



Centro de Investigación del Cáncer
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
(CIC-USAL)

Implicación de la quinasa humana VRK1 en enfermedades neurodegenerativas

TESIS DOCTORAL

Elena Martín Doncel

Salamanca, España

2019



D. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Implicación de la quinasa humana VRK1 en enfermedades neurodegenerativas” presentada por la licenciada en biología Elena Martín Doncel, 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 28 de junio de 2019

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena

Esta memoria ha sido realizada siendo ELENA MARTÍN DONCEL beneficiaria de una beca pre-doctoral otorgada por la Junta de Castilla y León, "Ayudas para financiar la contratación predoctoral de personal investigador" (2015-2019).

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

Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-44810R)

Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-57791-REDC)

Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI002U14)

Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI001U16)

Ministerio de Economía y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación (SAF2016-75774R)

A todas las
personas que sufren
enfermedades “raras”,
Y en especial a **Elena**,
una luchadora.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. Las proteína quinasas	3
1.1. La familia VRK	4
1.2. Estructura de las quinasas VRK	5
1.3. La quinasa humana VRK1	7
1.3.1. Implicación de VRK1 en proliferación y progresión del ciclo celular ..8	
1.3.2. Regulación de factores de transcripción por VRK1	9
1.3.3. Implicación de VRK1 en la remodelación de la cromatina	11
1.3.4. VRK1 en la fragmentación del aparato de Golgi	11
1.3.5. Implicación de VRK1 en el ensamblaje de la envuelta nuclear	12
1.3.6. Implicación de VRK1 en respuesta a daño en el ADN (DDR)	12
1.4. La quinasa VRK2	13
1.5. La quinasa VRK3	14
1.6. Regulación de las quinasas VRK	14
1.7. Ratones <i>knock-out</i> de VRK1 y VRK2	15
1.8. Las quinasas VRK en neurodegeneración	16
2. Ataxia espínocerebelosa tipo I	18
2.1. Ataxina1	19
2.1.1. Tracto de poliglutaminas	20
2.1.2. Funciones de Ataxina1	21
2.1.3. Implicación de VCP en SCA1	23
2.2. Modificaciones postraduccionales en Ataxina1 <i>wt</i> y <i>expandida</i>	24
2.3. SCA1 en otros tejidos	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Técnicas de manipulación del ADN	33
1.1. Obtención y purificación del ADN plasmídico	33
1.2. Cuantificación del ADN plasmídico	34
1.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa	34
1.4. Generación de vectores de ADN recombinante	34
1.5. Transformación de plásmidos en <i>E.coli</i>	35
1.6. Mutagénesis sitio-dirigida	35
2. Técnicas de manipulación del ARN	36
2.1. Purificación del ARN	36
2.2. Evaluación de la calidad del ARN	37
2.3. RT-PCR cuantitativa	37
3. Técnicas de manipulación de proteínas	38
3.1. Purificación de proteínas de fusión con GST (Glutati6n S-Transferasa) ..8	
3.2. Electroforesis de geles <i>SDS-PAGE</i>	39
3.3. Tinci6n con azul de <i>Coomassie</i>	39

3.4. Transferencia húmeda y <i>Western blot</i> de extractos proteicos	40
3.5. Tinción con rojo <i>Ponceau S</i>	41
4. Líneas celulares	41
4.1. Cultivo de líneas celulares	41
4.2. Generación de líneas celulares estables	41
4.3. Clonación de célula única de líneas celulares estables	42
4.4. Ensayo de cierre de herida	42
5. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo monocapa	43
5.1. Transfección con <i>JetPEJ™</i>	43
5.1. Transfección con <i>Lipofectamine™</i>	43
6. Transducción viral	44
7. Extractos proteicos	45
7.1. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo	45
7.2. Fraccionamiento núcleo-citosol de extractos proteicos	45
7.3. Fraccionamiento mitocondria-citosol de extractos proteicos	46
8. Ensayos de interacción entre proteínas	46
8.1. Ensayos de coimmunoprecipitación	46
8.2. Ensayos de <i>Pull-Down</i>	47
9. Cromatografía líquida de exclusión molecular HPLC (<i>High-performance liquid chromatography</i>)	47
10. Inmunofluorescencia, microscopía confocal y microscopía de campo claro	48
11. Ensayos de actividad quinasa	49
11.1. Ensayos quinasa <i>in vitro</i> con ATP radiomarcado	49
11.2. Ensayos quinasa <i>in vitro</i> con ATP frío	50
12. Reactivos y estimulaciones	50
13. Estudios de predicción de estabilidad de estructura	51
14. Programas estadísticos	51

RESULTADOS. Sección A: Caracterización de las variantes patogénicas de VRK1 implicadas en neurodegeneración

1. Estudio de pacientes con neuropatías asociadas al gen <i>VRK1</i>	63
1.1. Cuadro clínico de pacientes	63
1.2. Frecuencia alélica de las variantes patogénicas	65
2. Caracterización de la estabilidad de las variantes patogénicas de VRK1	67
2.1. Los mutantes de VRK1 asociados a neurodegeneración presentan distinta estabilidad a nivel proteico en líneas celulares	67
2.2. Los mutantes de VRK1 asociados a neurodegeneración presentan distinta estabilidad a nivel estructural	69
3. Caracterización de la actividad quinasa de las variantes patogénicas de VRK1	75
3.1. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre sustratos cromatínicos	75

3.2. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre factores de transcripción implicados en daño en el ADN y en respuesta a estrés	77
3.3. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre proteínas implicadas en procesos específicos	79

4. Estudio del comportamiento de las variantes patogénicas de VRK1 mediante la generación de líneas celulares estables82

4.1. Los mutantes de VRK1 en heterocigosis con VRK1 <i>wild type</i> causan cambios en las características de las células	82
4.2. Los mutantes de VRK1 en homocigosis causan defectos en la progresión del ciclo celular y en la migración celular	87
4.3. Los mutantes de VRK1 en homocigosis no responden al tratamiento con doxorubicina	91
4.4. Los mutantes de VRK1 en homocigosis presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal	97

RESULTADOS. Sección B: Implicación de la quinasa humana VRK1 en la Ataxia espinocerebelosa tipo I 101

1. Interacción entre la quinasa humana VRK1 y la proteína causante de la Ataxia espinocerebelosa tipo I Ataxina1 103

1.1. VRK1 y Ataxina1 interactúan	103
1.2. VRK1 interactúa por la superficie de contacto entre su dominio quinasa y su cola C-terminal con Ataxina1	104
1.3. VRK1 interactúa más con Ataxina1 expandida que con Ataxina1 <i>wild type</i>	106
1.4. VRK1 interactúa en el núcleo con Ataxina1, siendo la interacción mayor con Ataxina1 expandida	108

2. Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre Ataxina1 111

2.1. El silenciamiento de VRK1 reduce los niveles proteicos de Ataxina1 ..	111
2.2. El silenciamiento de VRK1 no afecta a las inclusiones nucleares de Ataxina1	114
2.3. La caída de los niveles de Ataxina1 como consecuencia del silenciamiento de VRK1 no se recupera inhibiendo el proteasoma 26s ni la degradación lisosomal	117
2.4. VCP interactúa con Ataxina1 y colocaliza con los agregados de poliQ en el núcleo, colocalización que se pierde al silenciar VRK1	121
2.5. La cantidad de VCP mitocondrial disminuye en las células que presentan Ataxina1 expandida	127

3. VRK1 fosforila a Ataxina1 128

3.1. VRK1 fosforila a Ataxina1 <i>wt</i> pero no a Ataxina1 expandida	128
3.2. VRK1 interactúa más con el mutante no fosforilable S239A y menos con el fosfomimético S239D respecto a Ataxina1 <i>wild type</i>	129
3.3. Ataxina1 <i>wild type</i> y expandida son menos estables cuando pierden la fosforilación en la Ser239	132
3.4. VCP interactúa con los mutantes en fosforilación de Ataxina1 <i>wild type</i> y expandida pero no colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida fosfomimética ni no fosforilable	134

DISCUSIÓN. Sección A 139

1. Estudio de pacientes con neuropatías asociadas al gen <i>VRK1</i>	141
2. Caracterización de la estabilidad de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i>	142
3. Caracterización de la actividad quinasa de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i>	143
4. Estudio del comportamiento de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i> mediante la generación de líneas celulares estables	144
DISCUSIÓN. Sección B	149
1. Interacción entre la quinasa humana <i>VRK1</i> y la proteína causante de la Ataxia espinocerebelosa tipo I Ataxina1	149
2. Efecto del silenciamiento de <i>VRK1</i> sobre Ataxina1	151
3. <i>VRK1</i> fosforila a Ataxina1	155
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
AGRADECIMIENTOS	175

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para amplificación	52
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de VRK1 humana	53
Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de VRK1 murina	54
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de Ataxina1	54
Tabla 5: ARN de interferencia utilizado en este trabajo	54
Tabla 6: Anticuerpos utilizados en este trabajo	55
Tabla 7: Líneas celulares utilizadas en este trabajo	56
Tabla 8: Construcciones utilizadas en este trabajo	58
Tabla 9: Cuadro clínico de los pacientes que presentan mutaciones en el gen humano <i>VRK1</i>	64
Tabla 10: Frecuencia alélica de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i>	66
Tabla 11: Aminoácidos y bases nitrogenadas con sus abreviaturas correspondientes	xiii

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación del quinoma humano	4
Figura 2: Representación esquemática de la estructura de las proteínas de la familia VRK	6
Figura 3: Estructura tridimensional de VRK1 y representación esquemática de la misma	7
Figura 4: Localización subcelular de la quinasa VRK1	8
Figura 5: Esquema que representa los distintos sustratos de VRK1, así como el residuo diana de la quinasa	10
Figura 6: Esquema representativo de las mutaciones de VRK1 asociadas a neurodegeneración sobre los dominios de la quinasa	17
Figura 7: Representación esquemática de Ataxina1	19
Figura 8: Representación esquemática del dominio poliQ en condiciones nativas, y del dominio en la Ataxia espinocerebelosa tipo I	20
Figura 9: Red de interacción de Ataxina1 con otras proteínas	23
Figura 10: Representación esquemática del balance entre los complejos que Ataxina1 forma con RBM17 y con Capicua	26
Figura 11: Representación esquemática de las modificaciones postraduccionales que sufre Ataxina1	27
Figura 12: Los mutantes de VRK1 presentan distinta estabilidad a nivel proteico	68
Figura 13: Localización en la estructura de las variantes patogénicas de VRK1	69
Figura 14: Predicción de la estabilidad de los mutantes de VRK1	71
Figura 15: Estructura de VRK1 con la mutación desestabilizante G135R y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	72
Figura 16: Estructura de VRK1 con la mutación desestabilizante R321C y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	72
Figura 17: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante R89Q y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	73
Figura 18: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante H119R y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	73
Figura 19: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante R133C y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	74
Figura 20: Estructura de VRK1 con la mutación neutra V236M y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno	75
Figura 21: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre sustratos cromatínicos y autofosforilación	76
Figura 22: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre factores de transcripción	78
Figura 23: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre proteínas implicadas en procesos específicos	79
Figura 24: Nivel medio de autofosforilación y de transfosforilación de las variantes patogénicas de VRK1	81
Figura 25: Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murina en los clones de las líneas celulares estables	82
Figura 26: La línea celular estable mR133C presenta un gran tamaño y varios núcleos por célula	83
Figura 27: Cuantificación del área media y del número de divisiones celulares de las variantes patogénicas de mVRK1	84
Figura 28: Cuantificación de la velocidad y la distancia media recorrida por las líneas estables para las variantes patogénicas de mVRK1	85

Figura 29: La línea celular <i>HeLa</i> estable mR133C presenta una estructura anómala del citoesqueleto	86
Figura 30: Las líneas celulares estables para los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración presentan defectos en el ciclo celular	88
Figura 31: Las líneas celulares estables en homocigosis mG135R, mR133C y mH119R presentan defectos en migración	89
Figura 32: Los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración no son capaces de inducir la formación de focos de 53BP1 ni la acetilación de la histona H4 en el residuo K16 en respuesta a doxorubicina	92
Figura 33: Los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal	98
Figura 34: Ataxina1 y VRK1 interactúan	103
Figura 35: VRK1 y Ataxina1 interactúan por la superficie de contacto de la cola C-terminal con el dominio quinasa de VRK1	105
Figura 36: VRK1 interactúa más con Ataxina1 <i>expandida</i> que con Ataxina1 <i>wild type</i>	107
Figura 37: VRK1 y Ataxina1 interactúan en el núcleo, siendo mayor la interacción con Ataxina1[85Q]	109
Figura 38: El silenciamiento de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 debido a la ausencia de su actividad quinasa	111
Figura 39: El silenciamiento de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 <i>wt</i> y <i>expandida</i>	112
Figura 40: El silenciamiento de VRK1 provoca un aumento de expresión de Ataxina1	114
Figura 41: El silenciamiento de VRK1 produce una disminución de Ataxina1 en complejos de alto peso molecular	115
Figura 42: El silenciamiento de VRK1 no tiene efecto sobre las inclusiones nucleares de Ataxina1	116
Figura 43: Las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG se ubiquitinan	118
Figura 44: Mecanismo de acción de la cloroquina y la bafilomicina A en la formación de los autolisosomas	120
Figura 45: El tratamiento con el inhibidor de la vía autofágica/lisosomal cloroquina acumula Ataxina1 en las células, pero no recupera sus niveles tras silenciar VRK1	121
Figura 46: VCP y VRK1 interactúan, Ataxina1 y VCP interactúan, siendo la interacción mayor con Ataxina1 <i>expandida</i>	122
Figura 47: VCP colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 <i>expandida</i> , y tras el tratamiento con MG-132, colocaliza con todas las construcciones de Ataxina1	124
Figura 48: VCP colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 <i>expandida</i> de forma dependiente de VRK1	125
Figura 49: La cantidad de VCP mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial disminuyen por la presencia de Ataxina1 <i>expandida</i>	127
Figura 50: VRK1 fosforila a Ataxina1 <i>wt</i> frente a la <i>expandida</i>	129
Figura 51: VRK1 interactúa más con la Ataxina1 que no puede ser fosforilada en el residuo 239	130
Figura 52: VRK1 interactúa más con Ataxina1 cuando no puede ser fosforilada en la Ser239, independientemente del estado de fosforilación de la Ser776	132
Figura 53: Ataxina1 <i>wild type</i> y <i>expandida</i> son más inestables si no pueden ser fosforiladas en la Ser239, al igual que en la Ser776	133
Figura 54: VCP interactúa más con Ataxina1[30Q] no fosforilable en el residuo Ser239	134

Figura 55: VCP no colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida con el residuo Ser239 no fosforilable, ni fosfomimético	136
Figura 56: Los dobles mutantes en fosforilación de Ataxina1 <i>wild type</i> y expandida no forman inclusiones nucleares	137
Figura 57: Mapeo de la región de VRK1 que interacciona con Ataxina1	150
Figura 58: Representación gráfica de la hipótesis de la protección de VRK1 sobre la degradación de Ataxina1 vía proteasoma	154
Figura 59: VRK1 regula la estabilidad de Ataxina1 mediando la fosforilacion de S776 a través de la fosforilación de S239	157

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

μCi: microcurio	DMEM: <i>Dulbecco's modified – minimum essential medium</i>
μg: microgramo	DMSO: dimetil sulfóxido
μL: microlitro	DNA-PK: <i>DNA-dependent protein kinase</i>
μM: micromolar	dNTPs: <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
μm: micrómetro	DRAM: <i>damage-regulated autophagy modulator</i>
53BP1: <i>53 binding protein 1</i>	DRPLA: Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana
A.Golgi: Aparato de Golgi	DTT: ditioneítrito
aa: aminoácido	DYG: aspártico-tirosina-glicina
ADN: ácido desoxirribonucleico	EDTA: <i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
ADNc: ADN codificante	EFG: factor de crecimiento epidérmico
APP: <i>amyloid-precursor protein</i>	ERAD: <i>Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation</i>
APS: persulfato de amonio	ERK1/2: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ARN: ácido ribonucleico	ES: Sarcoma de Ewing
ARNm: ARN mensajero	EST: <i>expressed sequence tag</i>
ATF2: <i>activating transcription factor 2</i>	FBS: <i>fetal bovine serum</i>
ATM: Ataxia telangectasia mutado	FRDA: Ataxia de Friedrich
ATP: adenosina 5'trifosfato	FXTAS: <i>Síndrome de Tremor</i>
AXH: <i>Ataxin-1 and HMG-box protein 1</i>	GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
Aβ: β-amiloide	GFP: <i>green fluorescent protein</i>
BAB: <i>basic-acid-basic domain</i>	GST: Glutación-S-Transferasa
BAF: <i>barrier to autointegrator factor</i>	h: hora
Bax: <i>Bcl-2 associated x protein</i>	H2AX: Histona H2AX
BCL-XL: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>	HA: hemaglutinina
BSA: <i>bovine serum albumin</i>	HD: <i>Huntington disease</i>
CAMK-IV: <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV</i>	hVRK1: VRK1 humano
CBs: <i>Cajal bodies</i>	IF: inmunofluorescencia
CDK: quinasa dependiente de ciclina	IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
CIC: Capicua	JNK: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
CKI: <i>Casein kinase I</i>	kb: kilobase
COX-2: Ciclooxygenasa-2	kcal: kilocaloría
CREB: <i>cAMP response element binding</i>	kDa: kilodalton
Ct: <i>Cycle threshold</i>	LB: medio "Lysogeny Broth"
C-terminal: carboxilo terminal	LEM: <i>lamin-interacting proteins</i>
DAPI: <i>4',6', Diamidino-2-Phenil indol</i>	M: molar
DDR: respuesta al daño en el ADN	
DM1: <i>Distrofia miotónica tipo 1</i>	

m/v: relación masa/volumen
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
Mdm2: *Murine doble minute 2*
MEK1: *mitogen-activated protein kinase 1*
mg: miligramo
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
nm: nanómetro
mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*
mVRK1: VRK1 murino
NBS1: *Nijmegen Breakage syndrome protein 1*
NES: *nuclear export signal*
NFAT: *nuclear factor of activated T cells*
ng: nanogramos
NLS: *nuclear localization signal*
nM: nanomolar
N-terminal: amino terminal
°C: grado centígrado
OPMD: Distrofia muscular oculofaríngea
PBS: *phosphate buffer salinum*
PCH: *pontocerebellar hypoplasia*
PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*
PCR: *polymerase chain reaction*
PEI: polietilenimina
PKA: *protein kinase A*
PKC: *Protein kinase C*
Plk3: *polo-like kinase 3*
PMSF: *phenyl methyl sulfonyl fluoride*
poliQ: poliglutamina
PVDF: *Polyvinylidene fluoride*
RBM17: RNA binding Motif protein 17
RE: retículo endoplasmático
RT: *room temperature*
RT-PCR: *reverse transcriptase PCR*
SBMA: *Spinobulbar muscular atrophia*
SCA1: *Spinocerebellar ataxia type I*
SDS: *sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE: *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
SiARN: *small-interference RNA*
SMA: *spinal muscular atrophy*
SMA-PCH: Atrofia espinal muscular con hipoplasia pontocerebelar
SMN1: *survival motor neuron 1*
SMRT: *single molecule real time sequencing*
SUMO: *small ubiquitin-related modifier*
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TBS-T: Tris buffer salino con Tween-20
TE: Tris-EDTA
Ub: Ubiquitina
UPS: *Ubiquitin-proteasome system*
UV: radiación ultravioleta
V: voltio
v/v: relación volumen/volumen
VCP: *Valosin containing protein*
VEA: valina-glutamina-alanina
VHR: *Von Hippel-Lindau*
VRK: *Vaccinia related kinase*
WB: *Western blot*
wt: *wild type*

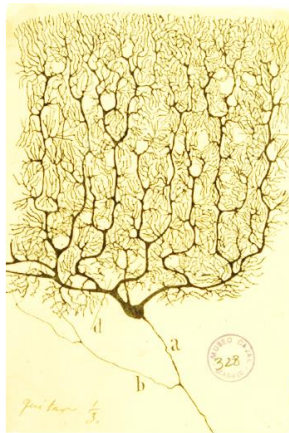
AMINOÁCIDOS		
Abreviatura	Aminoácido	
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

BASES NITROGENADAS	
A	Adenina
T	Timina
G	Guanina
C	Citosina
U	Uracilo

Tabla 11: Aminoácidos y bases nitrogenadas con sus abreviaturas correspondientes.

INTRODUCCIÓN

*“Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro”*



Santiago Ramón y Cajal

1. Las proteína quinasas

Las proteína quinasas son enzimas encargadas de catalizar la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas específicas. Es decir, llevan a cabo reacciones de fosforilación, que son modificaciones postraduccionales reversibles que median la transducción de señales en las células eucariotas mediante cambios en la conformación de las proteínas, en su localización, su interacción con otras moléculas, su estabilidad y su actividad (Manning, Whyte *et al.* 2002, Pawson & Scott 2005, Ubersax & Ferrell 2007). Por tanto, la fosforilación es un mecanismo implicado directamente en muchos procesos biológicos, entre ellos apoptosis, diferenciación celular, respuesta al daño en el ADN (DDR), crecimiento celular, metabolismo y migración (Shchemelinin, Seftc *et al.* 2006). Dada la importancia de estos procesos, la desregulación de las proteína quinasas provoca una gran variedad de enfermedades, entre ellas cáncer y neurodegeneración.

La fosforilación es un proceso reversible que debe ser regulado de forma muy precisa mediante fosfatasas, que eliminan el grupo fosfato de los aminoácidos fosforilados (Hunter 1995). En esta regulación, las diferencias en el dominio catalítico de las distintas quinasas son fundamentales. El dominio catalítico es una secuencia de 250-300 aminoácidos altamente conservada, que presenta secuencias específicas en los extremos amino y carboxilo críticas para la regulación positiva o negativa de la actividad de las quinasas (Hanks & Hunter 1995, Higgins 2001, Nolen, Taylor *et al.* 2004).

El análisis filogenético del quinoma humano se describió por primera vez en 1995 por Hanks y Hunter, seguido por Manning y colaboradores en 2002 (Hunter 1995, Manning, Plowman *et al.* 2002, Manning, Whyte *et al.* 2002). Hay 518 genes que codifican para proteína quinasas, lo que representa el 2% del genoma humano. Las quinasas fosforilan el 30% del total de proteínas celulares. El quinoma se divide en 8 grupos, que a su vez se encuentran divididos en familias. Uno de estos grupos es el de las caseín quinasas 1 (CK1), dentro del cual se encuentra la familia de las serina-treonina quinasas VRK (*Vaccinia-related kinase*) (Figura 1).

Introducción

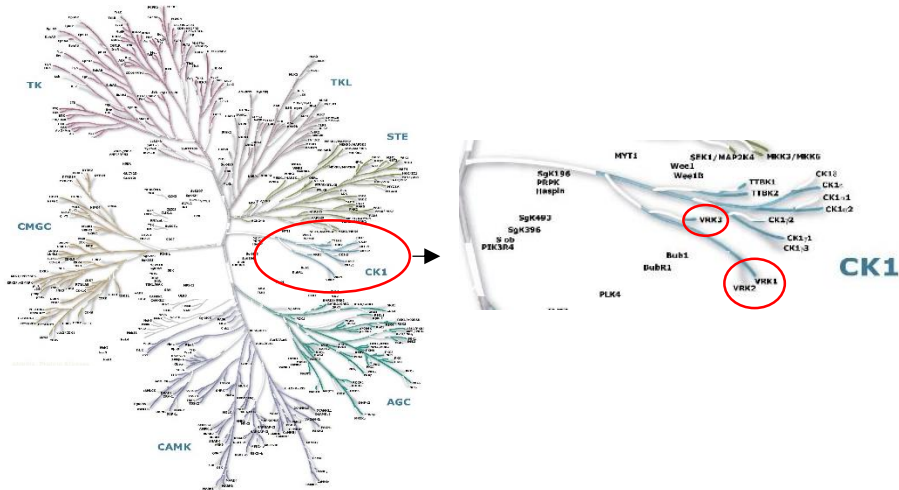


Figura 1: Representación del quinoma humano. Se muestra el quinoma humano completo, y en detalle el grupo de las caseín quinasa 1, al que pertenece la familia VRK. Imagen modificada de (Manning, Whyte *et al.* 2002).

1.1. La familia VRK

La familia VRK consta de tres miembros: VRK1, VRK2 y VRK3. VRK1 y VRK2 tienen actividad quinasa, mientras que VRK3 se describe como una pseudoquinasa sin actividad debido a sustituciones de aminoácidos en su dominio catalítico (Nichols & Traktman 2004).

En 1997 Nezu y colaboradores, buscando genes implicados en la regulación del ciclo celular utilizando una librería de ADNc enriquecida en genes fetales del hígado, diseñada para la caracterización de genes de tejidos altamente proliferativos, identificaron VRK1 y VRK2 (Nezu, Oku *et al.* 1997). Este grupo de quinasa recibió su nombre, *Vaccinia-related kinase*, debido a la alta homología con la quinasa B1R del virus *Vaccinia*, esencial para la replicación viral (Nichols & Traktman 2004). La primera quinasa descrita fue VRK1. B1R y VRK1 presentan un 39% de homología, de hecho la replicación del ADN de *Vaccinia* en virus carentes de B1R puede rescatarse mediante la expresión de VRK1 humano y murino (Traktman & Boyle 2004). La segunda en identificarse fue VRK2 a través de bases de datos EST, y la tercera, VRK3 (Vega, Gonzalo *et al.* 2003).

El análisis filogenético indica que los tres genes de VRK surgieron a partir de un único gen ancestral, que se duplicó dos veces en vertebrados; sin embargo, en invertebrados solamente aparece el primer gen original (Klerkx, Lazo *et al.* 2009). En levaduras no se

han identificado ortólogos, solo isoformas de CK1, como el gen *hrr25* de *Saccharomyces cerevisiae* y *hhp1* de *Schizosaccharomyces pombe* (Dhillon & Hoekstra 1994). En cambio, *Caenorhabditis elegans* presenta un gen ortólogo *vrk-1* que codifica una proteína VRK1, fundamental para la proliferación de las células germinales mediante la regulación de la actividad de CEP-1, que es ortólogo de *p53*. El silenciamiento de *vrk-1* mediante ARN de interferencia resulta letal para el embrión debido a defectos en la división celular (Kamath, Fraser *et al.* 2003, Waters, Yang *et al.* 2010). Además, en nemátodos se ha descrito que el ortólogo de VRK1 regula la fosforilación de BAF (*Barrier to autointegration factor*), importante para su correcta localización y participación en la formación de la envuelta nuclear (Gorjanacz, Klerkx *et al.* 2007). *Drosophila melanogaster* también presenta un ortólogo de VRK1, *nkh-1*, responsable de la fosforilación de la histona H2A en el residuo T119 durante la mitosis, y también regula parcialmente la localización de Aurora quinasa B en los centrómeros, y por tanto su correcta actividad durante las fases tempranas del ciclo (Aihara, Nakagawa *et al.* 2004, Brittle, Nanba *et al.* 2007, van der Waal, Saurin *et al.* 2012). NKH-1 fosforila a BAF para regular su afinidad por las proteínas de la cromatina y de la envuelta nuclear durante la formación del cariosoma (Lancaster, Cullen *et al.* 2007). En *Mus musculus* hay tres ortólogos igual que en humanos, VRK1 originalmente se llamó 51PK, fue descrita como una quinasa nuclear con alta capacidad de autofosforilarse en residuos de serina. Estas tres quinastas se expresan durante el desarrollo embrionario, manteniéndose en niveles elevados en tejidos altamente proliferativos, como en hígado, leucocitos, bazo y timo fetal (Zelko, Kobayashi *et al.* 1998). En ratas adultas el nivel de expresión de cada quinasa depende del tipo celular (Vega, Gonzalo *et al.* 2003). Finalmente, se han descrito ortólogos de VRK1 en otros organismos, como *Dario rerio*, *Xenopus laevis* o *Pan troglodytes*.

1.2. Estructura de las quinastas VRK

El gen *VRK1* se localiza en la región cromosómica 14q32, y codifica una proteína de 396 aminoácidos (Figura 2). VRK1 presenta su dominio catalítico (residuos 35-275) en el extremo N-terminal. Esta región contiene el dominio activo serina-treonina quinasa (173-185) y el dominio de unión al ATP (43-71). El extremo C-terminal contiene la señal de localización nuclear (356-360) (NLS) con señales de exportación nuclear (NES), y un dominio básico-ácido-básico (356-396) (BAB) conservado entre los genes ortólogos (Aihara, Nakagawa *et al.* 2004). Los tres miembros de VRK presentan alta homología en el extremo N-terminal (Lopez-Borges & Lazo 2000), pero el C-terminal es específico

● ● Introducción

de VRK1, por lo que se asume que es ésta la región reguladora de la quinasa (Lopez-Borges & Lazo 2000, Nichols & Traktman 2004).

El gen *VRK2*, con un 44% de homología con *VRK1*, se localiza en la región cromosómica 2p16 y codifica dos isoformas mediante *splicing* alternativo, VRK2A, de 508 aminoácidos, y VRK2B, de 397 (Figura 2). Estas dos proteínas son iguales hasta el aminoácido 394, donde se introduce un codón de parada en VRK2B, que reemplaza los aminoácidos 395-509 por tres residuos valina-glutamato-alanina (VEA) (Blanco, Klimcakova *et al.* 2006). VRK2A presenta en su extremo C-terminal una región transmembrana hidrofóbica (492-508) y dos motivos BAB superpuestos, sin embargo VRK2B carece de estas dos regiones. Tanto VRK1 como VRK2 son quinasa activas capaces de fosforilar proteínas ácidas o básicas y de autofosforilarse (Lopez-Borges & Lazo 2000, Barcia, Lopez-Borges *et al.* 2002).

Finalmente, el gen *VRK3*, con un 33% de homología con *VRK1* y un 23% con *VRK2*, se encuentra en la región cromosómica 19q13. Codifica una proteína de 474 aminoácidos que presenta en su extremo N-terminal una señal de localización nuclear, y en su extremo C-terminal un dominio quinasa degenerado, que no presenta actividad catalítica (Figura 2) (Kang & Kim 2006). En un estudio reciente se ha visto que en su extremo N-terminal, de estructura desconocida, presenta una región reguladora que permite que tenga actividad (Park, Ryu *et al.* 2015).

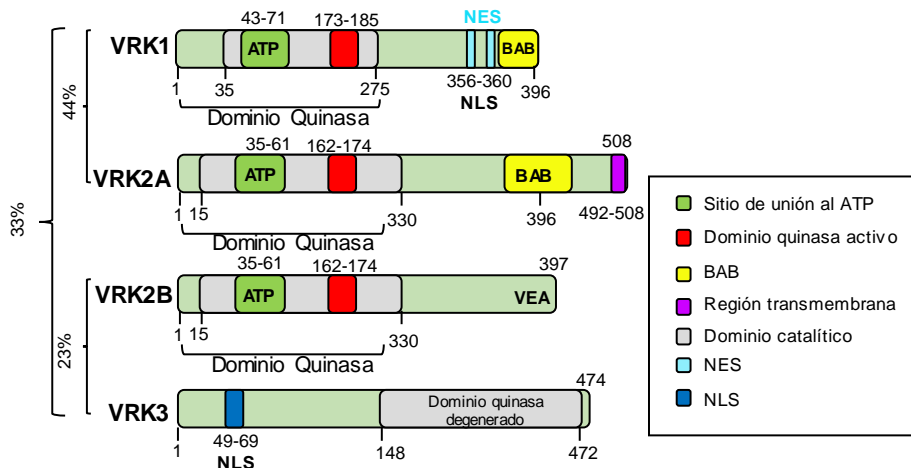


Figura 2: Representación esquemática de la estructura de las proteínas de la familia VRK. Se muestran los principales dominios y motivos de cada quinasa. El porcentaje indica el nivel de homología entre ellas. Se muestra la leyenda con el código de colores utilizado para la identificación de los dominios.

VRK2 y VRK3 fueron las dos primeras quinasas descritas en cuanto a la estructura tridimensional de los dominios catalíticos (Scheeff, Eswaran *et al.* 2009), y posteriormente se describió la de VRK1. Presenta un *G-loop*, donde se encuentra el sitio de unión al ATP y un motivo DYG, que regula la actividad catalítica. El extremo C-terminal de VRK1 se encuentra plegado por una región bisagra formada por dos residuos (E313-K314), orientándose hacia el sitio catalítico, con el que establece una serie de interacciones críticas tanto para la estabilidad estructural como para la actividad catalítica de la quinasa (Figura 3). La delección de esta región resulta en una reducción drástica de la actividad de VRK1. Además, se ha visto que algunos de los residuos de la cola C-terminal son necesarios para la interacción de VRK1 con sus sustratos, por lo que el papel de esta región es fundamental para la actividad biológica de la quinasa (Shin, Chakraborty *et al.* 2011). La familia VRK carece de lo se que conoce como *loop* de activación, que es una región del dominio catalítico de 20-40 aminoácidos que es fosforilada para la activación catalítica. Sin embargo, todas ellas presentan una α -hélice (α -C4) en el dominio quinasa que las hace constitutivamente activas.

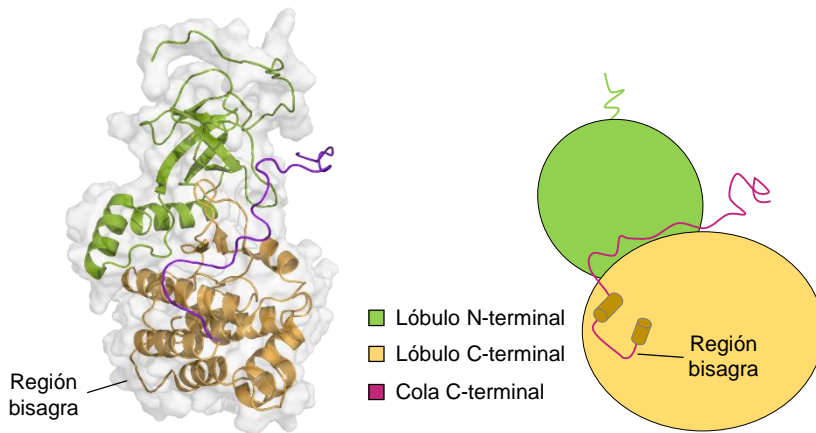


Figura 3: Estructura tridimensional de VRK1 y representación esquemática de la misma. Se indican las regiones *G-loop*, el motivo DYG y la cola C-terminal, así como la región bisagra de la proteína (código de PDB: 2LAV).

1.3. La quinasa humana VRK1

VRK1 es el primer miembro de la familia de las VRK y el mejor caracterizado. En las células, VRK1 es fundamentalmente nuclear debido a su NLS. En el núcleo, esta proteína se encuentra en nucleoplasma, nucleolo y en la cromatina (Andersen, Lam *et al.* 2005, Guermah, Palhan *et al.* 2006, Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2007). También se encuentra una subpoblación en el citoplasma y en el aparato de Golgi (Figura 4).

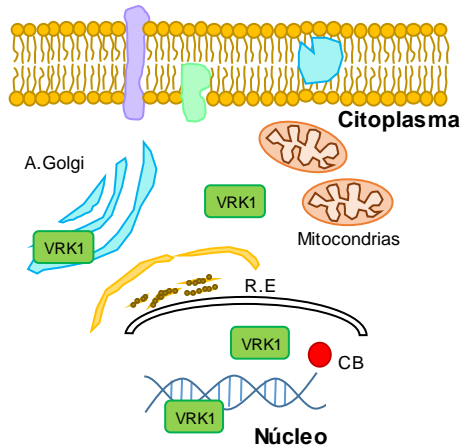


Figura 4: Localización subcelular de la quinasa VRK1. La quinasa se localiza fundamentalmente en el núcleo, tanto libre como asociada a la cromatina. También se encuentra en menor medida en el citoplasma y en el aparato de Golgi.

VRK1 se expresa en todos los tejidos, y de forma muy elevada en los altamente proliferativos, como en hígado, timo o líneas celulares tumorales (Nezu, Oku *et al.* 1997, Vega, Gonzalo *et al.* 2003). Es por ello que VRK1 se relaciona directamente con la regulación del ciclo celular y con proliferación, pero se sabe que tiene otras muchas funciones (Valbuena, Sanz-Garcia *et al.* 2011). En general, participa en la correcta progresión del ciclo celular mediante la regulación de factores de transcripción, en rutas de respuesta a daño en el ADN, en la regulación de los niveles de p53, en la rotura de la envuelta nuclear, en la fosforilación de histonas, en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal (CBs), en la condensación de la cromatina, en la fragmentación del aparato de Golgi y en procesos de desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. A continuación se desarrollan las distintas funciones de la quinasa.

1.3.1. Implicación de VRK1 en proliferación y progresión del ciclo celular

En estudios relacionados con la expresión de VRK1, se describió que en epitelio escamoso normal hay una elevada expresión de la quinasa cerca de la capa basal de la piel, donde la tasa proliferativa es alta, y va disminuyendo a medida que las células epiteliales se van diferenciando, de forma que se correlaciona positivamente con el marcador de proliferación Ki67. Además, en tumores escamosos de cabeza y cuello la expresión de VRK1 se correlaciona positivamente con marcadores tumorales, como CDK2, CDK6, ciclina A, Ki67 y tipoisomerasa II, y negativamente con inhibidores de ciclo, como p16 y p27. Asimismo, VRK1 se correlaciona positivamente con p63, un

marcador de proliferación en cáncer epitelial escamoso de faringe. Por tanto, VRK1 se comporta como marcador tumoral (Santos, Rodríguez-Pinilla *et al.* 2006, Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2007, Valbuena, Blanco *et al.* 2008). La inhibición de la expresión de VRK1 mediante ARN de interferencia específico reduce los niveles de ciclina A, ciclina D1 y PCNA, entre otros, provocando el arresto del ciclo celular en G1 (Valbuena, Blanco *et al.* 2008, Valbuena, Sanz-García *et al.* 2011). En sarcoma de Ewing (ES), la inhibición de la expresión de VRK1 induce una reducción de proliferación y un aumento de apoptosis. En estudios *in vivo*, se observa una clara reducción del desarrollo de tumores ES tras la inyección de células de sarcoma carentes de VRK1, demostrando la importancia de la quinasa en el desarrollo de este tipo de tumores (Riggi, Knoechel *et al.* 2014).

Pero no todos los tumores expresan el mismo nivel de VRK1. Por ejemplo, en cáncer de pulmón, en función del subtipo encontramos distintos niveles de expresión, los de células escamosas tienen niveles elevados en comparación con los adenocarcinomas. Es interesante que en los de células escamosas p53 está mutado, lo que podría indicar una tendencia a la acumulación de VRK1 en los tumores positivos para mutaciones en p53 (Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2007). En cáncer de mama también los niveles de VRK1 son variables, normalmente niveles elevados se asocian con peor pronóstico (Fournier, Martin *et al.* 2006). Este estudio se complementa con otros de cáncer de mama donde se ha visto que existe una elevada expresión de 16 quinastas relacionadas con el ciclo celular, entre ellas VRK1, lo que se correlaciona con mal pronóstico (Finetti, Cervera *et al.* 2008).

1.3.2. Regulación de factores de transcripción por VRK1

Entre los numerosos sustratos de VRK1, encontramos múltiples factores de transcripción (Figura 5). Uno de los más estudiados es el supresor tumoral p53, encargado de mantener la homeostasis mediante el arresto del ciclo celular para detectar posibles errores en el ADN. La estabilización y activación de p53 en respuesta a estrés está estrictamente regulada mediante fosforilación y acetilación. VRK1 fosforila a p53 en la treonina 18 para impedir su unión a Mdm2, regulador negativo, y promover su unión a p300 (Dumaz & Meek 1999, Barcia, Lopez-Borges *et al.* 2002), impidiendo así la degradación de p53, e incrementando la acetilación en las lisinas 373 y 382 por p300 (Vega, Sevilla *et al.* 2004). Además, VRK1 y p53 forman un bucle de autorregulación: la activación de p53 induce la expresión de DRAM (*damage-regulated autophagy modulator*), que a su vez promueve la degradación vía endocítica-lisosomal de VRK1 (Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2008, Valbuena, Sanz-García *et al.* 2011).

Por último, parece que el complejo VRK1-p53 es un buen marcador temprano de respuesta al daño en el ADN por luz UV (Lopez-Sanchez, Valbuena *et al.* 2014).

Otros factores de transcripción dianas de VRK1 son c-Jun y ATF2. C-Jun regula la expresión génica de citoquinas y factores de crecimiento en repuesta a estrés, controlando muchos mecanismos celulares, como diferenciación, proliferación o apoptosis. C-Jun se activa mediante fosforilación por diferentes quinasas de la familia de las MAP quinasas (Chang & Karin 2001), y también mediante la fosforilación por VRK1 en las serinas 63 y 73, lo que estabiliza y activa a c-Jun (Sevilla, Santos *et al.* 2004). ATF2 se encarga de la activación de genes relacionados con diferenciación, ciclo celular y respuesta inmune, promoviendo tanto proliferación como oncogénesis (van Dam & Castellazzi 2001). ATF2 se fosforila por distintos miembros de las MAPK y por VRK1, que tiene como dianas los residuos S62 y T73, ambos también fosforilados por la proteína quinasa A (PKA) y por la quinasa dependiente de calmodulina IV (CAMK-IV). La fosforilación en estos dos residuos promueve la acumulación de ATF2 (Sevilla, Santos *et al.* 2004). VRK1 también fosforila a CREB en S133. La activación de ATF2 y CREB por VRK1 permite a ambos factores transcripcionales la unión al promotor *CCND1* para el aumento de la expresión de la ciclina D1, promoviendo así la transición G1/S del ciclo celular (Sevilla, Santos *et al.* 2004).

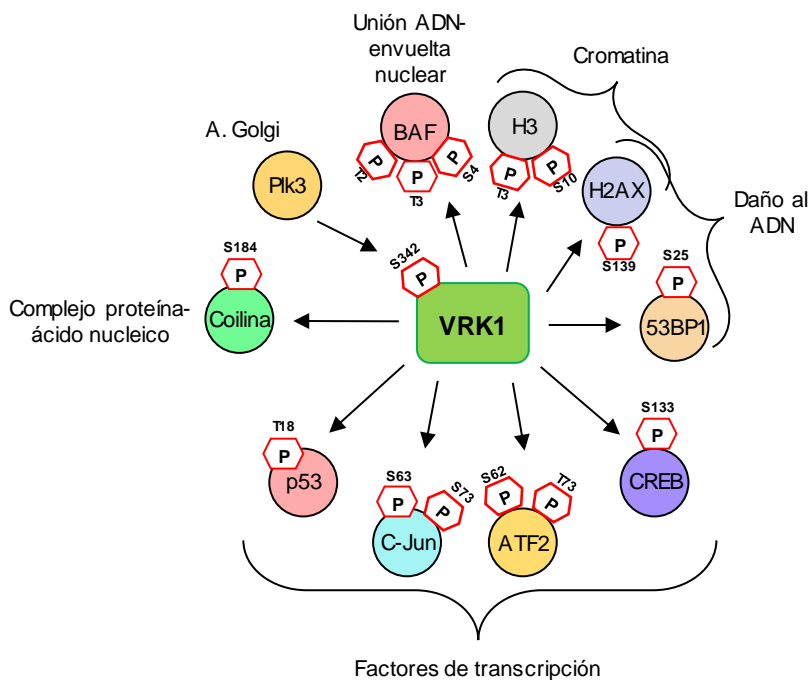


Figura 5: Esquema que representa los distintos sustratos de VRK1, así como el residuo diana de la quinasa.

1.3.3. Implicación de VRK1 en la remodelación de la cromatina

La remodelación de la cromatina es fundamental para distintos procesos, entre ellos, para la activación/represión transcripcional y la reparación del ADN. Esta remodelación se lleva a cabo mediante modificaciones postraduccionales de las histonas (Kouzarides 2007). VRK1 participa en la remodelación de la cromatina fundamentalmente mediante la fosforilación de la histona H3 en los residuos T3, también fosforilado por Haspina, y S10, diana de Aurora quinasa B (Kang, Park *et al.* 2007, Sanz-Garcia, Vazquez-Cedeira *et al.* 2011, Valbuena, Sanz-Garcia *et al.* 2011). Ambas fosforilaciones son fundamentales para la correcta progresión del ciclo celular, además la fosforilación en S10 también es importante para la relajación de la cromatina durante la transcripción (Prigent & Dimitrov 2003). VRK1, en menor medida, fosforila a H2A, H2B y H4, por lo que contribuye a la condensación de la cromatina, y por tanto a la transición G2/M mediante la fosforilación de histonas (Kang, Park *et al.* 2007, Valbuena, Sanz-Garcia *et al.* 2011). En los últimos años se ha visto que VRK1 también regula la acetilación y metilación de histonas (Salzano, Sanz-Garcia *et al.* 2015).

1.3.4. VRK1 en la fragmentación del aparato de Golgi

Durante la citocinesis, es necesaria la redistribución de los orgánulos entre las dos células hijas, lo que requiere la fragmentación, dispersión y reensamblaje del aparato de Golgi. Siempre se ha atribuido la regulación de este proceso a las quinasas MEK1 (*mitogen-activated protein kinase 1*) y Plk3 (*polo-like kinase 3*) (Ruan, Wang *et al.* 2004, Xie, Wang *et al.* 2004), pero en los últimos años se ha descrito que VRK1 participa de forma activa en la fragmentación: VRK1 interacciona con Plk3, formando un complejo estable que colocaliza en el aparato de Golgi. Plk3 fosforila a VRK1 en el residuo S342, en la cola C-terminal de la quinasa. Se ha visto que el silenciamiento de VRK1 bloquea parcialmente la fragmentación inducida por MEK1 y Plk3, mismo resultado que el obtenido mediante la expresión de un mutante de VRK1 sin actividad quinasa. Estos resultados sugieren que la actividad quinasa de VRK1 es fundamental para la correcta fragmentación del aparato de Golgi durante la transición de las fases G2/M, encontrándose bajo regulación de la ruta MEK1/Plk3 (Lopez-Sanchez, Sanz-Garcia *et al.* 2009).

1.3.5. Implicación de VRK1 en el ensamblaje de la envuelta nuclear

El ensamblaje y desensamblaje de la envuelta nuclear es un proceso altamente regulado que comienza en los primeros momentos de la mitosis y termina durante la telofase. Entre las muchas proteínas implicadas, se encuentra BAF, encargada de mantener la arquitectura nuclear. BAF se une tanto al ADN como a proteínas que presentan motivos LEM (*lamin-interacting proteins*), localizadas en la membrana nuclear interna. Durante la interfase, BAF se encuentra en la membrana nuclear interna, permitiendo el anclaje de la cromatina a las proteínas de la envuelta nuclear, y durante la mitosis, tiene un papel en la condensación de la cromatina y en la rotura de la envuelta nuclear. En anafase BAF se localiza cerca de los telómeros, promoviendo el reclutamiento de proteínas necesarias para el ensamblaje de la envuelta nuclear (Haraguchi, Koujin *et al.* 2001).

VRK1 fosforila a BAF en tres residuos de su región N-terminal, T2, T3 y S4. Estas fosforilaciones provocan la liberación de BAF de la cromatina, facilitando la condensación de ésta y la rotura de la envuelta nuclear (Nichols, Wiebe *et al.* 2006, Molitor & Traktman 2014, Zhuang, Semenova *et al.* 2014). Por tanto, VRK1 es fundamental en el ensamblaje de la envuelta nuclear.

1.3.6. Implicación de VRK1 respuesta a daño en el ADN (DDR)

El sistema DDR se encarga de la detección, señalización y reparación de roturas y mutaciones en el ADN producidas tanto por procesos celulares endógenos como por agentes exógenos. Errores en la reparación de lesiones del ADN generan tumorigénesis. Cuando ocurre daño en las células mediante radiación ionizante, VRK1 responde de forma inmediata fosforilando a p53 en T18, lo que permite a p53 acumularse y arrestar el ciclo para que el daño generado no se transfiera a las células hijas (Lopez-Sanchez, Valbuena *et al.* 2014).

VRK1 se activa induciendo la formación de focos de reparación de 53BP1 y γ H2AX de forma independiente de ATM y p53. Además, se sabe que 53BP1 es diana de fosforilación de VRK1. El silenciamiento de VRK1 provoca defectos en la formación de focos. Parece que VRK1 precede en la ruta a ATM y a otras quinasas como Chk2 y DNA-PK (Sanz-Garcia, Monsalve *et al.* 2012). VRK1 también afecta a la formación de focos de NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1*), el silenciamiento de VRK1 impide la correcta formación de los focos, además VRK1 fosforila a NBS1. VRK1 también se activa en respuesta al agente quimioterapéutico doxorrubicina, por lo que su activación es independiente del tipo de daño (Salzano, Vazquez-Cedeira *et al.* 2014).

También está implicada en la relajación de la cromatina bajo radiación ionizante de forma independiente de ATM, regulando la acetilación de las histonas H3 y H4.

Recientemente, se ha descrito que VRK1 confiere resistencia a distintos agentes quimioterapéuticos en cáncer de mama positivos para el receptor de estrógenos, lo que se relaciona con peor pronóstico (Salzano, Vazquez-Cedeira *et al.* 2014). También se ha visto que la combinación del agente quimioterapéutico olaparib y la depleción de VRK1 genera un mayor daño en el ADN debido a que éste no puede activar correctamente las rutas de reparación (Campillo-Marcos & Lazo 2019).

1.4. La quinasa VRK2

VRK2 presenta dos isoformas, VRK2A y VRK2B, ambas se expresan en todos los tejidos, y en altos niveles en músculo esquelético, corazón, páncreas y testículos (Nezu, Oku *et al.* 1997). En las células, VRK2A se encuentra anclada a las membranas del retículo endoplasmático, mitocondrias y envuelta nuclear, y VRK2B en nucleoplasma y citosol. En cáncer de mama, la expresión de VRK2 se correlaciona positivamente con receptores de estrógenos y progesterona, y negativamente con ErbB2, que está sobreexpresado en un 30% de tumores de mama, siendo marcador de mal pronóstico, por lo que VRK2 podría ser un marcador de buen pronóstico (Fernandez, Blanco *et al.* 2010).

