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat Biotechnol*, **25**, 887-893.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 523-533.
- Teufel, D.P., Bycroft, M. and Fersht, A.R. (2009) Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2. *Oncogene*, **28**, 2112-2118.

- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**, 152-157.
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J. and Abraham, R.T. (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev*, **14**, 2989-3002.
- Toledo, F. and Wahl, G.M. (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, **6**, 909-923.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B. and Burma, S. (2009) Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep*, **10**, 629-635.
- Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J., Jr. and Mir, L.M. (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res*, **53**, 5462-5469.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350.
- Traxler, P., Bold, G., Buchdunger, E., Caravatti, G., Furet, P., Manley, P., O'Reilly, T., Wood, J. and Zimmermann, J. (2001) Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Med Res Rev*, **21**, 499-512.
- Trieselmann, N. and Wilde, A. (2002) Ran localizes around the microtubule spindle in vivo during mitosis in Drosophila embryos. *Curr Biol*, **12**, 1124-1129.
- Tsai, M.Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003) A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **5**, 242-248.
- Turenne, G.A., Paul, P., Laflair, L. and Price, B.D. (2001) Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene*, **20**, 5100-5110.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. and Shiloh, Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J*, **22**, 5612-5621.
- Valbuena, A., Blanco, S., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2008a) The C/H3 domain of p300 is required to protect VRK1 and VRK2 from their downregulation induced by p53. *PLoS ONE*, **3**, e2649.
- Valbuena, A., Castro-Obregón, S. and Lazo, P.A. (2009 (enviado)) Induction of DRAM by p53 in response to DNA damage mediates the downregulation of VRK1, a p53 activator.
- Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I. and Lazo, P.A. (2008b) Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PLoS ONE*, **3**, e1642.
- Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I., Vega, F.M., Sevilla, A., Sanz-Garcia, M., Blanco, S. and Lazo, P.A. (2007a) Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch Biochem Biophys*, **465**, 219-226.
- Valbuena, A., Suarez-Gauthier, A., Lopez-Rios, F., Lopez-Encuentra, A., Blanco, S., Fernandez, P.L., Sanchez-Céspedes, M. and Lazo, P.A. (2007b) Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer*, **58**, 303-309.
- Valbuena, A., Vega, F.M., Blanco, S. and Lazo, P.A. (2006) p53 Downregulates Its Activating Vaccinia-Related Kinase 1, Forming a New Autoregulatory Loop. *Mol Cell Biol*, **26**, 4782-4793.
- van Dam, H. and Castellazzi, M. (2001) Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, **20**, 2453-2464.
- Vega, F.M., Gonzalo, P., Gaspar, M.L. and Lazo, P.A. (2003) Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett*, **544**, 176-180.
- Vega, F.M., Sevilla, A. and Lazo, P.A. (2004) p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol Cell Biol*, **24**, 10366-10380.

- Vernell, R., Helin, K. and Muller, H. (2003) Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem*, **278**, 46124-46137.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999a) Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
- Vetter, I.R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J. and Wittinghofer, A. (1999b) Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, **398**, 39-46.
- Wang, B. and Elledge, S.J. (2007) Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20759-20763.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P. and Elledge, S.J. (2007) Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*, **316**, 1194-1198.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B. and Elledge, S.J. (2002) 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, **298**, 1435-1438.
- Wang, Q., Song, C. and Li, C.C. (2004) Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol*, **146**, 44-57.
- Wang, W., Budhu, A., Forgues, M. and Wang, X.W. (2005) Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*, **7**, 823-830.
- Wang, Z.G., White, P.S. and Ackerman, S.H. (2001) Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem*, **276**, 30773-30778.
- Ward, I., Kim, J.E., Minn, K., Chini, C.C., Mer, G. and Chen, J. (2006) The tandem BRCT domain of 53BP1 is not required for its repair function. *J Biol Chem*, **281**, 38472-38477.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G. and Chen, J. (2003) Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem*, **278**, 19579-19582.
- Watrin, E. and Peters, J.M. (2009) The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *Embo J*, **28**, 2625-2635.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109.
- Weis, K. (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 328-335.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-451.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, **118**, 843-846.
- Wiebe, M.S., Nichols, R.J., Molitor, T.P., Lindgren, J.K. and Traktman, P. (2009) Mice Deficient in the Serine/Threonine Protein Kinase VRK1 Are Infertile Due to a Progressive Loss of Spermatogonia. *Biol Reprod*.
- Wiebe, M.S. and Traktman, P. (2007) Poxviral B1 kinase overcomes barrier to autointegration factor, a host defense against virus replication. *Cell Host Microbe*, **1**, 187-197.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M.S., Adam, S.A., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001) Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, **291**, 653-656.
- Wilde, A. and Zheng, Y. (1999) Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, **284**, 1359-1362.
- Wilson, K.A. and Stern, D.F. (2008) NFB1/MDC1, 53BP1 and BRCA1 have both redundant and unique roles in the ATM pathway. *Cell Cycle*, **7**, 3584-3594.
- Wu, J., Prindle, M.J., Dressler, G.R. and Yu, X. (2009) PTIP Regulates 53BP1 and SMC1 at the DNA Damage Sites. *J Biol Chem*, **284**, 18078-18084.
- Xia, F., Canovas, P.M., Guadagno, T.M. and Altieri, D.C. (2008) A survivin-ran complex regulates spindle formation in tumor cells. *Mol Cell Biol*, **28**, 5299-5311.