Debido a la alta homología entre sus dominios catalíticos, VRK2A y VRK2B comparten la mayoría de sustratos. Ambas tienen una gran capacidad de autofosforilación, y fosforilan caseínas, histonas H2B y H3 y mielina (Nichols & Traktman 2004, Blanco, Klimcakova *et al.* 2006). También comparten sustratos con VRK1, como p53 en T18 y S2, y BAF en S3 y T4, aunque estas fosforilaciones por parte de VRK2A no se han observado *in vivo* debido a la localización citosólica de la quinasa. En cambio, VRK2B sí fosforila a p53 *in vivo*, de forma similar a VRK1 (Blanco, Klimcakova *et al.* 2006).

VRK2 participa en numerosos mecanismos: modula la transcripción génica en respuesta a hipoxia y a estrés celular inducido por interleuquina 1 β a través de JNK (Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2007, Valbuena, Blanco *et al.* 2008), actúa como regulador negativo de ERK1/2 en la ruta de las MAPK en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Fernandez, Blanco *et al.* 2010) y fosforila al factor nuclear de las células T activadas (NFAT), activándolo para incrementar la transcripción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Se ha visto que el silenciamiento de VRK2 produce la bajada de COX-2 tanto a nivel proteico como de ARNm, sin alteración alguna de NFAT. Por último, se ha descrito que VRK2 interacciona con Bcl-xL, proteína que regula

negativamente la expresión de Bax, modulando de esta forma la apoptosis. El silenciamiento de VRK2 aumenta los niveles proteicos de Bax en las mitocondrias, aumentando por tanto la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas. Además, cuando los niveles de VRK2 son bajos, se reduce la invasión de las células tumorales, que son más susceptibles a sufrir apoptosis tras el tratamiento con agentes quimioterapéuticos (Vazquez-Cedeira & Lazo 2012, Monsalve, Merced *et al.* 2013).

1.5. La quinasa VRK3

VRK3 se define típicamente como una pseudoquinasa. Se pensaba que su función se limitaba a la regulación de distintos procesos mediante interacciones (Scheeff, Eswaran *et al.* 2009). VRK3 forma un complejo con el supresor tumoral VHR (Von Hippel-Lindau) y con ERK1/2, estimulando la actividad fosfatasa de VHR, que desfosforila a ERK1/2, regulando negativamente la ruta de señalización de ERK. De hecho, niveles elevados de VRK3 generan un bucle en el que ERK1/2 regula positivamente la expresión de VRK3, que a su vez regula negativamente a ERK1/2. Además, VRK3 se correlaciona negativamente con tejidos altamente proliferativos (Kang & Kim 2006, Kang & Kim 2008). En los últimos años, se ha visto que VRK3 puede actuar también como una quinasa activa, fosforilando a BAF en S4 para promover la rotura de la envuelta nuclear durante la interfase. Por tanto, VRK3 es capaz de regular el ciclo celular en interfase mediante su actividad catalítica.

1.6. Regulación de las quinasas VRK

A nivel transcripcional, la expresión de VRK1 está regulada por factores mitogénicos y de crecimiento presentes en el suero, la ausencia de estos factores provoca una bajada de los niveles proteicos de VRK1 en cultivos celulares, que se reestablecen añadiendo suero (Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2008). Además, ciertos factores de transcripción, como E2F1 y Myc, activan la expresión del gen *VRK1* (Kang & Kim 2006, Santos, Rodriguez-Pinilla *et al.* 2006). Recientemente se ha visto que el factor de transcripción aberrante EWS-FLI1 es capaz de activar al promotor de VRK1, lo que se ha confirmado en algunos tipos de cáncer de la familia de los tumores de *Ewing* (Riggi, Knoechel *et al.* 2014).

La forma más precisa de regular a VRK1 es mediante modificaciones postraduccionales, modulando su localización subcelular y su actividad. Tanto VRK1 como VRK2 tienen una alta capacidad de autofosforilación, lo que es fundamental para la estabilidad de ambas quinasas (Lopez-Borges & Lazo 2000). Cuando se produce

daño en el ADN, el residuo T355 de VRK1 es fosforilado por PKC δ (proteína quinasa C δ), que la regula de forma negativa, lo que promueve el arresto del ciclo celular, y por tanto la muerte por apoptosis dependiente de p53 (Barcia, Lopez-Borges *et al.* 2002, Park, Choi *et al.* 2011). En respuesta a luz UV, ATM y ATR fosforilan a VRK1 en T378 (Stokes, Rush *et al.* 2007). Además, los niveles proteicos de VRK1 aumentan después del tratamiento de las células con distintas drogas que inducen daño en el ADN, o de exposición a radiaciones UV (Valbuena, Sanz-Garcia *et al.* 2011, Sanz-Garcia, Monsalve *et al.* 2012). Estos datos confirman la función de la cola C-terminal de VRK1 como región reguladora de la quinasa.

VRK1 y VRK2 también se regulan mediante la interacción con otras proteínas, como la GTPasa Ran. VRK1 unida a RanGTP es una quinasa activa, pero cuando se une a RanGDP se inactiva (Sanz-Garcia, Lopez-Sanchez *et al.* 2008). Durante la interfase, VRK1 es regulada mediante su interacción con la macro histona H2A1.2. Esta interacción no afecta a la autofosforilación de VRK1, pero impide la fosforilación de H3 y BAF (Kim, Chakraborty *et al.* 2012).

Por último, las proteínas VRK son sensibles a inhibidores de quinasas y a metales (Sanz-Garcia, Vazquez-Cedeira *et al.* 2011, Barcia-Sanjurjo, Vazquez-Cedeira *et al.* 2013). Se ha visto que, aunque la sensibilidad de VRK a los inhibidores de quinasas es baja, cada miembro de la familia presenta respuestas distintas a los distintos inhibidores, lo que hace posible inhibir de forma selectiva cada una de las quinasas. De hecho, la luteolina es un inhibe específicamente a VRK1, impidiendo la fosforilación de BAF y de H3, junto con la supresión de la proliferación celular y la inducción de apoptosis (Kim, Kim *et al.* 2014).

1.7. Ratones *knock-out* de VRK1 y VRK2

Se han llevado a cabo estudios en ratones hipomórficos para VRK1, que expresan un 15% de la proteína. Estos ratones, aunque viables, son estériles. En machos la esterilidad se debe a defectos en la proliferación de las células espermatozógenas debido a defectos en mitosis y meiosis. En otro estudio se vio que los ratones macho nacen fértiles, pero se vuelven estériles de forma progresiva debido a alteraciones en la espermatogénesis, y los ratones hembra nacen estériles debido a defectos en el desarrollo de los oocitos (Schober, Aydiner *et al.* 2011). Los ratones no presentan alteraciones en otros tejidos, se cree que otros miembros de VRK lo sustituyen en sus funciones (Choi, Park *et al.* 2010, Wiebe, Nichols *et al.* 2010).

En un estudio muy reciente se vio que ratones sin VRK1 presentan defectos en la migración de los precursores neurales, efecto independiente de su actividad quinasa. Esto parece deberse a una regulación por parte de VRK1 sobre el precursor β -amiloide (APP). También compromete la progresión del ciclo celular de los progenitores neurales, de forma dependiente de su actividad quinasa (Vinograd-Byk, Sapir *et al.* 2015).

1.8. Las quinasas VRK en neurodegeneración

La proteína de la familia VRK típicamente relacionada con neurodegeneración es VRK2. En 2011 se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) unas 50 kb aguas arriba del gen *VRK2*, que provoca la sobreexpresión de VRK2, lo que se relaciona directamente con riesgo de padecer esquizofrenia (Steinberg, de Jong *et al.* 2011, Li, Wang *et al.* 2012). Se ha visto que este polimorfismo es importante, ya que genera alteraciones en la estructura cerebral, de hecho los pacientes esquizofrénicos con este SNP presentan una disminución de la materia blanca y defectos en la conectividad de la misma con distintas zonas del cerebro (Sohn, Kim *et al.* 2014). Además, se asocia a VRK2 con otras enfermedades neurológicas, como epilepsia y trastorno bipolar (Tesli, Wirgenes *et al.* 2016). Parece que VRK2 también participa en la formación de agregados de poliglutamina en la enfermedad de Huntington (HD) mediante la regulación negativa de la chaperonina TRiC (Kim, Park *et al.* 2014).

En 2009 se empezó a relacionar a VRK1 con el sistema nervioso, debido a tres niños de una familia consanguínea de origen judío-Ashkenazí. Estos pacientes presentaban, en general, microcefalia, hipoplasia pontocerebelar (PCH) atrofia espinal muscular (SMA), y ataxia, entre otros síntomas. Es decir, un fenotipo de neurodegeneración. Mediante análisis genético se vio que presentaban una mutación en homocigosis R358X/R358X, que generaba una proteína truncada sin señal de localización nuclear y con un nivel de expresión significativamente menor respecto a VRK1 *wt*. En este trabajo se propuso a VRK1 como un gen SMA-PCH. SMA-PCH se refiere a atrofia espinal muscular con hipoplasia pontocerebelar, la SMA en el 90% de los casos tiene como causa la mutación del gen *SMN1* (*Survival motor neuron 1*) (Renbaum, Kellerman *et al.* 2009, Wee, Kong *et al.* 2010, Peeters, Chamova *et al.* 2014), que codifica para la proteína SMN1, el segundo componente más importante de los cuerpos de Cajal. Se ha visto que los niveles de SMN1 están inversamente relacionados con la gravedad de la enfermedad. La hipoplasia pontocerebelar se caracteriza por una severa disfunción motora tanto central como periférica que provoca la muerte de los pacientes a edades

tempranas. Otros síntomas adicionales son microcefalia, hipotonía severa y debilidad muscular (Peeters, Chamova *et al.* 2014).

En 2013 se llevó a cabo un estudio en 3 pacientes con un fenotipo de microcefalia con polineuropatía distal simétrica, con un progreso rápido y severo de la enfermedad. Uno de ellos presentaba de nuevo la mutación en homocigosis R358X/R358X, y las otras dos, hermanas, la mutación en heterocigosis compuesta R89Q/V236M, que mediante algoritmos bioinformáticos se predecía que alteraba la función de VRK1 (Gonzaga-Jauregui, Lotze *et al.* 2013). En 2014 se reportaron 4 casos de pacientes con la mutación en homocigosis de VRK1 R133C/R133C (Peeters, Chamova *et al.* 2014), y en 2015 se identificó una mutación compuesta heterocigota H119R/R321C en un paciente adulto, con SMA distal y proximal. Fue el primer paciente hasta el momento que comenzó a desarrollar síntomas en la edad adulta (Nguyen, Biliciler *et al.* 2015). En 2016 aparecieron dos pacientes con las mutaciones compuestas R358X/H119R y G135R/L195V, ambos con atrofia espinal muscular distal (Stoll, Teoh *et al.* 2016). En 2018 se identificó una nueva mutación en homocigosis W375X que genera una proteína truncada con un fenotipo de PCH, y más adelante aparecieron dos pacientes con la misma mutación (Feng, Li *et al.* 2019, Li, Wang *et al.* 2019). Los dos últimos casos que aparecieron, también en homocigosis, fueron R219I/T254L. En estos pacientes, se analizaron los niveles de las proteínas de VRK1 generadas a partir de los genes mutados, observando que eran bajos debido a defectos postraduccionales. También se observó que las proteínas se deslocalizaban al citosol y que los fibroblastos de los pacientes presentaban defectos en la formación de los cuerpos de Cajal (Atkinson, Castro *et al.* 2019) (Figura 6).

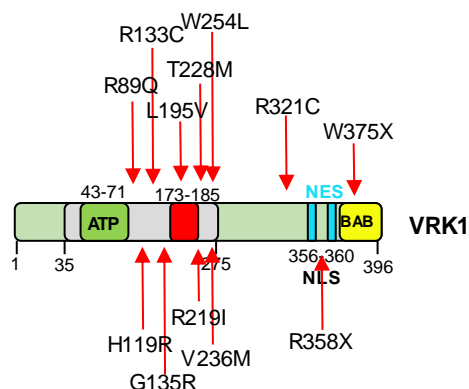


Figura 6: Esquema representativo de las mutaciones de VRK1 asociadas a neurodegeneración sobre los dominios de la quinasa.

Se han llevado a cabo algunos estudios con la mutación R358X, donde se ha visto que VRK1 tiene un papel en la progresión de los precursores neurales durante el desarrollo embrionario y en la migración neuronal mediante la regulación de la proteína precursora amiloide (APP), proponiendo a VRK1 como una proteína reguladora de la migración neuronal (Vinograd-Byk, Sapir *et al.* 2015).

Aparte de este último trabajo sobre los cuerpos de Cajal, donde se realiza un análisis más exhaustivo de las dos últimas mutaciones identificadas de VRK1, y de los trabajos con R358X realizados en ratón, no existían estudios de caracterización de estos mutantes. Por ello, en la primera parte de este trabajo, nuestro objetivo es la caracterización de estas variantes patogénicas de VRK1 que causan fenotipos de neurodegeneración severa.

En estudios previos en el laboratorio (datos sin publicar), se ha relacionado a VRK1 con SMN1: ambas proteínas interactúan, y VRK1 regula la localización subcelular de SMN1. SMN1, aparte de con Coilina, interactúa también con Ataxina1. Esta proteína presenta un tracto de poliglutaminas que puede sufrir expansión, causando la enfermedad Ataxia espinocerebelosa tipo I. La expansión provoca la formación de inclusiones nucleares tóxicas para las células. Mutaciones en Ataxina1 generan ataxia y distrofia espinal muscular, y también se han visto agregados de poliglutamina en otras enfermedades como en el Alzheimer. Además, otra de las proteínas que interactúa y es fosforilada por VRK1, VCP (*Valosin Containing Protein*), colocaliza con los agregados de poliglutamina para promover su degradación. Debido a las similitudes entre los fenotipos de neurodegeneración observados como consecuencia de mutaciones en VRK1, VCP, SMN1 y Ataxina1, la segunda parte de este trabajo tiene como objetivo el estudio de la relación entre VRK1 y Ataxina1 en la Ataxia espinocerebelosa tipo I.

2. Ataxia espinocerebelosa tipo I

La Ataxia espinocerebelosa tipo I (SCA1) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante que pertenece al grupo de enfermedades causadas por la expansión de un triplete CAG, que codifica un tracto de poliglutaminas, conocidas como enfermedades neurodegenerativas de poliglutamina (poliQ). En este grupo encontramos varias enfermedades, atrofia espinobulbar muscular (SBMA), enfermedad de Huntington (HD), ataxias espinocerebelosas (SCAs), distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), distrofia miotónica tipo 1 (DM1), síndrome de Tremor (FXTAS),

ataxia de Friedreich (FRDA) y atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA) (Orr & Zoghbi 2007).

SCA1 se caracteriza por una pérdida de coordinación motora, habla confusa, dificultades al tragar, espasticidad y deficiencias cognitivas. En esta patología, ocurre una pérdida significativa de las células de Purkinje en el córtex cerebelar, que son las neuronas más importantes del cerebelo debido a su función de integración, sus axones comunican el córtex cerebelar con los núcleos cerebelosos. A medida que la enfermedad avanza, se afectan otras áreas del cerebro, como los núcleos cerebelosos profundos, concretamente el núcleo dentado, la oliva inferior, el puente troncoencefálico, los núcleos rojos, y los núcleos de los nervios craneales III, X, y XII (Voogd & Glickstein 1998).

SCA1 se considera una enfermedad rara, dentro de las SCAs representa entre el 3 y el 16% de estas enfermedades, que tienen una prevalencia en la sociedad de 1-4 por 100.000 (Manto & Marmolino 2009). La edad media de aparición es de 30-40 años, y la supervivencia de 15 años, con un rango de entre 10 y 28 años en función del número de glutaminas que presente la proteína, cuantas más repeticiones más severa es la enfermedad y más rápido avanza (Schut & Haymaker 1951, Finsterer 2009). No existe cura para esta enfermedad, los tratamientos se basan en cuidados paliativos para tratar de mejorar la calidad de vida de los pacientes (Paulson 2007).

2.1 Ataxina1

En gen *SCA1* se encuentra en la región cromosómica 6p22.3 y consiste en 9 exones. A partir de los dos últimos se transcribe Ataxina1, una proteína altamente conservada en vertebrados que consta de 816 aminoácidos, aunque su longitud puede variar en función del tracto de poliQ (Klement, Skinner *et al.* 1998). En el extremo N-terminal, presenta el tracto de poliQ (197-223), y en su C-terminal, el dominio AXH (567-689) y la señal de localización nuclear (771-774).

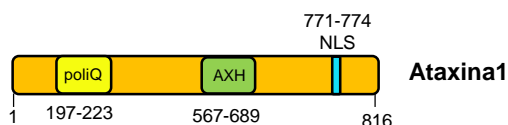


Figura 7: Representación esquemática de Ataxina1. PoliQ: tracto de poliglutaminas. NLS: Señal de localización nuclear.

Estudios de predicción de estructura en base a la secuencia de aminoácidos indican que Ataxina1 es una proteína fundamentalmente desestructurada. Se predice que el dominio poliQ tiene una baja complejidad (Masino, Kelly *et al.* 2002), presentando solo un dominio globular, AXH. En el extremo C-terminal, Ataxina1 presenta múltiples motivos lineales que permiten la regulación de la estabilidad de la proteína mediante la fosforilación y el reconocimiento por parte de moduladores (Klement, Skinner *et al.* 1998, Lai, O'Callaghan *et al.* 2011).

Ataxina1 presenta una tendencia intrínseca a degradarse y a agregar en condiciones normales, lo que dificulta su estudio mediante purificación. Parece que el dominio AXH tiende a dimerizar de forma natural, por lo que Ataxina1 se encuentra formando dímeros preferentemente (de Chiara, Giannini *et al.* 2003). La dimerización de AXH genera una estructura asimétrica muy plástica y flexible, que le permite agregar y desagregar de forma dinámica con otros AXH, es por ello que se conoce como una proteína camaleónica, muy inusual. Este hecho confiere a Ataxina1 una fuerte capacidad para agregar consigo misma y con otras proteínas con las que forma complejos (de Chiara, Rees *et al.* 2013).

2.1.1. Tracto de poliglutaminas

Normalmente, las repeticiones de los tripletes CAG oscilan entre 6 y 42 unidades, interrumpidas cada 21 trinucleótidos por 1-3 tripletes CAT, lo que genera una proteína con aproximadamente 30 glutaminas como máximo, entre las cuales se encuentran algunos residuos de histidina, fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad de la proteína. En SCA1, las repeticiones CAG pasan a tener entre 39 y 82 unidades sin interrupciones, generando un tracto puro de poliglutaminas (Chung, Ranum *et al.* 1993).

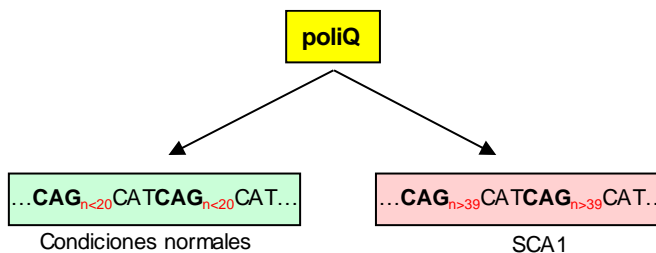


Figura 8: Representación esquemática del dominio poliQ en condiciones nativas, y del dominio en la Ataxia espinocerebelosa tipo I.

No se sabe mucho acerca de las funciones del poliQ en condiciones normales. Estas estructuras repetidas se encuentran en genes fundamentalmente implicados en el desarrollo del sistema nervioso, por lo que se postula que tienen alguna función relevante durante el desarrollo (Butland, Devon *et al.* 2007, Nithianantharajah & Hannan 2007). También se encuentran en genes encargados de la remodelación de la cromatina y de la transducción de señales; es decir, en procesos biológicos altamente dependientes de interacción proteína-proteína, asociados con la formación de complejos de alto peso molecular (Whan, Hobbs *et al.* 2010). Debido a su elevada flexibilidad, el dominio poliQ puede actuar como estabilizante de interacciones entre otras proteínas, favoreciendo la formación de macrocomplejos moleculares y acortando las distancias entre distintos dominios de otras proteínas, para que éstas puedan interactuar (Schaefer, Wanker *et al.* 2012). Por tanto, los dominios poliQ se consideran fundamentales para la integración de proteínas (Hancock & Simon 2005).

En las neuronas, Ataxina1 *wt* se encuentra normalmente tanto en núcleo como en citosol, mientras que cuando presenta la expansión poliQ, no puede ser transportada al citosol, por lo que se acumula en el núcleo, donde forma inclusiones de gran peso molecular debido a que aumentan sus características agregantes y a su proteólisis aberrante. En estas células, se observan alteraciones en la ruta de mTOR, en las rutas de reparación de daño en el ADN, y en la expresión de canales iónicos importantes para la regulación de la excitabilidad de la membrana de las neuronas. Las inclusiones nucleares formadas presentan fragmentos de poliQ que derivan del procesamiento proteolítico de Ataxina1, que agregan con multitud de proteínas diferentes, entre ellas miembros del sistema UPS (*Ubiquitin-proteasome system*) (Wellington & Hayden 1997).

2.1.2. Funciones de Ataxina1

Se sabe que Ataxina1 es una proteína de unión al ADN implicada en la represión transcripcional, pero se desconoce cuáles son sus funciones concretas, ya que siempre se estudia en relación a su expansión y desarrollo de la enfermedad SCA1. Ataxina1 interactúa con múltiples proteínas, muchas de ellas represores transcripcionales (Figura 9).

En ratones *knock-down* para Ataxina1, se observa que los animales presentan ansiedad, capacidades exploratorias reducidas y déficit de aprendizaje del entorno (Matilla, Roberson *et al.* 1998); es decir, se alteran sus funciones cognitivas. También su coordinación motora se ve comprometida (Crespo-Barreto, Fryer *et al.* 2010). Se piensa que los defectos en aprendizaje y memoria de los ratones se deben a alteraciones en los niveles del precursor β -amiloide, la ausencia de Ataxina1 aumenta el procesamiento de APP debido a que aumenta la expresión de la β -secretasa, que

● ● **Introducción**

procesa a APP generando A β , lo que en última instancia puede producir Alzheimer. Es por ello que se propone a Ataxina1 como un modificador de riesgo de padecer Alzheimer (Zhang, Browne *et al.* 2010).

Además, Ataxina1 regula al correpresor transcripcional SMRT y a las histona deacetilasas HDAC3 y HDAC4, inhibiendo su transcripción (Bolger, Zhao *et al.* 2007). Se sabe que estas deacetilasas se translocan al núcleo para regular la expresión de genes que promueven la muerte neuronal. Por tanto, Ataxina1 está implicada en apoptosis neuronal. A partir de estos estudios, se propone que Ataxina1 es un componente integrante de la ruta de Notch, que controla numerosos procesos implicados en el desarrollo del sistema nervioso, entre ellos, el crecimiento de los axones, la diferenciación de los miotubos, el desarrollo del sistema nervioso periférico y el desarrollo de las crestas neurales (Tong, Gui *et al.* 2011).

Ataxina1 forma complejos de dos tipos, con el represor transcripcional Capicua (CIC) y con la proteína de unión a motivos de ARN RBM17. Estas dos proteínas son mutuamente excluyentes; es decir, no pueden estar las dos en el mismo complejo con Ataxina1. Ataxina1 estabiliza a CIC, un factor de transcripción encargado de regular el desarrollo del sistema nervioso central a través de la ruta de Erb, controlando la proliferación y la autorrenovación de las células madre neuronales (Ahmad, Rogers *et al.* 2019). Ataxina1 también estabiliza a RBM17, que forma parte del complejo del espliceosoma. El balance en la formación de estos dos complejos está fuertemente relacionado con SCA1 (Zoghbi & Orr 2009).

Ataxina1 interacciona con Coilina en el nucleoplasma, pero no en los cuerpos de Cajal. Se desconoce la consecuencia de esta interacción (Hong, Ka *et al.* 2003). También interacciona con otras proteínas encargadas del procesamiento del ARNm y con proteínas del sistema UPS, entre ellas VCP.

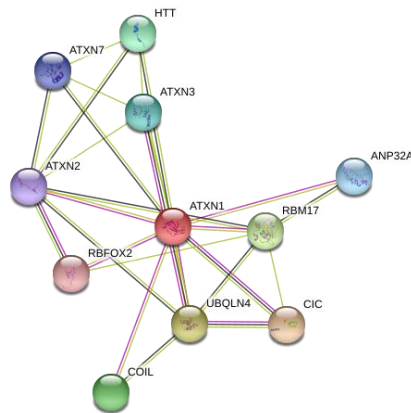


Figura 9: Red de interacción de Ataxina1 con otras proteínas. Imagen obtenida de la base de datos *String* (Szkarczyk, Gable *et al.* 2019).

2.1.3. Implicación de VCP en SCA1

VCP es una proteína de la familia de las ATPasas AAA tipo II, asociadas con múltiples actividades celulares. VCP cataliza el desplegamiento de las proteínas de forma ATP dependiente. También se asocia con la reconstrucción de la envuelta nuclear, ciclo celular, reensamblaje del aparato de Golgi tras la mitosis, supresión de la apoptosis, respuesta al daño del ADN y degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD) (Vij 2008). Normalmente, las proteínas que se degradan por ERAD son proteínas extraídas del retículo endoplasmático, de la cromatina o de las mitocondrias, que son llevadas al citosol para su degradación. Pero antes deben ubiquitinarse, y lo hacen a través de un sistema de tres enzimas, una enzima activadora de ubiquitinación (E1), una enzima conjugadora de ubiquitinas (E2) y una ubiquitín ligasa (E3). Se sabe que VCP se asocia con las ubiquitín ligasas para unirse a las proteínas ya poliubiquitinadas con el objetivo de remodelar su estructura (desestructurarlas) para facilitar los pasos subsiguientes. También VCP parece comportarse como asistente del proteasoma para facilitar la degradación de ciertos sustratos mal plegados (Meyer, Bug *et al.* 2012). VCP se une a agregados de poliglutamina en distintas enfermedades neurodegenerativas con el objetivo de tratar de desorganizarlos, y si no lo consigue, permanece constantemente atrapado. Además, el silenciamiento de VCP provoca un aumento de los agregados poliQ (Kobayashi, Manno *et al.* 2007).

Aunque VCP es una típica proteína de control de calidad del retículo endoplasmático, se sabe que tiene mucha importancia en el mantenimiento del buen estado de las mitocondrias. VCP se transloca a las mitocondrias, donde es capaz de reconocer

proteínas poliubiquitinadas en la membrana mitocondrial externa, extrayéndolas para que puedan ser degradadas por el proteasoma. Incluso proteínas dañadas que se encuentran en la membrana mitocondrial interna o en la matriz mitocondrial se translocan a la membrana mitocondrial externa para ser degradadas por el sistema UPS de forma dependiente de VCP (Khalil & Lievens 2017).

VCP está fuertemente asociada con neuropatías, puesto que existen distintas mutaciones en el gen *VCP* que causan enfermedades neurodegenerativas. La más estudiada es la enfermedad ósea de Paget y demencia frontotemporal (IBMPFD), donde ocurren deficiencias importantes en la función mitocondrial. Pero también se asocia con otras enfermedades neurodegenerativas donde el defecto genético es independiente de VCP, como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o la enfermedad de Huntington (HD). En HD, aparte de una expansión del tracto de poliQ en el gen que codifica para la Huntingtina que causa toxicidad por ganancia de función de la proteína, ocurren importantes defectos en las mitocondrias que llevan a un fallo bioenergético, causando neurotoxicidad y muerte celular (Tanaka, Cleland *et al.* 2010, Xu, Peng *et al.* 2011). VCP agrega con la Huntingtina expandida, quedando parcialmente atrapada en las mitocondrias, lo que la imposibilita para realizar sus funciones correctamente, provocando un mal funcionamiento de las mitocondrias, y finalmente agregación mitocondrial y mitofagia (Guo, Sun *et al.* 2016).

En las ataxias en general, incluyendo SCA1, se sabe que la maquinaria UPS agrega junto con las inclusiones nucleares de poliQ, quedando atrapada en estructuras no funcionales y consideradas tóxicas, lo que impide una correcta homeostasis celular, causando neurotoxicidad y por tanto muerte neuronal (Sherman & Goldberg 2001).

2.2. Modificaciones postraduccionales en Ataxina1 *wt* y expandida

La causa central de SCA1 es la expansión del tracto de poliQ, cuanto más largo sea el tracto mayor es la severidad de los síntomas, y la enfermedad aparece en edades más tempranas (Zoghbi & Orr 2009, Orr 2012). Sin embargo, la patología no depende solo de la expansión, se ha visto que la localización de la proteína expandida en el núcleo es fundamental para el desarrollo de la enfermedad (Klement, Skinner *et al.* 1998). También lo es el dominio AXH y diferentes modificaciones postraduccionales que sufre la proteína (de Chiara, Menon *et al.* 2005, Tsuda, Jafar-Nejad *et al.* 2005).

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes para la regulación de Ataxina1 y para el desarrollo de la patología es la fosforilación. Se han descrito al menos 7 sitios de fosforilación *in vivo* en Ataxina1, entre los que destaca la serina 776 (Huttlin,

Jedrychowski *et al.* 2010). La fosforilación en la S776 es fundamental en la patogénesis, la quinasa encargada descrita es AKT, aunque hay estudios que afirman que en el cerebelo es PKA la que fosforila este residuo (Jorgensen, Andresen *et al.* 2009, Hearst, Lopez *et al.* 2010). Ratones con Ataxina1 expandida no desarrollan SCA1 si ese residuo no puede ser fosforilado, tampoco presentan inclusiones nucleares. Sin embargo, cuando en Ataxina1 *wt* este residuo es fosfomimético, los ratones desarrollan SCA1 en una forma leve. Por ello, se cree que la expansión del poliQ modifica la conformación estructural de la proteína de la misma manera que la fosforilación en S776 (Lim, Crespo-Barreto *et al.* 2008, Duvick, Barnes *et al.* 2010, Huttlin, Jedrychowski *et al.* 2010).

La fosforilación de este residuo es importante tanto para la estabilidad como para la interacción con otras proteínas. Las chaperonas de la familia 14-3-3 interaccionan solo cuando el residuo está fosforilado, siendo la interacción más fuerte cuando Ataxina1 está expandida. La función de estas chaperonas es impedir la desfosforilación de esta serina, protegiendo a la proteína de su degradación. Además, regulan la localización subcelular de Ataxina1, puesto que enmascaran la señal de localización nuclear, manteniendo a la proteína en el citosol (Chen, Fernandez-Funez *et al.* 2003, Lai, O'Callaghan *et al.* 2011). Cuando Ataxina1 se transloca al núcleo, se desfosforila en este residuo por PP2A. Se ha descrito que Ataxina1 expandida genera un elevado incremento de la actividad de PP2A en el cerebelo, situando a Ataxina1 como sustrato y regulador de PP2A (Ahn, McAvoy *et al.* 2007).

Los complejos que Ataxina1 forma con CIC o con RBM17 están también regulados por la fosforilación de la S776. Ataxina1 estabiliza a ambas proteínas, promoviendo sus respectivas funciones. En condiciones normales, en el cerebelo la mayor parte de Ataxina1 se encuentra en complejos con CIC, con la que interacciona por su dominio AXH. La fosforilación en la S776 parece contribuir a la formación y mantenimiento de estos complejos, pero sin esta fosforilación Ataxina1 y CIC pueden interaccionar. En cambio, los complejos con RBM17 son totalmente dependientes de fosforilación (Lam, Bowman *et al.* 2006, Lim, Crespo-Barreto *et al.* 2008, Jafar-Nejad, Ward *et al.* 2011). Ataxina1 fosforilada en su S776 forma complejos con RBM17, estabilizándolo. Cuando Ataxina1 está expandida, preferentemente se une a RBM17, lo que provoca una alteración de la expresión génica regulada por esta proteína. Aun así, parece que ambos complejos favorecen la patología de SCA1 debido al exceso/defecto de actividad de las dos proteínas. Es decir, la modificación del balance entre ambos complejos contribuye a la enfermedad SCA1 (Figura 10).

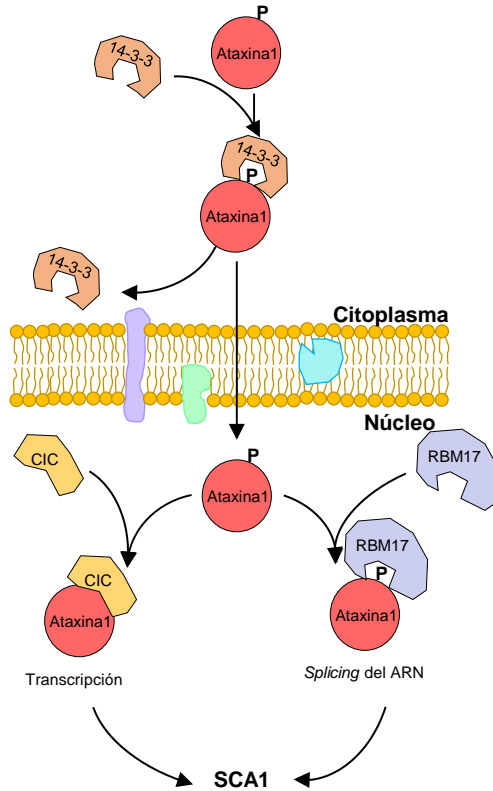


Figura 10: Representación esquemática del balance entre los complejos que Ataxina1 forma con RBM17 y con Capicua. Imagen modificada de (Orr 2012).

Otra modificación postraduccional importante para SCA1 es la ubiquitinación. Se ha visto que el tratamiento con inhibidores del proteasoma fomenta la formación de las inclusiones nucleares. Tanto Ataxina1 *wt* como expandida son poliubiquitinadas, pero la expandida es más resistente a la degradación por el proteasoma. El sistema UPS no es capaz de degradar completamente a esta proteína expandida, lo que genera agregados nucleares que colocalizan con ubiquitinas y con los distintos componentes del proteasoma (Cummings, Reinstein *et al.* 1999, Hong, Lee *et al.* 2008).

La sumoilación de Ataxina1 también se modifica como consecuencia de la expansión del tracto de poliQ, así como por la fosforilación en S776 y la localización subcelular. Ataxina1 expandida se encuentra menos sumoilada, pero se desconoce su efecto sobre la patología.

Por último, Ataxina1 se modifica por transglutaminación. Esta modificación postraduccional promueve la agregación de Ataxina1 expandida, y contribuye a la

incapacidad del sistema del proteasoma para degradar a la proteína debido a que obstruye el poro del proteasoma (Kahlem, Green *et al.* 1998, Mandrusiak, Beitel *et al.* 2003).

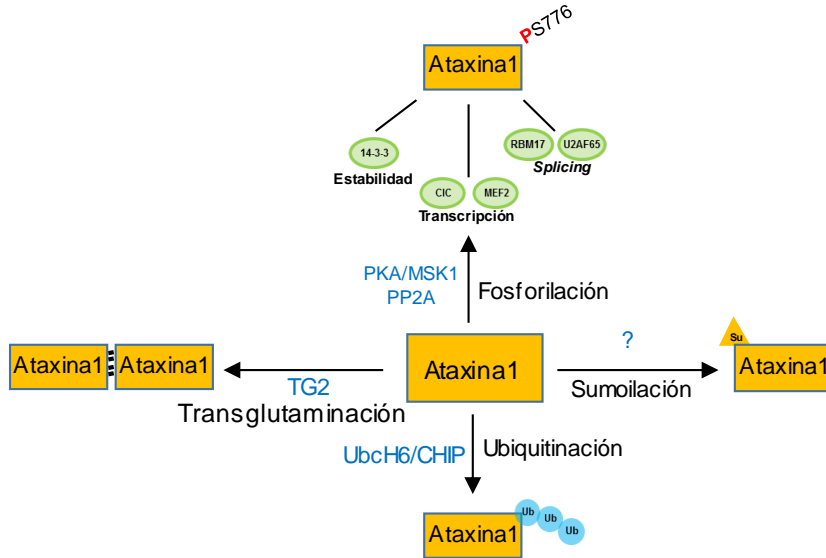


Figura 11: Representación esquemática de las modificaciones postraduccionales que sufre Ataxina1. Imagen modificada de (Ju, Kokubu *et al.* 2014).

2.3. SCA1 en otros tejidos

Uno de los síntomas de SCA1 es debilidad muscular y atrofia, que siempre se ha relacionado con la muerte de motoneuronas y por tanto con la pérdida de inervación hacia las células musculares. Sin embargo, se piensa que las células musculares pueden sufrir directamente las consecuencias de la expansión de Ataxina1 de forma independiente del sistema nervioso. Estos síntomas musculares generalmente aparecen muy pronto en el transcurso de la enfermedad, contribuyendo sustancialmente a la mortalidad. Ataxina1 es una proteína ubicua, se expresa en todos los tejidos regulando multitud de procesos, entre ellos rutas de señalización intracelular, regulación de la transcripción y metabolismo mitocondrial. Cuando sufre expansión, los agregados se forman en todos los tejidos. En estudios en *Drosophila* con la enfermedad de Huntington se ha visto que eliminando la proteína con expansión de poliQ en las células musculares disminuyen considerablemente los síntomas motores de la enfermedad (Huang, Yang *et al.* 2015). Por tanto, se propone que Ataxina1 expandida y otras proteínas mutadas en enfermedades poliQ causen un efecto directo sobre

● Introducción

tejidos periféricos, independientemente del efecto sobre el sistema nervioso (Ross, Aylward *et al.* 2014, Paulson, Shakkottai *et al.* 2017).

OBJETIVOS

- Caracterizar las variantes patogénicas de la quinasa humana VRK1 implicadas en neurodegeneración, analizando su estabilidad, actividad, fenotipo y capacidad de respuesta a la reparación del daño en el ADN tras el tratamiento con agentes quimioterapéuticos.
- Caracterizar la implicación de VRK1 en la enfermedad neurodegenerativa Ataxia espinocerebelosa tipo I, estudiando su posible interacción con Ataxina1, el efecto del silenciamiento de la quinasa sobre esta proteína y la posibilidad de que Ataxina1 sea sustrato de fosforilación de VRK1.

Materiales y métodos

“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia”



Santiago Ramón y Cajal

1. Técnicas de manipulación del ADN

1.1. Obtención y purificación del ADN plasmídico

Para la obtención del ADN plasmídico de *Escherichia coli* (*E. coli*) se utilizó la técnica de lisis alcalina descrita en 1979 por BirnBoim y Doly (Birnboim & Doly 1979). Mediante este método, el ADN plasmídico se obtiene tras la lisis de *E. coli* y la desnaturalización del ADN cromosómico y de las proteínas, en un proceso que depende de la alcalinización de las bacterias con NaOH (hidróxido sódico) en presencia del detergente aniónico SDS (sodio dodecil sulfato).

La extracción de plásmidos de ADN de alta pureza se realizó mediante el método clásico de fenol-cloroformo, en el que tras una serie de lavados con fenol-cloroformo las proteínas se eliminan y el ADN plasmídico se precipita con etanol. Normalmente, la extracción de plásmidos a pequeña escala (*Mini-prep*) se realizó utilizando el kit comercial *NucleoSpin® plasmid* (MACHEREY-NAGEL) siguiendo el protocolo de la compañía. Brevemente, se utilizó 1 mL de cultivo de *E. coli* saturado crecido en medio LB (*Lysogeny Broth*), que se precipitó a 11.000 x g durante 30 seg en una microcentrífuga (*Eppendorf*), descartando el sobrenadante. Las células precipitadas se lisaron a temperatura ambiente (*RT*), y el lisado celular se centrifugó a 11.000 x g durante 5 min utilizando una columna con membrana sílica. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces a 11.000 x g durante 2 min y el ADN se eluyó de la membrana utilizando un tampón TE (10 MM Tris pH 8,0 y 1 mM EDTA), centrifugando 1 min a 11.000 x g. Para la extracción de ADN plasmídico a gran escala (*Maxi-prep*), se utilizaron dos kits comerciales, *JETStar Plasmid Purification System* (Genomed), y *GeneJet Plasmid Maxiprep* (*Thermo Fisher scientific*), de acuerdo con los protocolos indicados por ambas casas. En ambos casos, se precipitaron 400 mL de cultivo saturado de *E. coli* en centrifugas *Avanti™ J-25* (*Beckman Coulter, Inc.*), a 2.500 x g durante 8 min o a 5.000 x g durante 5 min. Posteriormente, las células se lisaron a *RT* y el lisado se neutralizó y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min o a 20.000 x g durante 20 min. Con el primer kit, el sobrenadante se cargó en una columna con membrana sílica, que posteriormente se lavó una vez, y después se eluyó el ADN. Luego el plásmido se precipitó con isopropanol centrifugando a 12.000 x g durante 30 min, y después se lavó con etanol 70%, centrifugando a 12.000 x g durante 15 min. Finalmente, el precipitado de ADN se dejó secar en torno a 10 min, y después se eluyó en tampón TE. Con el segundo kit, el sobrenadante se mezcló con un volumen de etanol al 96%, y la mezcla se transfirió a una columna con membrana sílica, que se centrifugó a 2.000 x g durante 3 min. Posteriormente, la columna se lavó tres veces, con solución

● ● ● **Materiales y métodos**

de lavado. Finalmente, se utilizó un tampón de elución para extraer el ADN de la columna.

1.2. Cuantificación del ADN plasmídico

La concentración final del ADN plasmídico purificado se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Hitachi U-2001 (Hitachi High-Tech)*. Para conocer la pureza del ADN, se realizó el cociente entre las absorbancias A260/A280, que debe encontrarse entre 1,8 y 2,0 para el ADN purificado. También se utilizó el espectrofotómetro *NANODrop (NanoDrop Technologies)*. Finalmente, la concentración y la pureza del ADN obtenido se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa del 1% m/v.

1.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en función del tamaño y la carga de los fragmentos debido a los grupos fosfato presentes en el ADN, en un gel de agarosa del 1% m/v preparado en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8,0 y 1 mM EDTA). Este tampón mantiene el pH cercano a 8,0 durante el proceso de electroforesis, lo que es importante puesto que la migración del ADN a través de la agarosa depende de la carga negativa de los fosfatos y de la carga iónica presente en el medio. Como el ADN presenta carga negativa, migra desde el polo positivo al negativo cuando se aplica una corriente eléctrica constante de entre 50 y 70 voltios. Para observar los fragmentos de ADN, se utilizó bromuro de etidio (0,5 µg/mL) diluido en el tampón de electroforesis. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se sitúa entre las bases nitrogenadas del ADN emitiendo fluorescencia cuando se expone a luz UV. Así, la fluorescencia emitida por los fragmentos de ADN se puede visualizar utilizando una cámara digital presente en el analizador de imagen *Gel Doc TM (Bio-Rad)*. La imagen resultante se imprimió en papel térmico. Para analizar el tamaño de los fragmentos de ADN, se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*.

1.4. Generación de vectores de ADN recombinante

Los vectores de ADN recombinante se obtuvieron insertando secuencias codificantes específicas de ADN en los vectores de interés mediante la digestión de los fragmentos

de ADN con endonucleasas de restricción (*Fermentas - Thermo Fisher Scientific*) desde otros vectores, y la posterior ligación con la enzima *T4 DNA-ligase (Promega)*. Con las construcciones, se transformaron bacterias *E. coli* competentes (DH5 α o BL21), plaqueadas en medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o cloranfenicol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en función de la resistencia presente en el vector, e incubadas a 37°C toda la noche. De esta forma, solo las bacterias con el vector de interés fueron capaces de sobrevivir al antibiótico. El ADN se extrajo y purificó por *Mini-prep*, y el vector con la secuencia de interés se analizó mediante digestión enzimática y secuenciación. El análisis y alineamiento de las secuencias de ADN se realizó con los programas informáticos *Chromas (Technelysium Pty)* y *Blast (National Library of Medicine, NCBI)*. Los oligonucleótidos utilizados para la clonación se detallan en la Tabla 1.

1.5. Transformación de plásmidos en *E. coli*

El ADN recombinante se utilizó para transformar bacterias *E. coli* competentes, ya sea DH5 α o BL21. Normalmente, se utilizó DH5 α para producir el ADN plasmídico y BL21 para producir proteínas recombinantes. La transformación se realizó mediante el método del choque térmico. Esto es, se añadió una pequeña cantidad de ADN (50-100 ng) a las bacterias competentes, mezclando suavemente para homogeneizar, y se dejaron incubando en hielo unos 30 min. Después, se realizó la transformación con choque térmico a 42°C durante 45 seg, devolviendo las bacterias de nuevo al hielo durante al menos 2 min. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio LB sin antibiótico y las bacterias se dejaron recuperando en un incubador en agitación durante 1 h a 37°C. Tras este tiempo se eliminó el LB mediante centrifugación suave y las bacterias se plaquearon en una placa Petri con LB-agar y con el antibiótico adecuado en función de la resistencia del vector. Las bacterias se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias aisladas obtenidas se analizaron mediante digestión enzimática y/o secuenciación. Aquellas que resultaron positivas para la expresión del ADN recombinante se criopreservaron con glicerol estéril al 30% v/v a -80°C.

1.6. Mutagénesis sitio-dirigida

Las mutagénesis sitio-dirigidas se realizaron en base al protocolo del sistema comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*. Las reacciones de PCR se prepararon utilizando 50 ng del ADN a mutar (molde), 10 μM de cada oligonucleótido

● ● ● **Materiales y métodos**

con el sitio para la mutagénesis incluido (Tablas 2, 3 y 4) y 0,2 mM dNTPs (*Hoffman-La Roche*). En algunos casos se utilizó tampón 1x (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM MgSO₄, 1% Tritón X-100, BSA 1 mg/mL) y una unidad de *PFU turbo DNA polymerase* (*Stratagene*), y en otros *PFU DNA polymerase* (*Biotools*, *B&M Labs*). El volumen final de las reacciones fue de 20 µL.

La PCR se llevó a cabo durante 16 ciclos de la siguiente manera:

PFU turbo DNA polymerase:

- 94°C durante 5 min (desnaturalización inicial).
- 94°C durante 30 seg (desnaturalización).
- 55°C durante 1 min (hibridación).
- 72°C durante 14 min (elongación).
- 72°C durante 15 min (elongación final).

PFU DNA polymerase:

- 94°C durante 3 min (desnaturalización inicial).
- 94°C durante 3 min (desnaturalización).
- 55°C durante 1 min (hibridación).
- 68°C durante 14 min (elongación).
- 72°C durante 10 min (elongación final).

Tras la PCR, el ADN molde se eliminó utilizando la enzima *DpnI* (*Fermentas – Thermo Fisher Scientific*), que corta el ADN metilado y hemimetilado, pero no las copias mutadas, permitiendo limpiar la muestra del molde. El producto de PCR se transformó en DH5α y se seleccionaron las colonias positivas utilizando el correspondiente antibiótico en función de la resistencia del vector. Para confirmar que la mutagénesis se realizó correctamente, se secuenció el ADN y se analizó el resultado con los programas informáticos *Chromas* (*Technelysium Pty, Lda*) y *Blast* (*National Library of Medicine, NCBI*).

2. Técnicas de manipulación del ARN

2.1. Purificación del ARN

Para extraer ARN de las células de mamíferos, éstas se plaquearon en placas multipocillo *Style* de 6 pocillos y tras 24 horas se llevó a cabo el tratamiento adecuado:

transfección o silenciamiento. Después, las células se lavaron con PBS 1x y el ARN se extrajo utilizando el kit comercial *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Para la extracción, se lisaron las muestras y se homogeneizó en ARN en tampón de lisis (*RLT*), que contiene tiocianato de guanidina para inactivar las ribonucleasas, complementado con β -mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*) y etanol al 70% (*Sigma-Aldrich*). El volumen total se transfirió a una columna de purificación con membrana sílica y se centrifugó a 9.350 x g durante 15 seg a *RT*. Posteriormente, el ARN se lavó con distintos tampones, centrifugando de la misma forma que en el paso anterior. Finalmente, se eluyó el ARN de la columna utilizando agua libre de RNasas (*Qiagen*).

2.2. Evaluación de la calidad del ARN

El ARN se cuantificó en el espectrofotómetro *NANODrop* (*NanoDrop Technologies*). Se analizó el ratio a 260/280 y 260/230 nm para evaluar la calidad del ARN. Ambos ratios deben estar cerca de 2,0 para asegurar una buena calidad. Por debajo de 1,7 el ARN se volvió a purificar, puesto que podía estar contaminado con proteínas o compuestos orgánicos.

2.3. RT-PCR cuantitativa

La RT-PCR cuantitativa (*Quantitative reverse transcriptase-PCR*, *qRT-PCR*) es un método efectivo que permite la amplificación y cuantificación de una molécula concreta de ARN. Este sistema se basa en la capacidad de la enzima transcriptasa reversa para transformar ARN en ADN, que es el amplificado por PCR. El número de copias del ARN problema se puede cuantificar de forma precisa al principio de la reacción gracias al ciclo límite (*Ct*, *cycle threshold*), que se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente sea superior a la de fondo. Los niveles de *Ct* son inversamente proporcionales a la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la *qRT-PCR* se especifican en la Tabla 1. Para llevar a cabo este proceso, se utilizó el kit comercial *iScript™ One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green* (*Bio-Rad*). La reacción se llevó a cabo en el termociclador *iCycler* (*Bio-Rad*) y los datos se analizaron utilizando el programa *BioRad Iq5* (*Bio-Rad*). En cada experimento los niveles de ARN se normalizaron utilizando los niveles de expresión del gen *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*GAPDH*), que fueron determinados en cada muestra.

3. Técnicas de manipulación de proteínas

3.1. Purificación de proteínas de fusión con GST (Glutación S-Transferasa)

La expresión y purificación de proteínas etiquetadas con GST es una técnica muy útil para producir grandes cantidades de proteínas. La expresión y purificación se realizaron en bacterias BL21, que previamente fueron transformadas con el vector pGEX-4T-GST con la secuencia codificante de la proteína a expresar. Este vector presenta un promotor *lac* inducible que puede ser químicamente activado por lactosa o por un análogo de ésta, como el IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido).