- Xia, Z., Morales, J.C., Dunphy, W.G. and Carpenter, P.B. (2001) Negative cell cycle regulation and DNA damage-inducible phosphorylation of the BRCT protein 53BP1. *J Biol Chem*, **276**, 2708-2718.
- Yamauchi, M., Oka, Y., Yamamoto, M., Niimura, K., Uchida, M., Kodama, S., Watanabe, M., Sekine, I., Yamashita, S. and Suzuki, K. (2008) Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 405-417.
- Yang, G., Li, Q., Ren, S., Lu, X., Fang, L., Zhou, W., Zhang, F., Xu, F., Zhang, Z., Zeng, R., Lottspeich, F. and Chen, Z. (2009) Proteomic, Functional and Motif-Based Analysis of C-terminal Src Kinase (Csk)-interacting Proteins. *Proteomics*.
- Yokoyama, H., Gruss, O.J., Rybina, S., Caudron, M., Schelder, M., Wilm, M., Mattaj, I.W. and Karsenti, E. (2008) Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *J Cell Biol*, **180**, 867-875.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U. and et al. (1995) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature*, **376**, 184-188.
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Dunphy, W.G. (2007) Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. *J Biol Chem*, **282**, 17501-17506.
- You, Z., Bailis, J.M., Johnson, S.A., Dilworth, S.M. and Hunter, T. (2007) Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **9**, 1311-1318.
- Yu, X. and Chen, J. (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol*, **24**, 9478-9486.
- Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G. and Chen, J. (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, **302**, 639-642.
- Zgheib, O., Huyen, Y., DiTullio, R.A., Jr., Snyder, A., Venere, M., Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D. (2005) ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol*, **76**, 119-122.
- Zgheib, O., Pataky, K., Brugger, J. and Halazonetis, T.D. (2009) An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, **29**, 1050-1058.
- Zhang, C. and Clarke, P.R. (2000) Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in Xenopus egg extracts. *Science*, **288**, 1429-1432.
- Zhang, C., Goldberg, M.W., Moore, W.J., Allen, T.D. and Clarke, P.R. (2002) Concentration of Ran on chromatin induces decondensation, nuclear envelope formation and nuclear pore complex assembly. *Eur J Cell Biol*, **81**, 623-633.
- Zhang, C., Hughes, M. and Clarke, P.R. (1999) Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in Xenopus egg extracts. *J Cell Sci*, **112 (Pt 14)**, 2453-2461.
- Zhang, H., Wang, Q., Kajino, K. and Greene, M.I. (2000) VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells. *DNA Cell Biol*, **19**, 253-263.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis Pedro Lazo-Zbikowski el haberme dado la oportunidad de trabajar con él, ya que no podría haber encontrado un mejor apoyo, estímulo y dedicación por su parte para la realización de este trabajo.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio 4, a los actuales y a los que ya se han ido, por su trabajo, ideas y comentarios, que han sido esenciales para este trabajo, y de gran ayuda para mí. En especial, gracias a Virginia por su trabajo y su contribución a esta tesis.

Así mismo, quiero agradecer a todas las personas del Centro de Investigación del Cáncer que me han ayudado de alguna manera aportándome ideas, asesoramiento, y parte de su tiempo. En especial quiero agradecer la contribución a este trabajo de las componentes del Servicio de Proteómica de este centro.

Por último, gracias a mi familia, mis padres, mi hermano, Isa, y sobre todo a Alberto. Gracias por vuestro apoyo, vuestra comprensión, vuestro cariño y vuestros consejos, que con un punto de vista “más allá del mundo de la ciencia” han sido siempre los más valiosos para mí. Gracias a Juan Ángel por ayudarme con la portada de la tesis.

Parte del trabajo mostrado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en el siguiente artículo científico, del cual el doctorando es el principal autor:

Marta Sanz-García, Inmaculada López-Sánchez, and Pedro A. Lazo (2008)
“Proteomics Identification of Nuclear Ran GTPase as an Inhibitor of Human VRK1 and VRK2 (Vaccinia-related Kinase) Activities”. **Mol. Cell. Proteomics**, 2008 Nov; 7 (11): 2199-2214.