Las bacterias transformadas se preincubaron a distintas diluciones toda la noche en agitación a 37°C en medio LB con el antibiótico adecuado. Al día siguiente, se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) y aquella dilución que se encontraba a una DO_{600nm} no superior a 0,6 se utilizó para inocular un cultivo de 200 mL, que creció a 37°C hasta que volvió a alcanzar la DO_{600nm} de 0,6. En este punto, las bacterias se encuentran en fase de crecimiento exponencial, y es posible inducir la expresión de la proteína añadiendo 0,2 mM de IPTG (*Roche Applied Science*), dejando las bacterias 3 h más en agitación a 37°C. Después, el cultivo se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min. Las bacterias se resuspendieron en tampón de lisis (1% Tritón x-100, 0,2 µg/mL lisozima, 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro), 5 mM DTT (ditiotreitól), 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL leupeptina en PBS 1x). La suspensión se sonicó utilizando el sonicador *Vibra Cell (Sonics)* realizando 5 sonicaciones de intensidad media cada 10 seg descansando 10 seg entre cada una, en hielo. Posteriormente, la suspensión se dejó en hielo durante 30 min y luego se centrifugó a 19.000 x g durante 30 min. En este momento las proteínas inducidas se encuentran en el sobrenadante, por lo que se cogió una alícuota para comprobar mediante un gel que la inducción se había realizado correctamente. La fracción soluble se incubó durante 2 h en agitación suave con 100 µL de la resina *Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare)*, que tiene alta afinidad por las proteínas unidas a GST. Después, la resina se lavó 3 veces con PBS 1x con inhibidores de proteasas, centrifugando a 400 x g durante 4 min a 4°C. La proteína unida a GST se eluyó de la resina utilizando una solución de glutatión reducido 10 mM en 50 mM Tris-HCl pH 8,0, en agitación a 4°C durante 2 h. La proteína eluida se separó de la resina centrifugando a 400 x g durante 4 min. Para confirmar la purificación de la proteína, se llevó a cabo una electroforesis *SDS-PAGE*, seguida por una tinción con azul de *Coomassie*, (apartado 3.3 de Materiales y Métodos). Finalmente, se determinó la concentración de la proteína mediante técnicas colorimétricas con *Bio-Rad protein*

assay (*Bio-RAD*) utilizando la seroalbúmina bovina (*BSA*) para generar una curva estándar.

3.2. Electroforesis en geles *SDS-PAGE*

La separación de proteínas se llevó a cabo en función de su tamaño en condiciones desnaturizantes, mediante electroforesis vertical en *SDS-PAGE*. El SDS es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas y se une a ellas, confiriéndoles carga negativa debido a sus grupos sulfato, lo que enmascara la carga de la proteína. De esta forma, todas las proteínas tienen un ratio carga/masa uniforme, lo que permite la separación solo por tamaño. Se utilizaron tres geles separadores (*resolving*) diferentes en función del tamaño de la proteína a observar. Para proteínas de menos de 30 kDa, se utilizó un gel de acrilamida del 12,5%, para proteínas de tamaño medio, entre 30 kDa y 100 kDa, se utilizaron geles del 10%, y para las mayores de 100 kDa, del 7,5%. Estos geles se prepararon con 7,5-12,5% acrilamida, 0,13%-0,4% bis-acrilamida, en Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y 3,5 mM SDS. El gel concentrador (*stacking*) se preparó utilizando un 4,8% de acrilamida, 0,128% bis-acrilamida en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y 3,5 mM SDS. Para la solidificación de ambos geles se utilizó persulfato de amonio (APS) y, como agente catalítico para la formación de radicales libres, TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina). Antes de cargar las muestras en el gel de acrilamida, se resuspendieron en 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), y se calentaron a 100°C durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes con el tampón apropiado (25 mM Tris-HCl, 200 mM glicina y 1,7 mM SDS) y se utilizó el marcador de peso molecular *Precision plus Protein™ Standards Dual Color* (*Bio-Rad*).

3.3. Tinción con azul de *Coomassie*

Para visionar las proteínas en geles de poliacrilamida, se utilizó la tinción azul de *Coomassie*. El azul de *Coomassie* se preparó con 0,5% *Coomassie brilliant blue R250* (*Merck*), 50% metanol (*Sigma-Aldrich*) y 10% ácido acético glacial (*Merck*). Esta solución se añadió directamente a los geles de poliacrilamida, se dejó incubando en agitación suave durante 10-15 min y posteriormente se lavó con una solución que contiene 50% metanol (*Sigma-Aldrich*) y 10% ácido acético glacial (*Merck*). Cuando las bandas de las proteínas se hicieron visibles, el gel se escaneó con *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*).

3.4. Transferencia húmeda y *Western blot* de extractos proteicos

Tras la electroforesis en *SDS-PAGE*, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilon-P* o *Immobilon-FL* (*Millipore*), siguiendo el protocolo descrito por Towbin (Towbin, Staehelin *et al.* 1979). Primero, las membranas se activaron durante 2 min en metanol (*Sigma-Aldrich*), y se equilibraron durante otros 2 min en agua *MilliQ*. Después, se llevó a cabo la transferencia durante 90 min a 90 V y 4°C con un tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicina y 10-20% de metanol en agua *milliQ*), que varía en la concentración de metanol en función del tamaño de las proteínas a analizar, de forma que las más pequeñas necesitan mayores cantidades de metanol y las más grandes, menos cantidad. Cuando se creyó necesario, las membranas se incubaron durante 5-10 min con rojo *Ponceau S* para verificar que la transferencia tuvo lugar correctamente. Tras la transferencia, las membranas se lavaron varias veces con TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl y 0,1% Tween-20 (*Sigma-Aldrich*) en agua *milliQ*) y se bloquearon con 5% de leche desnatada en polvo o con *BSA* en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario concreto, siguiendo la hoja técnica específica de la casa comercial (Tabla 6). Normalmente, los anticuerpos primarios se prepararon en 1% *BSA* en TBS-T o en TBS-T y se incubaron durante 1 o 2 h a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron al menos 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios más utilizados fueron *Goat Anti-Mouse IgG*, *DyLightTM 680* (color rojo) y *Goat Anti-Rabbit IgG*, *DyLightTM 800* (color verde) (*Thermo Fisher Scientific*), a una dilución 1:10.000 durante 1 h en oscuridad. Después, las membranas se lavaron con TBS-T tres veces aproximadamente cada 10 min, y se escanearon en el escáner *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*), que detecta la fluorescencia asociada al anticuerpo secundario.

En ocasiones concretas, el anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado con peroxidasa (*ECL Anti-Mouse IgG*, *Horseradish peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody* (*Amersham Biosciences*) o *Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase Conjugate* (*Sigma-Aldrich*)). En estos casos, después de 1 h de incubación con el anticuerpo secundario (1:10.000), la luminiscencia se detectó con *ECL Western Blotting Detection Reagent* (*Amersham Biosciences*) tras 5 min de incubación, utilizando películas de rayos X (*Fujifilm*).

3.5. Tinción con rojo *Ponceau S*

En algunos experimentos en particular, las membranas de PVDF se sometieron a rojo *Ponceau S* para verificar si la transferencia se realizó de forma correcta. Para ello, las membranas se incubaron unos 5 min en una solución con 0,2% *Ponceau S* (3-hidroxi-4-2-sulfo-4-(4-sulfo-fenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico), 3% ácido sulfosalicílico, 3% ácido trifluoroacético y 1% ácido acético. Tras la incubación, las membranas se lavaron con agua hasta que se vieron las bandas.

4. Líneas celulares

4.1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo y su medio de cultivo se encuentran detallados en la Tabla 7. En general, todas las células se cultivaron en *Dulbecco's modified Eagle's-low glucose (DMEM)* (*Sigma-Aldrich*) con un 10% de suero fetal bovino (*FBS*) (*Gibco®-Life Technologies-Invitrogen*), 2 mM L-glutamina, y los antibióticos penicilina (50 unidades/mL) y estreptomycin (50 µg/mL) (*Gibco®*). Las células crecieron en un incubador *HERAcell 150i CO₂* (*Thermo Fisher Scientific*) a 37°C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa. Para levantar las células de sus placas de cultivo, se utilizó *TrypLE™ express* (*Gibco®*), compuesto libre de componentes derivados de animales que permite una recolección efectiva y rápida de las células sin dañarlas ni afectar a sus rutas de señalización intracelulares. Normalmente, después de levantarlas, las células se plaquearon en placas de cultivo celular *Style* de 100 x 20 mm, 60 x 15 mm o 35 x 15 mm, y en multiplacas de 6, 12, 24 o 96 pocillos, en función de las necesidades del experimento. Todas las líneas celulares se examinaron en un microscopio invertido *Zeiss Axiovert 25* (*Carl Zeiss AG*).

Para el conteo de células, se utilizó un *Coulter Counter* de la serie Z (*Life Sciences*). Se contaron todos los eventos de entre 8 y 24 µm.

4.2. Generación de líneas celulares estables

Para determinados experimentos, se generaron líneas celulares estables a partir de la línea *HeLa*, utilizando vectores lentivirales mediante el procedimiento de transducción viral (apartado 6 de Materiales y Métodos). Para estas líneas celulares, transformadas con vectores resistentes a blasticidina, el medio de cultivo DMEM fue suplementado

● ● **Materiales y métodos**

con 10 µg/mL de blasticidina (*InvivoGen*). Pasada una semana, las células que no habían sido infectadas murieron, manteniéndose aquellas que presentaban el vector lentiviral con la resistencia al antibiótico.

La expresión de las proteínas introducidas con los vectores lentivirales se comprobó mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal, y mediante electroforesis y *SDS-PAGE*.

4.3. Clonación de célula única de líneas celulares estables

Para eliminar la heterogeneidad debida a la inserción aleatoria de los vectores lentivirales en las líneas celulares generadas, se llevó a cabo la clonación de célula única, para poder disponer de una colección de células con las mismas características genéticas.

Para ello, las células se lavaron con PBS 1x y se filtraron con un filtro de 35 µm utilizando los tubos de citómetro *Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube (Corning Life Sciences)*, con el objetivo de eliminar posibles agregados celulares. Las células filtradas se separaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro *BD FACSAria™ III (BD Biosciences)* de forma que, en base a la relación entre tamaño y forma, se consiguiera separar una única célula por pocillo, en placas de 96 pocillos, con 200 µL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10 µg/mL de blasticidina (*InvivoGen*).

Tras dos semanas de crecimiento, se contaron los clones obtenidos, que se plaquearon en placas de mayor tamaño sucesivamente para obtener finalmente un cultivo celular estándar. Normalmente, la eficiencia de la técnica fue del 6-20%. La expresión de la proteína correspondiente se comprobó mediante técnicas de inmunofluorescencia.

4.4. Ensayo de cierre de herida

Los ensayos de cierre de herida se realizaron a partir de cultivos monocapa de líneas celulares estables, generando la herida con una punta de 0,75 mm de diámetro sobre el cultivo confluyente. El cierre de la lesión se determinó realizando fotos de campo claro durante 10 min, las horas necesarias para que la herida se cerrara. El análisis del área de la lesión se realizó con el programa *ImageJ*.

5. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo monocapa

5.1. Transfección con *JetPEI*[™]

La sobreexpresión de proteínas se llevó a cabo mediante la transfección de las células con ADN plasmídico específico (Tabla 8). 24 horas antes de transfectar, las células se plaquearon en placas de cultivo *Style* para obtener una confluencia óptima de 50-70%. La transfección se hizo con *JetPEI*[™] (*Polyplus Transfection SA*), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Este compuesto está basado en un polímero, polietilimina (PEI), que compacta el ADN dentro de partículas cargadas positivamente, que se adhieren a la carga negativa de los proteoglicanos de la superficie celular, permitiendo la entrada a la célula por endocitosis. El ADN se resuspendió en NaCl 150 mM, y el *JetPEI*[™] se resuspendió de la misma manera, y se añadió en proporción 2:1 al ADN. La cantidad de ADN utilizada fue específica para cada plásmido, aunque la concentración final del ADN en solución se mantuvo constante dentro de cada experimento. La mezcla de ADN y *JetPEI*[™] se incubó entre 20-30 min y posteriormente se vertió gota a gota sobre las células.

5.2. Transfección con *Lipofectamine*[™]

La supresión de VRK1 se llevó a cabo utilizando SiARN específicos (Tabla 5) proporcionados por *Dharmacon RNA Technologies (Dharmacon, Inc.)*. De forma simultánea, se utilizó *ON-TARGET plus siControl Nontargeting siRNA (Dharmacon, Inc.)*, un control negativo que no tiene diana en células humanas. Esta supresión genética se llevó a cabo utilizando el reactivo *Lipofectamine*[™] 2000 (*Invitrogen*), que contiene subunidades lipídicas que pueden producir liposomas en ambientes acuosos. Los liposomas tienen una naturaleza catiónica, lo que les permite formar un complejo de carga negativa con el ARN, eliminando las repulsiones electrostáticas de la membrana celular, también cargada negativamente. Esto permite la fusión del complejo con la membrana celular y su introducción en la célula.

Para llevar a cabo esta transfección, las células se plaquearon sin antibióticos. La *Lipofectamine*[™] 2000 se diluyó en *Opti-MEM (Gibco®)* y éste se añadió al SiARN resuspendido en *Opti-MEM*. Tras 20 min de incubación, la mezcla se vertió gota a gota sobre las células. 24 horas después, se cambió el medio a las células con el fin de añadir los antibióticos.

Adicionalmente, se utilizó el compuesto *Lipotransfectin* (Solmeclas) de la misma manera que la *Lipofectamine™ 2000*.

6. Transducción viral

La transducción viral utiliza vectores virales como estrategia de empaquetamiento para introducir ADN en las células. Para este trabajo se han utilizado los vectores lentivirales especificados en la Tabla 8. Estos vectores son capaces de transducir células tanto en división como células que no se están dividiendo, por lo que son un sistema altamente eficiente. Para el empaquetamiento de genes, estos vectores utiliza los genes *gag*, *pol* y *env*. Esto es, el vector lentiviral se transfecta junto con un vector que expresa los genes *gag* y *pol*, *pCMV-dRp8.91*, y con otro vector que expresa el gen *env*, *pMD26-VSV-G*.

En el proceso, el primer día se plaquearon células *HEK-293T*, y cuando se obtuvo la confluencia necesaria, se llevó a cabo la transfección con 9 µg del vector lentiviral y sus vectores de empaquetamiento, resuspendidos en 150 mM NaCl, igual que en una transfección normal (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). A las 24 horas de la transfección, se cambió el medio de las células. Al día siguiente, se sembraron las células a infectar; es decir, *HeLa*. Al día siguiente, se llevó a cabo la transducción añadiendo el medio de cultivo de las *HEK-293T* sobre las células *HeLa*. Para ello, el medio se filtró con un filtro de 0,45 µm (*Acrodisc® Syringe Filters, Pall Corporation*) y se añadieron 4 µg/mL de polibreno (*Sigma-Aldrich*). El polibreno es una molécula pequeña de carga positiva que puede unirse a la superficie celular para neutralizar su carga, permitiendo así a las glicoproteínas virales unirse de forma eficiente a los receptores. Este proceso se llevó a cabo tres veces cada 12 h, y después las células se seleccionaron con 10 µg/mL de blasticidina, ya que el vector lleva el gen de resistencia a este antibiótico.

Como control de transducción y de actividad del antibiótico, se infectó una placa en paralelo con un vector que expresa GFP pero que carece de la resistencia al antibiótico. De esta manera, se pudo observar mediante microscopía la fluorescencia emitida por las células, significado de una buena infección. A la hora de la selección, se observó la muerte de estas células al cabo de una semana, mientras que las células infectadas para el experimento, resistentes a blasticidina, permanecieron vivas.

7. Extractos proteicos

7.1. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo

Las células en cultivo se levantaron de las placas y se lisaron con un tampón de lisis suave, compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl y 1% Tritón X-100 en agua *milliQ*, complementado con inhibidores de fosfatasa (1 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄ (ortovanadato de sodio)) y con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptina y 10 µg/mL aprotinina). La suspensión se incubó en hielo durante 20 min y posteriormente se centrifugó durante 20 min a 16.100 x g a 4°C. Las proteínas quedaron presentes en el sobrenadante, descartando el precipitado.

Para medir la concentración de proteína extraída, se utilizó el método *Bradford*, que se basa en el cambio de color del colorante *G-250 Coomassie* que pasa de pardo a rojo-azulado cuando se une a las proteínas, lo que modifica su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm. El reactivo utilizado fue *Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad)*. Se utilizó la proteína seroalbúmina bovina (*BSA*) para generar la recta patrón.

7.2. Fraccionamiento núcleo-citosol de extractos proteicos

Para obtener extractos proteicos a partir del núcleo y del citosol de forma individual, las células se lisaron en un tampón de lisis de fracción citosólica (10 mM HEPES pH 7,6, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5% glicerol y 0,5% IGEPAL CA-630). La solución se centrifugó a 1.250 x g durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante, que representa la fracción citosólica. El precipitado se lavó dos veces con tampón de lisis citosólico, centrifugando a 1.250 x g durante 5 min a 4°C para evitar posibles contaminaciones de citosol en la fracción nuclear. Después, ese precipitado se lisó con el tampón de lisis de la fracción nuclear (10 mM HEPES pH 7,0, 1,1 mM EGTA, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl y 25% glicerol) y se dejó incubando en hielo durante 20 min. Tras este tiempo, la muestra se centrifugó a 1.250 x g durante 5 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante, que representa la fracción nuclear.

Finalmente, para conocer la concentración de proteínas de cada fracción, se llevó a cabo la cuantificación por el método *Bradford*, y las muestras se analizaron mediante electroforesis y *SDS-PAGE*.

7.3. Fraccionamiento mitocondria-citosol de extractos proteicos

Para obtener extractos proteicos de mitocondria y citosol de forma individual, se llevó a cabo el aislamiento de orgánulos siguiendo el protocolo de Christian Frezza (Frezza, Cipolat *et al.* 2007). Brevemente, las células lavadas con PBS 1x frío se resuspendieron en tampón IBc frío (0,1 M Tris/MOPS pH 7,4, 0,1 M EGTA/Tris pH 7,4 disueltos en sucrosa 1M) y se homogeneizaron mecánicamente utilizando un mortero de Teflón. El homogeneizado se centrifugó a 600 x g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 7.000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido en este paso corresponde con la fracción citosólica. El precipitado se lavó con IBc frío y se centrifugó a 7.000 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado corresponde con las mitocondrias funcionales. Estas mitocondrias se lisaron en tampón de lisis *RIPA* (150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 4 mM EDTA, 50 mM Hepes, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 10% glicerol), dejándolas en hielo durante 20 min y centrifugando a 16.100 x g durante 5 min a 4°C.

Finalmente, las dos fracciones se cuantificaron utilizando el método *Bradford* y las muestras se analizaron por electroforesis y *SDS-PAGE*.

8. Ensayos de interacción entre proteínas

8.1. Ensayos de coimmunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones (IP) se llevaron a cabo utilizando entre 0,5 y 2 mg de proteína a partir de los extractos celulares, en un volumen total de 1 mL. Primero, el extracto se incubó con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4°C en agitación, utilizando una concentración de anticuerpo entre 1:50 y 1:500, dependiendo de las instrucciones de la hoja técnica. Como control negativo, se utilizó una muestra con un anticuerpo inespecífico. Después, los extractos se incubaron con 40 µL de la resina equilibrada *Gammabind plus Sepharose* (GE Healthcare) o con 20 µL de la resina equilibrada *Protein G Agarose Resin 4 Rapid Run™* (Agarose Bead Technologies) durante toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente, en rotación (para equilibrar la resina, se lavó 3 veces centrifugando a 400 x g durante 2 min a 4°C con tampón de lisis). Durante este tiempo, el anticuerpo unido a la proteína específica se une a la resina, pudiéndose así precipitar la proteína. Después, la resina unida a las proteínas se precipitó centrifugando a 400 x g durante 2 min, y se lavó al menos 3 veces con tampón de lisis, centrifugando de la misma forma. La resina precipitada se

resuspendió en tampón de carga y se calentó a 100°C durante 5 min. Las muestras se analizaron mediante electroforesis y *SDS-PAGE*.

8.2. Ensayos de *Pull-Down*

En los ensayos de *Pull-Down* (PD), se precipitan proteínas fusionadas a GST previamente transfectadas para observar los complejos proteicos o las interacciones que llevan a cabo.

Después de transfectar con la proteína a estudiar fusionada a GST, las células se lisaron en tampón de lisis (apartado 7.1 de Materiales y Métodos). Posteriormente, se incubaron entre 0,5 mg y 2 mg del extracto proteico total, con la resina *Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare)*, previamente equilibrada con tampón de lisis, de la misma forma que se equilibró la resina para IP. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C en rotación. Después, la resina se centrifugó a 400 x g durante 2 min a 4°C y se lavó 3 veces con tampón de lisis, centrifugando de la misma forma. La resina precipitada se resuspendió en tampón de carga y se calentó a 100°C durante 5 min. Finalmente, las muestras se analizaron mediante electroforesis y *SDS-PAGE*.

9. Cromatografía líquida de exclusión molecular HPLC (*High-performance liquid chromatography*)

La cromatografía es un método de separación de mezclas complejas para su posterior caracterización. Las técnicas de cromatografía son muy variadas, pero todas se basan en la separación de los componentes de una mezcla en función de las características de dichos componentes, que luego serán detectados. Siempre hay una fase móvil, un gas, líquido o fluido supercrítico que a través de un flujo constante de alta presión arrastra a la muestra hasta una columna, donde se encuentra la fase estacionaria. En esta fase, los componentes de la muestra se quedan retenidos durante más o menos tiempo en función de su composición, circulando por la columna a distintas velocidades, lo que permite la separación de los distintos componentes. De esta forma, las partículas más pequeñas son las últimas en salir de la columna, puesto que recorren con más facilidad los poros que se encuentran en la misma, haciendo un recorrido mayor, y las más grandes salen más rápidamente. Combinar esta técnica con electroforesis *SDS-PAGE* nos permite conocer las proteínas presentes en diferentes complejos multiproteicos de distinto peso molecular, comparar la diferencia en el peso molecular

● ● ● **Materiales y métodos**

entre las proteínas nativas y desnaturalizadas, así como obtener información sobre la estructura cuaternaria de las proteínas.

Para llevar a cabo este experimento, las células se lisaron en tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM β -glicerolfosfato, 10% glicerol y 1% Tritón-X-100) al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa. Después de centrifugar el lisado, el sobrenadante se filtró con una jeringa. De estos extractos, se fraccionaron 3 mg por HPLC en una columna *Superose 12/10/300 GL (GE Healthcare)*. Para equilibrar y eluir la columna, se utilizó un tampón con 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM KCl y 0,025% azida sódica, que se filtró utilizando un filtro de 0,42 μ m y se desgasificó por sonicación. Las muestras se pasaron por la columna a un flujo de 0,3 mL/min, y se recogieron fracciones de 200 μ L. De estas fracciones, solo se trabajó con las impares. Las proteínas se precipitaron, se resuspendieron en tampón de carga y se calentaron a 100°C durante 5 min para su posterior análisis mediante electroforesis y *SDS-PAGE*.

Para la calibración de la columna y la estimación de los pesos moleculares de las muestras, se utilizaron la tiroglobulina bovina (670 kDa), la γ -globulina bovina (150 kDa), la ovoalbúmina de pollo (44 kDa), la mioglobina de caballo (17 kDa) y la vitamina B12 1,35 (kDa), como marcadores de peso molecular.

10. Inmunofluorescencia, microscopía confocal y microscopía de campo claro

Para analizar los niveles y la localización subcelular de proteínas endógenas o sobreexpresadas en cultivos celulares, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia (IF). Para ello, las células se cultivaron en placas con cubreobjetos (*Thermo Fisher Scientific*). En el caso de células semiadherentes o cuando los tratamientos afectaban a la adherencia de las células, se utilizó 0,01% poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*), que incrementa la adhesión celular al cristal. Posteriormente, las células se fijaron con 1-3% de paraformaldehído (*Sigma-Aldrich*), durante 30 min a *RT*. Para reducir el exceso de grupos aldehído después de la fijación, las células se trataron con 20 mM glicina durante 15 min. Posteriormente, se permeabilizaron con 0,2% Tritón-X-100 en PBS 1x durante 30 min. Finalmente, las células se bloquearon con 1% *BSA* en PBS 1x durante al menos 1 h a *RT*, o durante toda la noche a 4°C.

Tras este proceso, las células se incubaron con el anticuerpo primario en la dilución adecuada, con 1% *BSA* y azida sódica en PBS 1x (Tabla 6). Normalmente, el primer

anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C, y el segundo primario entre 2 y 4 h a RT. Estos dos primarios siempre fueron de distinta procedencia, generalmente ratón y conejo. Después, las células se lavaron al menos 3 veces con PBS 1x y se incubaron con los anticuerpos secundarios, que van unidos al fluoróforo cianina Cy2 (*CyTM2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/ anti-Mouse (H+L)*) o Cy3 (*CyTM3-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/ anti-Mouse (H+L)*) (*Jackson ImmunoResearch*). Estos anticuerpos siempre se usaron a una dilución 1:1.000 en PBS 1x durante 1 h a RT, en oscuridad. A partir de este momento, las células se mantuvieron en oscuridad para preservar la emisión del fluoróforo. Tras la incubación con el secundario, las células se lavaron al menos 3 veces con PBS 1x y el ADN nuclear se marcó utilizando DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) en PBS 1x durante 15 min. El exceso de DAPI se eliminó lavando las células con PBS 1x, y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos (*LineaLab*) usando medio de montaje *MOWIOL@4-88* (*Calbiochem*). Por último, para observar la fluorescencia de las células, se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia *Leica TCS SP5* (*Leica Microsystems*) conectado a una video cámara digital *Leica DC100* (*Leica Microsystems*). El análisis de las imágenes se completó utilizando los programas *LAS AF Lite* (*Leica Microsystems*) e *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

La realización de fotos y vídeos se llevó a cabo con el microscopio de campo claro *Nikon Eclipse TE 2000* a un aumento del 10x.

11. Ensayos de actividad quinasa

11.1. Ensayos quinasa *in vitro* con ATP radiomarcado

La actividad serina/treonina quinasa se estudió mediante ensayos quinasa *in vitro* utilizando ATP radiomarcado, (ATP [γ -³²P]), cuando no se pudieron utilizar anticuerpos específicos para detectar la fosforilación. Esta técnica se llevó a cabo utilizando proteínas fusionadas a GST, expresadas en *E. coli*, o inmunoprecipitadas a partir de extractos celulares transfectados.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizó un tampón específico para caseína quinasa, compuesto por 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl, junto con 5 μ M de ATP frío y 5 μ Ci de ATP [γ -³²P], y los sustratos específicos fusionados a GST (Tabla 8), y las histonas H3 y H2AX (*Upstate® - Millipore*). La reacción de fosforilación se incubó durante 30 min a 30°C en agitación en un *Thermomixer Compact* (*Eppendorf*). Las condiciones de fosforilación fueron las mismas tanto para las

● ● ● **Materiales y métodos**

proteínas recombinantes producidas en *E. coli* como para las comerciales o las inmunoprecipitadas. Después, a la reacción de fosforilación se añadió tampón de carga, y se calentó a 100°C durante 5 min. Las muestras se analizaron posteriormente mediante electroforesis y *SDS-PAGE*. Las bandas radiactivas se detectaron exponiendo directamente las membranas a películas de rayos X (*Fujifilm*) a distintos tiempos. Los controles de carga se observaron con *Ponceau S* o utilizando anticuerpos específicos para GST o para las proteínas (Tabla 6).

11.2. Ensayos quinasa *in vitro* con ATP frío

Cuando se conocía el sitio de fosforilación y se disponía de los anticuerpos fosfo-específicos adecuados, la actividad serina/treonina quinasa se analizó mediante ensayos quinasa *in vitro* con ATP frío. Se utilizaron como sustratos tanto proteínas de fusión a GST como proteínas inmunoprecipitadas, igual que en apartado anterior. La reacción de fosforilación se llevó a cabo en el mismo tampón de caseína quinasa, en este caso con 10 µM de ATP frío, a 30°C durante 30 min en agitación. Posteriormente, la reacción de fosforilación se resuspendió en tampón de carga y se calentó a 100°C durante 5 min. Las muestras se analizaron por electroforesis y *SDS-PAGE*, y la fosforilación se detectó con anticuerpos fosfo-específicos (Tabla 6). Los controles de carga se detectaron con anticuerpos específicos para GST o para las proteínas.

12. Reactivos y estimulaciones

Para la inhibición del proteasoma de células en cultivo, se utilizó un inhibidor potente pero reversible, el MG-132 (*Calbiochem*), a 5 µM durante 10 h. El MG-132 bloquea la actividad proteolítica del proteasoma 26s uniéndose a los sitios activos de las subunidades β del proteasoma 20s.

Para inhibir la síntesis *de novo* de las proteínas en células en cultivo con el fin de estudiar su estabilidad, se utilizó la cicloheximida (*Sigma-Aldrich*) a 50 µg/mL. La cicloheximida interfiere en la actividad peptidil transferasa de la subunidad 60s de los ribosomas, lo que bloquea la elongación traduccional.

Para inhibir la degradación lisosomal de proteínas, se utilizaron distintas concentraciones de cloroquina (*Sigma-Aldrich*), que bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, impidiendo la formación de los autolisosomas.

Para generar roturas de doble cadena en el ADN se utilizó la doxorubicina, un fármaco citotóxico que actualmente se utiliza como agente quimioterapéutico. Se sabe que bloquea la acción de la topoisomerasa II mediante su intercalación en el ADN, lo que impide la relajación de las hebras del ADN y su separación para la transcripción (Tewey, Rowe *et al.* 1984, Kurz, Douglas *et al.* 2004).

13. Estudios de predicción de estabilidad de estructura

Para predecir la estabilidad de la estructura de VRK1 como consecuencia de ciertas mutaciones, se utilizó el programa FoldX. FoldX es un campo de fuerza empírico que se desarrolló en 2005 con el objetivo de elaborar una evaluación rápida del efecto de una mutación en la estabilidad, plegamiento y dinámica de una proteína concreta, método utilizado para este tipo de propósitos de forma rutinaria (Studer, Opperdoes *et al.* 2014). Con este método, la estabilidad de una proteína se define por la energía libre en kcal/mol, cuanto más baja más estable es la proteína; es decir, cuanto más energía libere una mutación ($\Delta\Delta G > 0$ kcal/mol), más desestabiliza a la estructura.

14. Programas estadísticos

Para la realización de este trabajo, se han utilizado dos programas estadísticos: *IBM SPSS Statistics 23* y *Graphpad Prism 8*. Los test estadísticos utilizados fueron *t-student*, cuando la muestra seguía una distribución normal, test no paramétrico *Games Hower* para comparar muestras 2 a 2, regresión polinómica y T-test de dos colas con la corrección de *Welch*, para comparar observaciones de dos grupos.

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICACIÓN		
Nombre	Secuencia 5'→3'	Amplificado
VRK1 Forward	CCTCGTGTAAGCAGCTCAAGCTG	VRK1 humana
VRK1 Reverse	GGACTCTCTTCTGGTTCTTGAACGG	
muVRK1 Forward	CTAAGTATTGGGGATCTGGTCTACGTGATAAAAATG	VRK1 murina
muVRK1 Reverse	CATTTTATCACGTAGACCAGATCCCAATACTTAG	
HalfmuVRK1 Forward	GTACGTGCACGGGGACATCAAGGC	
V2 Forward (Thermo)	AGAGCTCGTTTAGTGAA	Plenti-C-HA-IRES-BSD (Thermo)
LR50 Reverse (Thermo)	CAGAGGTTGATTATCGATAAG	
pLenti Reverse	CGCACACCGGCCTTATTCC	
F720 Forward	GCCGAGCAGGAAAACGGAATCAACC	Atxn1[30Q] y Atxn1[85Q]
F720 Reverse	GGTTGATTCCGTTTTCTGCTCGGC	
Rev350C Reverse	GACCACCAGTGCCTGGACTC	
GAPDH Forward	GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTG	GAPDH humana RT-PCR
GAPDH reverse	ACCTAACTACATGGTTTACATGTT	
Pex2hVRK1 forward	GAGGCCATACAGACCCGTTT	VRK1 humana RT-PCR
Pex2hVRK1 reverse	TCCACCTCGCAAGACTCACA	
Atxn1 Forward	CCAGGTCAGCGTTGAAGTTT	Atxn1 humana RT-PCR
Atxn1 Reverse	CAAAGAGCTGGCTGTTCTC	
Capicua Forward	GGTACTGGCAAGAAGGTGAAGG	Capicua humana RT-PCR
Capicua Reverse	ACTCAGGCAACTCAGCAAAGC	

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para amplificación.

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MUTAGÉNESIS DE VRK1 humana		
Nombre	Secuencia 5'→3'	Mutación
R89Q Forward	AATTAAGTTCTACCAACAAGCTGCAAAACCAGAGCA	R89Q
R89Q Reverse	TGCTCTGGTTTTGCAGCTTGTTGGTAGAACTTTAATT	
H119R Forward	TCTGGTCTACGTGACAAAAATGGAA	H119R
H119R Reverse	TTCCATTTTTGTCACGTAGACCAGA	
R133C Forward	GGTTTATGATAATGGATTGCTTTGGGAGTGACCTTCAG	R133C
R133C Reverse	CTGAAGGTCACTCCCAAAGCAATCCATTATCATAAACC	
G135R Forward	GGTTTATGATAATGGATCGCTTTAGGAGTGACCTTCAG	G135R
G135R Reverse	CTGAAGGTCACTCCTAAAGCGATCCATTATCATAAACC	
L195V Forward	GGCCTCAAATCTTCTTGTAAGTACAAGAATCCTGACC	L195V
L195V Reverse	GGTCAGGATTCTTGTAGTTCACAAGAAGATTTGAGGCC	
V236M Forward	ATCGACGCTCACAAAGGCATGGCCCCATCAAGACG	V236M
V236M Reverse	CGTCTTGATGGGGCCATGCCTTTGTGAGCGTCGAT	
R321C Forward	TGAAAATTTATGTGACATTCTTTTGCA	R321C
R321C Reverse	TGCAAAAGAATGTCACATAAAATTTCA	
R358X Forward	GACCAGCCTCAAAGAAGTAGAAGAAAGAAGCAGAAGAAAGC	R358X
R358R Reverse	GCTTTCTTCTGCTTCTTTCTTCTACTTCTTTGAGGCTGGTC	
K179E Forward	AGTATGTGCATGGAGATATCGAGGCCTCAAATCTTCTTCTGAAT	K179E
K179E Reverse	AGTTCAGAAGAAGATTTGSGGCCTCGATATCTCCATGCACATACT	
W375X Forward	GGAACCTGGTGTGAAGATACGGAATGATCAAACACACAGACAGAGG	W375X
W375X Reverse	CCTCTGTCTGTGTGTTTGATCATTCCGTATCTTCAACACCAGTTCC	

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de VRK1 humana.

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MUTAGÉNESIS DE VRK1 murina		
Nombre	Secuencia 5'→3'	Mutación
<i>muR89Q Forward</i>	CACGGAATTAAGTTCTACCAGCAGGCTGCTAAACCAGAG	muR89Q
<i>muR89Q Reverse</i>	CTCTGGTTTAGCAGCCTGCTGGTAGAACTTTAATTCCTGTG	
<i>muH119R Forward</i>	CTAAGTATTGGGGATCTGGTCTACGTGATAAAAATG	muH119R
<i>muH119R Reverse</i>	CATTTTTATCACGTAGACCAGATCCCAATACTTAG	
<i>muR133C Forward</i>	GTTTATGATAATGGACTGCTTTGGGAGTGACCTTC	muR133C
<i>muR133C Reverse</i>	GAAGGTCACCTCCCAAAGCAGTCCATTATCATAAAC	
<i>muG135R Forward</i>	GTTTATGATAATGGACCGCTTTCCGGAGTGACCTTC	muG135R
<i>muG135R Reverse</i>	GAAGGTCACCTCCGAAAGCGGTCCATTATCATAAAC	
<i>muL195V Forward</i>	GCCTCCAACCTGCTCGTGAGTCACAAGAACCCTG	muL195V
<i>muL195V Reverse</i>	CAGGGTTCTTGTGACTCAGAGCAGTTGGAGGC	
<i>muV236M Forward</i>	GCATCGACGCTCACAAAGGCATGGCCCCATCAAGACG	muV236M
<i>muV236M Reverse</i>	CGTCTTGATGGGGCCATGCCTTTGTGAGCGTCGATGC	
<i>muR321C Forward</i>	CTCTCTATCAAAACCTATGTGATATCCTTTTACAAGGAC	muR321C
<i>muR321C Reverse</i>	GTCCTTGTA AAAAGGATATCATATAGTTTTGATAGAGAG	
<i>muR358X Forward</i>	GACCAGCCTCAAAGAAGTAGAAGAAAGAAGCAG	muR358X
<i>muR358R Reverse</i>	CTGCTTCTTTCTTCTACTTCTTTGAGGCTGGTC	
<i>muK179E Forward</i>	GTGCACGGGGACATCGAGGCCTCCAACCTGCTCCT	muK179E
<i>muK179E Reverse</i>	CTCTGGTTTAGCAGCCTGCTGGTAGAACTTTAATTCCTG	

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de VRK1 murina.

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MUTAGÉNESIS DE ATAXINA1		
Nombre	Secuencia 5'→3'	Mutación
<i>S239A Forward</i>	CATCACCCCGGGGGCCCCCACCAG	S239A
<i>S239A Reverse</i>	CTGGTGGGGGGGGCCCCGGGGTGATG	
<i>S239D Forward</i>	CATCACCCCGGGGGACCCCCACCAGCC	S239D
<i>S239D Reverse</i>	GGCTGGTGGGGGGTCCCCGGGGTGATG	
<i>S776A Forward</i>	CGAGGAAGAGGAGGTGGGCGGCCAGAGAGCC	S776A
<i>S776A Reverse</i>	GGCTCTCTGGCGCCGCCACCTCTCTTCTCTCG	
<i>S776E Forward</i>	CGAGGAAGAGGAGGTGGGAGGCCAGAGAGCC	S776E
<i>S776E Reverse</i>	GGCTCTCTGGCGCCTCCACCTCTCTTCTCTCG	

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de Ataxina1.

ARN DE INTERFERENCIA		
Nombre	Secuencia 5'→3'	Gen silenciado
SiControl	UGUUUACAUGUCGACUAA	
SiVRK1-02	CAAGGAACCUUGUGUUGAAUU	VRK1 humana
SiVRK1-03	GGAAUGGAAAGUAGGAUUA	VRK1 humana

Tabla 5: ARN de interferencia utilizado en este trabajo.

ANTICUERPOS			
Anticuerpo	Tipo	Dilución	Procedencia
53BP1 (NB100-304)	Policlonal conejo	IF 1:200	Novus biologicals and biotechne brand
Acetil histona H4 (K16)	Policlonal conejo	IF 1:200	Abcam
Ataxina1 A302-291A	Policlonal conejo	WB 1:1000	Bethyl laboratories
Citocromo C oxidasa	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
Coilina Pdelta	Monoclonal ratón	IF: 1:200	Santa Cruz
Coilina H300	Policlonal conejo	IF: 1:200	Santa Cruz
FLAG tag	Monoclonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Sigma-Aldrich
FLAG tag	Policlonal ratón	WB:1:1000 IF: 1:200	Sigma-Aldrich
Giantina 114C	Policlonal ratón	IF: 1:200	Biologend
GlyRS (GARS) H-300	Policlonal conejo	WB: 1:200	Santa Cruz
GST tag	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
H2A.X	Policlonal conejo	WB 1:1000	Cell signaling
H3	Policlonal conejo	WB: 1:1000	Cell signaling
H3 pThr3	Policlonal conejo	WB: 1:500	Millipore
HA tag	Monoclonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Santa cruz
HA tag	Policlonal ratón	WB:1:1000 IF: 1:200	Sigma-Aldrich
Myc tag	Monoclonal ratón	WB:1:1000 IF: 1:200	Millipore
Myc tag	Policlonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Millipore
VCP	Policlonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Santa Cruz
VRK1 1F6	Monoclonal ratón	WB:1:1000	Producc. propia
VRK1 1B5	Monoclonal ratón	WB:1:1000 IF: 1:200	Producc. propia
VRK1 VC	Policlonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Producc. propia
VRK1 HPA000660	Policlonal conejo	WB:1:1000 IF: 1:200	Sigma-Aldrich
β-Actina	Monoclonal ratón	WB:1:1000 IF: 1:200	Santa Cruz

Tabla 6: Anticuerpos utilizados en este trabajo.

● ●
● **Materiales y métodos**

LÍNEAS CELULARES				
Línea celular	Organismo	Procedencia	Características	Medio de cultivo
HEK-293T	Humano	Embrionarias de riñón		DMEM, 10%FBS
HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18	DMEM, 10%FBS
A549	Humano	Carcinoma de pulmón		DMEM, 10%FBS
MCF7	Humano	Adenocarcinoma de mama		DMEM, 10%FBS
pLenti-C-HA-IRES-BSD-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[R89Q]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[R89Q]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[H119R]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[H119R]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[R133C]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[R133C]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[G135R]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[G135R]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C-HA-IRES-	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD

BSD- muVRK1[L1 95V]-HeLa			Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[L195V]</i>	
pLenti-C- HA-IRES- BSD- muVRK1[V 236M]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[V236M]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C- HA-IRES- BSD- muVRK1[R 321C]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[R321C]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C- HA-IRES- BSD- muVRK1[R 358X]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[R358X]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD
pLenti-C- HA-IRES- BSD- muVRK1[K 179E]-HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18 Transformadas con vector lentiviral. Expresan <i>muVRK1[K179E]</i>	DMEM, 10%FBS, 5 µg/µl BSD

Tabla 7: Líneas celulares utilizadas en este trabajo.

CONSTRUCCIONES		
Construcción	Vector	Uso
HA-VRK1	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R89Q)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (H119R)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R133C)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (G135R)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (L195V)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (V236M)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R321C)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R358X)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (W375X)	pCEFL	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (K179E)	pCEFL	Expresión en eucariotas
VRK1-Myc	pCDNA3.1	Expresión en eucariotas
VRK1-NL-Myc (1-332)	pCDNA3.1	Expresión en eucariotas
VRK1-NC-Myc (1-267)	pCDNA3.1	Expresión en eucariotas
VRK1-Myc (E131G)	pCDNA3.1	Expresión en eucariotas
VRK1-Myc (E313G/K314I)	pCDNA3.1	Expresión en eucariotas
GST-VRK1	pCEFL-GST	Expresión en eucariotas
GST-VRK1-C (267-396)	pCEFL-GST	Expresión en eucariotas
GST-VRK1 R358X	pCEFL-GST	Expresión en eucariotas
pGEX-GST-VRK1	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (R89Q)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (H119R)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (R133C)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (G135R)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (L195V)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (V236M)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (R321C)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (R358X)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pGEX-GST-VRK1 (K179E)	pGEX4T1-GST	Expresión en bacterias
pLenti-HA-VRK1	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (R89Q)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (H119R)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (R133C)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (G135R)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (L195V)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas

pLenti-HA-VRK1 (V236M)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (R321C)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (R358X)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
pLenti-HA-VRK1 (K179E)	pLenti-HA-IRES-BSD	Expresión en eucariotas
GST-VRK1	pCEFL-GST	Expresión en eucariotas
VCP-GST	pCEFL-GST	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239D]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S776E]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239A][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239A][S776D]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239D][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[30Q][S239D][S776E]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239D]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S776E]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239A][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239A][S776D]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239D][S776A]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas
Ataxina1[85Q][S239D][S776E]-Myc-FLAG	pCNA3.1	Expresión en eucariotas

Tabla 8: Construcciones utilizadas en este trabajo.

RESULTADOS

Sección A: Caracterización de las variantes patogénicas de VRK1 implicadas en neurodegeneración

"Las ideas no duran mucho, hay que hacer algo con ellas"



Santiago Ramón y Cajal

1. Estudio de pacientes con neuropatías asociadas al gen *VRK1*

1.1. Cuadro clínico de pacientes

En los últimos años, el número de pacientes con neuropatías asociadas a polimorfismos poco frecuentes en el gen *VRK1* ha ido en aumento. Siendo *VRK1* la línea principal de trabajo en el laboratorio, decidimos estudiar estas mutaciones a nivel estructural, molecular y celular. Para poner en común las distintas alteraciones y tratar de establecer similitudes entre ellas, reunimos en una tabla las características clínicas de los 18 pacientes (Tabla 9). De los cuatro miembros de la familia Ashkenazí, tres presentan la misma mutación en el gen *VRK1*, R358X/R358X. Tienen atrofia espinal muscular distal, ataxia, microcefalia, deficiencia mental, problemas de alimentación y deformación bilateral del esqueleto. Sin embargo, uno presenta hipoplasia pontocerebelar y el otro no. El cuarto paciente no presenta ataxia ni deficiencia mental. Otros dos pacientes, también Ashkenazíes, son heterocigotos para R358X/H119R. No padecen ataxia, PHC, microcefalia ni deficiencia mental. Hay otro paciente heterocigoto que comparte la mutación sin sentido con los demás, R358X/T228M. Su fenotipo es similar a R358X/H119R, ambos tienen un desarrollo más lento de la enfermedad, que es menos grave. Otros dos pacientes presentan una mutación sin sentido en homocigosis, W375X/W375X. En estos casos no hay PHC, microcefalia, ataxia ni deficiencia mental. La diferencia entre estos sujetos y los homocigotos para R358X/R358X es la longitud de la proteína *VRK1* que se genera, a los más graves les falta una mayor parte del extremo C-terminal, donde se encuentra la región reguladora de *VRK1*. Hay otro paciente que presenta también la mutación H119R en heterocigosis con R321C, no presenta PHC, deficiencia, ataxia ni microcefalia, pero sí ALS. Del resto, hay un grupo que presenta mutaciones en heterocigosis: R89Q/V236M, G135R/L195V y R219I/W254L. Los dos primeros comparten la mayoría de las características fenotípicas; sin embargo, el tercero no padece microcefalia, problemas de alimentación, respiratorios, ni deformaciones en el esqueleto. Por último, hay cuatro pacientes homocigotos para R133C/R133C de los que solo se ha reportado que presentan deficiencia mental (Tabla 9). Como vemos, hay diferencias sustanciales en el fenotipo de estos pacientes, lo que nos hace pensar que las mutaciones alteran a *VRK1* de distinto modo, y por eso decidimos caracterizarlas de forma individual.

CUADRO CLÍNICO DE PACIENTES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>VRK1</i>					
	R358X R358X	R358X R358X	R358X R358X	R358X H119R	H119R R321C
Mutación alelo 1	c.1072G>T	c.1072G>T	c.1072G>T	c.1072G>T	c.356A>G
Mutación alelo 2	c.1072G>T	c.1072G>T	c.1072G>T	c.356A>G	c.961C>T
Tipo de mutación	S.S.	S.S.	S.S.	S.S. y P.S.	P.S.
SMA	Distal	Distal	Desc.	Distal	Distal y proximal
Clínica/MRI	SMA-PCH1	Displasia cortical	Patrón giral simplificado e hipoplasia vermiana	Neuropatía sensorio-motora axonal	ALS
Síntomas iniciales	Motores y ataxia temprana	Motores y ataxia temprana	Motores	Motores	Motores
PHC	Sí	No	No	No	No
Microcefalia	Sí	Sí	Sí	No	No
Ataxia	Sí	Sí	No	No	No
Def. mental	Sí	Sí	No	No	No
Problemas de alimentación	++	++	+	Desc.	-
Problemas respiratorios	-	-	-	Desc.	-
Deformación de esqueleto	Bilateral	Bilateral	Escoliosis	Desc.	Pie cavo
Progresión	Rápida	Rápida	Rápida	Moderada	Lenta
Origen	Ashkenazí	Ashkenazí	Ashkenazí	Ashkenazí	Hispánico
Edad de diagnóstico	Niñez	Prenatal	Prenatal	Adulta	Adulta
Nº de casos	2	1	1	2	1
Referencia	(Renbaum, Kellerman et al. 2009)	(Renbaum, Kellerman et al. 2009)	(Gonzaga-Jauregui, Lotze et al. 2013)	(Stoll, Teoh et al. 2016)	(Nguyen, Biliciler et al. 2015)

CUADRO CLÍNICO DE PACIENTES CON MUTACIONES EN EL GEN <i>VRK1</i>					
R133C R133C	R89Q V236M	G135R L195V	W375X W375X	R219I W254L	T228M R358X
-	c.266G>A	c.403G>A	c.1124G>A	c.656G>T	c.683C>T
-	c.706G>A	c-583T>G	c.1124G>A	c.761G>T	c.1072G>T
P.S.	P.S.	P.S.	S.S.	P.S.	S.S. y P.S.
No	Distal (solo un caso)	Distal	Distal	Distal	Distal
Desorden cognitivo recesivo	Neuropatía sensorio motora axonal	ALS juvenil/ Neuropatía sensorio-motora axonal	Neuropatía sensorio motora axonal	Síndrome piramidal, Reflejo de Babinsky	Síndrome piramidal
Desc.	Motores	Motores	Debilidad	Motores	Motores
No	No	No	No	No	No
No	Sí	Sí	No	No	No
No	No	No	No	No	No
Sí	No	No	No	No	No
Desc.	+/-	-	-	-	-
Desc.	+/-	+	-	-	-
Desc.	Escoliosis/-	Severa	-/Pie arqueado	-	Desc.
Desc.	Rápida	Rápida	Lenta	Lenta	Lenta
Irani	Europeo	Desc. (USA)	Asiático	Asiático	Desc.
Niñez	Niñez	Adolescencia	Adolescencia	Niñez	Niñez
4	2	1	2	2	Desc.
(Najmabadi, Hu et al. 2011)	(Gonzaga-Jauregui, Lotze et al. 2013)	(Stoll, Teoh et al. 2016)	(Li, Wang et al. 2019)	(Atkinson, Castro et al. 2019)	(Atkinson, Castro et al. 2019)

Tabla 9: Cuadro clínico de los pacientes que presentan mutaciones en el gen humano *VRK1*. PHC: Hipoplasia pontocerebelar. ALS: Esclerosis lateral amiotrófica. Desc.: Desconocido. S.S.: Mutación sin sentido. P.S.: Mutación de pérdida de sentido.

1.2. Frecuencia alélica de las variantes patogénicas

Determinamos también la proporción en la que se encuentran estos alelos en la población. A través del *Exome-Aggregation Consortium* (EXAC) (Lek, Karczewski *et al.* 2016), que utiliza 125.748 secuencias exómicas y 15.708 secuencias de genoma completo procedentes de estudios genéticos poblacionales y de enfermedades, observamos que solo cuatro de las mutaciones son *de novo*, el resto se encuentran en la población, pero tienen una presencia muy excepcional (Tabla 10).

FRECUENCIA DE LAS VARIANTES PATOGENICAS DE <i>VRK1</i>			
Variante patogénica	Frecuencia alélica (ExAc)	ClinVar (ID del alelo)	Presentación de las variantes
R89Q (rs773138218)	3,19e ⁻⁵	197213	Heterocigosis compuesta
H119R (rs371295780)	2,83e ⁻⁵	209204	Heterocigosis compuesta
R133C (rs387906830)	1,2e ⁻⁵	30243	Homocigosis
G135R	<i>de novo</i> (?)	-	Heterocigosis compuesta
L195V (rs748878251)	7,96e ⁻⁶	533534	Heterocigosis compuesta
R219I	<i>de novo</i> (?)	-	Heterocigosis compuesta
T228M (rs146113610)	5,57e ⁻⁵	251374	Heterocigosis compuesta
V236M (rs771364038)	2,39e ⁻⁵	218924	Heterocigosis compuesta
W254L	<i>de novo</i>		Heterocigosis compuesta
R321C (rs772731615)	1,95e ⁻⁴	209202	Heterocigosis compuesta
R358X (rs137853063)	6,39e ⁻⁵	7497	Homocigosis y heterocigosis compuesta
W375X	<i>de novo</i>	-	Homocigosis

Tabla 10: Frecuencia alélica de las variantes patogénicas de *VRK1*. Se indica la variante patogénica con su referencia de *dbSNP*, la identificación del alelo en ClinVar (Landrum, Lee *et al.* 2016), y la presentación de las distintas variantes.

2. Caracterización de la estabilidad de las variantes patogénicas de VRK1

2.1 Los mutantes de VRK1 asociados a neurodegeneración presentan distinta estabilidad a nivel proteico en líneas celulares

Como primera aproximación para la caracterización de los mutantes de VRK1, estudiamos la vida media en las células de cada variante, con el objetivo de determinar las diferencias en estabilidad respecto a VRK1 *wt* y para poderlos comparar entre ellos, tratando de establecer algún tipo de relación con las diferencias que observamos en el fenotipo de los pacientes. Para ello, realizamos mutagénesis sitio-dirigida sobre la construcción pCEFL-HA-VRK1, y transfectamos células *HEK-293T* con estos mutantes. Inhibimos la síntesis *de novo* de proteínas utilizando cicloheximida, y analizamos la presencia de los mutantes en el lisado celular durante 24 horas (Figura 12A). En estos experimentos utilizamos un mutante artificial de VRK1, K179E, que no presenta actividad quinasa, y que hemos visto previamente en el laboratorio que es muy inestable. Cuantificamos la cantidad de proteína respecto a la β -Actina cada 4 horas (Figura 12B), observando diferencias sustanciales entre los distintos mutantes. En general podemos establecer dos grupos, uno de proteínas estables y otro de inestables. Los mutantes estables, junto con VRK1 *wt*, son R89Q, H119R y V236M. Éstos permanecen en niveles constantes en las células durante 24 horas. El resto, junto con K179E, son inestables, todos ellos a partir de las 4 horas empiezan a decaer. Es interesante el caso de los mutantes R89Q y V236M, ambos aparecen juntos en heterocigosis en los pacientes, que presentan de los fenotipos más graves; sin embargo, generan proteínas estables. Por tanto, el problema en estos dos pacientes no radica en la estabilidad de la proteína. En este estudio faltan los mutantes W375X, T228M, W254L y R259I debido a que se han descrito muy recientemente.

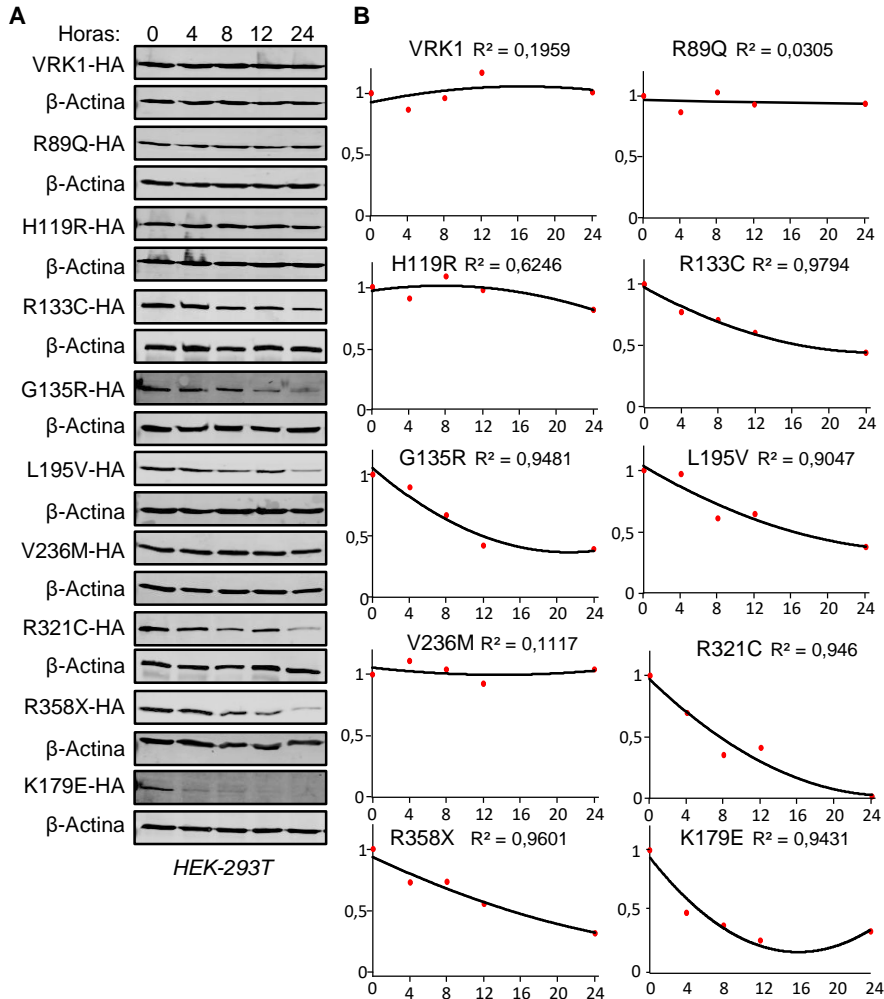
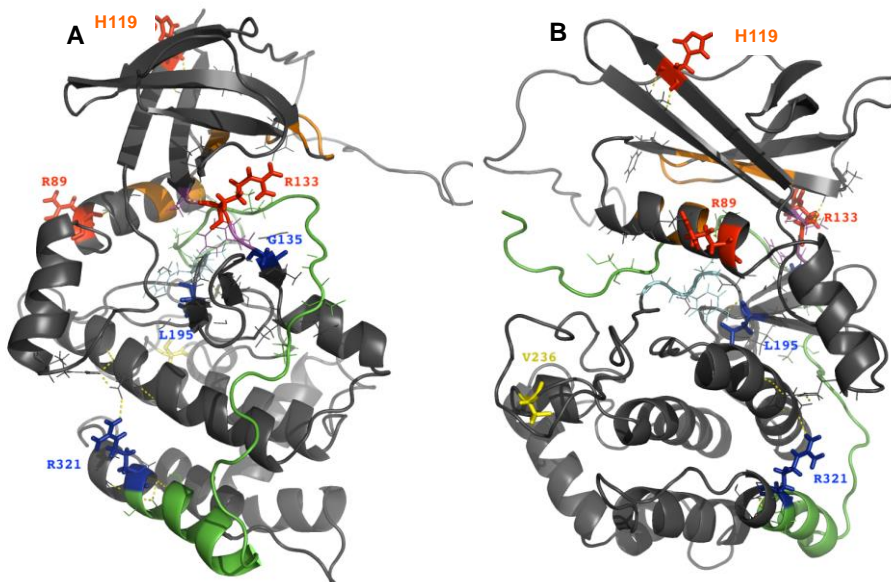


Figura 12: Los mutantes de VRK1 presentan distinta estabilidad a nivel proteico. **A:** Estabilidad de los mutantes de VRK1 asociados a neurodegeneración. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con los distintos mutantes de VRK1 en la construcción pCEFL-HA-VRK1. Tras 48 h, las células se trataron con cicloheximida 50 µg/mL y se analizó la presencia de los distintos mutantes en el extracto celular tras 0, 4, 8, 12 y 24 h de tratamiento. Las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos específicos. **B:** Cuantificación de la estabilidad de los mutantes de VRK1. Se cuantificaron los niveles de expresión de los mutantes de VRK1 respecto a la β-Actina, y se relativizaron al valor obtenido a las 0 h, que equivale a 1. La línea de tendencia sigue una regresión polinómica, se presenta el valor de R^2 para indicar la bondad del ajuste de la curva, siendo $R^2=0$ un mal ajuste y $R^2=1$ un buen ajuste. En el caso de que la estabilidad no cambie, al no formarse una curva la R^2 se aproxima a 0.

2.2. Los mutantes de VRK1 asociados a neurodegeneración presentan distinta estabilidad a nivel estructural

Para completar el estudio de estabilidad, comparamos los resultados obtenidos *in vivo* con estudios de predicción de la estabilidad estructural de la quinasa. Para ello, a partir de la estructura tridimensional de VRK1 obtenida por cristalografía de rayos X y *NMR* (códigos 2RSV y 2LAV respectivamente) (Scheeff, Eswaran *et al.* 2009, Shin, Chakraborty *et al.* 2011), disponible en la base de datos *Protein Data Bank* (Gilliland, Berman *et al.* 2000), se realizó un modelado estructural de los diferentes mutantes. Para comprobar si las mutaciones identificadas tienen un efecto en la estabilidad estructural de VRK1, utilizamos el programa informático FoldX (Schymkowitz, Borg *et al.* 2005). El primer paso fue localizar las distintas mutaciones en la estructura con un código de colores relacionado con la cantidad de energía que liberan, dividiéndolos en siete categorías, de altamente estabilizantes a altamente desestabilizantes (Figura 13C). Vemos que algunos mutantes, como R89Q, son altamente estabilizantes, y otros, como R321C, son desestabilizantes (Figura 13A y 13B).



C

Altamente estabilizante	$\Delta\Delta G < -1,84 \text{ kcal/mol}$
Estabilizante	$-1,84 \text{ kcal/mol} \leq \Delta\Delta G < -0,92 \text{ kcal/mol}$
Ligeramente estabilizante	$-0,92 \text{ kcal/mol} \leq \Delta\Delta G < -0,46 \text{ kcal/mol}$
Neutro	$-0,46 \text{ kcal/mol} < \Delta\Delta G \leq +0,46 \text{ kcal/mol}$
Ligeramente desestabilizante	$+0,46 \text{ kcal/mol} < \Delta\Delta G \leq +0,92 \text{ kcal/mol}$
Desestabilizante	$+0,92 \text{ kcal/mol} < \Delta\Delta G \leq +1,84 \text{ kcal/mol}$
Altamente desestabilizante	$\Delta\Delta G > +1,84 \text{ kcal/mol}$

Figura 13: Localización en la estructura de las variantes patogénicas de VRK1. **A:** Vista frontal de la proteína. **B:** Vista rotada. **C:** Tabla que muestra el código de colores para la cantidad de energía liberada de la estructura por los mutantes.

Para poner en común estos resultados de predicción con los obtenidos previamente en sistemas celulares, construimos una tabla donde se muestra la energía liberada por cada mutante y la predicción de estabilidad sobre la estructura (Figura 14A). Las tres mutaciones que *in vivo* son igual de estables que VRK1 *wt*, se predice que tienen un efecto neutro, ligeramente estabilizante o estabilizante sobre la estructura (Figura 14B). Para el resto, que vimos que son inestables en las células, la predicción resuelve que son desestabilizantes o ligeramente desestabilizantes, de forma concordante con los resultados *in vivo*, excepto uno de los mutantes, R133C, que *in vivo* aparece como inestable y sin embargo se predice que estabiliza ligeramente la estructura. Salvo esta diferencia, nuestros resultados *in vivo* se corresponden con los resultados de predicción. El mutante R358X no ha podido estudiarse mediante este sistema porque se encuentra en la región C-terminal de VRK1, de la que no se dispone de información estructural.

A

PREDICCIÓN DEL EFECTO DE LOS MUTANTES SOBRE LA ESTABILIDAD DE VRK1				
Mutación	Estructura			Predicción estabilidad
	2018_2rsv_diff	diff_2RSV	diff_2LAV	
G135R	2,4208	2,9714	0,6761	Ligeramente desestabilizante
H119R	-0,8401	-0,7466	-1,5024	Estabilizante
L195V	0,1785	0,0108	1,5525	Desestabilizante
R133C	-0,7308	-0,783	-0,6514	Ligeramente estabilizante
R321C	1,7191	1,7558	0,725	Ligeramente desestabilizante
R89Q	-0,1242	-0,065	-0,72	Ligeramente estabilizante
V236M	0,3835	0,3926	-0,3905	Neutro
R358X	No aplicable			

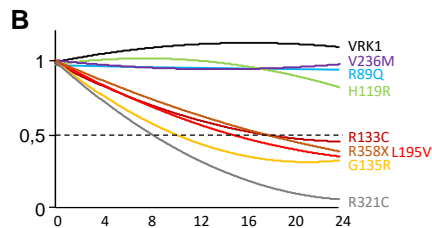


Figura 14: Predicción de la estabilidad de los mutantes de VRK1. **A:** Tabla que muestra las diferencias en energía total entre VRK1 wt y VRK1 mutada, y la predicción del efecto sobre la estabilidad. El error cometido por FoldX puede variar en $\pm 0,46$ kcal/mol. **B:** Estabilidad *in vivo* de los mutantes de VRK1.

De forma más detallada, los tres mutantes detectados mediante predicción como desestabilizantes son G135R, L195V y R321C. Del mutante L195V se desconoce el motivo de su inestabilidad. Los mutantes G135R y R321C, en cambio, sufren alteraciones en la red de interacción con las cadenas laterales de los aminoácidos colindantes. Para G135R, aparecen nuevas interacciones con N186 e Y192 (Figura 15) y para R321C, desaparece la interacción con D163, Y167 y R103 (Figura 16).

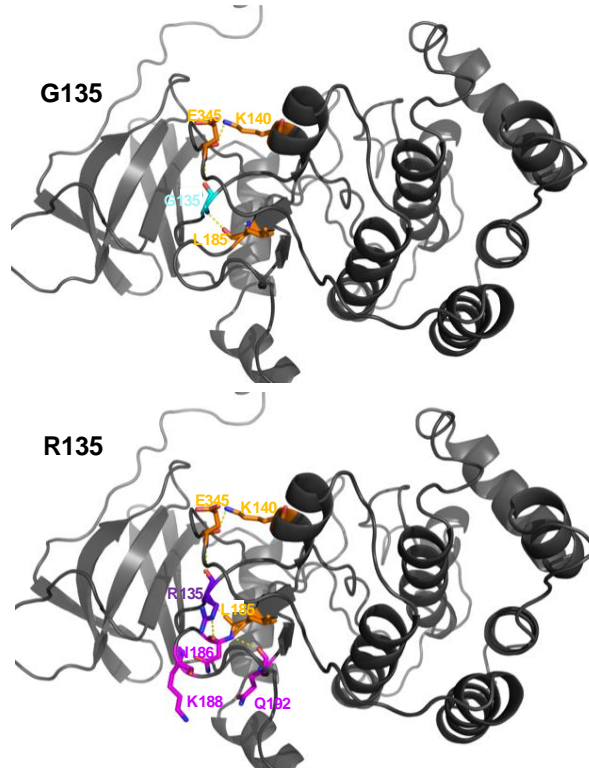


Figura 15: Estructura de VRK1 con la mutación desestabilizante G135R y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido *wt* se colorean en cian, y los mutados en morado. En naranja observamos los residuos que interaccionan.

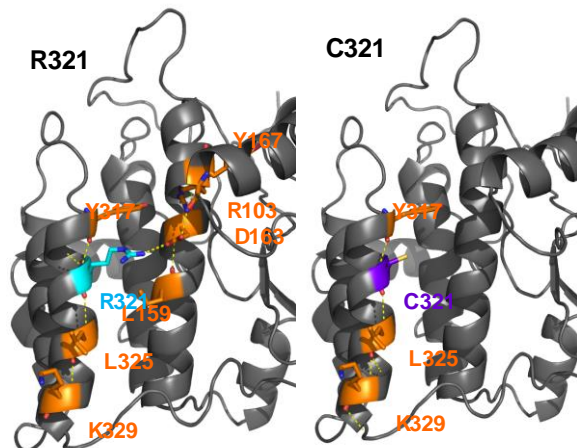


Figura 16: Estructura de VRK1 con la mutación desestabilizante R321C y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido *wt* se colorean en cian, y los mutados en morado. En naranja observamos los residuos que interaccionan. En este caso vemos cómo se pierde la interacción con la hélice vecina.

Las mutaciones que se predicen estabilizantes son R89Q, H119R y R133C. En los experimentos en células, R89Q y H119R son estables; sin embargo, R133C comienza a degradarse a las 4 horas de tratamiento. Observando la red de interacción de estos aminoácidos dentro de la estructura, en el caso de R89Q se pierden dos interacciones, con K85 e Y173, sin aparecer nuevas (Figura 17), y en H119R, sin embargo, no se observa ninguna variación (Figura 18). Los cambios en R89Q generan una proteína más estable, y en el caso de H119R, aunque no haya cambios en su red de interacción, la proteína presenta una organización más flexible con rotámeros alternativos, lo que puede condicionar su interacción o su accesibilidad a distintas proteínas reguladoras.

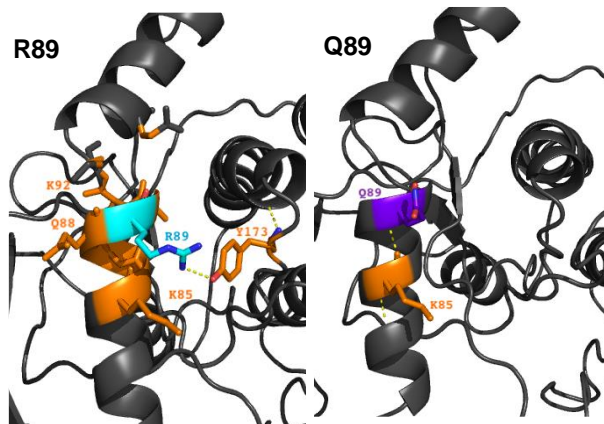


Figura 17: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante R89Q y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido *wt* se colorean en morado, y los mutados en naranja observamos los residuos que interaccionan.

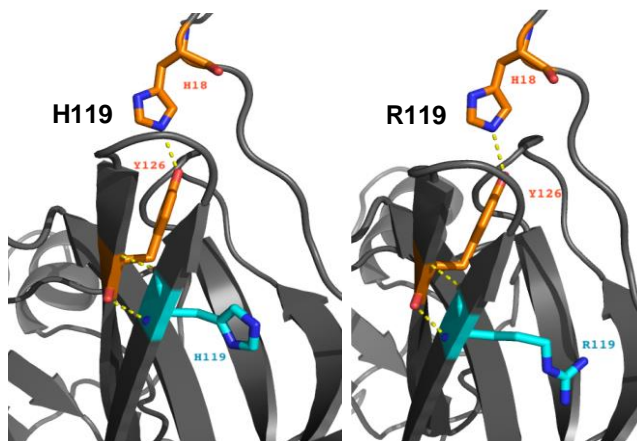


Figura 18: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante H119R y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido *wt* se colorean en cian, y los mutados en azul oscuro. En naranja observamos los residuos que interaccionan.

Resultados

En el caso de R133C, nos llamó la atención que el resultado predicho fuera estabilidad, cuando nuestra observación era la contraria. Estudiando su red de interacción, se observan importantes modificaciones. El cambio de aminoácido provoca una pérdida de interacción con P67, y aunque se mantiene la interacción con D132, este residuo desarrolla dos nuevas interacciones, con F134 y W114 (Figura 19). Aunque estos cambios predicen una mayor estabilidad, en el contexto de la célula pueden suponer alteraciones en su regulación o interacción con otras proteínas que provoquen una inestabilidad inesperada.

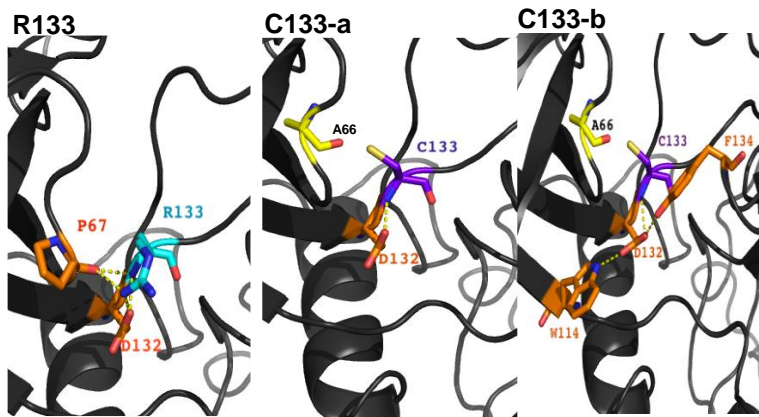


Figura 19: Estructura de VRK1 con la mutación estabilizante R133C y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido *wt* se colorean en cian, y los mutados en morado. En naranja observamos los residuos que interaccionan. En C133-b se muestran las cadenas laterales de otros residuos colindantes.

Por último, se predice que V236M no tiene efecto sobre la estabilidad de la proteína, resultado que concuerda con lo observado en células, donde durante las 24 horas de tratamiento con cicloheximida los niveles proteicos de V236M permanecieron constantes. En cuanto a la red de interacción, V236 interacciona con S229, D231, G235 y G239, y cuando cambia a M236, no sufre variaciones (Figura 20).

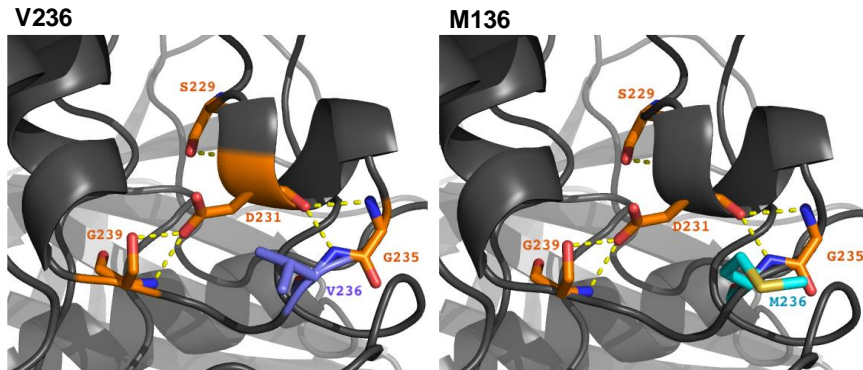


Figura 20: Estructura de VRK1 con la mutación neutra V236M y su red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno. Las líneas amarillas representan interacciones polares entre residuos. Los residuos correspondientes con el aminoácido wt se colorean en morado, y los mutados en cian. En naranja observamos los residuos que interactúan.

3. Caracterización de la actividad quinasa de las variantes patogénicas de VRK1

3.1. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre sustratos cromatínicos

Al ser VRK1 una quinasa reguladora de múltiples procesos mediante fosforilación, decidimos estudiar la capacidad de estos mutantes para fosforilar distintos sustratos, así como su autofosforilación (Barcia, Lopez-Borges *et al.* 2002, Lopez-Borges & Lazo 2000). El primer grupo de sustratos a estudiar fue el de los cromatínicos. Dentro de este grupo, nos centramos en la fosforilación de dos de las cinco histonas implicadas en la formación de la estructura de la cromatina, H3 y H2AX. H3 es fosforilada en la serina 10 y en la treonina 3 por VRK1 (Kang, Park *et al.* 2007). Mediante ensayos quinasa con ATP frío y las distintas variantes de VRK1 purificadas con GST, vimos que salvo R89Q y L195V, el resto de variantes no son capaces de fosforilar a H3 (Figura 21A). Sin embargo, R89Q y L195V presentan una actividad significativamente mayor sobre este sustrato. Este experimento y todos los siguientes en relación a la actividad quinasa se llevaron a cabo también con una de las mutaciones descritas más recientemente, W375X. En cuanto a la histona H2AX, se sabe que es fosforilada por VRK1 en la serina 139, lo que es necesario para la formación de los focos de reparación de γ H2AX (Salzano, Sanz-García *et al.* 2015). En este caso llevamos a cabo un ensayo quinasa con ATP radiomarcado. El resultado fue similar al anterior, todos los mutantes salvo R89Q y L195V tienen una actividad significativamente reducida sobre H2AX, y R89Q y L195V tienen una mayor actividad catalítica (Figura 21B).

Resultados

El uso de ATP radiomarcado nos permitió estudiar la autofosforilación de los distintos mutantes. En comparación con VRK1 *wt*, salvo R89Q y L195V, todos los mutantes de VRK1 presentan una reducción de su autofosforilación, y R89Q y L195V son más activos, mismo patrón que el observado con sus sustratos.

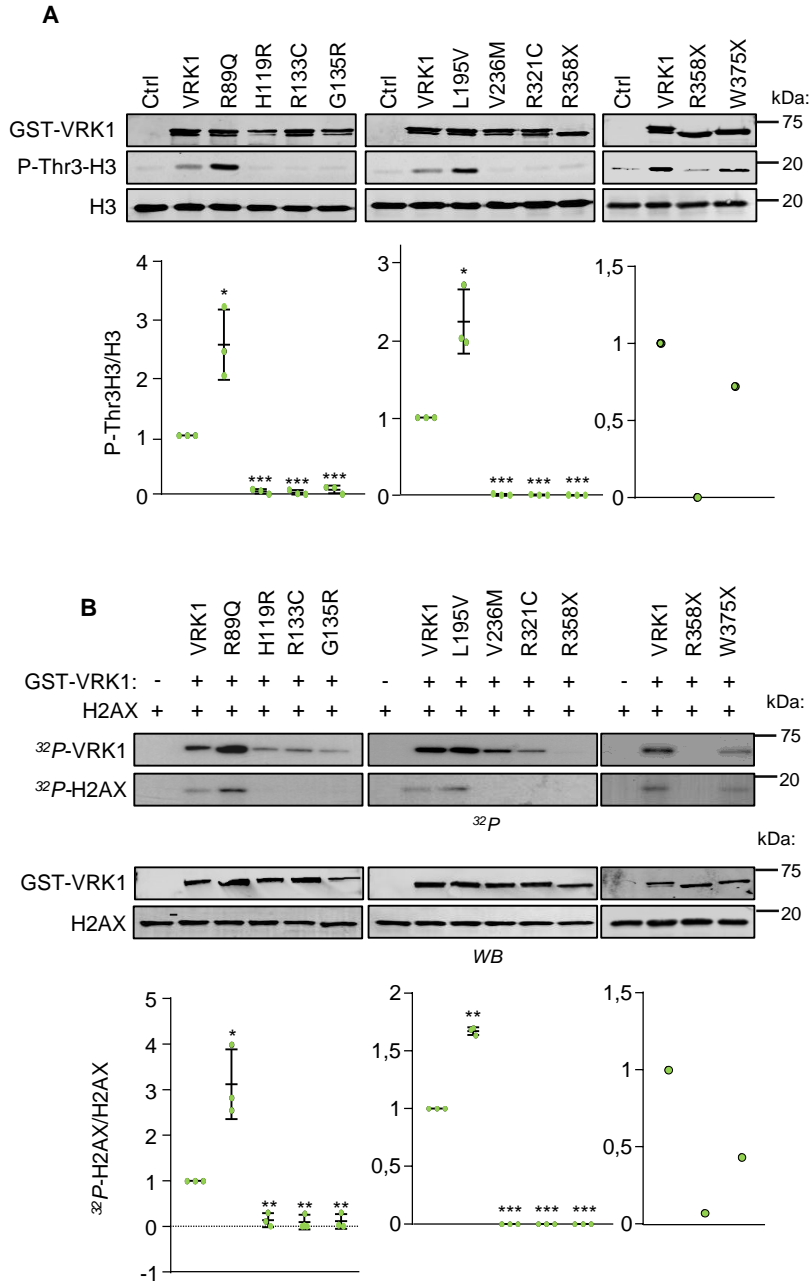


Figura 21: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre sustratos cromatínicos y autofosforilación. **A:** Los distintos mutantes de VRK1 tienen distinta capacidad de fosforilar a la histona H3. Se purificaron las proteínas de VRK1 fusionadas a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP frío sobre la histona H3. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. **B:** Los mutantes tienen distinta capacidad de fosforilar a la histona H2AX y distinta capacidad de autofosforilación. Se purificaron las proteínas de VRK1 fusionadas a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP radiomarcado. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot*, exponiendo las membranas a películas de rayos X y con anticuerpos específicos. Los datos se analizaron con el programa estadístico *IBM SPSS 23*. Los experimentos de las dos primeras partes del *blot* se realizaron por triplicado, la significación estadística se analizó utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *= p -Valor $<0,05$; **= p -Valor $<0,005$; ***= p -Valor $<0,0005$.

3.2. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre factores de transcripción implicados en daño en el ADN y en respuesta a estrés

Dentro del grupo de sustratos relacionados con daño en el ADN y respuesta a estrés, estudiamos a p53 y c-Jun. VRK1 fosforila a p53 en la treonina 18 para estabilizarlo. (Lopez-Borges & Lazo 2000, Vega, Sevilla *et al.* 2004, Lopez-Sanchez, Valbuena *et al.* 2014). Mediante ensayos quinasa utilizando ATP frío y un fragmento de p53 fusionado a GST que corresponde con su dominio de transactivación, estudiamos la capacidad de los mutantes de VRK1 de fosforilar a p53. El resultado fue el mismo que para los sustratos cromatínicos: salvo R89Q y L195V, que tienen una actividad quinasa significativamente mayor sobre este sustrato, el resto de mutantes presentan una pérdida significativa de la capacidad de fosforilar a p53 (Figura 22A). El siguiente sustrato fue c-Jun, que es fosforilado por VRK1 en las serinas 63 y 73 también para protegerlo de la degradación. Mediante ensayos quinasa utilizando ATP radiomarcado, y un fragmento de la proteína c-Jun fusionada a GST, obtuvimos el mismo resultado, una mayor fosforilación por parte de R89Q y L195V, y una menor fosforilación por parte del resto de mutantes, en comparación con VRK1 *wt* (Figura 22B). En este segundo ensayo, de nuevo se comprobó la autofosforilación de los mutantes de VRK1.

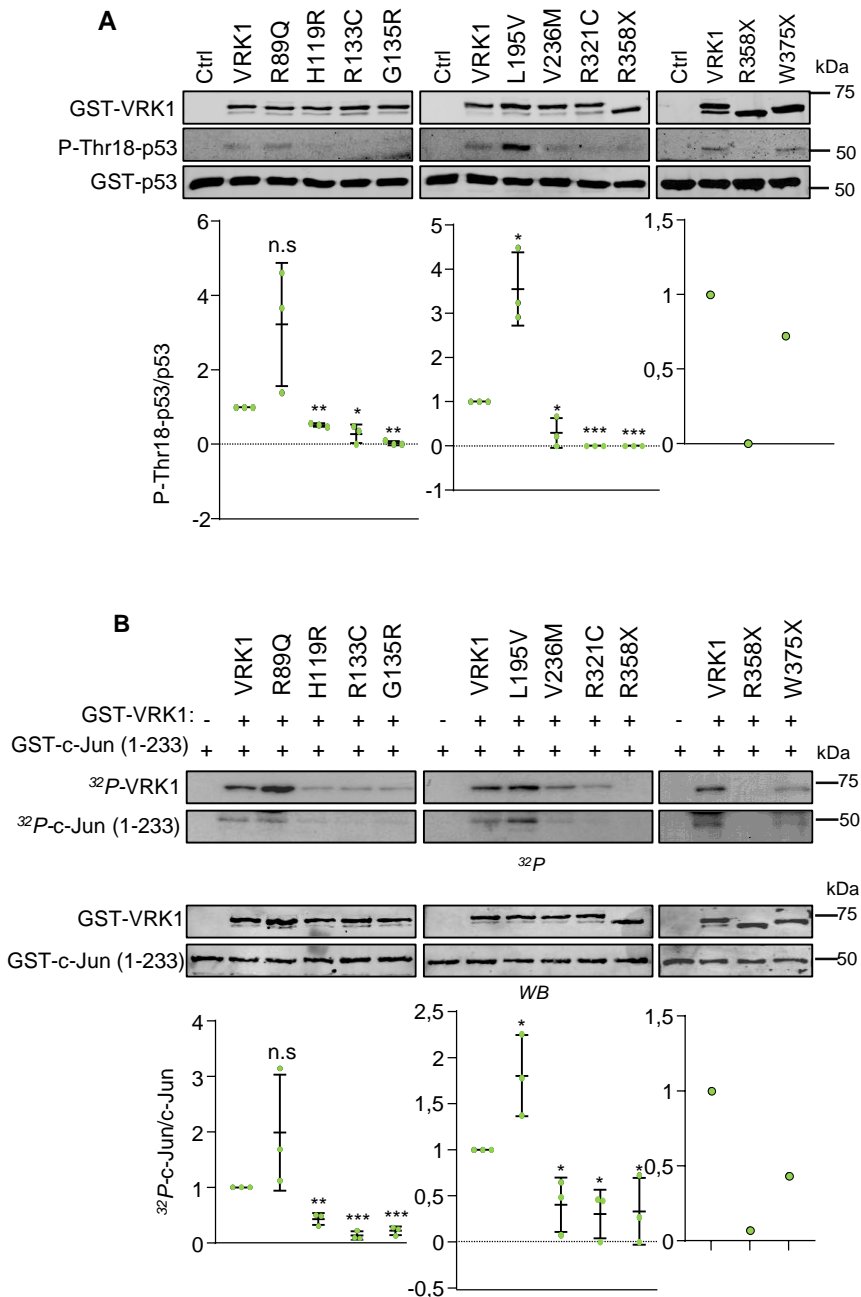
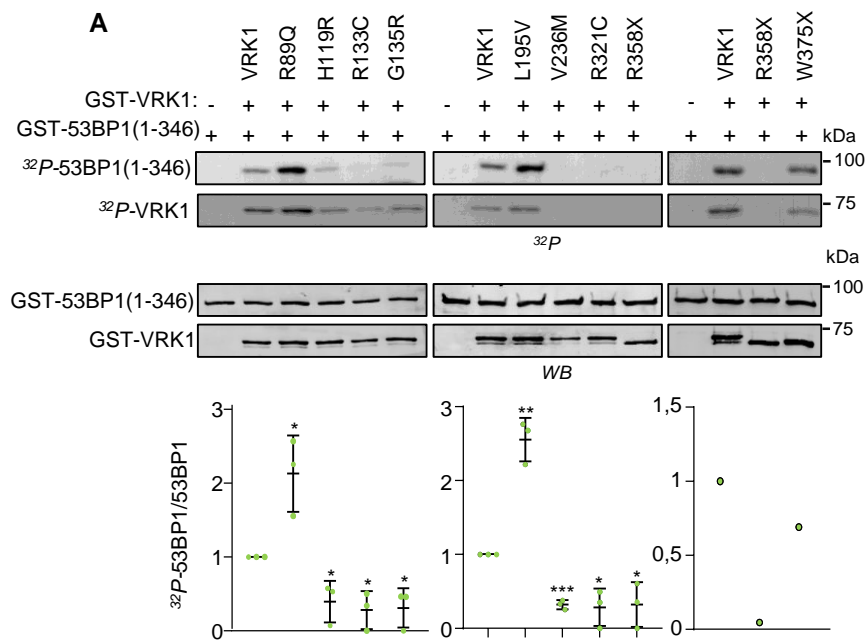


Figura 22: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre factores de transcripción. **A:** Los distintos mutantes de VRK1 tienen distinta capacidad de fosforilar a p53. Se purificaron las variantes de VRK1 y el fragmento de p53 fusionados a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP frío. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. **B:** Los mutantes tienen distinta capacidad de fosforilar a c-Jun y distinta capacidad de autofosforilación. Se purificaron las proteínas de VRK1 y el fragmento de c-Jun fusionados a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP radiomarcado. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot* exponiendo las membranas a películas de rayos X y con anticuerpos específicos. Los datos se analizaron con el

programa estadístico *IBM SPSS 23*. Los experimentos de las dos primeras partes del *blot* se realizaron por triplicado, la significación estadística se analizó utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *=*p*-Valor<0,05; **=*p*-Valor<0,005; ***=*p*-Valor<0,0005.

3.3. Actividad quinasa de los mutantes de VRK1 sobre proteínas asociadas a procesos específicos

Los dos últimos sustratos que analizamos fueron 53BP1, que es fosforilada por VRK1 en respuesta a daño en el ADN (Sanz-Garcia, Monsalve *et al.* 2012, Salzano, Vazquez-Cedeira *et al.* 2014), y Coilina, que es fosforilada por VRK1 para la regulación de los cuerpos de Cajal (Dundr, Hebert *et al.* 2004). Ambos ensayos se llevaron a cabo utilizando ATP radiomarcado, utilizando un fragmento de 53BP1 y un fragmento de Coilina fusionados a GST. El resultado fue el mismo que los casos anteriores, R89Q y L195V tienen una fuerte actividad catalítica sobre ambos sustratos, y el resto de mutantes presentan una actividad reducida (Figura 23). En el caso de Coilina, se utilizó también un mutante para el residuo serina 184, que es clave para la formación de los cuerpos de Cajal. No observamos diferencias en fosforilación entre Coilina *wt* y mutada en ese residuo a alanina, no fosforilable. Esto se debe a que aunque la fosforilación de S184 por VRK1 es esencial para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, hay múltiples residuos de Coilina que son diana de VRK1 (Sanz-Garcia, Vazquez-Cedeira *et al.* 2011, Cantarero, Sanz-Garcia *et al.* 2015).



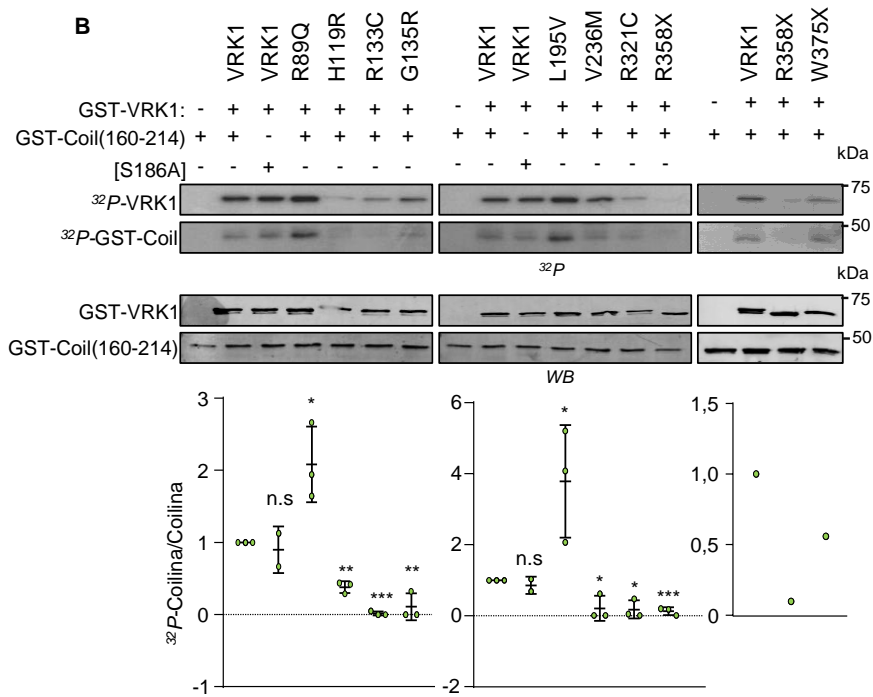


Figura 23: Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre proteínas implicadas en procesos específicos. **A:** Los mutantes de VRK1 tienen distinta capacidad de fosforilar a 53BP1 y distinta capacidad de autofosforilación. Se purificaron las proteínas de VRK1 y el fragmento de 53BP1 fusionados a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP frío. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. **B:** Los mutantes tienen distinta capacidad de fosforilar a Coilina y de autofosforilarse. Se purificaron las proteínas de VRK1 y el fragmento de Coilina fusionados a GST y se llevó a cabo un ensayo quinasa con ATP radiomarcado. La fosforilación se analizó mediante técnicas de electroforesis y *Western blot* exponiendo las membranas a películas de rayos X y con anticuerpos específicos. Los datos se analizaron con el programa estadístico *IBM SPSS 23*. Los experimentos de las dos primeras partes del *blot* se realizaron por triplicado, la significación estadística se analizó utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *=p-Valor<0,05; **=p-Valor<0,005; ***=p-Valor<0,0005.

De cada uno de los cuatro sustratos estudiados mediante ensayos quinasa con ATP radiomarcado, obtuvimos información sobre la capacidad de las variantes patogénicas para autofosforilarse. Los mutantes R89Q y L195V presentan una actividad quinasa significativamente mayor que VRK1 *wt*, y el resto de mutantes, H119R, R133C, G135R, V236M, R321C, R358X y W375X, presentan una actividad significativamente menor (Figura 24A). Como todos los experimentos realizados sobre los distintos sustratos generaron el mismo patrón de fosforilación, analizamos los datos en conjunto. La capacidad catalítica de los mutantes de VRK1 es independiente del tipo de sustrato, por lo que la actividad quinasa es una propiedad de la variante patogénica en sí misma, no dependiendo del sustrato (Figura 24B).

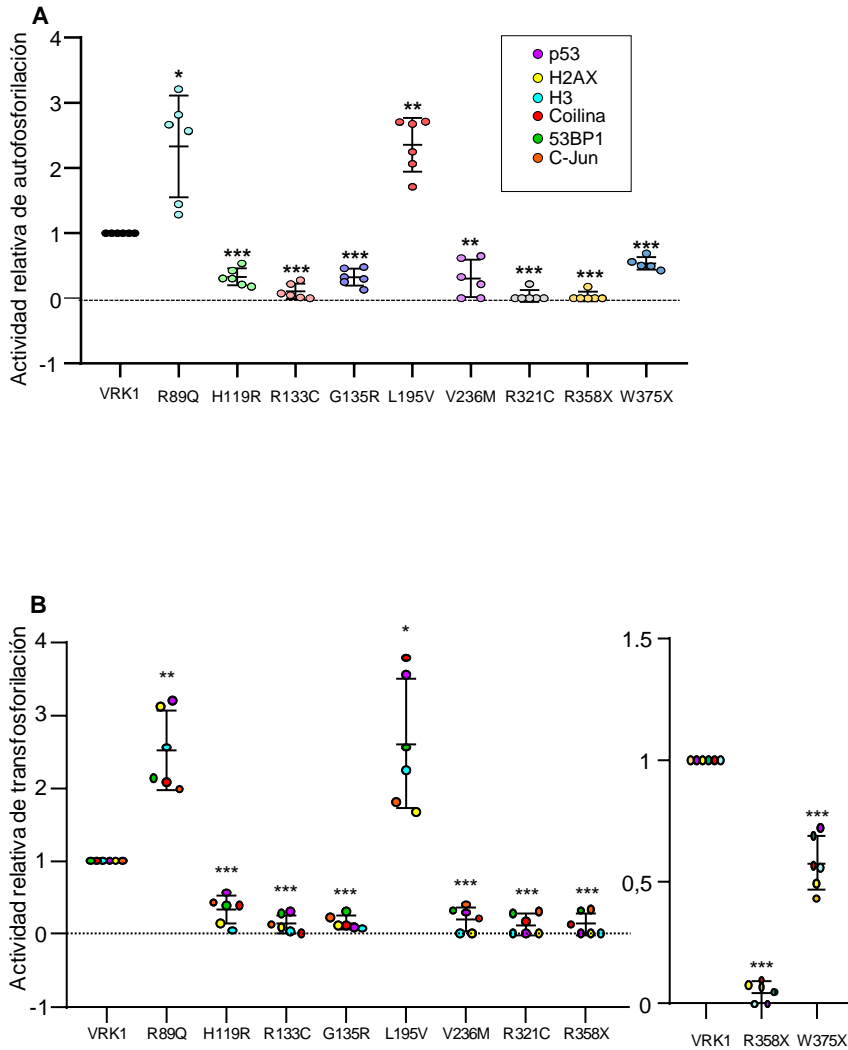


Figura 24: Nivel medio de autofosforilación y de transfosforilación de las variantes patogénicas de VRK1. **A:** Nivel medio de autofosforilación de los mutantes de VRK1. Los resultados corresponden con 6 medidas realizadas en experimentos independientes, salvo en el caso de W375X, que corresponden con 5 medidas. **B:** Nivel medio de transfosforilación de los mutantes de VRK1. En la primera gráfica los datos corresponden con la media de tres experimentos para cada uno de los sustratos. En la segunda gráfica, los valores provienen de un solo experimento. Se muestra la leyenda con el código de colores para diferenciar los distintos sustratos en ambas gráficas. La significación estadística se analizó utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *= p -Valor $<0,05$; **= p -Valor $<0,005$; ***= p -Valor $<0,0005$.

4. Estudio del comportamiento de las variantes patogénicas de VRK1 mediante la generación de líneas celulares estables

4.1. Los mutantes de VRK1 en heterocigosis con VRK1 *wild type* causan cambios en las características de las células

Sabiendo que los distintos mutantes de VRK1 presentan alteraciones en estabilidad y en actividad quinasa, quisimos comprobar las consecuencias de estas diferencias en un sistema *in vivo*. Para ello, generamos líneas celulares *HeLa* estables mediante transducción viral con las distintas proteínas mutadas en VRK1 murina. Utilizamos mVRK1 porque rescata el fenotipo de hVRK1 cuando ésta se elimina de la célula mediante SiARN específico (Moura, Campillo-Marcos *et al.* 2018, Cantarero, Sanz-García *et al.* 2015). Una vez generadas las líneas estables, se realizó la clonación de célula única para eliminar la heterogeneidad debida a la inserción aleatoria de los vectores virales. Los clones utilizados para todos los experimentos que se realizaron con estas células se muestran en la Figura 25. Se intentaron también generar las líneas estables para los mutantes mR89Q y mR358X, sin éxito. En el caso de mR89Q, las líneas en heterocigosis no sobreviven, y en el caso de mR358X, se logró obtener una estable en heterocigosis, pero no se consiguieron clones. Los niveles de ARNm de mR358X son muy bajos en las células, y por tanto también lo es el nivel proteico.

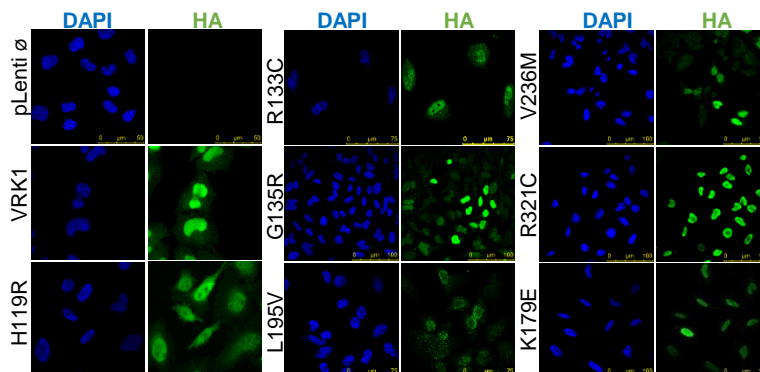


Figura 25: Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murina en los clones de las líneas celulares estables. Las células estables *HeLa* se procesaron para su análisis por microscopía confocal. Se detectaron las variantes de mVRK1 utilizando el anticuerpo α -HA policlonal.

Durante el proceso de generación de las líneas, observamos particularidades tanto en la velocidad de crecimiento de las células como en su morfología. Para determinar si realmente existían diferencias respecto a la línea generada con mVRK1 *wt*, hicimos fotos de campo claro y vídeos para evaluar las diferencias en crecimiento y movimiento.

En las fotos no se observaron diferencias importantes en la morfología de las células, ni respecto a células *HeLa* estables para el vector lentiviral vacío donde están clonados los distintos mutantes, ni respecto a *HeLa* estables para mVRK1 *wt*, salvo en el caso de mR133C, donde las células son muy grandes y multinucleadas (Figura 26A y 26B).

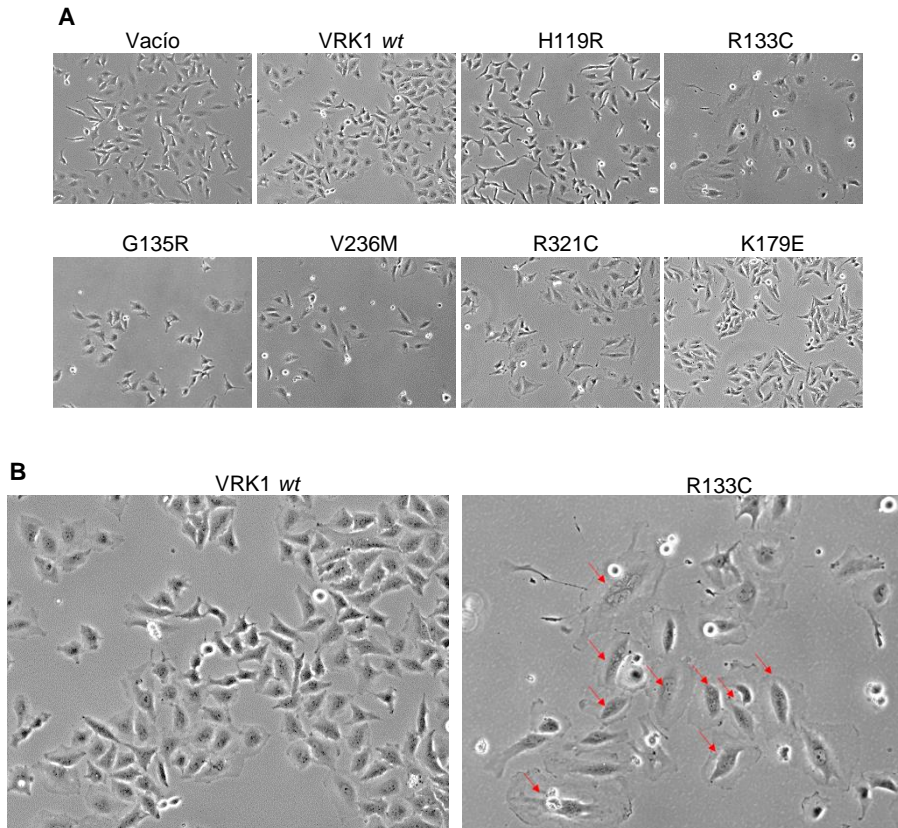


Figura 26: La línea celular estable mR133C presenta un gran tamaño y varios núcleos por célula. **A:** Fotos de campo claro de las líneas celulares estables *HeLa* para el vector lentiviral vacío, mVRK1 *wt*, mK179E, y las variantes patogénicas mH119R, mR133C, mG135R, mV236M, y mR321C, tomadas con un aumento de 10X. **B:** Ampliación de las fotos de mVRK1 *wt* y mR133C. Se indican las células multinucleadas con flechas rojas.

A partir de los vídeos (1-8 en el CD que acompaña este trabajo) analizamos el área, velocidad y distancia recorrida por las células y número de divisiones celulares que tienen lugar durante 48 horas. En cuanto al área, las células estables para mR133C duplican en tamaño a las mVRK1 *wt* (Figura 27A). Además, la línea mV236M tiene un área significativamente mayor, y la quinasa inactiva mK179E un área significativamente menor. El resto no presenta diferencias significativas. En mV236M se observan algunas células multinucleadas, lo que hace que aumente el tamaño del área en la

Resultados

cuantificación. En cuanto al mutante mK179E, desconocemos el motivo por el que las células son más pequeñas.

Para determinar el número de divisiones celulares, cuantificamos el número de células cada 12 horas, observando que en 48 horas las células con mVRK1 *wt* o con el vector vacío se dividen unas 3 veces. Vemos que las células mR133C se dividen más lentamente respecto a las *wt*, solo 2 veces en 48 horas; en cambio, las mH119R lo hacen casi 4 veces. La línea con la quinasa inactiva también destaca por dividirse más que la *wt*, y la mG135R por dividirse menos (Figura 27B). Observamos que existe un defecto en el ciclo celular en estas líneas estables para las variantes patogénicas de VRK1, aunque para su estudio completo conviene eliminar la heterocigosis silenciando VRK1 humana.

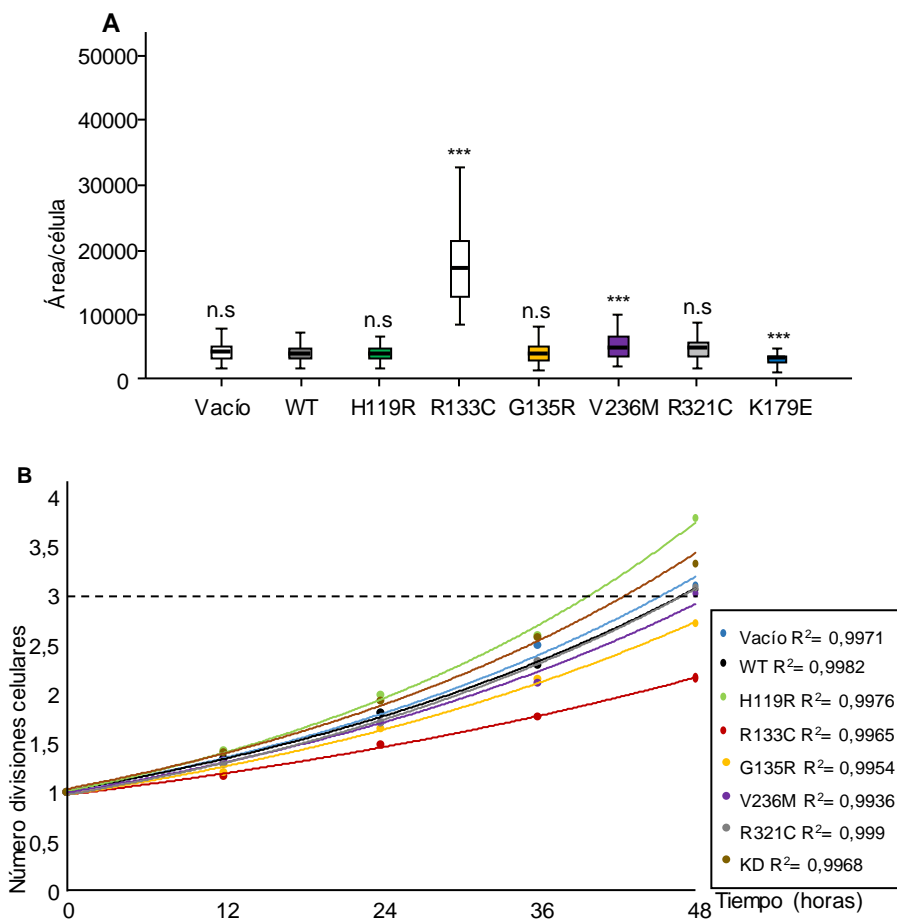
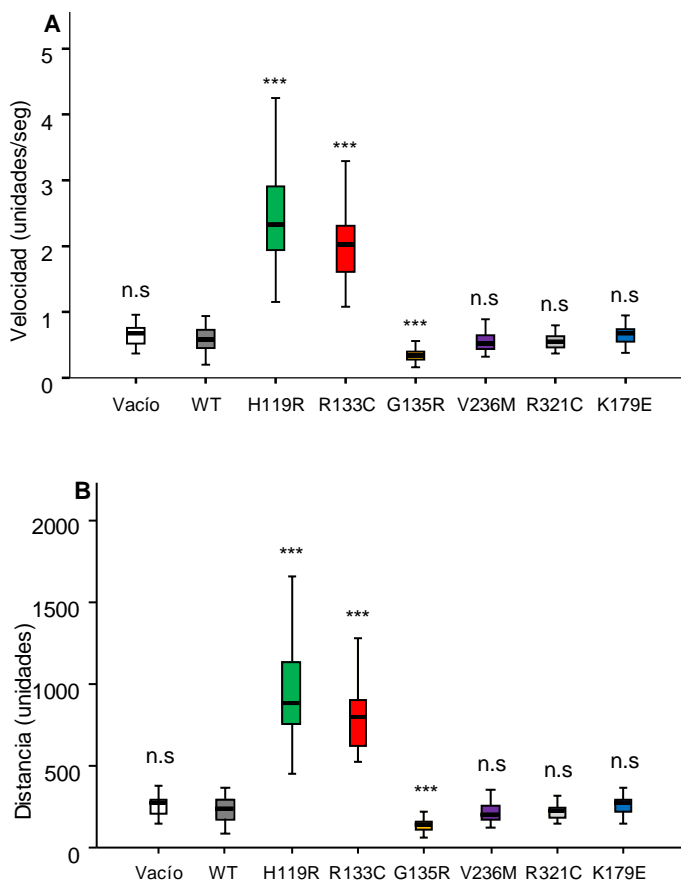


Figura 27: Cuantificación del área media y del número de divisiones celulares de las variantes patogénicas de mVRK1. **A:** Área media por célula. Se cuantificó el área de 90 células de cada una de las líneas celulares estables utilizando el programa *ImageJ*. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *IBM SPSS 23*, utilizando un T-test de dos colas con la corrección de

Welch. En todos los casos, el nivel de significación fue: *=p-Valor<0,05; **=p-Valor<0,005; ***=p-Valor<0,0005. n.s.= no significativo. **B**: Número de divisiones celulares durante 48 h, cuantificando el número de células por campo cada 12 h. Cada punto representa la media del número de células de 3 campos. Se muestra en la leyenda el código de colores utilizado para representar cada mutante. Los valores responden a una regresión polinómica, se representa el R^2 para determinar la bondad del ajuste.

En cuanto a la motilidad celular, observamos que las células mR133C y mH119R se desplazan a una velocidad significativamente mayor respecto a mVRK1 *wt*, mientras que mG135R, por el contrario, presenta un movimiento más lento (Figura 28). Por otro lado, en mR133C observamos que muchas veces la citocinesis no puede concluir, las dos futuras células hijas presentan un movimiento desmedido en un intento de finalizar la división, en vano, puesto que finalmente el proceso concluye con una célula con dos núcleos, que en la próxima división pasará a tener 3 o 4 núcleos, o sufrirá apoptosis (Vídeo 4). Las mH119R, en cambio, son células muy activas, se dividen un mayor número de veces que mVRK1 *wt*.



Resultados

Figura 28: Cuantificación de la velocidad y la distancia media recorrida por las líneas estables para las variantes patogénicas de mVRK1. **A:** Velocidad media en unidades aleatorias/seg de las variantes patogénicas de mVRK1. Se cuantificó la velocidad de 30 células de cada una de las líneas celulares estables. **B:** Distancia media en unidades aleatorias de las variantes patogénicas de mVRK1. Se cuantificó la distancia recorrida por 30 células para cada una de las líneas celulares estables. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa IBM SPSS 23, utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *= p -Valor $<0,05$; **= p -Valor $<0,005$; ***= p -Valor $<0,0005$. n.s.= no significativo.

Nos llamó la atención el defecto en citocinesis de la línea mR133C. En este proceso, el aparato de Golgi juega un papel fundamental, dado que su fragmentación en pequeñas vesículas junto con la formación del anillo contráctil de actina permite la correcta finalización de la citocinesis. Teniendo VRK1 un papel importante en la fragmentación del aparato de Golgi durante la mitosis, decidimos marcar las células mR133C con giantina como marcador del aparato de Golgi y con β -Actina como marcador de citoesqueleto, para determinar alguna diferencia en estas células respecto a mVRK1 *wt*. Vemos que las líneas estables para mR133C son muy grandes, con varios núcleos, y con un aparato de Golgi situado entre ellos. Sería interesante realizar un estudio completo del ciclo celular para observar los posibles defectos del aparato de Golgi durante la fase final de la citocinesis. Cabe destacar la disposición de los filamentos de actina a lo largo del citosol de mR133C, vemos que forman una serie de fibras que rodean a los núcleos (Figura 29). Este resultado sugiere que la línea mR133C presenta, aparte de un citosol laxo con unos lamelipodios muy grandes y dinámicos, un elevado número de fibras de estrés. Los resultados sobre esta línea indican que en esta variante patogénica podría haber una alteración en la ruta de la Reelina, una de las más afectadas por el silenciamiento de VRK1 (Vinograd-Byk, Sapir *et al.* 2015). Desarrollaremos esta idea en el apartado de discusión de este trabajo.

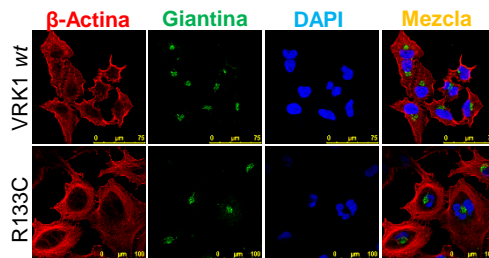


Figura 29: La línea celular *HeLa* estable mR133C presenta una estructura anómala del citoesqueleto. Las células se procesaron y marcaron para su análisis por microscopía confocal. Se utilizaron anticuerpos específicos para la β -Actina como marcaje de citoesqueleto, giantina como marcaje del aparato de Golgi y DAPI para el núcleo.

4.2. Los mutantes de VRK1 en homocigosis causan defectos en la progresión del ciclo celular y en la migración celular

VRK1 es un importante regulador del ciclo celular, hemos visto que las líneas celulares estables para las distintas variantes patogénicas de VRK1 presentan defectos en el ciclo, puesto que se altera el número de divisiones celulares. Llevamos a cabo un experimento silenciando hVRK1 endógena para observar la capacidad de las distintas variantes de progresar en el ciclo por sí mismas. Este experimento también nos permitió estudiar de forma más precisa respecto a los vídeos el crecimiento celular en las líneas en heterocigosis, puesto que cuantificamos la totalidad de las células vivas que hay en el cultivo. Así, observamos que la línea estable para mH119R crece significativamente más que la mVRK1 *wt*, así como mR133C, mG135R y mV236M crecen significativamente menos (Figura 30). Este resultado concuerda con las observaciones en los vídeos para mH119R, mR133C y mG135R (Figura 27). En el caso de mV236M no vimos ningún cambio claro en los vídeos; sin embargo, podemos ver que el crecimiento celular es significativamente menor respecto a la línea estable para mVRK1 *wt*. En cuanto a las variantes en homocigosis, vemos que mVRK1 no presenta diferencias en división respecto a mVRK1 en heterocigosis con hVRK1, lo que confirma que mVRK1 rescata el fenotipo de hVRK1. Para el resto de mutantes, todos presentan un menor número de células frente a mVRK1 *wt*; es decir, sufren defectos en el ciclo celular. Además, en comparación con cada línea en heterocigosis, cuando el mutante se presenta en homocigosis el defecto se acentúa, aumentando la significación de los resultados. Hay dos casos en los que observamos un comportamiento anómalo, mH119R y mR133C. En el primer caso, vemos que en heterocigosis el ciclo celular es más rápido respecto al *wt*, y en homocigosis sin embargo es más lento. En mR133C el cultivo aparentemente no presenta división celular, lo que ocurre es que debido a los defectos de citocinesis, aumenta el número de células multinucleadas, pero no el número total de células.

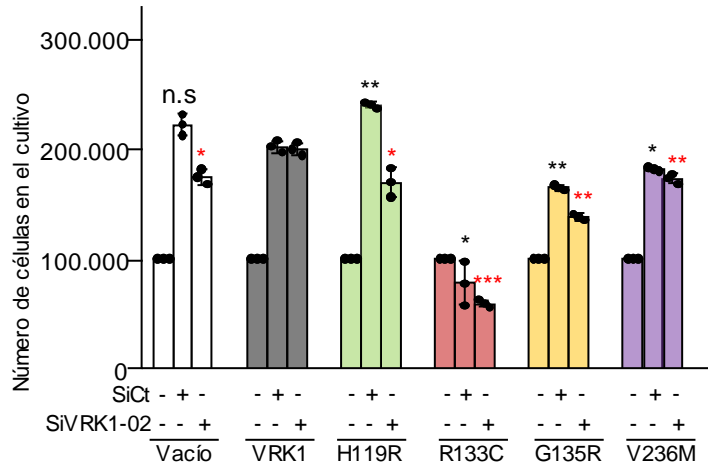
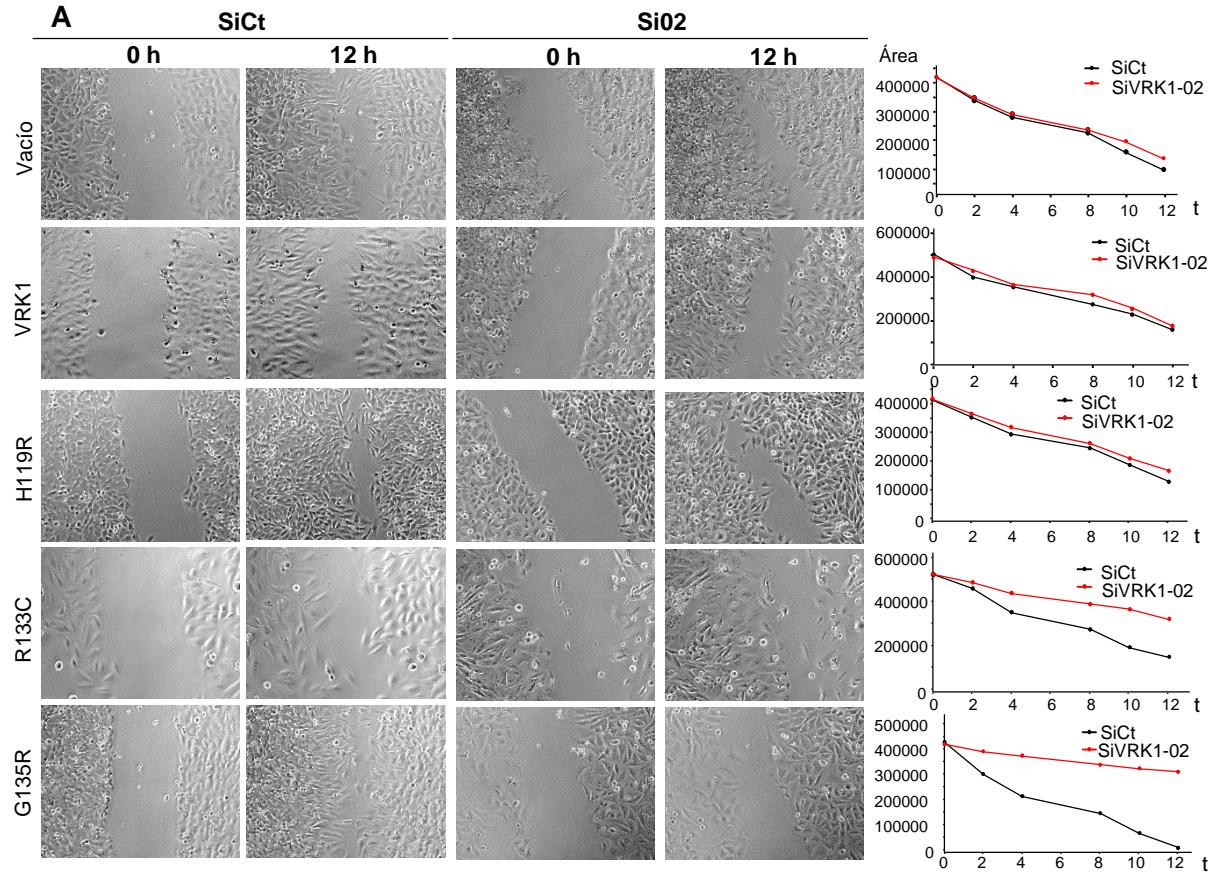


Figura 30: Las líneas celulares estables para los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración presentan defectos en el ciclo celular. Se sembraron 100.000 células por cada uno de los puntos del experimento. Al día siguiente, se silenciaron utilizando SiARN control o SiARN específico para VRK1. A las 72 h de silenciamiento, se cuantificó el número de células presentes en el cultivo. Los datos se muestran en un gráfico de barras donde cada punto representa uno de los triplicados. El análisis estadístico de los datos se realizó a partir de tres experimentos independientes con el programa IBM SPSS 23, utilizando un T-test de dos colas con la corrección de *Welch*. En todos los casos, el nivel de significación fue: *=*p*-Valor<0,05; **=*p*-Valor<0,005; ***=*p*-Valor<0,0005. n.s.= no significativo. En negro se muestra la comparativa de las líneas en heterocigosis respecto a mVRK1 *wt* en heterocigosis. En rojo, la comparativa de las líneas en homocigosis respecto a mVRK1 *wt* en homocigosis.

VRK1 es importante en migración neuronal de forma independiente de su actividad quinasa (Vinograd-Byk, Sapir *et al.* 2015). Una de las rutas más alteradas como consecuencia del silenciamiento de VRK1 es la de la Reelina, fundamental para la migración neuronal. Como al menos uno de los mutantes, mR133C, presenta defectos en citoesqueleto, y junto con mH119R causan cambios en el movimiento de las células, realizamos un ensayo de cierre de herida para determinar posibles defectos en migración (Figura 31). En comparación con las líneas estables en heterocigosis, en homocigosis el cierre de la herida es más lento, salvo en mH119R, que es igual, y mL195V, que parece más rápida. Comparando todas las líneas en homocigosis con mVRK1 *wt*, mG135R apenas reduce el área de la herida, mR133C y mH119R también presentan un cierre más lento, y mL195V, mV236M y mK179E se cierran de forma similar a la *wt*. Por tanto, con mK179E corroboramos que el defecto en migración es independiente de la actividad quinasa, y que los mutantes que en los vídeos observamos con alteraciones en movimiento frente a mVRK1 *wt* presentan menor capacidad de migración.



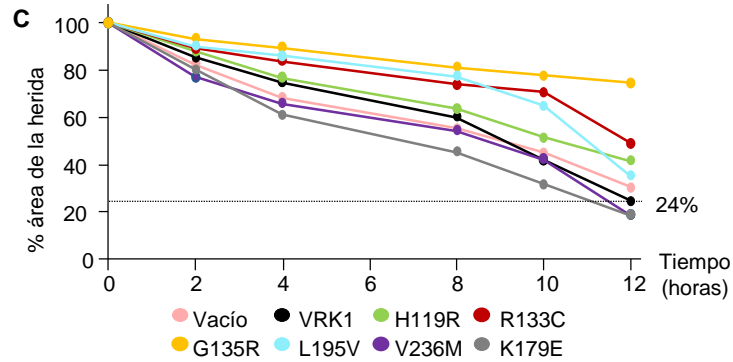
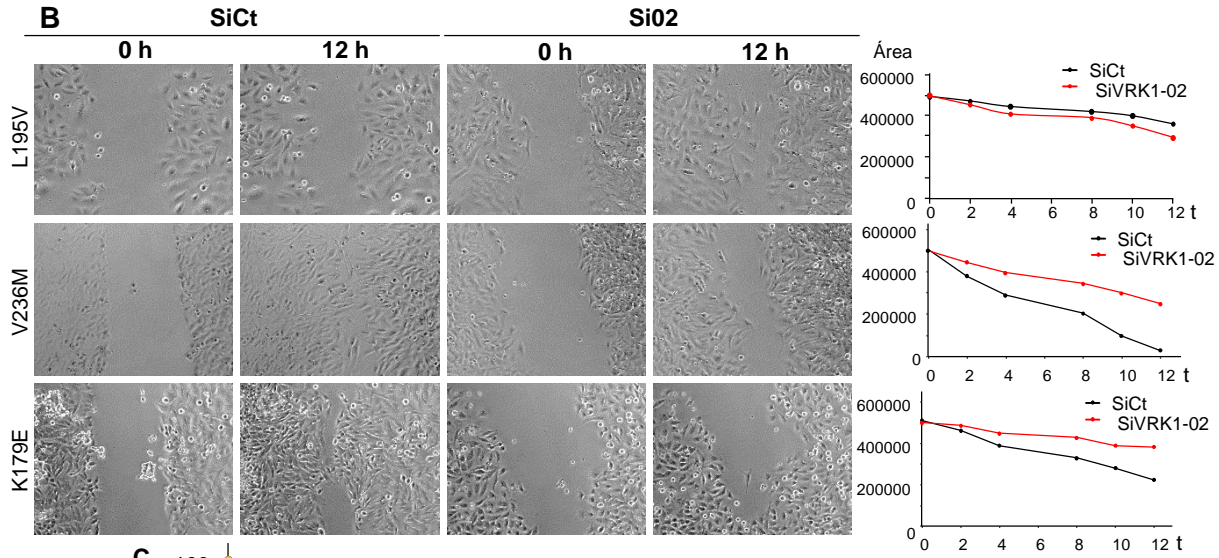


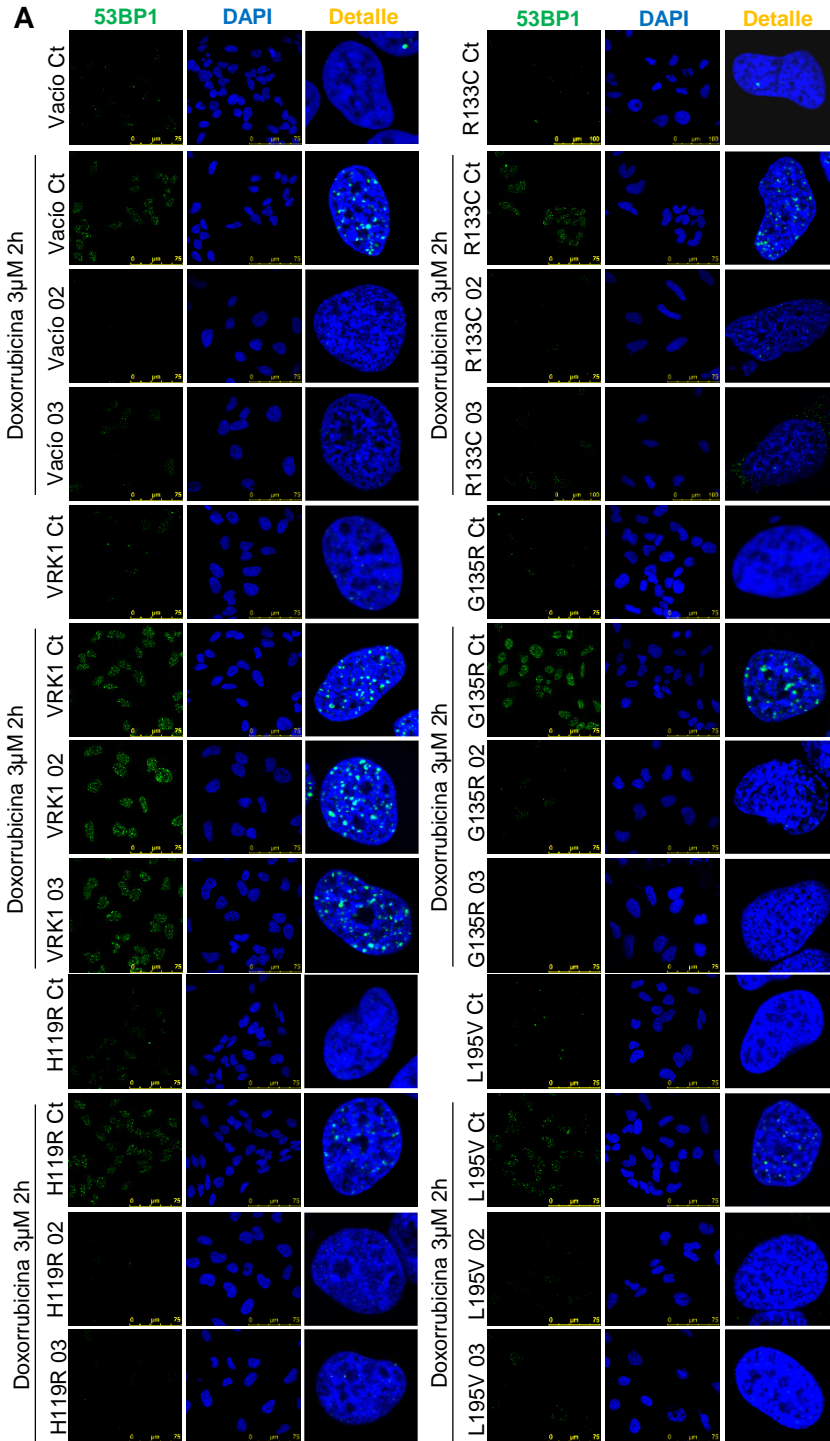
Figura 31: Las líneas celulares estables en homocigosis mG135R, mR133C y mH119R presentan defectos en migración. **A:** Ensayo de cierre de herida en las líneas celulares estables para las variantes patogénicas de VRK1. Se sembraron las distintas líneas en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se llevó a cabo el silenciamiento de VRK1 utilizando SiARN específico o SiARN control. A las 72 h de silenciamiento, se generaron las heridas en el cultivo monocapa y se tomaron fotos durante 10 minutos cada 12 h. En la figura se muestran las fotos a tiempo 0 y 12 h, acompañadas de una gráfica donde se observa el tamaño del área de la herida cada 2 h, de cada línea en heterocigosis y en homocigosis. **B:** Gráfica que compara el área ocupada por la herida cada 2 h durante las 12 h de mVRK1 *wt* en homocigosis con el resto de mutantes en homocigosis.

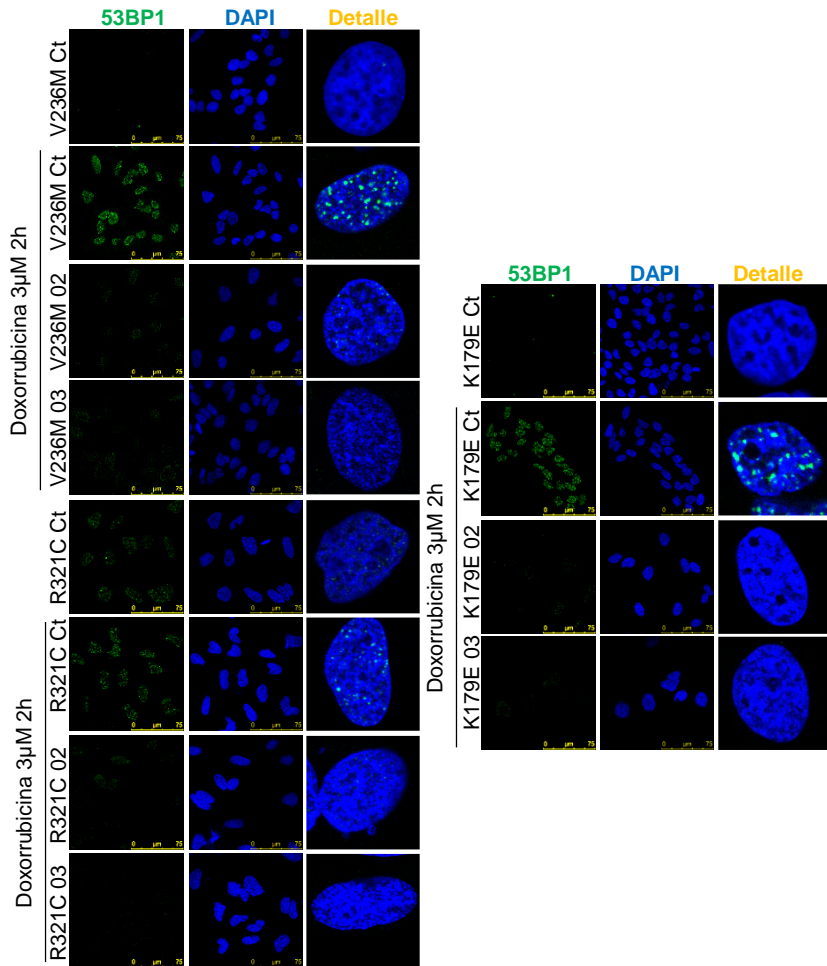
4.3. Los mutantes de VRK1 en homocigosis no responden al tratamiento con doxorubicina

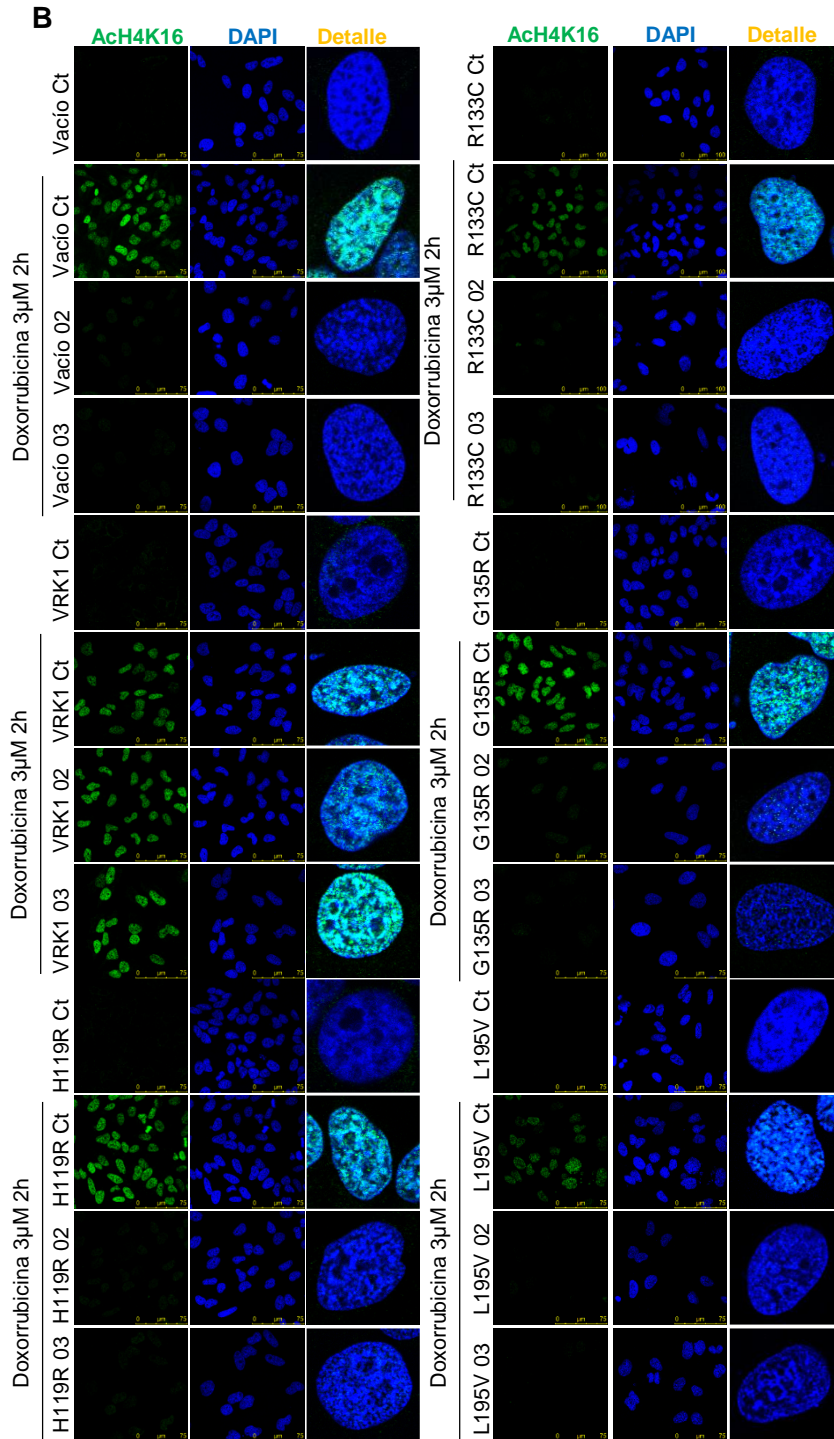
Siendo VRK1 esencial en respuesta a daño, decidimos estudiar la capacidad de las variantes patogénicas de VRK1 tanto para inducir la formación de focos de reparación de 53BP1 (Figura 32A) como para promover la acetilación de la histona H4 en la lisina 16 (Figura 32B) en respuesta al daño generado con doxorubicina. En la línea estable para el vector vacío, el tratamiento con doxorubicina induce la formación de focos de reparación de 53BP1 y la acetilación de la histona H4, y cuando VRK1 endógena está silenciada, no se forman los focos ni hay acetilación. En la línea estable para mVRK1 *wt*, el tratamiento con doxorubicina induce tanto la formación de focos como la acetilación de la histona H4, y el silenciamiento de VRK1 endógena no produce alteraciones en ambas modificaciones. Para las variantes patogénicas de VRK1, en todos los casos, cuando las líneas se encuentran en heterocigosis con hVRK1 son capaces de responder a la doxorubicina tanto induciendo la formación focos como la acetilación de H4, pero cuando VRK1 endógena está silenciada, ninguno de los mutantes induce la formación de focos de 53BP1 ni tampoco la acetilación de la histona H4 (Figura 32A y 32B).

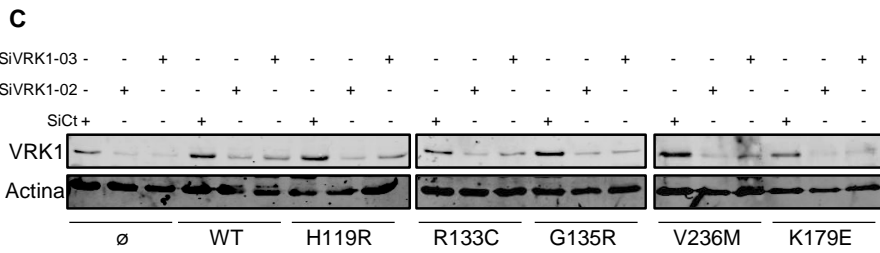
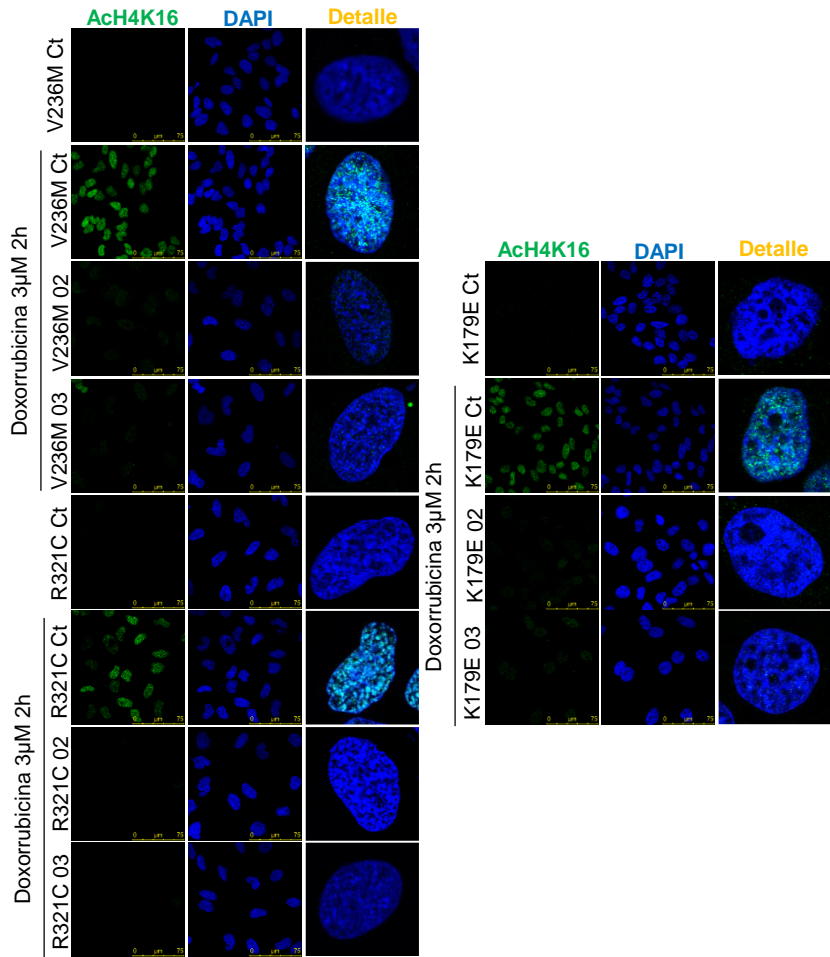
Para los focos de 53BP1, hay dos mutantes, mR321C y mR133C, que en heterocigosis forman más focos que mVRK1 *wt*, y para la acetilación, sin embargo, estos dos mutantes junto con mL195V y la quinasa inactiva mK179E, presentan una acetilación significativamente disminuida (Figura 32D y 32E).

Esperábamos que la variante mL195V fuera capaz de inducir la respuesta al daño generado, puesto que presenta una actividad quinasa significativamente mayor que mVRK1 *wt*, y además concretamente tiene una fuerte capacidad de fosforilar a 53BP1, pero parece que esta fosforilación no es suficiente para la formación de los focos de reparación.









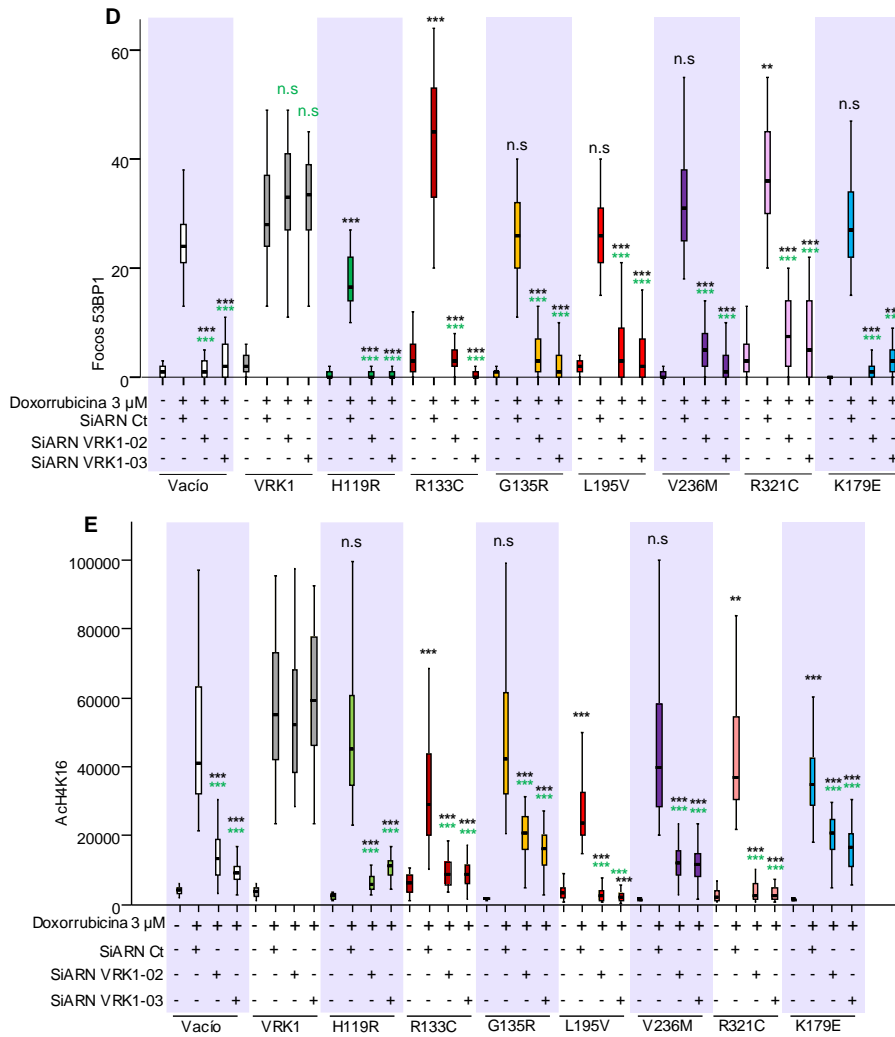


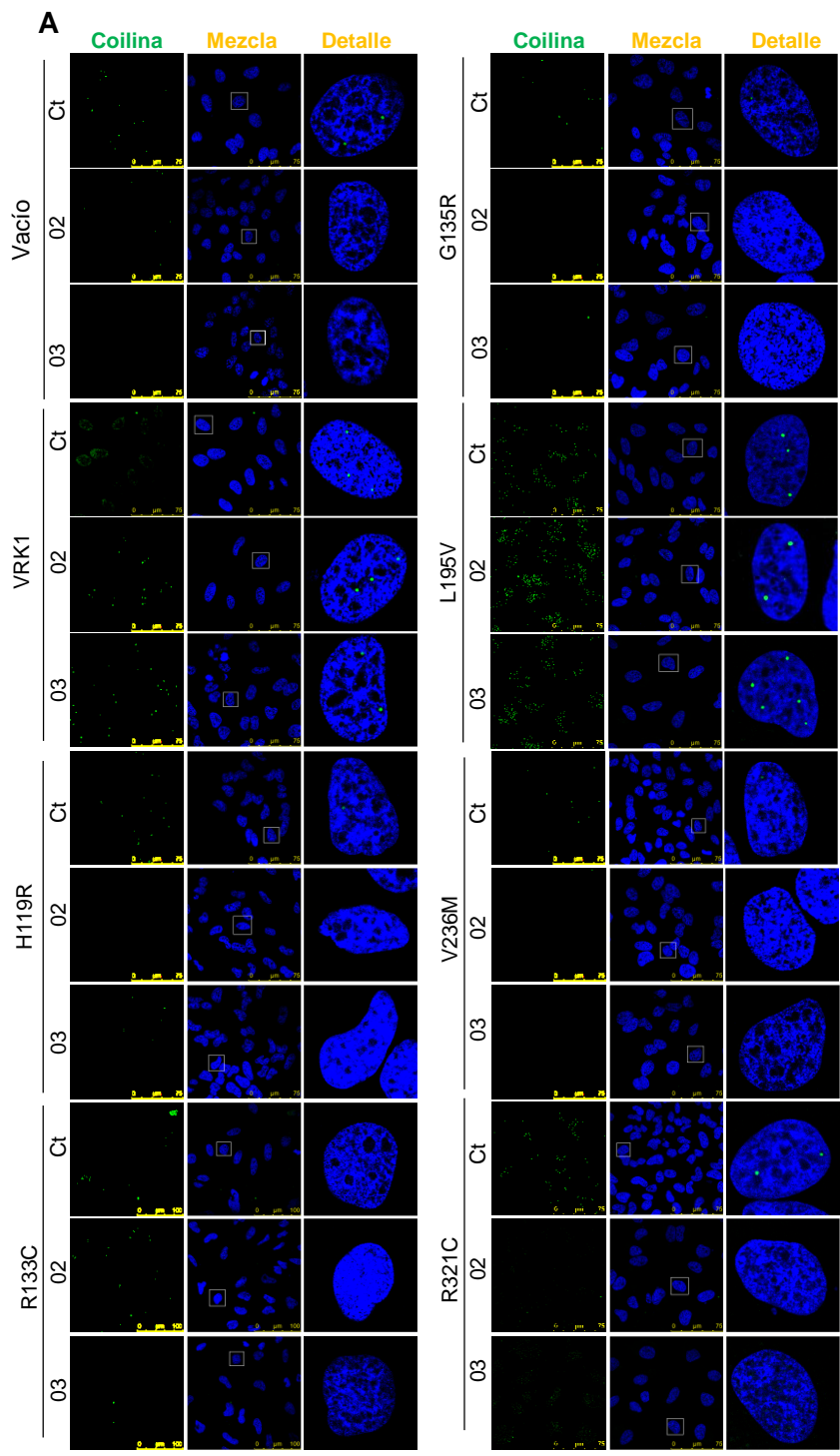
Figura 32: Los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración no son capaces de inducir la formación de focos de 53BP1 ni la acetilación de la histona H4 en el residuo K16 en respuesta a doxorubicina. **A:** Las variantes patogénicas de VRK1 no forman focos de reparación de 53BP1 en respuesta a doxorubicina. Las líneas estables para las variantes patogénicas de VRK1 se trataron con SiARN control o SiARN específico para VRK1. A las 72 h, se trataron o no con doxorubicina 3 μ M durante 2 h, y las células se procesaron para su estudio por microscopía confocal. **B:** Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de promover la acetilación de la histona H4 en la lisina 16 en respuesta a doxorubicina. Las líneas estables para los mutantes de VRK1 se trataron con SiARN control o SiARN específico para VRK1. A las 72 h, se trataron o no con doxorubicina 3 μ M durante 2 h, y las células se procesaron para su estudio por microscopía confocal. **C:** *Western blot* donde se observa el silenciamiento de VRK1 con SiARN específico, 02 o 03. **D,E:** Cuantificación del número de focos de 53BP1 y de la fluorescencia para la acetilación de H4K16. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa IBM SPSS 23, utilizando el test no paramétrico *Games Hower* para comparar muestras 2 a 2 ($n=70$). En todos los casos, el nivel de significación fue: *= p -Valor $<0,05$; **= p -Valor $<0,005$; ***= p -Valor $<0,0005$. n.s.= no significativo. En verde se muestra la comparación entre el mutante en heterocigosis y en homocigosis. En negro,

la comparación entre mVRK1 *wt* en heterocigosis o en homocigosis con los mutantes en heterocigosis o en homocigosis, respectivamente.

4.4. Los mutantes de VRK1 en homocigosis presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal

La fosforilación de Coilina por VRK1 en la Ser186 es fundamental para la formación de los cuerpos de Cajal, de forma que la ausencia de VRK1 produce una pérdida de los mismos (Cantarero, Sanz-Garcia *et al.* 2015). En el estudio realizado este mismo año donde se descubrieron las dos últimas variantes patogénicas de VRK1, W254L y R219I, se observa que en los fibroblastos de los pacientes con estas mutaciones no tiene lugar el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, y además se promueve la degradación de la Coilina por el sistema del proteasoma (El-Bazzal, Rihan *et al.* 2019). Decidimos estudiar el estado de los cuerpos de Cajal en nuestras líneas celulares (Figura 33A), tanto en heterocigosis con hVRK1 como en homocigosis. Vimos que en heterocigosis el número células con cuerpos de Cajal es significativamente menor respecto a mVRK1 *wt*, y al silenciar VRK1 endógena; es decir, con los mutantes en homocigosis, el número de células capaces de formar cuerpos de Cajal es mucho menor (Figura 33B). Esto ocurre en todos los mutantes salvo en el caso de mL195V, donde las células en homocigosis forman cuerpos de Cajal normalmente, incluso se observa una mayor proporción de células con estas estructuras, aunque los datos no son significativos.

Por tanto, salvo L195V, las variantes patogénicas de VRK1 implicadas en neurodegeneración presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Estos defectos se deben presumiblemente a la falta de actividad quinasa de los mutantes, ya que la fosforilación de Coilina por VRK1 es necesaria para su correcto ensamblaje.



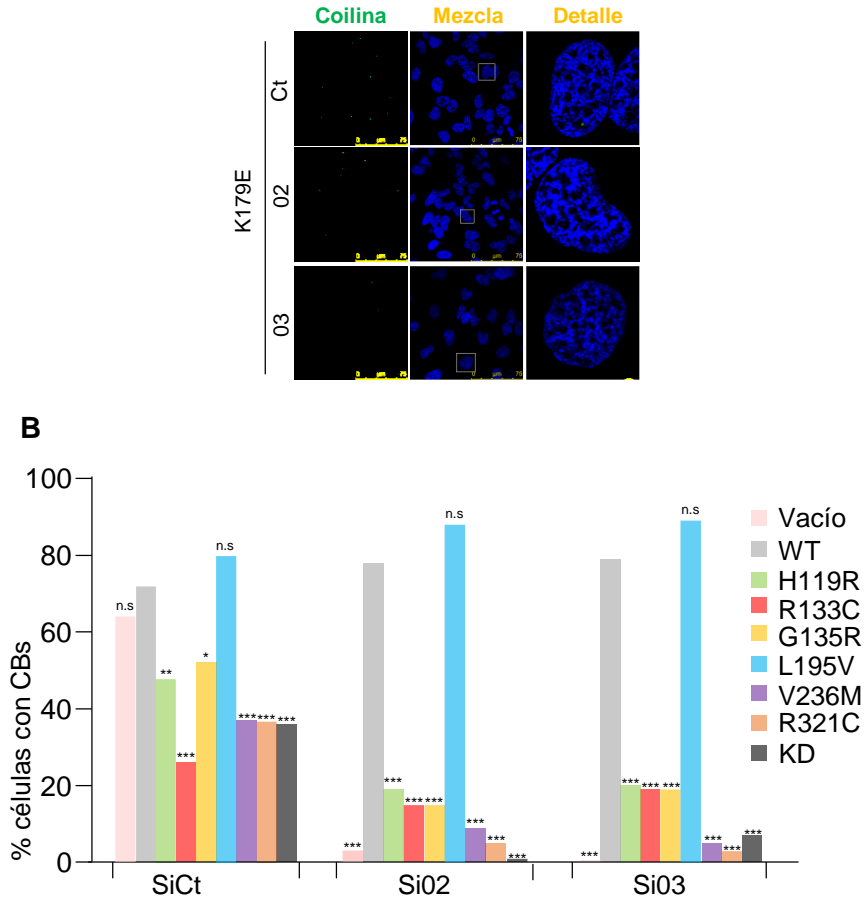
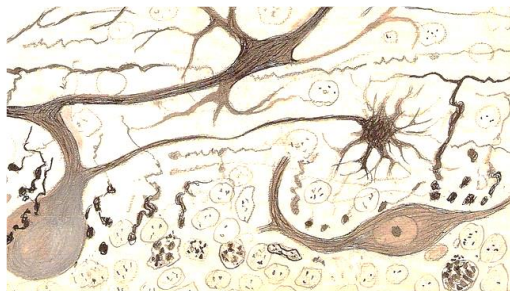


Figura 33. Los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. **A:** Las variantes patogénicas de VRK1 tanto en heterocigosis como en homocigosis no forman correctamente cuerpos de Cajal. Las líneas celulares estables se trataron con SiARN control o específico para VRK1 Si-02 o Si-03. A los 3 días se procesaron para su estudio por microscopía confocal. **B:** Cuantificación del porcentaje de células que presentan cuerpos de Cajal. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa IBM SPSS 23, utilizando el test de Bonferroni. En todos los casos, el nivel de significación fue: *p-Valor<0,05; **p-Valor<0,005; ***p-Valor<0,0005. n.s.= no significativo. La comparación se realizó frente a mVRK1 *wt* en heterocigosis para las variantes que se encuentran en heterocigosis, y lo mismo en homocigosis.

RESULTADOS

Sección B: Implicación de la quinasa humana VRK1 en la Ataxia espinocerebelosa tipo I

“Procuremos agradar e instruir, nunca asombrar”

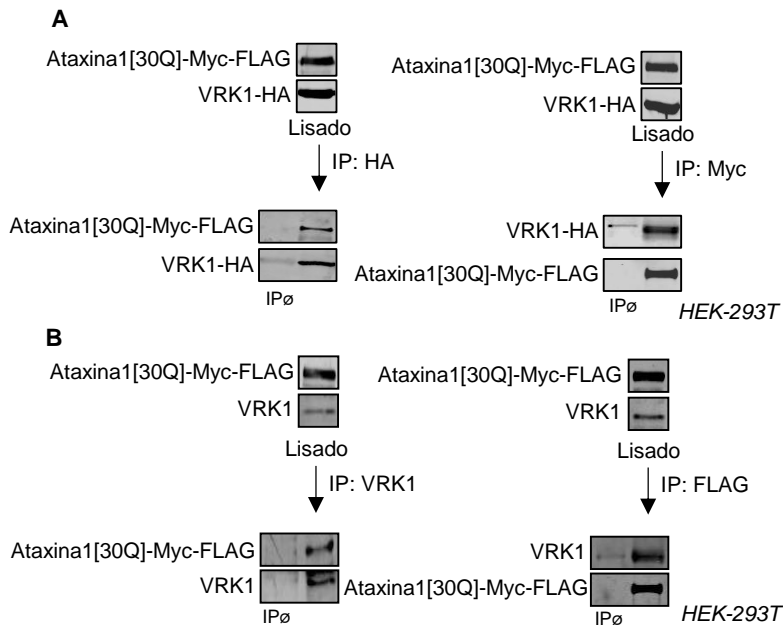


Santiago Ramón y Cajal

1. Interacción entre la quinasa humana VRK1 y la proteína causante de la Ataxia espinocerebelosa tipo I Ataxina1

1.1. VRK1 y Ataxina1 interaccionan

Previamente en el laboratorio se llevó a cabo un estudio del perfil de los posibles sustratos de VRK1, donde a partir de un chip de matriz de péptidos se identificaron múltiples potenciales sustratos de la quinasa, entre ellos Coilina, que ahora sabemos que es regulada por la fosforilación de VRK1 en el residuo Ser184 para la formación de los cuerpos de Cajal (Sanz-García, Vazquez-Cedeira *et al.* 2011, Cantarero, Sanz-García *et al.* 2015). En este estudio, entre otras muchas proteínas, se identificó Ataxina1, y dado el creciente interés en la comunidad científica por el papel de VRK1 en neurodegeneración, quisimos caracterizar este posible sustrato. Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación, de VRK1 endógena y VRK1-HA con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG transfectadas en la línea celular *HEK-293T* (Figura 34A y 34B), y de ambas proteínas endógenas (Figura 34C), observando interacción en todos los casos. Para confirmar la interacción, se llevó a cabo una curva de dosis transfecando cantidades crecientes de Ataxina1[30Q] en *HEK-293T*, analizando su interacción con VRK1 endógena (Figura 34D). En todos los casos se observa interacción, por tanto, confirmamos que VRK1 y Ataxina1 interaccionan, y que la interacción es dosis-dependiente.



Resultados

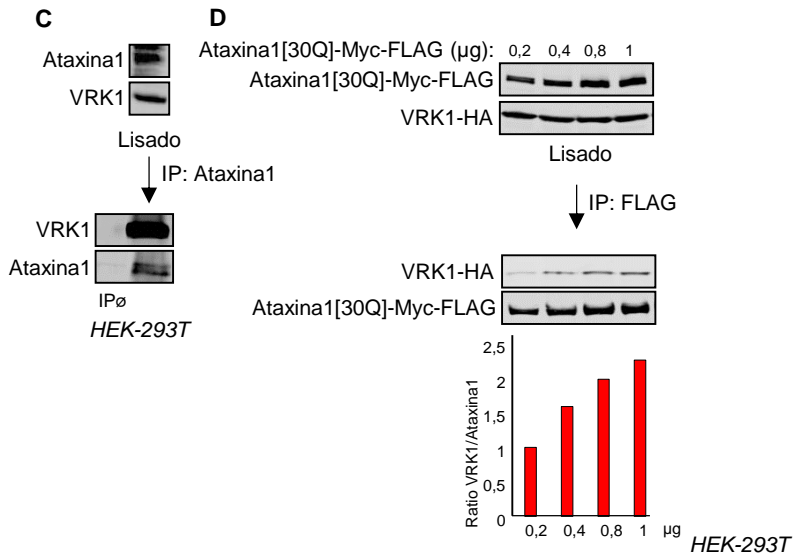
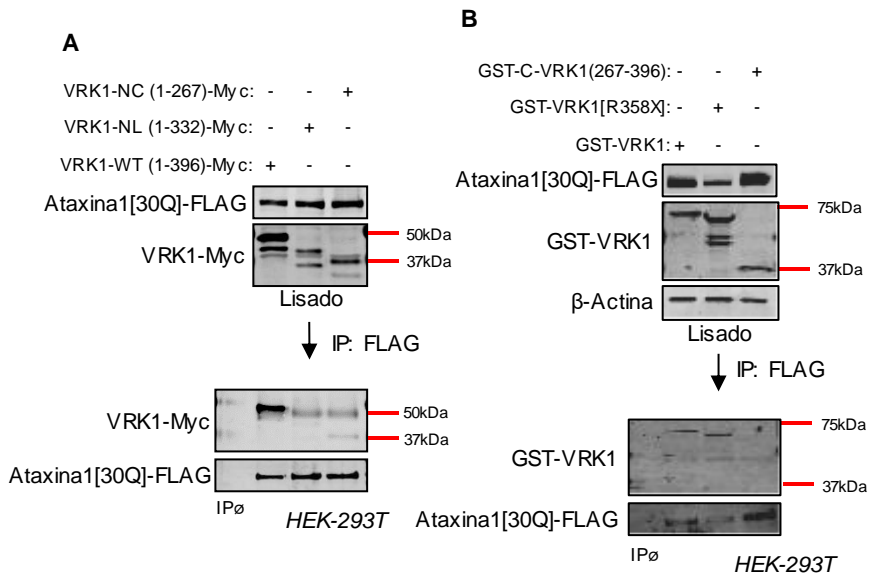


Figura 34: Ataxina1 y VRK1 interactúan. **A:** Interacción entre Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y VRK1-HA. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1 y pCEFL-Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se inmunoprecipitó VRK1 con α -HA y se detectó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG, o se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG con α -Myc y se detectó VRK1-HA. **B:** Interacción entre Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y VRK1 endógena. Células *HEK-293T* se transfectaron con pCEFL-Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se inmunoprecipitó VRK1 endógena y se detectó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG, o se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y se detectó VRK1 endógena. **C:** Interacción entre VRK1 y Ataxina1 endógenas. Se inmunoprecipitó Ataxina1 endógena y se detectó VRK1 endógena. **D:** Interacción dosis-dependiente entre Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y VRK1-HA. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con pCEFL-HA-VRK1 y con 0,2, 0,4, 0,8 o 1 μ g de pCEFL-Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG. Se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG con α -FLAG y se detectó VRK1-HA.

1.2. VRK1 interactúa por la superficie de contacto entre su dominio quinasa y su cola C-terminal con Ataxina1

Una vez confirmada la interacción, evaluamos la región de VRK1 por la que tiene lugar. Para ello, utilizamos distintas construcciones de VRK1-Myc y VRK1-GST de distintos tamaños; esto es, tres construcciones que representan el extremo N-terminal de VRK1: NH-L, que incluye desde el aminoácido 1 al 332, NH-C, que representa un N-terminal más corto, desde el aminoácido 1 al 267, y R358X, uno de los mutantes de VRK1 implicados en neurodegeneración, al que le faltan los últimos 38 aminoácidos del extremo C-terminal; y una construcción del extremo C-terminal, que incluye desde el aminoácido 267 al 396 de VRK1 (Figura 35D). Estas construcciones se transfectaron junto con Ataxina1[30Q] en células *HEK-293T*, y se observó que Ataxina1 no interactúa con el extremo N-terminal ni con el C-terminal de VRK1, pero sí interactúa con el mutante R358X (Figura 35A y 35B). A partir de este resultado caben

dos opciones, o que Ataxina1 interaccione con VRK1 por la región situada entre los aminoácidos 332 y 358, o bien que necesite de la totalidad de VRK1 correctamente plegada para su interacción. Para responder a esta cuestión, se utilizaron dos mutantes que presentan una o dos mutaciones en la región bisagra de VRK1 (E313G o E313G/K314I), región por la que el extremo C-terminal se pliega sobre el N-terminal (Shin, Chakraborty *et al.* 2011). Se transfectaron tanto VRK1 *wt* como ambas construcciones mutadas junto con Ataxina1[30Q] en *HEK-293T*, observando que con un solo residuo mutado disminuye la interacción, y con los dos, la interacción se pierde (Figura 35C). Por tanto, Ataxina1 necesita que VRK1 esté correctamente plegada para poder interaccionar con ella, sugiriendo que la interacción podría ocurrir por la superficie generada al plegarse el extremo C-terminal sobre el dominio catalítico de VRK1 (Figura 35D).



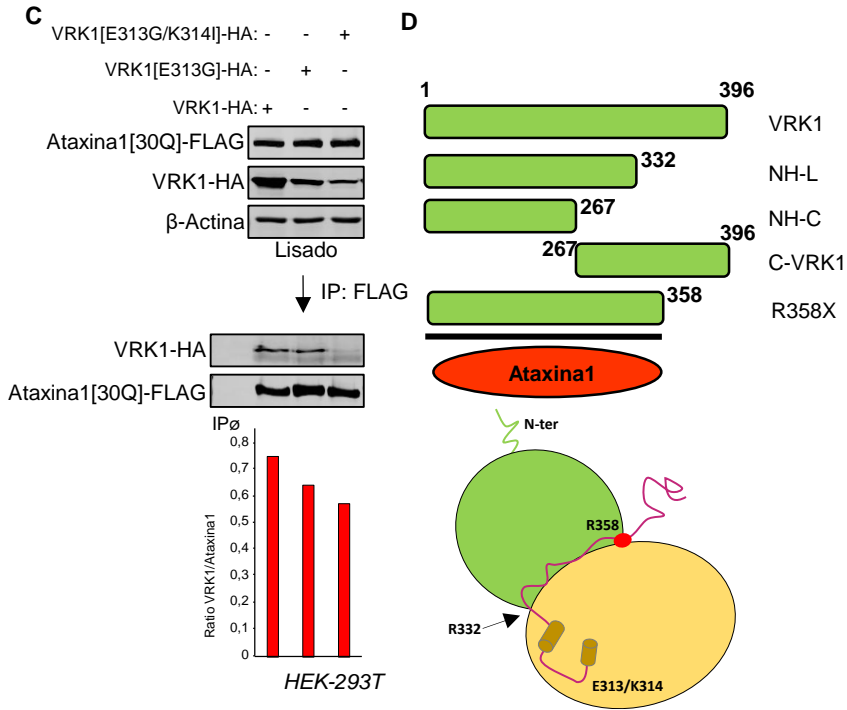
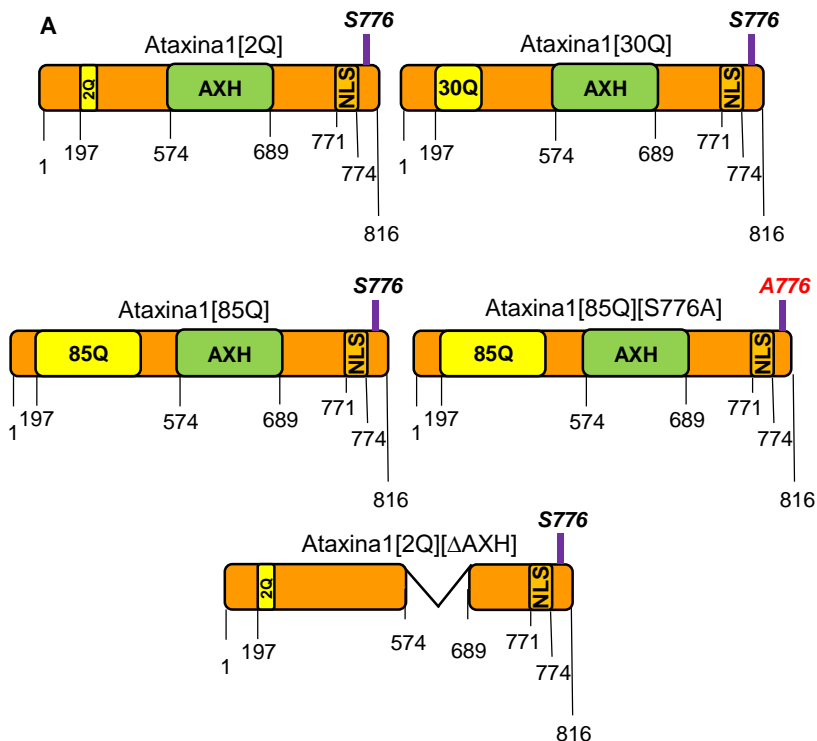


Figura 35: VRK1 y Ataxina1 interactúan por la superficie de contacto de la cola C-terminal con el dominio quinasa de VRK1. **A:** Interacción entre VRK1-Myc y mutantes, y Ataxina1[30Q]-FLAG. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con pCEFL-Ataxina1[30Q]-FLAG y pCEFL-VRK1-Myc, pCEFL-VRK1-NL(1-332)-Myc o pCEFL-VRK1-NC(1-267)-Myc. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-FLAG con α -FLAG y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **B:** Interacción entre GST-VRK1 y mutantes, y Ataxina1[30Q]-FLAG. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con pCEFL-Ataxina1[30Q]-FLAG y con pCEFL-GST-VRK1, pCEFL-GST-VRK1[R358X] o pCEFL-GST-C-VRK1(267-396). Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-FLAG con α -FLAG y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **C:** Interacción entre VRK1-HA y mutantes y Ataxina1[30Q]-FLAG. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con pCEFL-Ataxina1[30Q]-FLAG y pCEFL-VRK1-HA, pCEFL-VRK1[E313G]-HA o pCEFL-VRK1[E313G/K314I]-HA. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-FLAG con α -FLAG y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **D:** Construcciones y estructura de VRK1. Se representan las distintas construcciones utilizadas en este experimento y la posible región de interacción de VRK1 con Ataxina1. Se representa también un esquema de la estructura tridimensional de VRK1 con su región bisagra, constituida por los residuos E313 y K314, los distintos dominios de la proteína, y los residuos R332 y R358.

1.3. VRK1 interactúa más con Ataxina1 expandida que con Ataxina1 wild type

Dada la importancia del tracto de poliQ en la enfermedad SCA1, decidimos evaluar si la interacción entre VRK1 y Ataxina1 variaba con una serie de construcciones de Ataxina1 con distinto número de glutaminas en su tracto de poliQ (Skinner, Koshy *et al.* 1997). Para ello, utilizamos una construcción de pCEFL-Ataxina1-Myc-FLAG con dos

glutaminas; es decir, una proteína solo con el dominio AXH y sin el dominio poliQ; una construcción con 30 glutaminas, que representa a Ataxina1 *wt*; una con 85 glutaminas en su tracto de poliQ, construcción que se utiliza como Ataxina1 patogénica, ya que tiene un número de glutaminas suficientemente alto como para causar el fenotipo de SCA1; la misma construcción con el residuo Ser776 mutado a alanina, mutante no fosforilable en ese residuo, que revierte el fenotipo causado por la expansión del tracto de poliQ; y una construcción que no presenta ni el dominio AXH ni el dominio poliQ; es decir, una proteína sin estructura (Figura 36A) (Skinner, Koshy *et al.* 1997). Se transfectoron las distintas construcciones de Ataxina1 con VRK1-HA en células HEK-293T, observando una mayor interacción con Ataxina1[85Q] que con Ataxina1[30Q], y una mayor interacción con Ataxina1[85Q][S776A] que con Ataxina1[85Q] (Figura 36B). Se llevó a cabo el mismo experimento con VRK1 endógena (Figura 36C), obteniendo el mismo resultado. Por tanto, VRK1 interacciona más con Ataxina1 expandida que con Ataxina1 *wt*, siendo la interacción más fuerte cuando el residuo Ser776 está mutado a alanina.



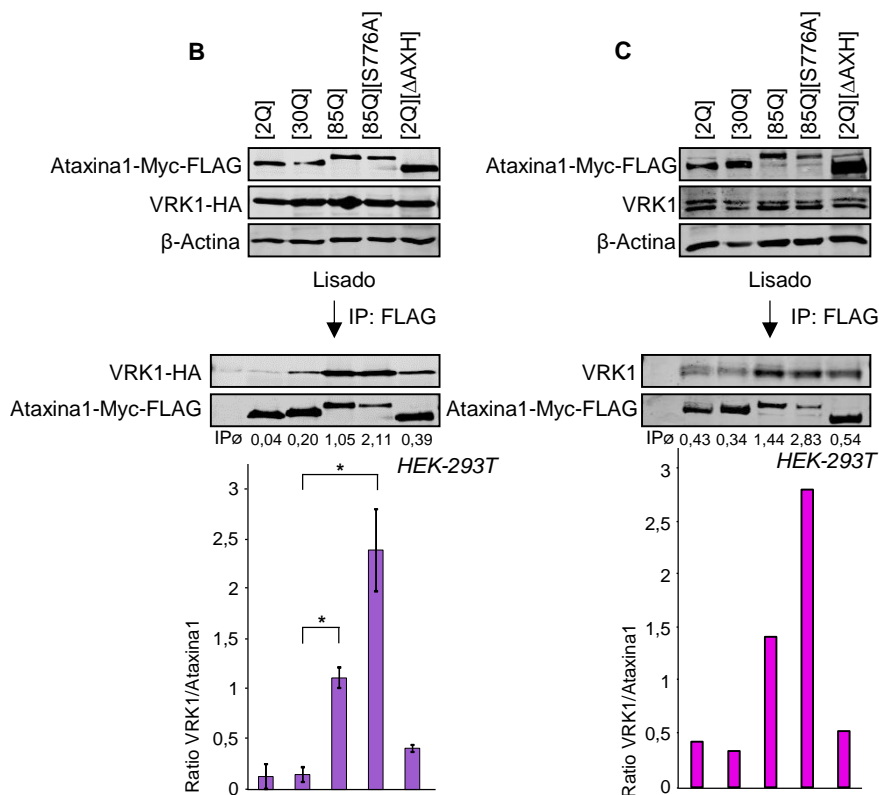
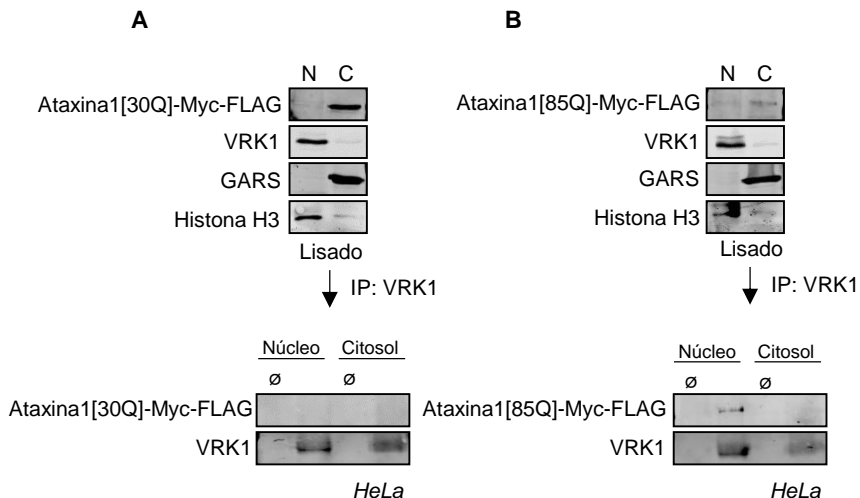


Figura 36: VRK1 interacciona más con Ataxina1 expandida que con Ataxina1 *wild type*. **A:** Representación de las distintas construcciones de pCEFL-Ataxina1-Myc-FLAG que se utilizaron en este experimento. **B:** Interacción entre VRK1-HA y las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Células *HEK-293T* se transfectoron con pCEFL-VRK1-HA y con las distintas construcciones de pCEFL-Ataxina1-Myc-Flag. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1-Myc-FLAG con el anticuerpo α -FLAG y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **C:** Interacción entre VRK1 endógena y distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Células *HEK-293T* se transfectoron con las distintas construcciones de pCEFL-Ataxina1-Myc-FLAG. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1-Myc-FLAG con α -FLAG y se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos.

1.4. VRK1 interacciona en el núcleo con Ataxina1, siendo la interacción mayor con Ataxina1 expandida

Siendo VRK1 una quinasa mayoritariamente nuclear, esperábamos que la interacción con Ataxina1 tuviera lugar en este compartimento. Para comprobarlo, se realizaron ensayos de fraccionamiento núcleo/citosol y se estudió la interacción entre ambas proteínas en los dos compartimentos celulares. Primero, determinamos la interacción entre Ataxina1[30Q] y Ataxina1[85Q] con VRK1 endógena en la línea celular *HeLa*. Inmunoprecipitando VRK1 endógena, no logramos detectar interacción ni en el núcleo ni en el citosol con Ataxina1[30Q] (Figura 37A), mientras que con Ataxina1[85Q]

observamos interacción en la fracción nuclear (Figura 37B). Al inmunoprecipitar Ataxina1-Myc-FLAG, observamos interacción con VRK1 endógena en el núcleo y muy ligeramente en el citosol, tanto con Ataxina1[30Q] (Figura 37C) como con Ataxina1[85Q] (Figura 37D). Además, en la fracción nuclear, Ataxina1[85Q] interacciona más que Ataxina1[30Q] con VRK1. En los lisados, en todos los casos, llama la atención el hecho de que Ataxina1 se observe más en el citosol que en el núcleo, cuando se sabe que es en el núcleo donde se localiza la mayoría de la proteína, y donde lleva a cabo su función. Para determinar si estábamos perdiendo proteína en la fracción insoluble durante el fraccionamiento, se cargó el precipitado (fracción insoluble) en un gel (Figura 37E), observando una gran cantidad de proteína, tanto de Ataxina1[30Q] como de Ataxina1[85Q]. Además, mediante microscopía confocal, vimos que en ambos casos se forman inclusiones nucleares (Figura 37F). Es decir, la bajada en el lisado de ambas proteínas se debe a que durante el fraccionamiento, la proteína que se encuentra en las inclusiones nucleares precipita junto con la fracción insoluble, por lo que la proteína con la que se observa interacción con VRK1 es la que no se encuentra en los agregados. Por tanto, la interacción entre VRK1 y Ataxina1 ocurre en el núcleo de las células con la Ataxina1 no agregada, y además, la interacción con Ataxina1 expandida es mayor que con la *wt*. Al inmunoprecipitar VRK1 endógena, no se observa interacción con Ataxina1[30Q], por lo que la interacción es leve o transitoria, y por tanto difícil de detectar. El hecho de que aumente con Ataxina1[85Q], indica que es más fuerte o menos transitoria cuando la proteína está expandida.



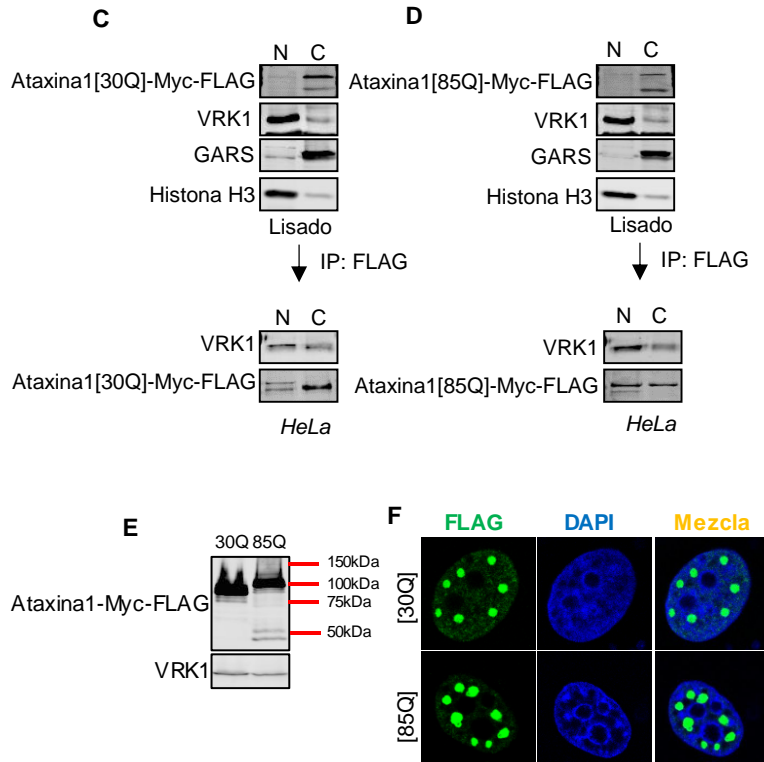


Figura 37: VRK1 y Ataxina1 interactúan en el núcleo, siendo mayor la interacción con Ataxina1[85Q]. **A.B:** Interacción entre Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG con VRK1 endógena en núcleo y citosol. Células *HeLa* fueron transfectadas con pCEFL-Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o pCEFL-Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se llevó a cabo un fraccionamiento núcleo/citosol, se inmunoprecipitó VRK1 endógena y se detectaron Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG en el precipitado. Como control de fraccionamiento nuclear, se utilizó la histona H3, y como control de fraccionamiento citosólico, GARS. **C.D:** Interacción entre Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG con VRK1 endógena, en núcleo y citosol. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se llevó a cabo un fraccionamiento núcleo/citosol, se realizó la inmunoprecipitación de Ataxina1-Myc-FLAG con el anticuerpo α -FLAG y se detectó VRK1 en el precipitado. Se utilizaron la histona H3 y GARS como control del fraccionamiento. **E:** Gran cantidad de Ataxina1 se encuentra en la fracción insoluble. El precipitado del fraccionamiento núcleo/citosol se cargó en un gel y se detectaron Ataxina1-Myc-FLAG y VRK1 con anticuerpos específicos. **F:** Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG forman inclusiones nucleares. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG y tras 48 h, se procesaron para su análisis por microscopía confocal. Se detectó Ataxina1-Myc-FLAG con un anticuerpo α -FLAG.

2. Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre Ataxina1

2.1. El silenciamiento de VRK1 reduce los niveles proteicos de Ataxina1

Para determinar la importancia de la interacción entre VRK1 y Ataxina1, evaluamos si la ausencia de VRK1 producía algún efecto sobre los niveles proteicos de Ataxina1. Para ello, silenciamos VRK1 en la línea celular *HeLa* y analizamos la presencia de Ataxina1 endógena en el lisado celular. La ausencia de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 endógena (Figura 38A). Hicimos el mismo experimento con Ataxina1[30Q] sobreexpresada en las líneas *HeLa* y *MCF-7*, observando el mismo resultado (Figura 38B y 38C). Sabiendo que la actividad catalítica y la estabilidad de VRK1 dependen de factores mitogénicos presentes en el suero, evaluamos si la bajada de Ataxina1 era consecuencia de una disminución de la actividad de VRK1 privando de suero a las células durante dos días. El resultado fue una disminución de Ataxina1[30Q] (Figura 38D). Por tanto, la bajada de los niveles de Ataxina1 debido al silenciamiento de VRK1 puede estar asociada a la falta de actividad quinasa de VRK1.

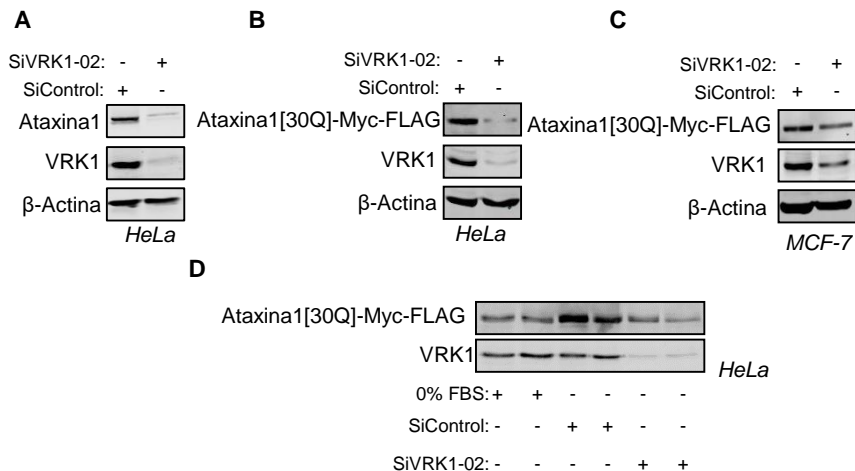
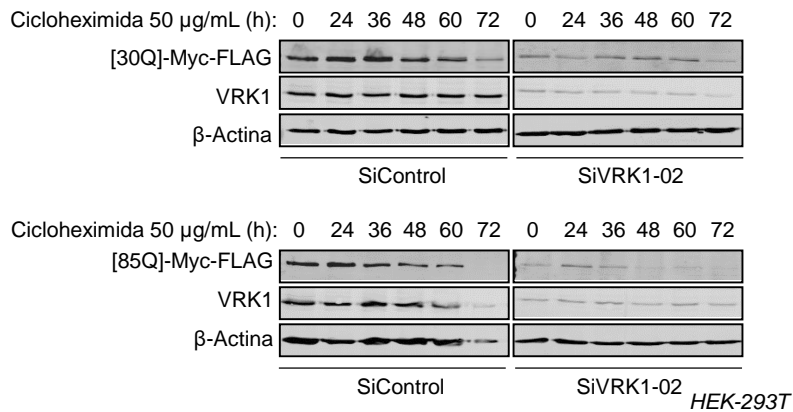


Figura 38: El silenciamiento de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 debido a la ausencia de su actividad quinasa. **A:** Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre Ataxina1 endógena. Células *HeLa* fueron transfectadas con ARN de interferencia SiVRK1-02 o con SiControl y tras 72 h de silenciamiento, las proteínas se detectaron con anticuerpos específicos. **B, C:** Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre Ataxina1[30Q] sobreexpresada. Células *HeLa* y *MCF-7* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG. Tras 24 h, se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl, y 72 h después, se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **D:** Efecto del silenciamiento de VRK1 y de la ausencia de suero sobre Ataxina1[30Q] sobreexpresada. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG. Tras 24 h, se silenciaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl, o se les privó de suero durante 48 h. VRK1 y Ataxina1 se detectaron en el extracto celular con anticuerpos específicos.

Resultados

Intentamos determinar la vida media de Ataxina1 en la célula en ausencia de VRK1. Para ello, transfectamos células *HEK-293T* con Ataxina1[30Q] o con Ataxina1[85Q], silenciamos VRK1 e inhibimos la síntesis *de novo* de proteínas con cicloheximida (Figura 39A). Se detectó la bajada de Ataxina1 tanto *wt* como expandida como consecuencia del silenciamiento de VRK1, pero no una bajada debido a la cicloheximida, puesto que ya no había Ataxina1 en la célula cuando llevamos a cabo el tratamiento. Abordamos el experimento silenciando primero las células y tras 24 horas, cuando aún el silenciamiento de VRK1 no es muy fuerte, transfectando Ataxina1[30Q] y Ataxina1[85Q], observando distintos tiempos post-transfección con el objetivo de detectar el comienzo de la expresión de Ataxina1, y el momento en el que empieza a disminuir como consecuencia del silenciamiento de VRK1 (Figura 39B). Vimos que al cabo de 12 horas tanto Ataxina1 *wt* como expandida empiezan a expresarse. En el caso de la Ataxina1 *wt*, la expresión se mantiene basal, no alcanza los niveles normales pero tampoco disminuye, y en el de la Ataxina1 expandida, comienza a expresarse a las 24 horas a un nivel basal, que se mantiene constante hasta las 48 horas y luego decae.

A



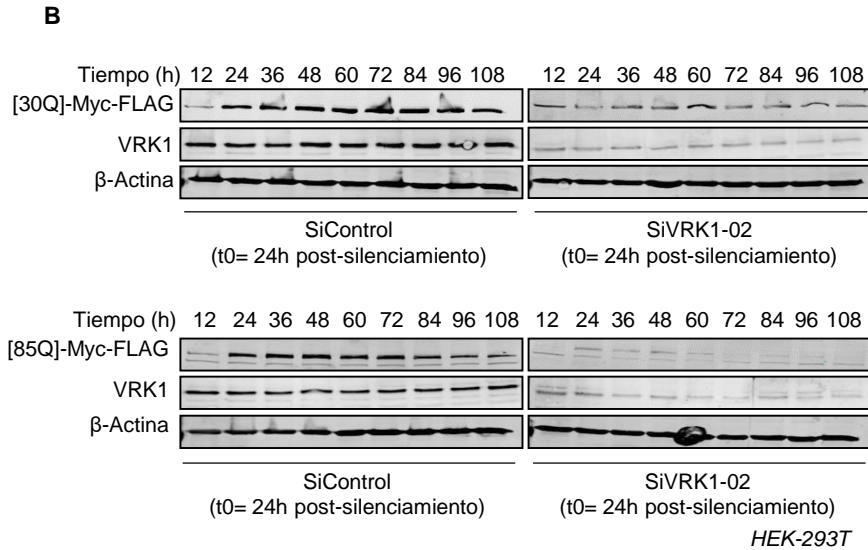


Figura 39: El silenciamiento de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 *wt* y *expandida*. **A:** No se puede observar el efecto de la cicloheximida sobre Ataxina1 transfectada en células sin VRK1. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG, y a las 24 h se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl. 48 h después, se trataron con cicloheximida 50 µg/mL y se analizó la expresión de proteínas cada 12 h con anticuerpos específicos. **B:** Ataxina1 *wt* y *expandida* transfectadas no alcanzan los niveles máximos de expresión en las células cuando VRK1 está silenciada. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con ARN de interferencia SiVRK1-02 o con SiControl, tras 24 h se transfectaron con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG, y se analizó la expresión de proteínas cada 12 h con anticuerpos específicos.

Para confirmar que el silenciamiento de VRK1 provoca la disminución de Ataxina1 a nivel proteico y no a nivel transcripcional, se llevó a cabo un ensayo de *qRT-PCR* y se analizaron los niveles de ARNm de VRK1 y de Ataxina1, transfectando las células *HeLa* con SiVRK1-03 o con SiControl (Figura 40). Observamos el descenso del ARNm de VRK1 como consecuencia del silenciamiento del mismo, pero no una bajada en los niveles de ARNm de Ataxina1, sino subida, posiblemente como consecuencia de la disminución de la proteína, para tratar de reestablecer los niveles.

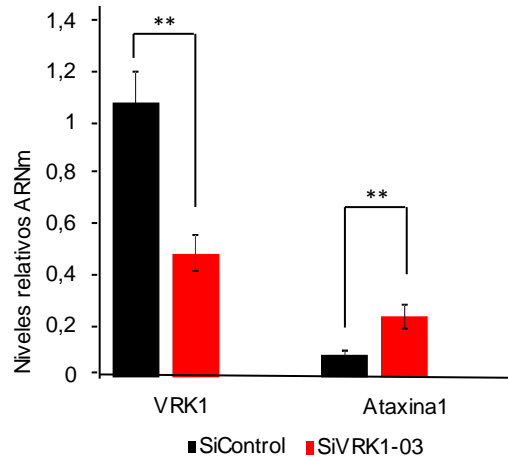


Figura 40: El silenciamiento de VRK1 provoca un aumento de expresión de Ataxina1. Células *HeLa* fueron transfectadas con ARN de interferencia, y tras 72 h, se extrajo el ARN total y se realizó una *qRT-PCR* utilizando oligonucleótidos para VRK1, Ataxina1 y GAPDH, especificados en la Tabla 1. Los valores se normalizaron con respecto a los obtenidos para GAPDH como control. La estadística se realizó con la prueba t-Student *= $p < 0,05$ **= $p < 0,005$ ***= $p < 0,0005$.

2.2. El silenciamiento de VRK1 no afecta a las inclusiones nucleares de Ataxina1

Como el silenciamiento de VRK1 causa una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1, quisimos comprobar si tenía algún efecto sobre las inclusiones nucleares que se forman. Para ello, llevamos a cabo un ensayo de HPLC en condiciones nativas. Con esta técnica, a partir del extracto nuclear podemos separar distintas fracciones donde se recogen todos los complejos multiproteicos de las células, desde un peso molecular alto (unos 700 kDa) a pesos moleculares muy bajos.

Se silenció VRK1 con SiARN específico en la línea celular *MCF-7*, y tras 72 horas las células se lisaron y se llevó a cabo la HPLC. Observamos la forma monomérica de Ataxina1, aproximadamente 100 kDa, que corresponde con las fracciones 19-23 de la HPLC, y complejos multiproteicos que oscilan entre 158 y 670 kDa donde se encuentra Ataxina1, que corresponden con las fracciones 5-15 (Figura 41). Al silenciar VRK1, Ataxina1 monomérica deja de detectarse, esperable según los resultados anteriores, y la Ataxina1 que observamos en los complejos de alto peso molecular también disminuye.

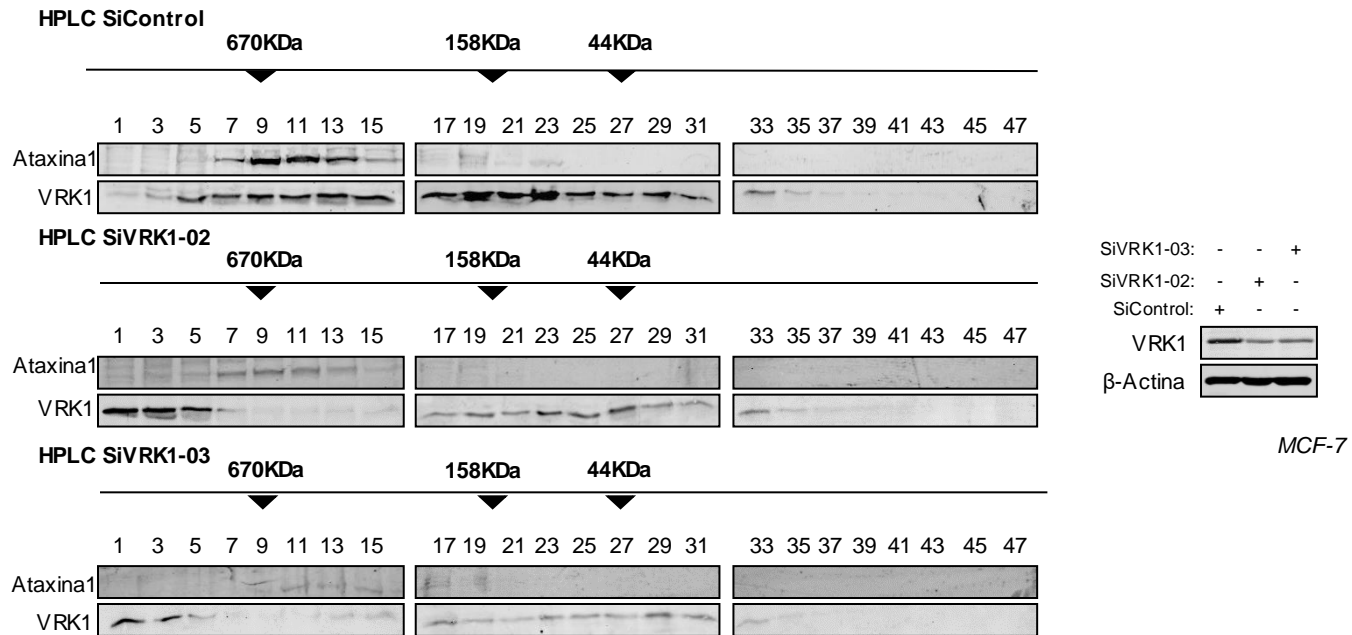


Figura 41: El silenciamiento de VRK1 produce una disminución de Ataxina1 en complejos de alto peso molecular. Células *MCF-7* se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02, SiVRK1-03 o SiControl. Tras 72 h, las células se lisaron y se prepararon 3 mg de extracto celular filtrado para fraccionarlo por HPLC. De las fracciones recogidas, se utilizaron las impares, a partir de las cuales se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético y se resuspendieron en un volumen menor para poderlas analizar mediante electroforesis y *Western blot*. Se complementa la figura con un *Western blot* donde se observa el silenciamiento de VRK1.

Resultados

Se analizó también por inmunofluorescencia el efecto del silenciamiento de VRK1 sobre las inclusiones formadas por los distintos mutantes. Vemos que el tamaño de las inclusiones nucleares depende de la longitud del poliQ, y que tanto el mutante [85Q][S776A] como el [2Q][ΔAXH] no forman agregados (Emamian, Kaytor *et al.* 2003), pero no vemos ningún efecto debido al silenciamiento de VRK1 (Figura 42).

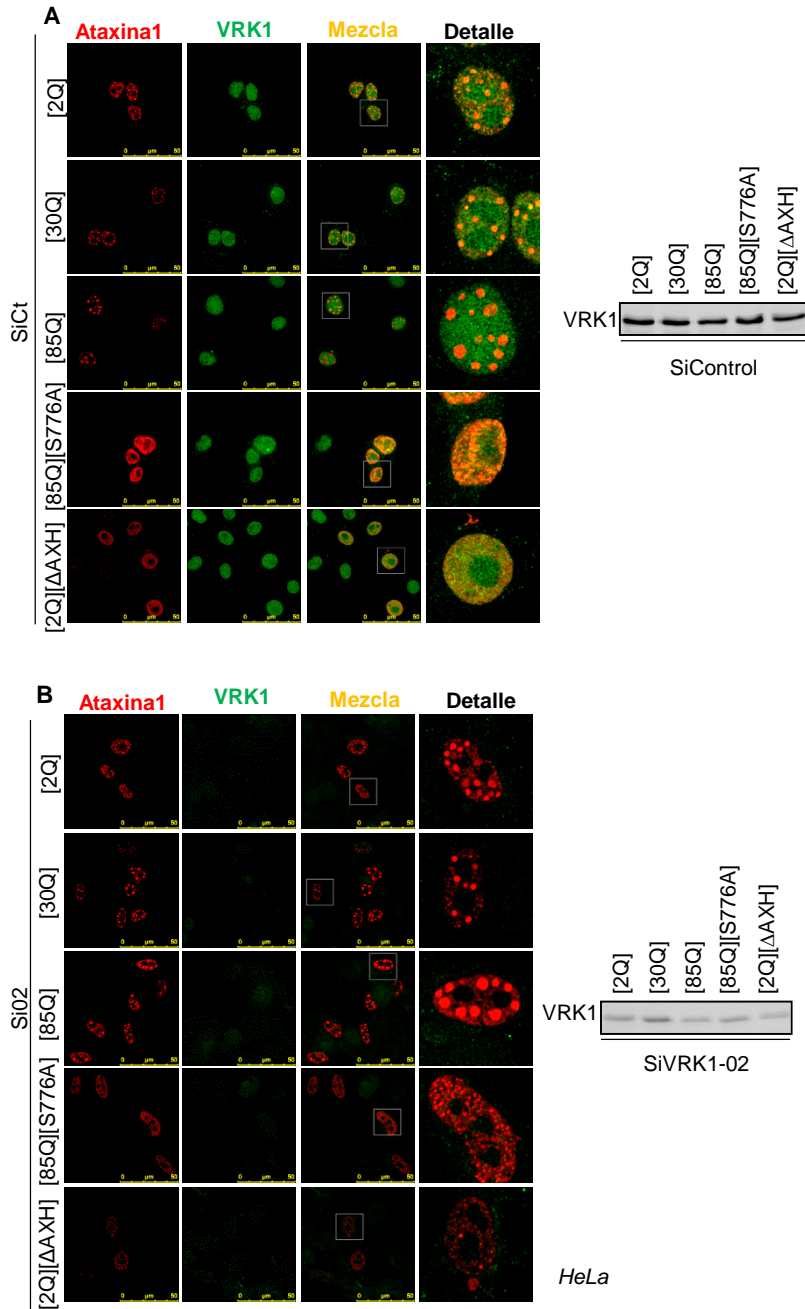


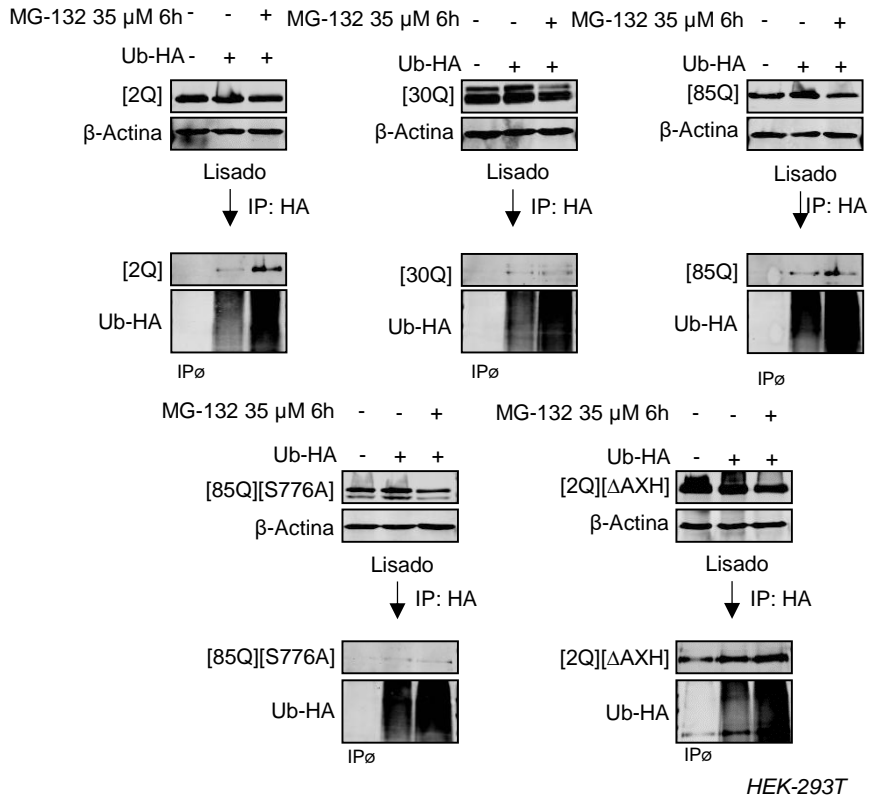
Figura 42: El silenciamiento de VRK1 no tiene efecto sobre las inclusiones nucleares de Ataxina1. Células *HeLa* se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl, y tras 24 h, se transfectaron con distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Después de 48 h, las células se procesaron y se marcaron para su análisis por microscopía confocal. El apartado A representa el panel de células con SiControl, y el B con SiVRK1-02. En ambos casos, se detecta el silenciamiento de VRK1 tanto por inmunofluorescencia como por *Western blot*.

2.3. La caída de los niveles de Ataxina1 como consecuencia del silenciamiento de VRK1 no se recupera inhibiendo el proteasoma 26s ni la degradación lisosomal

Como la ausencia de VRK1 provoca una bajada de los niveles proteicos de Ataxina1 y un aumento de los niveles de ARNm, pensamos que VRK1 podría estar ejerciendo un papel protector sobre Ataxina1 frente a la degradación. Primero, evaluamos si nuestras construcciones de Ataxina1 eran procesadas por el sistema UPS, que es el principal responsable de la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas (Bard, Goodall *et al.* 2018, Kohiyama & Lagalwar 2015). Para ello, se transfectaron células *HEK-293T* con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG y con Ub-HA para favorecer la ubiquitinación, y después se trataron o no durante 6 horas con el inhibidor del proteasoma MG-132 (Figura 43A). Tras la inmunoprecipitación de Ub-HA, observamos que todas las construcciones se ubiquitan. Parece que la que menos se ubiquitina es Ataxina1[85Q][S776A], y la que más Ataxina1[2Q][ΔAXH]. De esta última, se observa una banda en el punto de la IP \emptyset , lo que nos hace pensar que al ser una proteína sin dominios, tanto sin tracto de poliQ como sin dominio AXH, está muy desestructurada y se une de forma inespecífica a la resina utilizada para la inmunoprecipitación.

Para comprobar si Ataxina1 estaba siendo controlada por VRK1 para su degradación, tratamos de recuperar los niveles proteicos de Ataxina1 tras silenciar VRK1 con el inhibidor del proteasoma 26S. Primero, las células *HEK-293T* se transfectaron con Ataxina1[30Q] y con Ub-HA y posteriormente se silenció VRK1. A las 48 horas, las células se trataron o no con MG-132, y se inmunoprecipitó Ataxina1-Myc-FLAG o Ub-HA (Figura 43B). Al silenciar VRK1, Ataxina1 desaparece y por tanto no se observa ubiquitinación, y al tratar con MG-132 los niveles de Ataxina1 no se recuperan. Esto puede deberse a que Ataxina1 esté siendo degradada por otro sistema, o bien a que el tiempo de inhibición del proteasoma no sea suficiente para acumular Ataxina1 ubiquitinada. Intentamos ampliar el tiempo del tratamiento con MG-132, pero las células no sobrevivieron a la exposición al compuesto durante tiempos más prolongados.

A



B

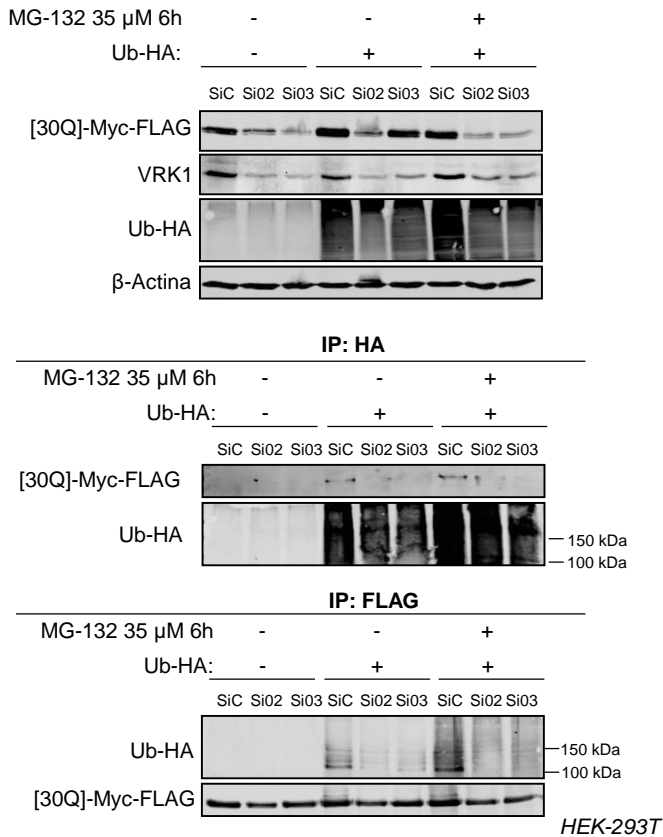


Figura 43: Las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG se ubiquitan. El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG-132 no recupera los niveles de Ataxina1 tras silenciar VRK1. **A:** Las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG se ubiquitan. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG y con ubiquitina-HA o no. A las 48 h de transfección, las células se trataron o no con el inhibidor del proteasoma MG-132 35 μ M durante 6 h. Posteriormente, se inmunoprecipitó Ataxina1-Myc-FLAG con el anticuerpo α -FLAG y se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos. **B:** MG-132 no recupera los niveles de Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG al silenciar VRK1. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y con Ubiquitina-HA o no, y tras 24 h con ARN de interferencia SiVRK1-02, SiVRK1-03 o SiControl. A las 48 h, se añadió el inhibidor del proteasoma MG-132 35 μ M durante 6 h. Se inmunoprecipitó Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG con α -FLAG o Ubiquitina-HA con α -HA y se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos.

Como no conseguimos recuperar los niveles de Ataxina1 inhibiendo el proteasoma, pensamos en la vía de degradación autofágica/lisosomal, otro sistema adicional que trata de degradar los fragmentos de poliQ (Weber, Sowa *et al.* 2014). Para estudiar esta vía utilizamos la cloroquina, un inhibidor que impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Figura 44). Aunque su mecanismo de acción es desconocido, se sabe que la

Resultados

cloroquina inhibe la formación del autolisosoma mediante cambios en el pH de los lisosomas (Mauthe, Orhon *et al.* 2018).

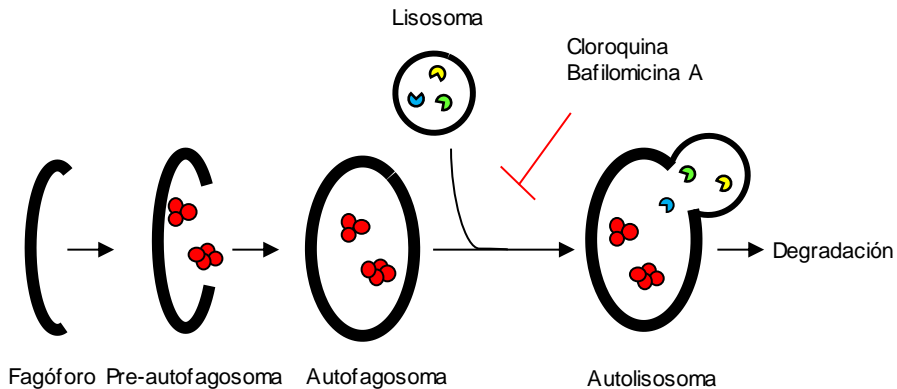


Figura 44: Mecanismo de acción de la cloroquina y la bafilomicina A en la formación de los autolisosomas. La membrana de aislamiento o fagóforo se va expandiendo, envolviendo los productos a eliminar (en este caso, se representan agregados de poliQ), hasta formar el autofagosoma. El autofagosoma posteriormente fusiona su membrana con un lisosoma o con un endosoma, formando un autofagolisosoma. Finalmente, las enzimas (hidrolasas) aportadas por el lisosoma degradan el contenido del autolisosoma. Imagen modificada de (Mauthe, Orhon *et al.* 2018).

Primero, comprobamos si el tratamiento con cloroquina promovía la acumulación en las células de Ataxina1, *wt* y *expandida*. Tratamos células *HEK-293T* transfectadas con Ataxina1[30Q] o con Ataxina1[85Q] con concentraciones crecientes de cloroquina durante 24 horas. Observamos que a medida que aumenta la concentración de cloroquina, aumenta la acumulación de ambas proteínas en las células (Figura 45A). Para determinar si Ataxina1 se estaba degradando a través de esta vía como consecuencia del silenciamiento de VRK1, transfectamos células *HEK-293T* con Ataxina1[30Q] o con Ataxina1[85Q], y tras 24 h silenciamos VRK1. Las células se trataron con concentraciones crecientes de cloroquina durante 24 h y se analizó la cantidad de Ataxina1 en el extracto celular (Figura 45B). Al silenciar VRK1, los niveles de Ataxina1 *wt* y *expandida* disminuyen, pero no conseguimos observar una recuperación al tratar con cloroquina. Por tanto, no podemos asegurar que el silenciamiento de VRK1 promueva la degradación de Ataxina1 vía UPS o vía autofágica/lisosomal.

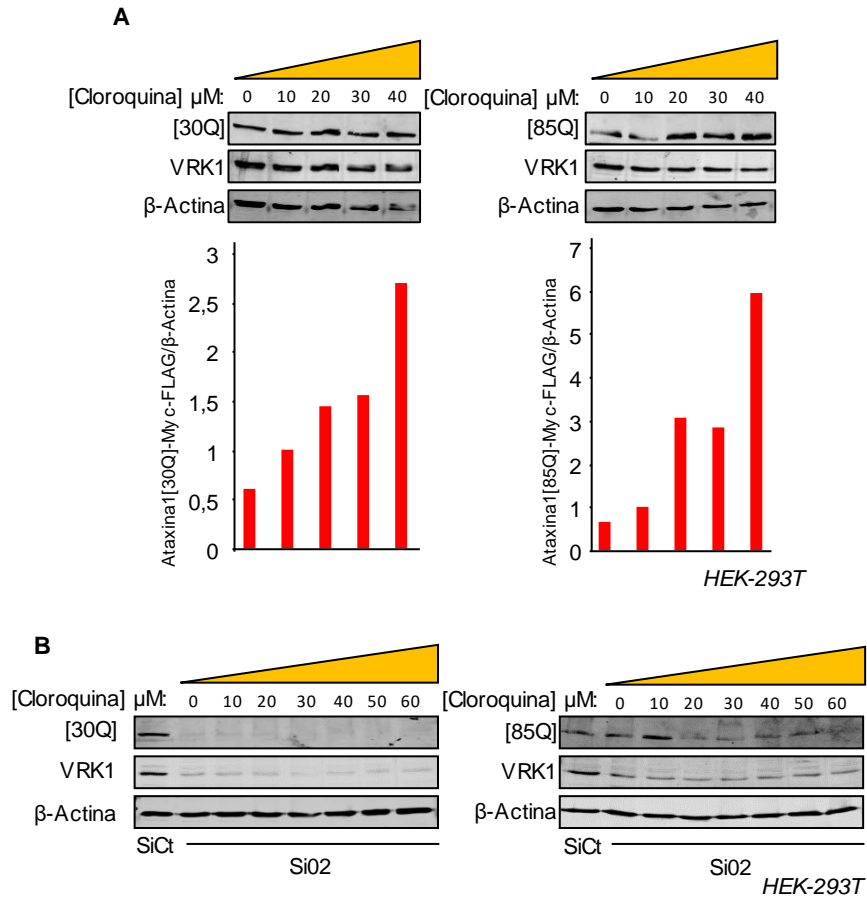


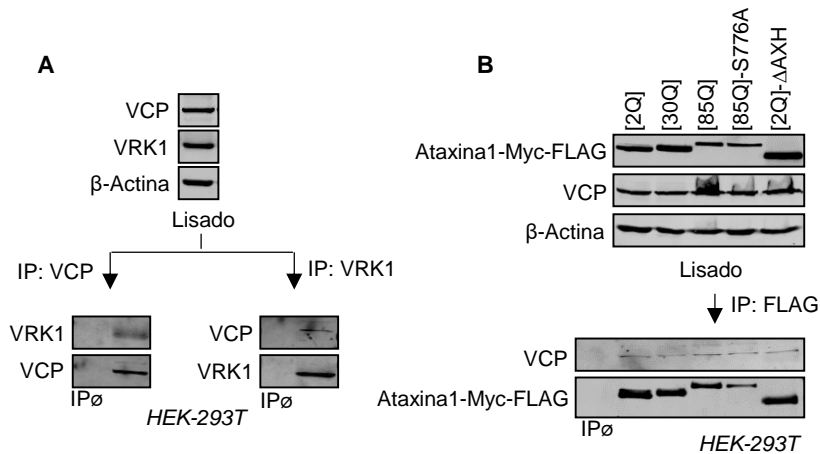
Figura 45: El tratamiento con el inhibidor de la vía autofágica/lisosomal cloroquina acumula Ataxina1 en las células, pero no recupera sus niveles tras silenciar VRK1. **A:** Ataxina1-Myc-FLAG *wt* y *expandida* se acumulan tras el tratamiento con cloroquina. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. A las 48 h, las células se trataron con 0, 10, 20, 30 o 40 μ M cloroquina durante 24 h. Se analizaron las proteínas en el extracto celular utilizando anticuerpos específicos. **B:** La cloroquina no recupera los niveles de Ataxina1 tras silenciar VRK1. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. Tras 24 h, se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl. A las 48 h, las células se trataron con 0, 10, 20, 30 o 40 μ M de cloroquina durante 24 h. Se analizaron las proteínas con anticuerpos específicos a partir del extracto celular.

2.4. VCP interacciona con Ataxina1 y colocaliza con los agregados de poliQ en el núcleo, colocalización que se pierde al silenciar VRK1

Como último intento de abordar la degradación de Ataxina1, introdujimos una nueva proteína en el estudio, VCP, que colocaliza con los agregados de poliQ. En estudios previos en el laboratorio (datos sin publicar), vimos que VCP y VRK1 interactúan y que VCP es fosforilada por VRK1, por lo que decidimos estudiar la implicación de VCP en la degradación de Ataxina1. Primero, comprobamos de nuevo la interacción entre

Resultados

VCP y VRK1 (Figura 46A). Posteriormente, evaluamos la interacción entre VCP y las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG con distinta longitud del tracto de poliQ. Se transfectaron células *HEK-293T* con las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG y se observó la interacción con VCP endógena. Todas las construcciones interaccionan levemente con VCP (Figura 46B). Para obtener datos más concretos, hicimos un fraccionamiento núcleo/citosol de células *HeLa* transfectadas con las construcciones de Ataxina1 (Figura 46C). Observamos que con Ataxina1[2Q] y Ataxina1[30Q] la interacción es prácticamente nula, sin embargo con Ataxina1[85Q], Ataxina1[85Q][S776A] y con Ataxina1[2Q][ΔAXH] es mayor. Este resultado es consistente con la bibliografía, a mayor número de glutaminas mayor es la interacción. Con la construcción sin poliQ y sin dominio AXH también se ve una fuerte interacción, posiblemente debido a que es una proteína totalmente desestructurada que tiende a degradarse.



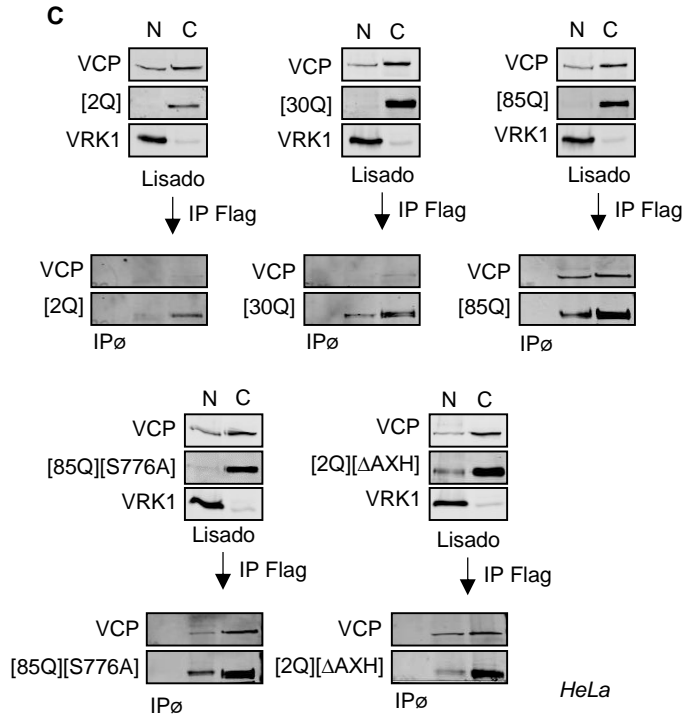


Figura 46: VCP y VRK1 interaccionan, Ataxina1 y VCP interaccionan, siendo la interacción mayor con Ataxina1 expandida. **A:** VCP y VRK1 interaccionan. Células *HEK-293T* se lisaron y se inmunoprecipitaron VCP y VRK1 con anticuerpos específicos. Se analizó la presencia de las proteínas en el inmunoprecipitado y en el lisado con anticuerpos específicos. **B:** Ataxina1-Myc-FLAG y VCP interaccionan. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[2Q]-Myc-FLAG, Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG, Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG, Ataxina1[85Q][S776A]-Myc-FLAG o Ataxina1[2Q][ΔAXH]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se inmunoprecipitaron las construcciones de Ataxina1 con α-FLAG, y se analizó la presencia de las proteínas en el inmunoprecipitado y en el lisado con anticuerpos específicos. **C:** La interacción entre VCP y Ataxina1 es mayor con Ataxina1 expandida. Células *HeLa* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Tras 48 h, se llevó a cabo el fraccionamiento núcleo/citosol, y se inmunoprecipitaron las construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG en núcleo y citosol con α-FLAG. Se utilizaron anticuerpos específicos para observar las proteínas en el lisado y en el inmunoprecipitado.

Determinamos si VCP colocalizaba con las inclusiones nucleares formadas a partir de las distintas construcciones de Ataxina1. VCP colocaliza con los agregados de poliQ formados por Ataxina1[85Q] y no lo hace con ninguna otra construcción, aunque formen agregados (Figura 47A). Para analizar si esta colocalización se debe a que VCP intenta promover la disociación de los agregados de poliQ para su degradación, tratamos las células *HeLa* transfectadas con el inhibidor del proteasoma MG-132. Vemos que en todas las construcciones, las inclusiones de poliQ que se forman en el núcleo son mucho mayores, además las construcciones con 2Q y 30Q, que antes formaban discretas inclusiones, ahora presentan grandes agregados que colocalizan con VCP

Resultados

(Figura 47B). Incluso la construcción 85Q con la serina 776 mutada a alanina, que no forma agregados, agrega y colocaliza con VCP debido a la inhibición del proteasoma. Por tanto, VCP tiene un claro papel en la degradación de las inclusiones nucleares de poliglutamina vía proteasoma.

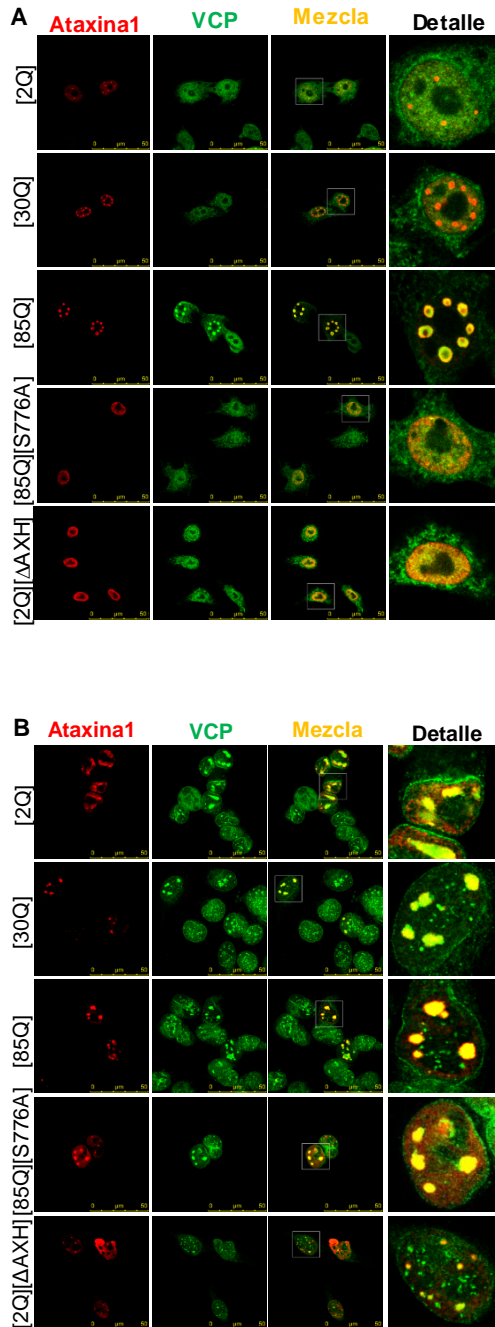
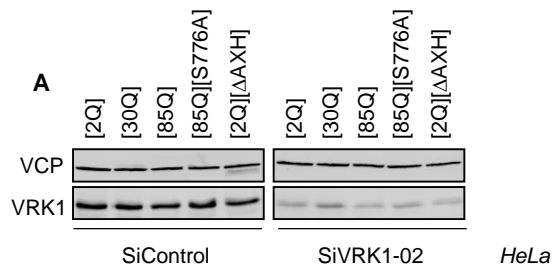


Figura 47: VCP colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida, y tras el tratamiento con MG-132, colocaliza con todas las construcciones de Ataxina1. **A:** VCP colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1[85Q]. Células *HeLa* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Tras 48 h, las células se procesaron y se marcaron para su análisis por microscopía confocal. Se detectaron las proteínas con anticuerpos específicos. **B:** VCP colocaliza con todas las construcciones de Ataxina1 tras la inhibición del proteasoma con MG-132. Células *HeLa* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Tras 48 h, se trataron durante 6 h con MG-132 35 μ M, y después se procesaron y marcaron para su análisis por microscopía confocal, detectándose las proteínas con anticuerpos específicos.

Para determinar si VRK1 tiene algún papel sobre los agregados a través de VCP, contribuyendo así a la degradación de las inclusiones nucleares, transfectamos células *HeLa* con las distintas construcciones de poliQ, y silenciamos VRK1. Observamos que al silenciar VRK1, la colocalización de VCP con los agregados de 85Q desaparece, aun formándose las inclusiones nucleares (Figura 48). Por lo que, aparte de regular los niveles proteicos de Ataxina1, VRK1 interviene en la degradación de los agregados de poliglutamina mediada por VCP. Se necesitan más estudios para determinar si VRK1 contribuye en este proceso a través de la fosforilación de VCP, o si lo hace por otro mecanismo diferente.



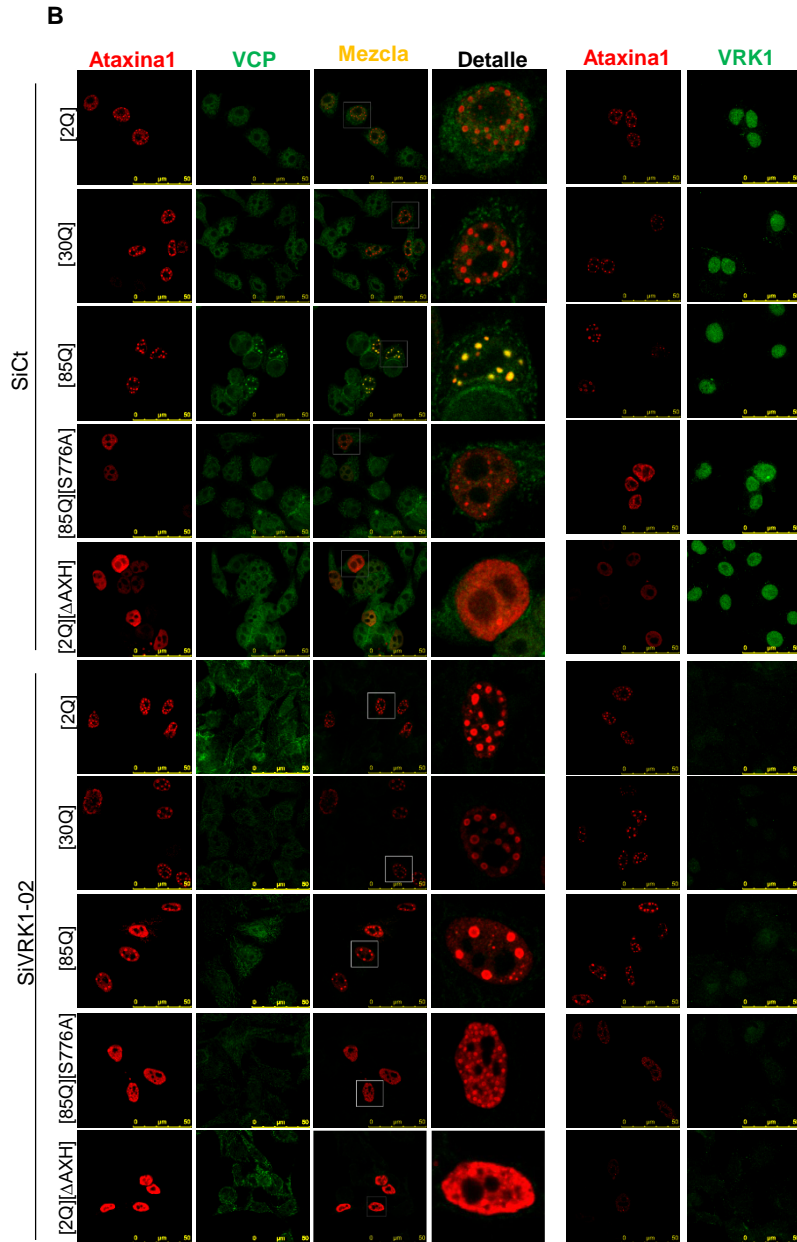
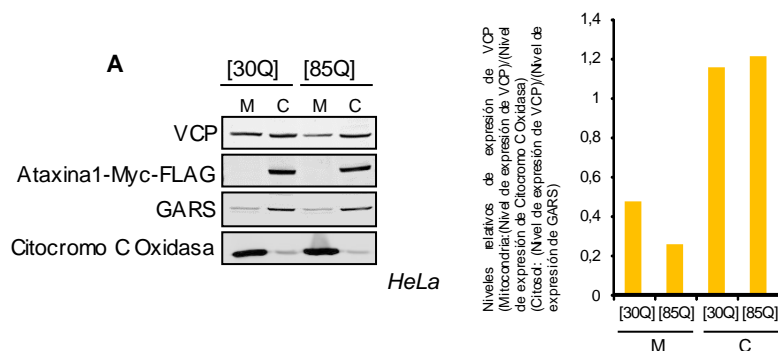


Figura 48: VCP colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida de forma dependiente de VRK1. Células *HeLa* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. Tras 24 h, se transfectaron con ARN de interferencia SiVRK1-02 o SiControl, y 48 h después, las células se procesaron y se marcaron para su análisis por microscopía confocal. En el apartado A podemos ver el *Western blot* donde se detecta el silenciamiento de VRK1, y en el B la inmunofluorescencia, junto con un panel a la derecha donde se ve el silenciamiento de VRK1 mediante inmunofluorescencia.

2.5. La cantidad de VCP mitocondrial disminuye en las células que presentan Ataxina1 expandida

Debido a que la ATPasa VCP es un miembro de la maquinaria de control de calidad de las mitocondrias, a que las mitocondrias se encuentran en el punto de mira de las enfermedades neurodegenerativas y a que VCP se acumula en los agregados de poliglutamina, decidimos estudiar si la colocalización de VCP con las inclusiones nucleares de poliQ expandida impide que la ATPasa pueda realizar su función. Para ello, evaluamos el efecto de Ataxina1 expandida sobre la cantidad de proteína VCP presente en las mitocondrias. Se transfectaron células *HeLa* con Ataxina1[30Q] o con Ataxina1[85Q] y se llevó a cabo un fraccionamiento de orgánulos. Estudiando la cantidad de VCP en el citosol y en las mitocondrias en células *HeLa* con [30Q] y con [85Q], observamos que VCP disminuye en las mitocondrias de las células con Ataxina1 expandida (Figura 49A). Como la bajada de VCP en las mitocondrias podría suponer una pérdida parcial de la correcta función mitocondrial, intentamos estudiar el estado de las mitocondrias por técnicas de inmunofluorescencia utilizando *Mitotracker™ Red FM*, que se une a las mitocondrias de células en cultivo emitiendo una fluorescencia roja dependiente del potencial de membrana. Transfectamos células *HeLa* con Ataxina1[30Q] o con Ataxina1[85Q] y las marcamos con *Mitotracker™ Red FM* (Figura 49B). Frente a las células con [30Q], que presentan unas mitocondrias visiblemente sanas y normales, las células con [85Q] tienen un marcaje mitocondrial más débil, indicando que éstas carecen de un correcto potencial de membrana. Por tanto, la agregación de VCP con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida disminuye la cantidad de VCP en las mitocondrias, causando una bajada del potencial de membrana de las mismas.



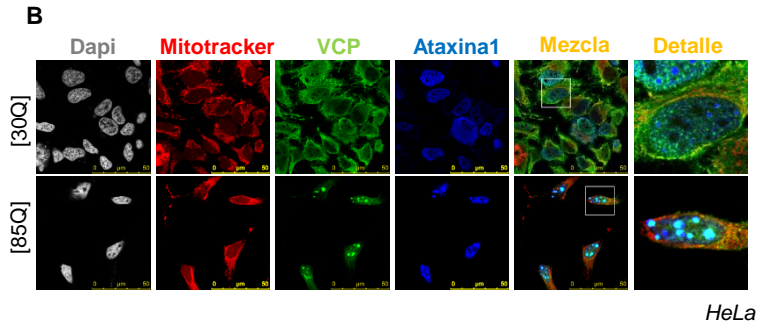


Figura 49: La cantidad de VCP mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial disminuyen debido a la presencia de Ataxina1 expandida. **A:** VCP mitocondrial disminuye como consecuencia de Ataxina1 expandida. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, se llevó a cabo el aislamiento de las mitocondrias viables, que se lisaron y se procesaron para el estudio de las proteínas con anticuerpos específicos. Como control de fraccionamiento se utilizaron GARS como marcador citosólico y Citocromo C Oxidasa como marcador mitocondrial. La cantidad de VCP se cuantificó relativizando sus niveles frente a GARS en el citosol y frente a Citocromo C Oxidasa en las mitocondrias. **B:** El potencial de membrana de las células con Ataxina1 expandida disminuye frente a Ataxina1 *wt*. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. Tras 48 h, las células se trataron con *Mitotracker™ Red FM* y se marcaron y procesaron para su estudio por microscopía confocal.

3. VRK1 fosforila a Ataxina1

3.1. VRK1 fosforila a Ataxina1 *wt* pero no a Ataxina1 expandida

A partir de los resultados anteriores, decidimos estudiar si Ataxina1 era sustrato de fosforilación de VRK1. Primero, comprobamos la capacidad de VRK1 de fosforilar las construcciones de Ataxina1 que presentan diferente longitud del tracto de poliQ. Mediante un ensayo quinasa utilizando ATP radiomarcado y la quinasa GST-VRK1 purificada en bacterias, vimos que VRK1 fosforila *in vitro* a Ataxina1 *wt* pero no a Ataxina1 expandida ni al resto de construcciones con distinta longitud del tracto de poliQ (Figura 50A). Se observa una ligera banda de fosforilación en la construcción [85Q][S776A], pero no se pueden sacar conclusiones puesto que la proteína presenta una banda control muy baja. Sería interesante estudiar a fondo la posibilidad de que VRK1 sea capaz de fosforilar a Ataxina1 expandida cuando el residuo Ser776 no se puede fosforilar. Quisimos centrarnos en Ataxina1 *wt* frente a la expandida, y repetimos el experimento con estas dos construcciones, aumentando los controles para observar de forma clara diferencias en fosforilación. De nuevo, vimos que VRK1 es capaz de fosforilar a Ataxina1 *wt* y no a la expandida (Figura 50B). Por tanto, Ataxina1 es sustrato de fosforilación de VRK1, pero cuando sufre la expansión de su tracto de poliQ deja de ser fosforilada por esta quinasa.

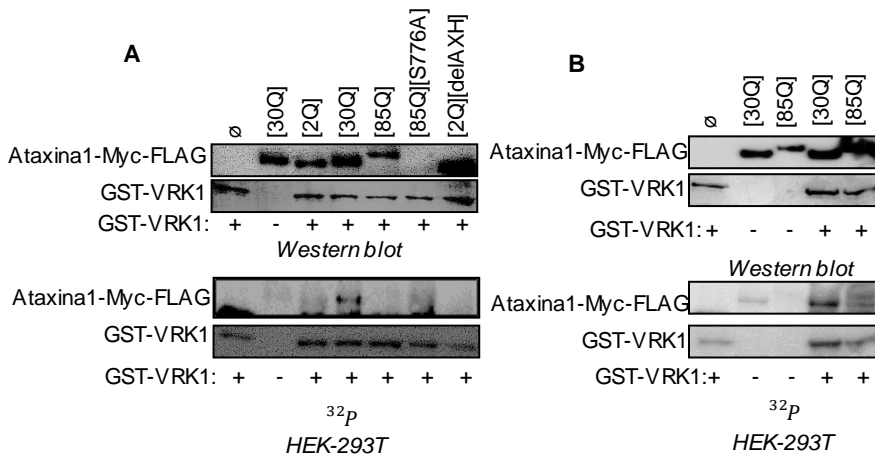


Figura 50: VRK1 fosforila a Ataxina1 wt frente a la expandida. **A:** VRK1 fosforila solo a la Ataxina1 que presenta 30 glutaminas en su tracto de poliQ. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG. A las 48 h, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Ataxina1 utilizando el anticuerpo α -FLAG. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a un ensayo quinasa *in vitro* utilizando ATP radiomarcado y la quinasa humana VRK1 producida en bacterias, GST-VRK1. La radiactividad se detectó en películas radiográficas, y las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos específicos. Como control, se utilizó Ataxina1[30Q] inmunoprecipitada sin quinasa GST-VRK1. **B:** VRK1 fosforila a Ataxina1 wt frente a la expandida. Células *HEK-293T* se transfectaron con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG. A las 48 h, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Ataxina1 con α -FLAG. Se llevó a cabo un ensayo quinasa *in vitro* de la misma manera que en el apartado A. Como control, se utilizaron tanto la Ataxina1[30Q] como la Ataxina1[85Q] sin GST-VRK1.

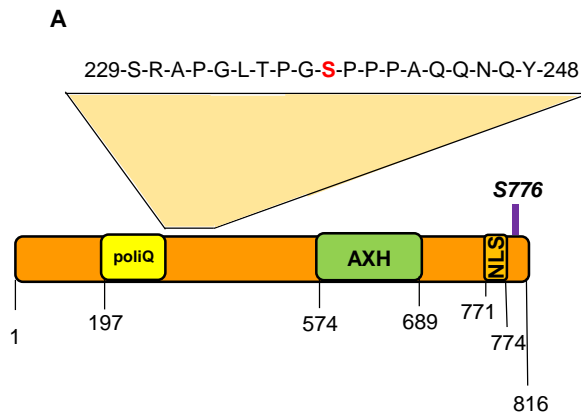
3.2. VRK1 interacciona más con el mutante no fosforilable S239A y menos con el fosfomimético S239D respecto a Ataxina1 wild type

Mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOFF se encontró un residuo de Ataxina1 candidato a ser fosforilado por un miembro de la familia de las caseín quinazas tipo I, la serina 239 (Vierra-Green, Orr *et al.* 2005) (Figura 51A). A partir de los resultados anteriores, pensamos que este residuo podría ser la diana de fosforilación de VRK1. Normalmente, la interacción de las quinazas con sus sustratos es rápida y transitoria. En estudios previos en nuestro laboratorio, se vio que utilizando un mutante de VRK1 sin actividad quinasa, K179E, la interacción con los sustratos era más fuerte, puesto que al no poder fosforilarlos permanecía unida a ellos. Por eso, decidimos llevar a cabo mutagénesis sitio-dirigida para disponer de Ataxina1[30Q] y Ataxina1[85Q] con el residuo S239 no fosforilable (mutado a alanina) y fosfomimético (mutado a aspártico) y combinar este residuo en construcciones de Ataxina1[30Q] y Ataxina1[85Q] con el residuo S776 fosfomimético y no fosforilable, para tratar de obtener información sobre el efecto de la combinación entre estos dos residuos de fosforilación. Primero, estudiamos la interacción entre VRK1 y los mutantes de Ataxina1[30Q] no fosforilables

Resultados

y fosfomiméticos para Ser239 y Ser776. Transfectamos *HEK-293T* con las distintas construcciones de Ataxina1-Myc-FLAG y con VRK1-HA, y vimos que la interacción entre VRK1 y Ataxina1[30Q] disminuye con Ataxina1[30Q][S239D] y aumenta con Ataxina1[30Q][S239A] (Figura 51B), lo que indica que el residuo Ser239 puede ser la diana de fosforilación de VRK1. Con los mutantes en el residuo Ser776, llama la atención que VRK1 interacciona fuertemente con Ataxina1[30Q][S776E], este resultado será discutido posteriormente.

Como VRK1 no fosforila a Ataxina1 expandida, esperábamos que el aumento de interacción con [30Q][S239A] no tuviera lugar con [85Q][S239A]. Vimos que Ataxina1[85Q][S239A] no aumenta su interacción con VRK1 frente al aumento que ocurre con Ataxina1[30Q][S239A], lo que apoya la hipótesis de que el residuo 239 de Ataxina1 sea la diana de fosforilación de VRK1 (Figura 51C).



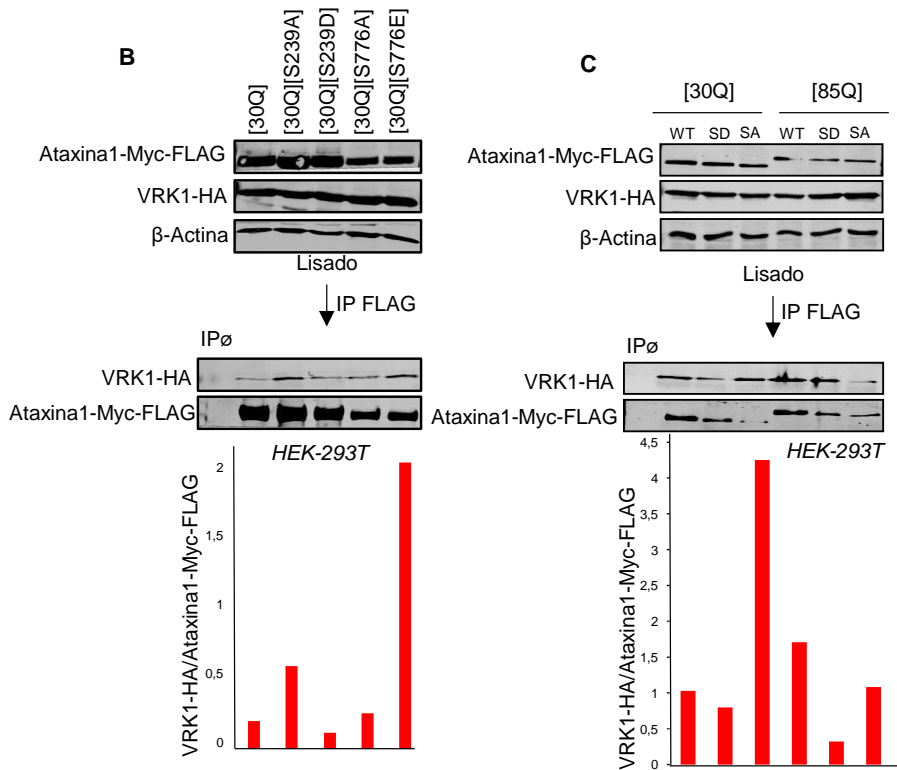


Figura 51: VRK1 interacciona más con la Ataxina1 que no puede ser fosforilada en el residuo 239. **A:** Representación de la serina candidata a ser fosforilada por un miembro de la familia CK1. **B:** VRK1 interacciona más con Ataxina1 no fosforilable en el residuo Ser239. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con las distintas construcciones de Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG mutadas a no fosforilables o fosfomiméticas en los residuos S239 y S776, y con VRK1-HA. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1 con α-FLAG y se analizó la presencia de las proteínas con anticuerpos específicos. **C:** VRK1 no interacciona más con Ataxina1 expandida no fosforilable en Ser239. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina[85Q]-Myc-FLAG y con sus respectivos mutantes en Ser239, no fosforilable y fosfomimético, y con VRK1-HA. Tras 48 h, se inmunoprecipitó Ataxina1 con α-FLAG y se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos.

Evaluamos también la interacción entre VRK1 y los dobles mutantes para Ser239 y Ser776 de Ataxina1 (Figura 52). Vimos que el efecto dominante para la interacción con VRK1 recae sobre el residuo Ser239, ya que cuando éste no puede ser fosforilado, independientemente del estado de la Ser776, la interacción con VRK1 aumenta. Esto podría indicar que VRK1 regula la fosforilación de Ser776 a través de Ser239.

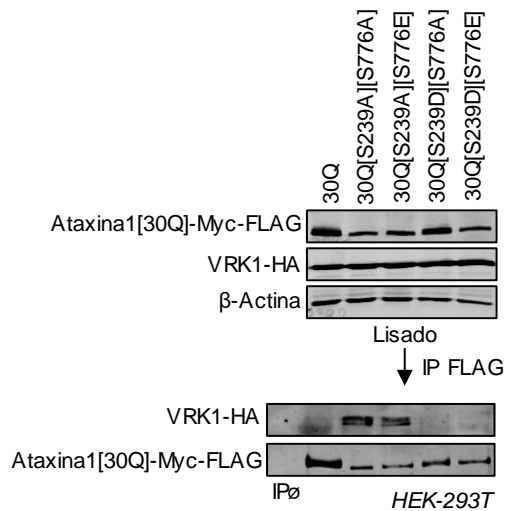


Figura 52: VRK1 interacciona más con Ataxina1 cuando no puede ser fosforilada en la Ser239, independientemente del estado de fosforilación de la Ser776. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con los dobles mutantes en fosforilación de Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG o con Ataxina1[30Q] y con VRK1-HA. A las 48 h de la transfección, se precipitó Ataxina1 con α -FLAG y se detectaron las proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpos específicos.

3.3. Ataxina1 *wild type* y *expandida* son menos estables cuando pierden la fosforilación en la Ser239

Sabiendo que VRK1 regula la estabilidad de Ataxina1, esperábamos que si la diana de VRK1 fuera la Ser239, mutantes de Ataxina1 no fosforilables en este residuo debían ser más inestables respecto a la *wt*. Realizamos experimentos de estabilidad utilizando cicloheximida en la línea celular *HEK-293T*, transfectando con Ataxina1[30Q], Ataxina1[85Q] y los distintos mutantes en fosforilación de la Ser239. Ataxina1[30Q] es estable al menos durante 24 h, cuando se encuentra constitutivamente fosforilada en la Ser239 sigue manteniendo su estabilidad, y cuando no puede ser fosforilada disminuye drásticamente su vida media en las células (Figura 53A y 53C). En el caso de Ataxina1 *expandida*, observamos que es bastante inestable. Cuando está constitutivamente fosforilada en la Ser239 no cambia su estabilidad, y cuando no puede fosforilarse, la estabilidad decae aún más rápidamente (Figura 53B y 53D). Comparando las distintas construcciones entre sí, observamos que Ataxina1[30Q] es mucho más estable que Ataxina1[85Q], y que ambas disminuyen su vida media al no poderse fosforilar en la Ser239 (Figura 53E). Para comparar nuestros resultados con lo que ya se conocía sobre la estabilidad de Ataxina1 respecto a la Ser776, comprobamos también la estabilidad de estos mutantes en la construcción Ataxina1[30Q]. Vemos que Ataxina1

no fosforilable en la Ser776 es inestable frente a la *wt*, mientras que la fosfomimética no presenta cambios (Figura 53F). Este resultado indica que el residuo Ser239, candidato a ser fosforilado por VRK1, es fundamental para la regulación de la estabilidad de Ataxina1, al igual que la Ser776.

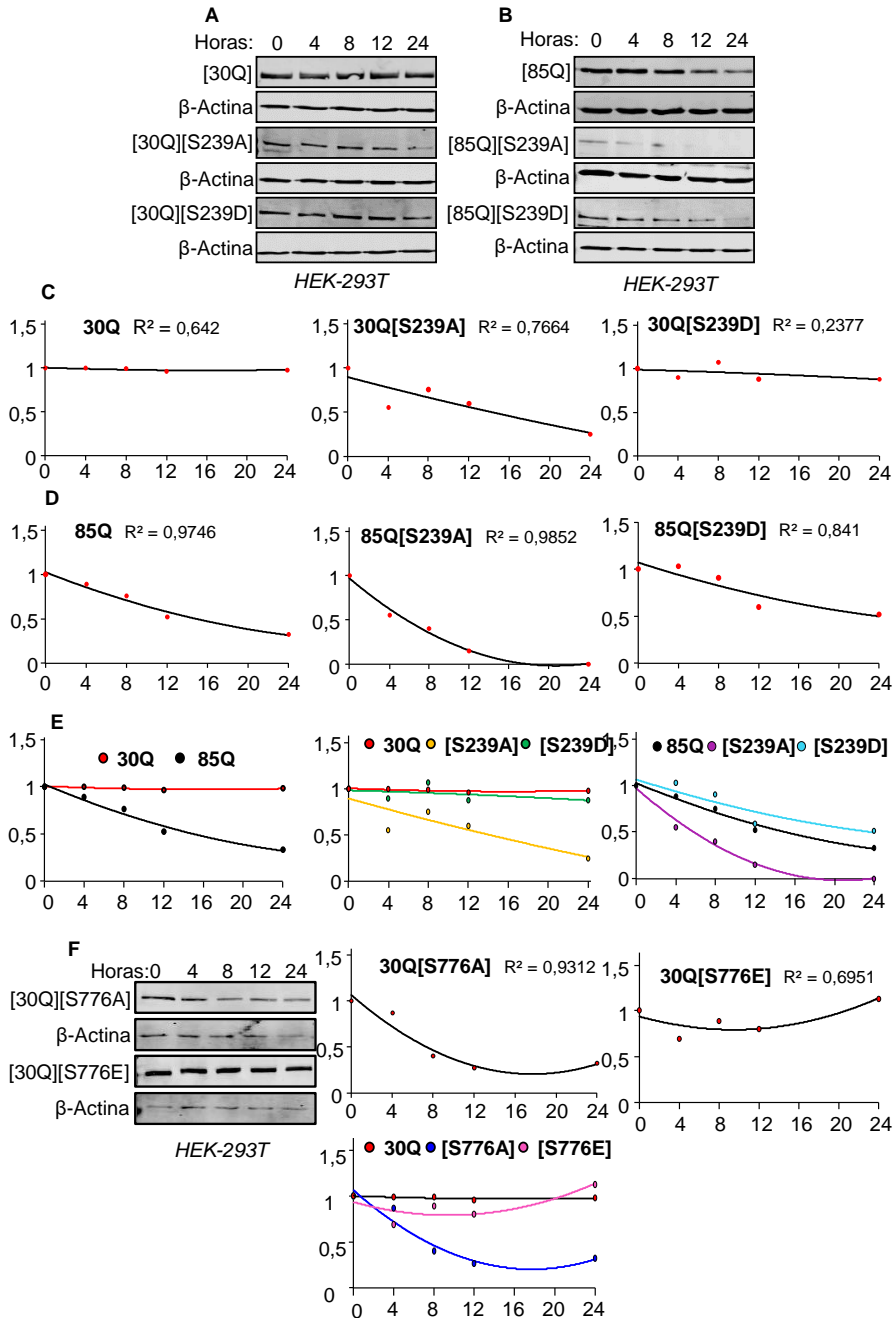


Figura 53: Ataxina1 *wild type* y expandida son más inestables si no pueden ser fosforiladas en la Ser239, al igual que en la Ser776. **A.B:** Ataxina1 *wt* y expandida son más inestables cuando la Ser239 se encuentra mutada a alanina. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG, Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG y los mutantes en la Ser239 (S239A y S239D). A las 48 h, se trataron con cicloheximida a 50 µg/mL y se analizó la expresión de las proteínas a las 0, 4, 8, 12 y 24 h del tratamiento, con anticuerpos específicos. **C.D.E:** Cuantificación de la estabilidad de las distintas construcciones de Ataxina1. Las cuantificaciones se llevaron a cabo relativizando los niveles de Ataxina1 frente a β-Actina. La línea de tendencia sigue una regresión polinómica, se presenta el valor de R² que indica la bondad del ajuste de la curva, siendo R²=0 un mal ajuste y R²=1 un buen ajuste. En el caso de que la estabilidad no cambie, como en la Ataxina1[30Q], al no formarse una curva la R² se aproxima a 0. **F:** Ataxina1[30Q] es inestable cuando la Ser776 no puede ser fosforilada. Células *HEK-293T* se transfectaron con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG no fosforilable o fosfomimética para el residuo Ser776. A las 48 h, las células se trataron con cicloheximida 50 µg/mL y se analizó la expresión de proteínas a las 0, 4, 8, 12 y 24 h del tratamiento, con anticuerpos específicos. Se representa la cuantificación de la estabilidad de la misma forma que en los apartados C, D y E.

3.4. VCP interacciona con los mutantes en fosforilación de Ataxina1 *wild type* y expandida pero no colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida fosfomimética ni no fosforilable

Lo siguiente a analizar fue la relación entre estos mutantes de Ataxina1 y VCP. Se transfectaron células *HEK-293T* con las distintas construcciones de Ataxina1[30Q] y Ataxina1[85Q], fosfomiméticas y no fosforilables para el residuo 239, junto con VCP-GST. En este caso, decidimos sobreexpresar VCP-GST para tratar de mejorar la débil interacción que habíamos visto anteriormente (Figura 54). Observamos un ligero aumento en la interacción de VCP-GST con Ataxina1[85Q] frente a Ataxina1[30Q], resultado que concuerda con el obtenido previamente, y una interacción notablemente mayor entre Ataxina1[30Q][S239A] y VCP-GST con respecto a la Ataxina1[30Q]. Como hemos visto, este mutante no fosforilable es más inestable, lo que concuerda con una mayor interacción con VCP.

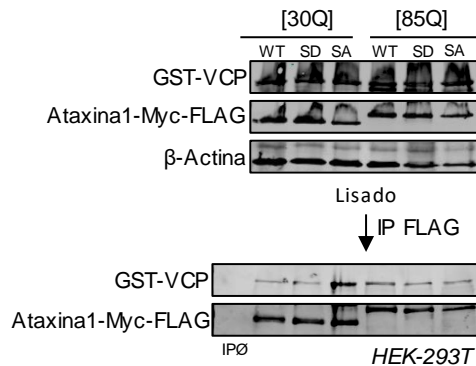


Figura 54. VCP interacciona más con Ataxina1[30Q] no fosforilable en el residuo Ser239. Células *HEK-293T* fueron transfectadas con las construcciones Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y los mutantes S239A y S239D, o con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG y los mutantes S239A y S239D, junto con VCP-

GST. Tras 48 h, las células se lisaron y se inmunoprecipitó Ataxina1 con α -FLAG. Se detectaron las proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpos específicos.

Evaluamos si los nuevos mutantes de fosforilación en Ser239 forman o no estos agregados y si colocalizan con VCP. En el caso de Ataxina1[30Q], los nuevos mutantes en Ser239 forman inclusiones nucleares que no colocalizan con VCP. Los mutantes en Ser776 no forman inclusiones nucleares, ni el no fosforilable ni el fosfomimético (Figura 55A). Para Ataxina1[85Q], cuando la Ser239 no se puede fosforilar, desaparecen las inclusiones nucleares, y por tanto también la colocalización, y cuando es fosfomimética, se forman inclusiones más pequeñas que las que se suelen formar con Ataxina1 expandida, pero no colocalizan con VCP (Figura 55B).

Este resultado es muy interesante, recordamos que el silenciamiento de VRK1 no disminuye los agregados de Ataxina1 expandida, pero impide su colocalización con VCP. Si VRK1 realmente fosforila a Ataxina1 en el residuo 239, cuando la quinasa está silenciada no se pueden formar las inclusiones, esto podría deberse a que desaparece la protección de Ataxina1 frente a la degradación. En cambio, cuando el residuo Ser239 se encuentra constitutivamente fosforilado, se forman agregados pero no son tan grandes como los que se forman normalmente con Ataxina1[85Q], sino que se parecen más a los que se forman con Ataxina1[30Q] como consecuencia de su sobreexpresión. Vimos que VRK1 no es capaz de fosforilar a Ataxina1 expandida, pero según estas observaciones, si esa Ser239 pudiera ser fosforilada, VCP no se quedaría atrapado en las inclusiones nucleares y disminuiría la neurotoxicidad de las células. Estos resultados serán discutidos más adelante.

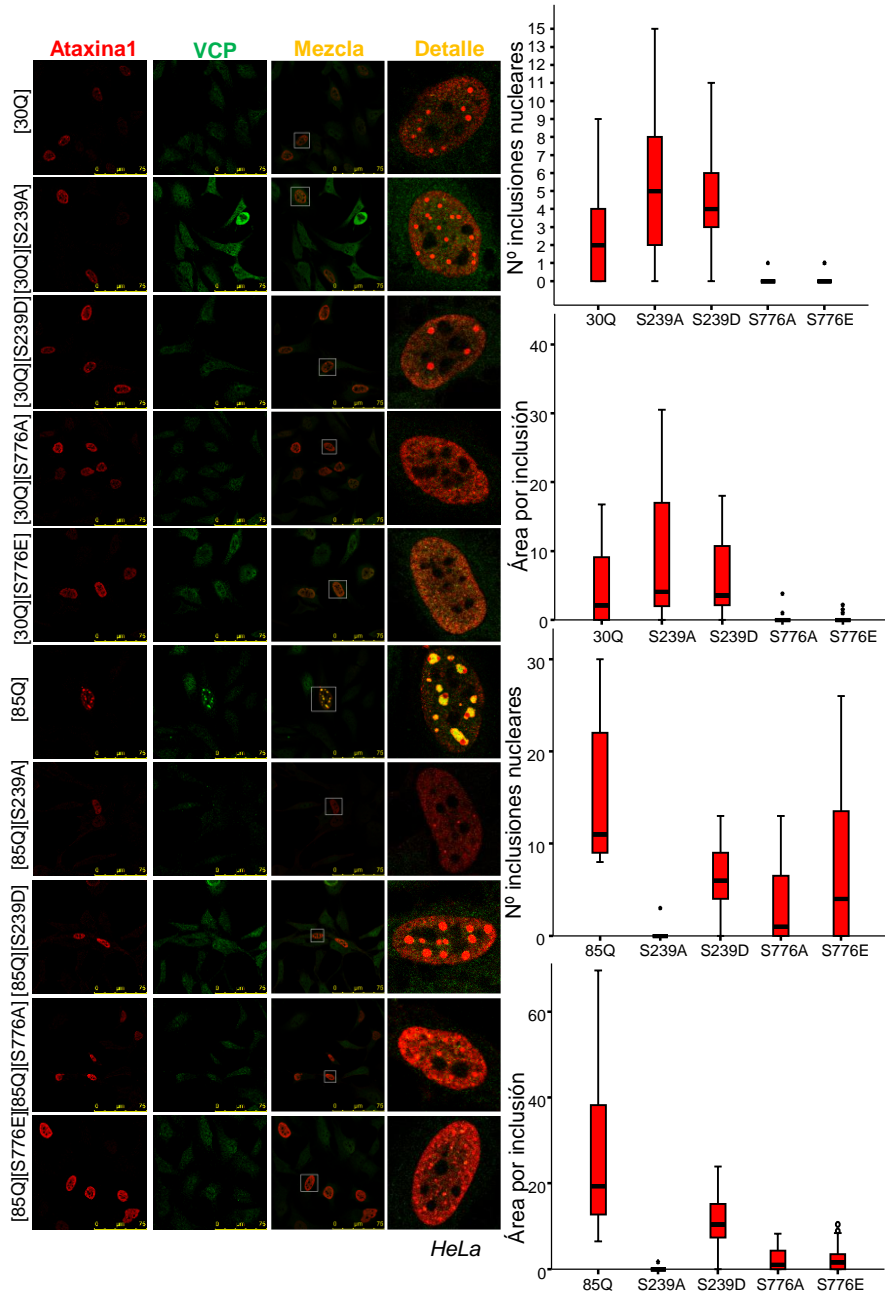
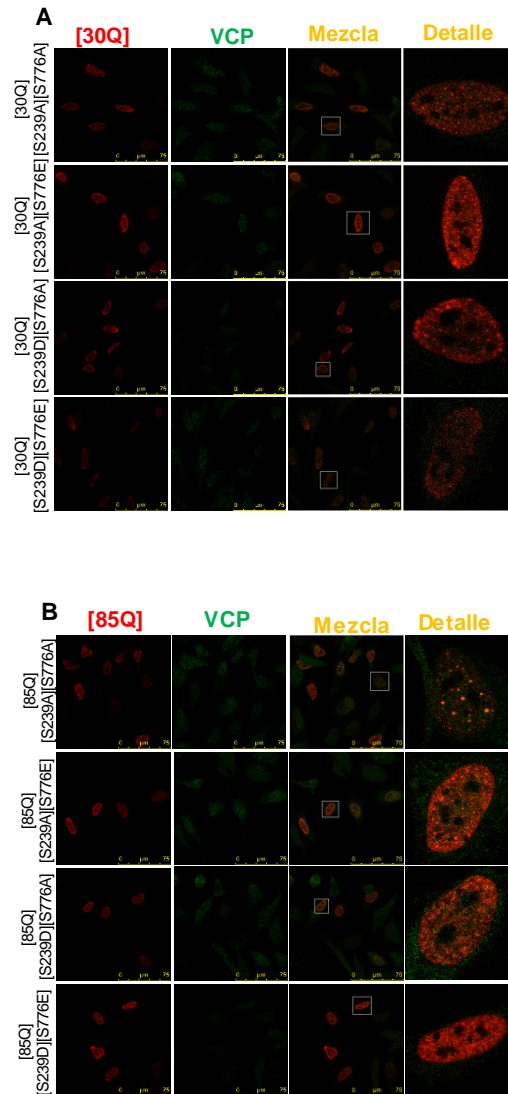


Figura 55: VCP no colocaliza con las inclusiones nucleares de Ataxina1 expandida con el residuo Ser239 no fosforilable, ni fosfomimético. Ataxina1[30Q] no fosforilable y fosfomimética en el residuo Ser239 forma inclusiones nucleares que no colocalizan con VCP. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y los distintos mutantes en fosforilación de las serinas 239 y 776. Tras 48 h, las células se procesaron y se marcaron para su estudio por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Ataxina1[85Q] no fosforilable en Ser239 no forma inclusiones nucleares, y la fosfomimética en Ser239 forma inclusiones pero no colocalizan con VCP. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG y los distintos mutantes en fosforilación de las serinas 239 y 776. Tras 48 h, las células se procesaron y marcaron para

inmunofluorescencia y microscopía confocal. La figura se acompaña de las cuantificaciones del número de inclusiones nucleares y área por inclusión.

Comprobamos las inclusiones nucleares que se forman con las distintas combinaciones de mutantes fosfomiméticos y no fosforilables en las serinas 239 y 776 (Figura 56). En ambos casos, ninguna de las combinaciones es capaz de formar inclusiones nucleares, lo que pone de manifiesto la importancia de la fosforilación de Ataxina1 en SCA1.



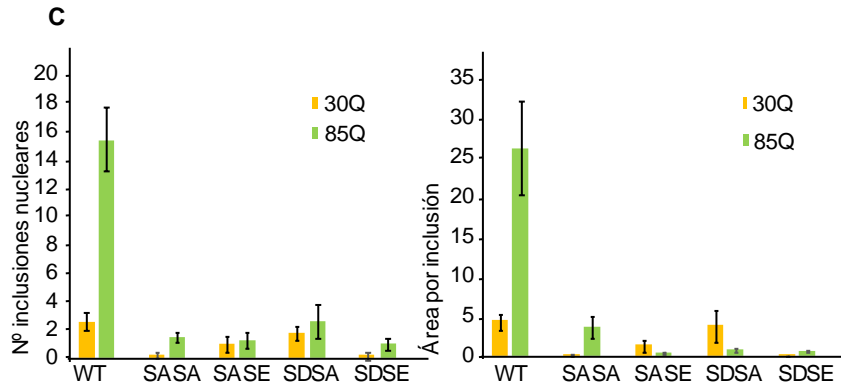
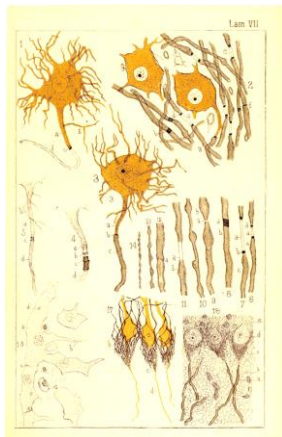


Figura 56: Los dobles mutantes en fosforilación de Ataxina1 *wild type* y *expandida* no forman inclusiones nucleares. **A.B:** Los dobles mutantes en fosforilación de Ataxina1 *wt* no forman inclusiones nucleares. Células *HeLa* fueron transfectadas con Ataxina1[30Q]-Myc-FLAG y con Ataxina1[85Q]-Myc-FLAG y las distintas construcciones de dobles mutantes en los residuos S239 y S776. Tras 48 h, las células se marcaron y procesaron para su análisis por microscopía confocal. **C:** Se representan las cuantificaciones del número de inclusiones nucleares y área por inclusión de los dobles mutantes en fosforilación de Ataxina1 *wt* (naranja) y *expandida* (verde).

DISCUSIÓN

“Mientras el cerebro sea un misterio, el universo seguirá siendo un misterio”



Santiago Ramón y Cajal

1. Estudio de pacientes con neuropatías asociadas al gen *VRK1*

Debido a los fenotipos de gravedad severa observados en pacientes que presentan las distintas variantes patogénicas de *VRK1*, parece evidente que esta quinasa desarrolla funciones importantes durante el desarrollo del cerebro y la supervivencia de las motoneuronas. Por tanto, es fundamental estudiar el papel de *VRK1* en el desarrollo del sistema nervioso. En un estudio reciente se observó que ratones con baja expresión de *VRK1* presentan una ligera reducción del tamaño del cerebro, y ciertos problemas motores (Vinograd-Byk, Renbaum *et al.* 2018). A nivel de expresión, se observan alteraciones en genes implicados en rutas de señalización tanto neuronales como no neuronales. En las neuronales, se encuentran sobreexpresados genes implicados en la señalización de neurotrofinas y en la guía de axones, y también genes de fosforilación oxidativa y asociados al proteasoma. Las neurotrofinas son fundamentales tanto en el desarrollo del sistema nervioso como en su mantenimiento posterior, inducen la diferenciación de los progenitores neurales, regulan la supervivencia y la apoptosis de las neuronas, y contribuyen al crecimiento de axones y dendritas. Además, controlan funciones sinápticas, plasticidad neuronal y supervivencia, morfología y diferenciación de las neuronas en cerebros adultos. Una sobreexpresión de estos genes provoca la desregulación de todos estos procesos y una elevada apoptosis neuronal, defectos observados en ALS (Redler & Dokholyan 2012). También las proteínas de la guía de axones se encuentran alteradas en ALS. Estas proteínas son fundamentales para la correcta formación de las sinapsis entre axones y dendritas, la alteración de estos procesos provoca defectos en las sinapsis neuromusculares, lo que está directamente relacionado con ALS y SMA (Schmidt, Pasterkamp *et al.* 2009). Los genes de fosforilación oxidativa se relacionan directamente con la función mitocondrial, que sufre alteraciones en ALS, y defectos en los genes del proteasoma generan problemas para la degradación de proteínas mal plegadas, promoviendo su agregación en inclusiones celulares, lo que también está relacionado con ALS y con otras muchas enfermedades neurodegenerativas.

Por el momento, solo se ha visto que los pacientes con R358X presentan alteraciones en la guía de axones. Por eso, es fundamental el estudio a fondo de estas variantes de *VRK1* en cuanto a las alteraciones que puedan generar en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, para tratar de establecer una relación entre genotipo y fenotipo y ampliar el conocimiento en este campo.

2. Caracterización de la estabilidad de las variantes patogénicas de VRK1

La primera aproximación para el estudio de los distintos mutantes de VRK1 fue su caracterización a nivel estructural. Hasta el momento, la variante más estudiada era R358X, que carece de la cola C-terminal (Shin, Chakraborty *et al.* 2011). Llevamos a cabo un estudio de estabilidad de estos mutantes utilizando dos aproximaciones, en un sistema celular *in vivo*, observando la vida media de las proteínas en las células durante 24 horas, y mediante la predicción del efecto de las mutaciones sobre la estructura de la proteína. En ambos casos obtuvimos un resultado similar, un grupo de mutaciones desestabilizantes de VRK1 (G135R, L195V, R321C, R358X), y un grupo que tienen un efecto neutro o estabilizante (R89Q, H119R, V236M). Solo en caso del mutante R133C obtuvimos información contradictoria, ya que en células observamos que es una proteína muy inestable, y sin embargo en los estudios de predicción aparece como ligeramente estabilizante. Pensamos que su inestabilidad en células se debe a alteraciones en su red de interacción con otras proteínas o reguladores que estén modulando su estabilidad. Dentro del grupo de proteínas desestabilizantes, observamos que G135R y R321C pierden y generan nuevas interacciones con los aminoácidos colindantes, lo que provoca una liberación de energía por parte de la estructura, hecho que se relaciona con inestabilidad. Del mutante L195V se desconoce el motivo estructural de la inestabilidad, el cambio de leucina a valina, al ser dos aminoácidos neutros y apolares, no se esperaba que tuviera consecuencias para la estructura de VRK1. Sin embargo, por ambas aproximaciones se observa que genera una proteína inestable. En el caso del R358X, no se dispone de información de predicción de la estructura porque la cola C-terminal no se pudo estudiar mediante rayos X debido a su elevada flexibilidad, pero hemos visto *in vivo* que es una proteína muy inestable. Previamente en el laboratorio, estudiamos que no presenta ninguna alteración en el dominio quinasa (Sanz-García, Vázquez-Cedeira *et al.* 2011); sin embargo, el plegamiento de la cola C-terminal sobre el dominio quinasa de VRK1 regula su actividad, de forma que la variante R358X presenta una actividad catalítica residual. Es por ello que pensamos que otras variantes, como R133C o V236M, que no presentan aparentes cambios que afecten a la estabilidad, sufran problemas para interactuar con esta región flexible de VRK1, pudiendo tener consecuencias en su actividad quinasa. Finalmente, R89Q modifica también su red de interacción, pero en este caso disminuyendo la energía libre y aumentando por tanto la estabilidad.

3. Caracterización de la actividad quinasa de las variantes patogénicas de VRK1

Las alteraciones en VRK1 afectan a la progresión del ciclo celular (Valbuena, Lopez-Sanchez *et al.* 2008, Valbuena, Sanz-Garcia *et al.* 2011, Cantarero, Sanz-Garcia *et al.* 2015, Hashiguchi, Arakawa *et al.* 2016, Moura, Fernandez *et al.* 2016, Moura, Campillo-Marcos *et al.* 2018), a la respuesta al daño en el ADN (Sanz-Garcia, Monsalve *et al.* 2012, Salzano, Vazquez-Cedeira *et al.* 2014, Monsalve, Campillo-Marcos *et al.* 2016), alteran el ensamblaje de la envuelta nuclear (Nichols, Wiebe *et al.* 2006), y también provocan alteraciones en la diferenciación neuronal a través de la regulación de Sox2 (Moura, Fernandez *et al.* 2016). Todos estos procesos son críticos durante el desarrollo neuronal temprano; de hecho, fallos en la progresión del ciclo celular pueden generar microcefalia e hipoplasia (Bianchi, Berto *et al.* 2018), neuropatías observadas en varios de los pacientes que presentan mutaciones en VRK1.

Con todas estas premisas, estudiamos la capacidad de las variantes patogénicas de VRK1 para fosforilar varios grupos de sustratos, con el fin de englobar las distintas funciones de la quinasa para conocer si se alteran todas, o alguna de forma específica. Utilizamos un grupo de sustratos cromatínicos (histonas H3 y H2AX), otro de factores de transcripción implicados en respuesta a daño y a estrés (p53 y c-Jun), y un grupo de sustratos implicados en procesos más concretos (53BP1 y Coilina). En todos los casos obtuvimos el mismo resultado, de nuevo se pueden establecer dos grupos de mutantes de VRK1, uno con una actividad quinasa reducida o residual (H119R, R133C, G135R, V236M, R321C, R358X y W375X) y otro con una actividad quinasa significativamente mayor que la proteína *wt* (R89Q y L195V). La actividad de cada mutante es independiente del tipo de sustrato, por lo que las variantes de VRK1 no generan especificidad por ningún sustrato.

VRK1 se regula mediante autofosforilación en su extremo C-terminal, en las treoninas 355 y 390 (Barcia, Lopez-Borges *et al.* 2002). El C-terminal es fundamental para la actividad catalítica de la proteína, puesto que su correcto plegamiento es necesario para la activación de la quinasa. Por tanto, la autofosforilación de VRK1 es fundamental para su actividad. Utilizando ATP radiomarcado podemos ver que el mismo grupo de mutantes que presenta problemas para fosforilar a los distintos tipos de sustratos, también tiene una menor capacidad de autofosforilarse, y el grupo con mayor actividad quinasa se autofosforila significativamente más. Es decir, hay dos variantes de VRK1 que son muy activas, y el resto son inactivas.

A partir del estudio de predicción de estabilidad sobre la estructura, se puede establecer una relación entre los cambios en estructura y la actividad quinasa. Se sabía que R358X presenta una actividad quinasa residual debido a la desregulación por parte del extremo C-terminal. En otros casos, como el de R133C, ocurre un defecto en la catálisis debido a la imposibilidad para interactuar con el ATP, por lo que R133C es catalíticamente inactiva (Najmabadi, Hu *et al.* 2011, Byun & Melacini 2018). G135 también interactúa con el ATP, por lo que su mutación a arginina genera una proteína sin actividad catalítica. Por tanto, estos dos residuos generan perturbaciones que afectan a la unión al ATP (Ngow, Rajan *et al.* 2019). Las otras mutaciones que se encuentran en el dominio quinasa de VRK1 y que generan una quinasa inactiva son H119R y V236M. Estos dos mutantes son neutros o estabilizantes de la estructura. Su actividad reducida podría deberse también a problemas para interactuar con el ATP, o con sus sustratos o reguladores. En cuanto al residuo L195, se sabe que interactúa con el motivo DYG de unión al ATP. El cambio de aminoácido de leucina, que es grande, a valina, más pequeño, podría facilitar la entrada de la molécula de ATP, generando una proteína más activa. Pero esta actividad podría ser compensada por su reducida vida media, ya que es una de las variantes más inestables. Para R89Q sin embargo, con una elevada actividad catalítica y mucha estabilidad, la neuropatía podría deberse al exceso de actividad.

Por tanto, las variantes patogénicas de VRK1 presentan alteraciones en su actividad catalítica, lo que afecta negativamente a todos los procesos donde esta quinasa está implicada, mediante la imposibilidad de fosforilar a sus sustratos, o mediante su fosforilación excesiva.

4. Estudio del comportamiento de las variantes patogénicas de VRK1 mediante la generación de líneas celulares estables

Con el fin de integrar las distintas funciones de VRK1 y las consecuencias de las mutaciones en un sistema *in vivo*, generamos líneas celulares estables a partir de células *HeLa*. Estas células resultaron una herramienta muy útil, puesto que nos permitieron estudiar tanto la capacidad de la proteína VRK1 mutada de dominar sobre VRK1 *wt* en las líneas en heterocigosis, como el efecto de las mutaciones *per se*, cuando se encuentran en homocigosis. Tuvimos problemas con dos de las variantes, R89Q y R358X. En el caso de R89Q, las líneas celulares no sobrevivieron tras la selección, y las que lo hicieron presentaban un nivel de expresión residual. Esto podría indicar que R89Q, que produce una quinasa muy activa y muy estable, impide la

supervivencia de las células. Los dos pacientes con esta mutación en heterocigosis con V236M murieron en la niñez, presentando uno de los fenotipos más graves observados en estos pacientes (Gonzaga-Jauregui, Lotze *et al.* 2013). Del mutante R358X se logró obtener la línea en heterocigosis, pero no se consiguió la clonación de célula única. Los niveles de ARNm de R358X son muy bajos en la célula, y por tanto, lo es también el nivel proteico. Además, se localiza en el citosol debido a que esta proteína truncada no presenta señal de localización nuclear. Aunque se pueda trabajar con este mutante sobreexpresando la proteína, en el caso de las transducciones virales los niveles de expresión son muy bajos, resultando difícil de detectar.

Una vez generadas las líneas, estudiamos sus características morfológicas y su capacidad de movimiento y migración, así como el ciclo celular. En cuanto a su morfología, solo tres de las seis líneas generadas presentan cambios significativos respecto a VRK1 *wt* y a células *HeLa* transducidas con el vector lentiviral vacío: R133C, que presenta un área del doble de tamaño respecto a VRK1 *wt*, V236M, que es significativamente más grande, y K179E, que es más pequeña. Para K179E desconocemos el motivo de la reducción de su tamaño, pero al ser un mutante artificial generado para disponer de un control negativo respecto a la actividad catalítica de la proteína, no lo consideramos importante. La línea con el mutante V236M presenta un citosol ligeramente más laxo y se observan algunas células multinucleadas en el cultivo, lo que explica el aumento del tamaño.

El mutante R133C es el que más destaca por sus características morfológicas, son células muy grandes y multinucleadas, con unas protrusiones citoplasmáticas muy laxas. Se desplazan a una velocidad mucho mayor que VRK1 *wt*, además se observan defectos en la última parte de la citocinesis, motivo por el que se generan estas células multinucleadas. El ciclo celular por tanto se encuentra profundamente alterado, de hecho, a lo largo de 72 horas el cultivo disminuye en número de células, puesto que el proceso de división no concluye, generándose muchas células con varios núcleos, que terminan sufriendo apoptosis. Se llevó a cabo un marcaje del aparato de Golgi y del citosol para observar de forma más específica la morfología de estas células. Pudimos ver largas fibras de actina rodeando a los núcleos, sugiriendo que estas células presentan peculiaridades en cuanto a la estructura del citoesqueleto. Evaluando la capacidad de migración mediante un ensayo de cierre de herida, vemos que R133C en comparación con VRK1 *wt* presenta dificultades para disminuir el área de la lesión.

H119R también provoca alteraciones significativas, las células no presentan peculiaridades en cuanto a tamaño, pero tienen una gran movilidad, recorriendo grandes distancias, y en el ensayo de herida presentan dificultades para disminuir el

● **Discusión sección A**

área de la lesión. Presentan además un ciclo celular muy activo, en los vídeos se observa un mayor número de divisiones celulares respecto a VRK1 *wt*; de hecho, en el conteo de células en cultivo se observa que el número de células es significativamente mayor en heterocigosis, pero en homocigosis es significativamente menor que VRK1 *wt*. Por tanto, H119R por sí misma genera defectos en la capacidad de división y migración celular. Pensamos que en heterocigosis con VRK1 se sobreactiva el ciclo debido a que H119R tiene problemas para autofosforilarse y por tanto activarse, pero si VRK1 endógena es capaz de fosforilar a la proteína mutada ésta puede activarse. Al ser estabilizante, la célula tendría dos VRK1, una de estabilidad normal y otra muy estable, lo que podría sobreactivar el ciclo celular, entre otros procesos. H119R en pacientes se encuentra en heterocigosis con R358X o con R321C. En el primer caso, la enfermedad se desarrolla de forma moderada y en el segundo de forma lenta y con ALS. Tanto R358X como R321C tienen una capacidad de autofosforilación nula y por tanto también de transfosforilación, por lo que las diferencias en el fenotipo de los pacientes posiblemente se deba a procesos independientes de la actividad quinasa de VRK1.

G135R no modifica el área de las células, pero éstas presentan un movimiento significativamente menor respecto a VRK1 *wt*. Además, presentan claros defectos en el ciclo celular, tanto en heterocigosis como en homocigosis el número de células en cultivo se encuentra significativamente reducido. El mayor defecto de este mutante se observa en el ensayo de herida, cuando se encuentra en homocigosis es incapaz de cerrarla. En pacientes se encuentra en heterocigosis con L195V, una quinasa muy activa pero muy inestable. El paciente presenta uno de los fenotipos más severos, con ALS y un desarrollo rápido de la enfermedad. El resto de mutantes no presenta alteraciones significativas en tamaño ni movilidad celular, y tampoco en la capacidad de migración, pero sí en el ciclo celular, característica típicamente asociada con defectos en VRK1.

Estamos viendo por tanto un claro defecto en migración en al menos 3 de los mutantes. Desconocemos las alteraciones producidas por los nuevos mutantes descritos (W375X, T228M, R219I y W254L), que también deberían ser evaluadas. Se sabe que R358X genera defectos en migración, como dijimos anteriormente. Por tanto, al menos 13 de los 18 pacientes presentan mutaciones que generan alteraciones en migración celular. Una reducción en los niveles de VRK1 se asocia a una disminución de la proteína precursora β -amiloide (APP) debido a la alteración de la ruta de la Reelina. La consecuencia de esta disminución es una reducción de la migración neuronal hacia el telencéfalo y hacia la médula espinal, que puede ser rescatada mediante sobreexpresión de APP (Vinograd-Byk, Sapir *et al.* 2015). Además, se ha descrito que

defectos en motilidad celular como consecuencia de la ausencia de VRK1 favorecen la metástasis en cáncer de mama debido a que se facilita la transición epitelio-mesénquima (Mon, MacKinnon *et al.* 2018). Los defectos en migración neuronal tienen consecuencias muy importantes tanto en el tamaño como en la organización del sistema nervioso, produciendo hipoplasia y microcefalia, causando por tanto síndromes neurológicos severos, observados en estos pacientes.

El córtex cerebral durante el desarrollo es especialmente vulnerable a alteraciones en la estabilidad genómica. Algunas de las manifestaciones más claras de este desorden son microcefalia, que puede ir acompañada con otros síntomas neurológicos (Passemaid, Kaindl *et al.* 2013), el síndrome de Nijmegen (Matsuura, Kobayashi *et al.* 2004), el síndrome de Cockayne (Natale & Raquer 2017) y ALS (Penndorf, Witte *et al.* 2018), entre otros muchos (Sepe, Payan-Gomez *et al.* 2013). La inestabilidad genómica se debe fundamentalmente a la inactivación de las rutas de reparación del daño en el ADN, lo que modifica distintos procesos relacionados con el ciclo celular, entre ellos la replicación del ADN, segregación cromosómica y citocinesis (Ganem, Storchova *et al.* 2007). Estos procesos son clave sobre todo en células que se encuentran en constante división, por lo que alteraciones en los mismos generan profundos defectos en el desarrollo del sistema nervioso. Ya hemos visto que las variantes patogénicas de VRK1 presentan defectos en motilidad y en el ciclo celular, y sabiendo que esta quinasa es fundamental en respuesta al daño en el ADN siendo un regulador temprano de ATM (Sanz-Garcia, Monsalve *et al.* 2012, Salzano, Sanz-Garcia *et al.* 2015, Monsalve, Campillo-Marcos *et al.* 2016), estos mutantes de VRK1 podrían estar causando alteraciones en la reparación del ADN. Por ello, estudiamos la capacidad de los mutantes de responder al tratamiento con doxorubicina mediante la inducción de la formación de focos de 53BP1 y de la relajación de la cromatina por la acetilación de la histona H4. Ninguno de los mutantes fue capaz de responder al tratamiento cuando se encontraban en homocigosis, mientras que sí lo hicieron en heterocigosis. Es decir, estas variantes generan una incapacidad de respuesta al daño en el ADN. El mutante L195V, con una gran actividad quinasa, tampoco es capaz de activar la respuesta al daño. Hemos visto en los ensayos de actividad que fosforila a 53BP1, sin embargo no se forman focos de reparación. Esto puede deberse a la corta estabilidad de la proteína, su rápida degradación en las células puede compensar su alta capacidad de fosforilación, o a defectos de regulación por parte de los moduladores de la quinasa. Por tanto, los mutantes de VRK1 implicados en neuropatías no solo provocan alteraciones en motilidad y en ciclo celular, sino también en respuesta al daño en el ADN.

● **Discusión sección A**

Finalmente, comprobamos si los mutantes de VRK1 producían alteraciones en la regulación de Coilina. Coilina se asocia con otras proteínas, como SMN, scaRNPs y Ataxina1, que están implicadas en fenotipos neurológicos de gravedad, como atrofia muscular y ataxias. En este contexto, las mutaciones de VRK1 podrían ser una alternativa patogénica a distintos síndromes, como la Ataxia espinocerebelosa tipo I, de la que hablamos y relacionamos con VRK1 en la segunda parte de este trabajo. Alteraciones en la organización y regulación de los cuerpos de Cajal mediante VRK1 pueden tener consecuencias neuropatológicas importantes, además se sabe que VRK1 regula la degradación de Coilina vía proteasoma. En nuestros experimentos, las células con las distintas variantes patogénicas de VRK1 en homocigosis son incapaces de llevar a cabo el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, salvo en el caso del mutante L195V. Este mutante, con mayor actividad quinasa, es capaz de formar cuerpos de Cajal, aunque su vida media en la célula sea muy corta. También consideramos interesante estudiar el posible efecto sobre la neuropatía de presentar un mayor número de cuerpos de Cajal. Se desconocen las consecuencias directas de la ausencia de los cuerpos de Cajal en el sistema nervioso, pero siendo un centro de procesamiento de ARN y de biogénesis de las telomerasas, resulta evidente que la ausencia de estas estructuras contribuye al fenotipo de neurodegeneración.

1. Interacción entre la quinasa humana VRK1 y la proteína causante de la Ataxia espinocerebelosa tipo I Ataxina1

Para evaluar las posibilidades de VRK1 como quinasa reguladora, en el laboratorio se utilizaron sistemas de afinidad y técnicas proteómicas para estudiar qué proteínas podrían estar formando complejos con VRK1 (Sanz-Garcia, Vazquez-Cedeira *et al.* 2011). En este trabajo, se identificaron treinta proteínas con una puntuación lo suficientemente alta para considerar la interacción como cierta, entre ellas la GTPasa Ran, que ahora sabemos que interacciona de forma estable con VRK1 con el objetivo de modular la actividad de la quinasa (Sanz-Garcia, Lopez-Sanchez *et al.* 2008), y Coilina (Cantarero, Sanz-Garcia *et al.* 2015). Pero también aparecieron otras candidatas con puntuaciones más bajas, lo que puede deberse a que la identificación sea errónea, o a que la proteína de partida esté a baja concentración, obteniendo pocos péptidos para el análisis.

Entre las proteínas con baja puntuación se encuentra Ataxina1, causante de la Ataxia espinocerebelosa tipo I. Como ya hemos visto que VRK1 tiene un papel importante en neuropatías y que forma complejos con Coilina y SMN1, dos proteínas que también están relacionadas con Ataxina1 (Hong, Ka *et al.* 2003), pensamos que esta información podría ser veraz. Por tanto, determinamos la interacción entre ambas proteínas tanto sobreexpresadas en líneas celulares como endógenas, comprobando que interaccionan. Se ha visto que Ataxina1 *wt* sobreexpresada tiende a agregar y a formar inclusiones nucleares, algunas de las interacciones que ocurren con Ataxina1 patogénica (expandida) y con la proteína normal sobreexpresada son inespecíficas (Ju, Kokubu *et al.* 2014). Por ello, aseguramos la especificidad de la interacción utilizando dosis crecientes de Ataxina1, observando que la interacción es dosis-dependiente.

Caracterizamos más a fondo esta interacción haciendo un mapeo con distintas construcciones de VRK1 para buscar la región de contacto con Ataxina1. Ataxina1 no interacciona ni con el extremo N-terminal ni con el C-terminal de VRK1, pero sí con el mutante R358X, al que le faltan los últimos aminoácidos de la cola C-terminal. Podríamos estar ante dos escenarios distintos, o que la región de interacción con Ataxina1 se encuentre entre los aminoácidos 267 y 358, y el motivo por el que no observemos interacción con la construcción C-VRK1 es que sea demasiado pequeña y desestructurada para que la interacción tenga lugar (Figura 57A), o que Ataxina1 interaccione con la superficie generada por el plegamiento de la cola C-terminal sobre el dominio catalítico; es decir, con una VRK1 correctamente plegada (Figura 57B) (Shin, Chakraborty *et al.* 2011). Para estudiar esta segunda opción, utilizamos dos mutantes de VRK1 en su región bisagra. Vimos que al impedir este plegamiento impedíamos

● **Discusión sección B**

también la interacción con Ataxina1, por lo que lo más probable es que Ataxina1 interaccione con la superficie generada por la cola C-terminal y el dominio quinasa de VRK1 (Figura 57B).

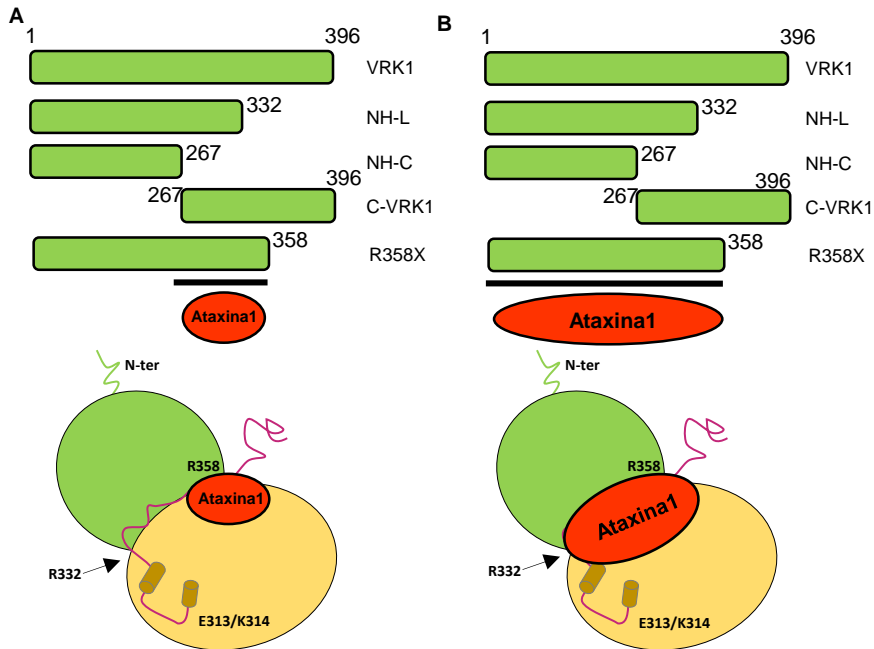


Figura 57: Mapeo de la región de VRK1 que interacciona con Ataxina1. **A:** Ataxina1 interacciona con una región entre los extremos N-terminal y el C-terminal de VRK1. **B:** Ataxina1 interacciona por la superficie de contacto generada por el plegamiento de la cola C-terminal sobre el dominio quinasa de VRK1.

Lo siguiente fue determinar si VRK1 interaccionaba de forma diferente con Ataxina1 si ésta sufría la expansión del poliQ. Vimos que VRK1, tanto endógena como sobreexpresada, interacciona más con Ataxina1 expandida que con Ataxina1 *wt*. Este resultado puede deberse a que VRK1 interaccione por el poliQ con Ataxina1, y al aumentar la región de interacción ésta aumente, o a que la interacción de la quinasa con Ataxina1 sea para fosforilarla, no pudiendo llevar a cabo su actividad sobre la expandida. Cuando las quinasas interaccionan con sus sustratos, lo hacen de una forma rápida y transitoria, pero si es un sustrato al que no pueden fosforilar, la interacción puede ser más estable. A partir de este resultado sospechamos que Ataxina1 es sustrato de fosforilación de VRK1.

En este experimento, vimos que VRK1 interacciona más aún con Ataxina1 expandida cuando ésta no puede fosforilarse en el residuo S776. Ya vimos la importancia de este residuo en el desarrollo de la enfermedad, una Ataxina1 expandida que no pueda ser

fosforilada en S776 no forma inclusiones nucleares, y ratones transgénicos que la expresan no desarrollan la enfermedad (Emamian, Kaytor *et al.* 2003). Una posible causa de este aumento es que ésa sea la región de interacción de VRK1 con Ataxina1. Se sabe que alrededor del residuo S776 ocurren distintas interacciones, por ejemplo con las chaperonas 14-3-3. Otra opción es que cuando ese residuo no pueda fosforilarse, la diana de VRK1 tampoco pueda debido a cambios conformacionales y que la interacción aumente aún más, discutiremos estas observaciones más adelante.

Vimos que la interacción entre estas dos proteínas ocurre en el núcleo y más fuertemente con Ataxina1 expandida. En el lisado de la fracción nuclear apenas se observaba Ataxina1, aunque se veía proteína al concentrarla inmunoprecipitando. Pensamos que esto podría deberse a que durante las centrifugaciones para realizar el fraccionamiento, parte de la proteína precipitara con la fracción insoluble debido a que estuviera quedándose atrapada en las inclusiones de poliQ. Los agregados son fundamentalmente fragmentos de poliQ generados a partir del proceso de degradación por el proteasoma y por la vía autofágica/lisosomal de la Ataxina1, que también pueden atrapar a la proteína completa (Paulson, Perez *et al.* 1997, Wellington, Ellerby *et al.* 1998). Hicimos un *Western blot* a partir de la fracción insoluble obtenida, y vimos una gran cantidad de proteína que habíamos perdido durante el proceso. Por tanto, VRK1 interacciona con Ataxina1 libre, que no se encuentra atrapada en los agregados nucleares, por lo que esta interacción debe tener una implicación en la función de Ataxina1.

2. Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre Ataxina1

Para determinar la implicación de esta interacción a nivel biológico, evaluamos el efecto de la ausencia de la quinasa sobre Ataxina1. Para ello, silenciamos VRK1, y observamos que bajaron los niveles proteicos de Ataxina1, tanto endógena como sobreexpresada. Para determinar si esta caída se debe a la actividad quinasa de VRK1, privamos a las células de factores mitogénicos, observando de nuevo la bajada de Ataxina1. Por tanto, VRK1 está regulando la estabilidad de Ataxina1 mediante fosforilación, directa o indirecta.

Para estudiar más a fondo esta posible regulación, tratamos células control y células silenciadas con cicloheximida, pero no pudimos sacar conclusiones porque cuando comenzamos el tratamiento ya no había Ataxina1. Decidimos silenciar primero a la quinasa y transfectar después Ataxina1, con el objetivo de comenzar a ver la expresión de la proteína hasta sus niveles normales, y la bajada como consecuencia del

● Discusión sección B

silenciamiento de VRK1. En el caso de Ataxina1 *wt*, comienza a expresarse pero no alcanza su nivel máximo, sino que se mantiene en niveles basales a lo largo del tiempo. Ataxina1 *expandida* tampoco alcanza su nivel máximo; de hecho, a las 48-60 horas se observa una ausencia total de la proteína. Estos experimentos demuestran que Ataxina1 *wt* y *expandida* son muy sensibles a la quinasa VRK1, ya que su ausencia las convierte en proteínas muy inestables. Se necesitan más experimentos, fundamentalmente con Ataxina1 endógena, para comprender el alcance del silenciamiento de VRK1 sobre la estabilidad de Ataxina1.

Debido al rápido efecto de VRK1 sobre Ataxina1, sospechábamos que además hubiera una regulación a nivel transcripcional, pero no solo no disminuyen los niveles de ARNm de Ataxina1, sino que aumentan, por lo que se activa un mecanismo de compensación por falta de proteína; es decir, se intenta suplir la bajada de Ataxina1 aumentando su expresión. Esto explica que veamos una cantidad basal de proteína de forma prolongada en el tiempo tras silenciar la quinasa. Por tanto, el silenciamiento de VRK1 desestabiliza a Ataxina1 tanto *wt* como *expandida*, provocando la caída de sus niveles proteicos, lo que se intenta suplir aumentando la transcripción del gen *SCA1*.

Dada la importancia de VRK1 en la estabilidad de Ataxina1, pensamos que la quinasa podría tener alguna implicación tanto en la formación de complejos macromoleculares donde esté presente Ataxina1 como en la formación de los agregados poliQ. Mediante HPLC, vimos que la Ataxina1 que se encuentra en complejos de alto peso molecular disminuye al silenciar VRK1, y la monomérica desaparece. En cuanto a las inclusiones nucleares, se siguen formando cuando la quinasa no está presente. Nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de VRK1 provoca una pérdida de estabilidad de Ataxina1, lo que hace que disminuya su presencia en complejos macromoleculares y que no encontremos proteína monomérica. Sin embargo, los agregados poliQ no se ven afectados por el silenciamiento de la quinasa.

Posteriormente, intentamos determinar si la quinasa estaba implicada en la degradación de Ataxina1 vía UPS, tratando de recuperar los niveles de Ataxina1 tras silenciar VRK1 utilizando MG-132, pero no observamos recuperación. Pensamos que podría estar ocurriendo a través de la vía autofágica/lisosomal, pero tampoco conseguimos recuperar los niveles. Al inhibir la degradación, como hemos visto que aumenta la expresión del ARNm de Ataxina1, deberíamos ver un aumento de los niveles proteicos. Puede que no lo veamos porque la proteína sintetizada *de novo* agregue con las inclusiones nucleares. Se necesita hacer experimentos donde se intenten recuperar los niveles de Ataxina1 endógena utilizando los distintos inhibidores. Como VCP es fosforilada por VRK1 con consecuencias aún desconocidas, y está ampliamente estudiado que VCP interacciona con agregados de poliQ para promover su degradación vía proteasoma, pusimos en común estas tres proteínas para obtener

información sobre la degradación de Ataxina1. Observamos que VCP interacciona con las construcciones con expansión del tracto de poliQ, tanto en núcleo como en citosol. Vimos también que VCP colocaliza con las inclusiones nucleares formadas por Ataxina1 expandida y no con el resto, lo que pone de manifiesto la importancia de la localización de VCP en los agregados nucleares en SCA1. Al tratar las células con MG-132, todas las construcciones forman inclusiones nucleares aberrantes que además colocalizan con VCP. Esto confirma que las construcciones se degradan vía proteasoma, el hecho de inhibir esta vía provoca una acumulación de Ataxina1 en las inclusiones nucleares, que además atrapan a toda la maquinaria UPS, lo que confiere toxicidad celular. Nuestra hipótesis es que la proteína Ataxina1 que se sintetiza *de novo* tras el silenciamiento de VRK1 queda atrapada en los agregados poliQ al estar inhibido el sistema UPS. Para determinar la importancia de VRK1 en esta colocalización entre VCP y los agregados nucleares, silenciamos la quinasa, el resultado fue la pérdida de la colocalización entre VCP y los agregados de Ataxina1 expandida.

En conjunto, al silenciar VRK1 se pierden los niveles proteicos de Ataxina1 de forma rápida, los niveles de expresión aumentan para intentar suplir la caída de los niveles proteicos, pero no se observa recuperación de Ataxina1 al inhibir el sistema UPS ni la vía autofágica/lisosomal porque ésta se queda atrapada en los agregados. Además, VCP colocaliza con Ataxina1 expandida, la colocalización desaparece al silenciar VRK1, y cuando se inhibe el proteasoma se forman inclusiones nucleares que colocalizan con VCP independientemente del número de glutaminas del tracto de poliQ y del estado de fosforilación de la proteína. A partir de aquí, proponemos un modelo en el que VRK1 establece una regulación sobre Ataxina1 de forma que, directamente, mediante la fosforilación de Ataxina1, o de forma indirecta a través de algún otro mecanismo, protege a Ataxina1 de la degradación (Figura 58A). Cuando no hay VRK1; es decir, cuando Ataxina1 no se fosforila por VRK1 o se modifica de forma indirecta por la quinasa, Ataxina1 se degrada (Figura 58B). Al tratar de recuperar los niveles proteicos mediante la inhibición del proteasoma, éstos no se recuperan porque aunque la transcripción esté sobreactivada como consecuencia de la bajada de los niveles proteicos, la que se sintetiza *de novo* se queda atrapada en unos grandes agregados nucleares tóxicos formados debido al mal funcionamiento del proteasoma (Figura 58C). Por otro lado, el hecho de que el silenciamiento de VRK1 deslocalice a VCP de los agregados en el caso de la Ataxina1 expandida, puede explicarse porque al eliminar la protección de Ataxina1 frente a la degradación, ésta desaparezca de la célula con más facilidad, sin contribuir a engrosar los agregados nucleares, que se comportan como si se formaran a partir de Ataxina1 *wt*, sin colocalizar con VCP (Figura 58D y 58E). Se requieren más experimentos para comprobar este modelo.

● Discusión sección B

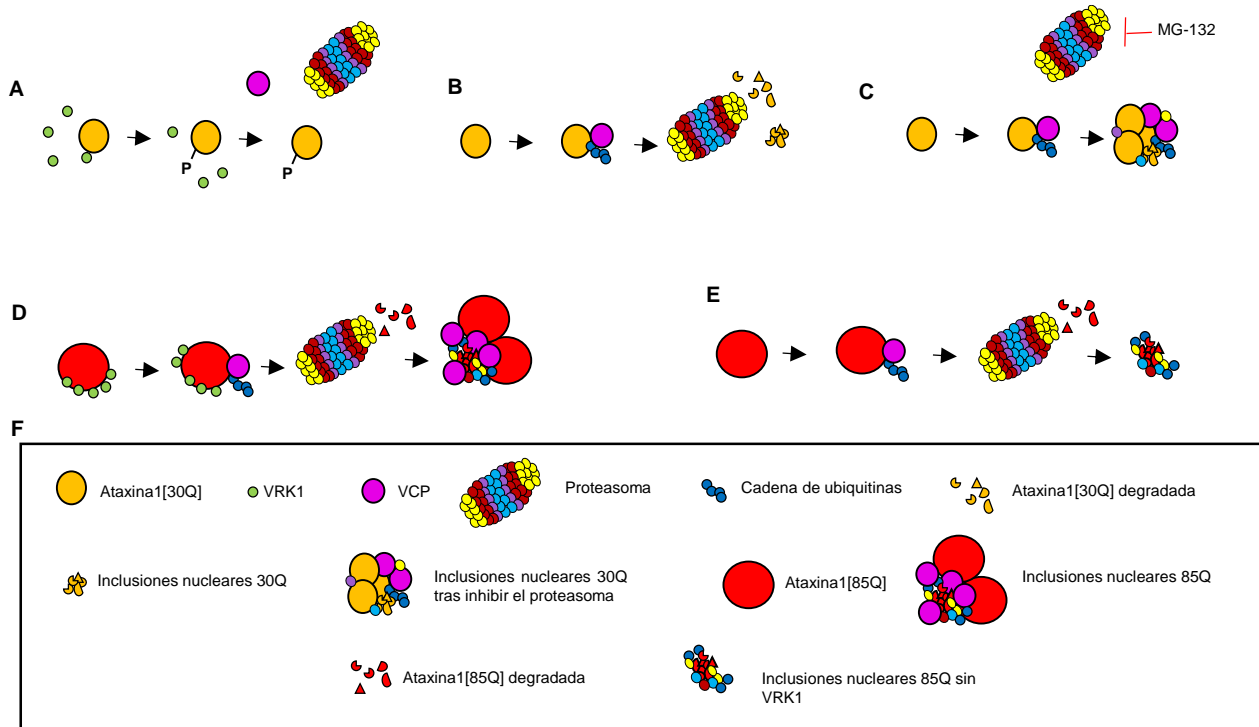


Figura 58: Representación gráfica de la hipótesis de la protección de VRK1 sobre la degradación de Ataxina1 vía proteasoma. **A:** VRK1 protege a Ataxina1 de la degradación vía proteasoma. **B:** La ausencia de VRK1 promueve la degradación de Ataxina1. **C:** La caída de los niveles proteicos de Ataxina1 como consecuencia del silenciamiento de VRK1 no se recupera inhibiendo el proteasoma con MG-132 porque la proteína sintetizada *de novo* queda atrapada en las inclusiones nucleares. **D:** Ataxina1 expandida se degrada vía proteasoma generando fragmentos que agregan, formando inclusiones nucleares que colocalizan con VCP. **E:** Ataxina1 expandida se degrada con mayor facilidad por el proteasoma cuando no hay VRK1. VCP no se queda atrapada en las inclusiones nucleares.

Finalmente, tratamos de determinar una consecuencia de la acumulación de VCP en las inclusiones de Ataxina1 expandida. Decidimos poner nuestra atención sobre las mitocondrias por la importancia de VCP en el control de calidad de las mismas y por lo fundamental del buen estado de estos orgánulos en las neuronas, que son las células que mueren en SCA1. Hay fuertes evidencias de que las enfermedades de poliglutamina dañan las estructuras cerebrales por muerte celular por apoptosis debido a fallos bioenergéticos (Kann & Kovacs 2007). Se ha observado un mal funcionamiento de las mitocondrias, así como daño oxidativo, en múltiples enfermedades neurodegenerativas (DiMauro & Schon 2008, Allen, Duffy *et al.* 2015, Ripolone, Ronchi *et al.* 2015). Vimos que en las células con Ataxina1 expandida la población de VCP mitocondrial disminuye, así como el potencial de membrana de las mismas. Por tanto, el reclutamiento de VCP en las inclusiones nucleares puede ser una de las claves en la muerte neuronal en SCA1 y en otras enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por formar agregados poliQ. Se necesitan más experimentos para determinar si el silenciamiento de VRK1 reestablece los niveles mitocondriales de VCP, y si así se lograra recuperar el potencial de membrana de las mismas.

3. VRK1 fosforila a Ataxina1

Mediante ensayos quinasa *in vitro* utilizando ATP radiomarcado [ATP], comprobamos que VRK1 fosforila a Ataxina1 *wt* y que además no puede fosforilar a Ataxina1 expandida. Por tanto, VRK1 interacciona más con Ataxina1 expandida que con *wt*, en ambos casos el silenciamiento de la quinasa produce una bajada de los niveles proteicos, y además, en el caso de la Ataxina1 expandida, se pierde su colocalización con VCP, y por último VRK1 fosforila a Ataxina1 *wt* pero no a la expandida. Inicialmente, pensamos que VRK1 solo podía fosforilar a Ataxina1 *wt* protegiéndola de la degradación vía proteasoma. Cuando VRK1 no está, Ataxina1 no puede ser fosforilada, perdiendo su protección y degradándose. Ataxina1 expandida, al no poderse fosforilar es más inestable, pero la ausencia de la quinasa la desestabiliza por completo promoviendo su degradación y deslocalizando a VCP de las inclusiones nucleares, cuando esperábamos que el efecto del silenciamiento de VRK1 sobre la Ataxina1 expandida fuera nulo. Proponemos que VRK1 solo pueda fosforilar parcialmente a Ataxina1 expandida y el experimento de fosforilación *in vitro* no sea lo suficientemente sensible para captarlo, lo que explicaría el aumento de la interacción y la pérdida de estabilidad de la proteína. Si esto fuera cierto, al desaparecer la quinasa se perdería por completo la fosforilación, disminuyendo la estabilidad de la proteína. Con VCP, como hemos dicho antes, al no haber VRK1 se promueve más la degradación de la proteína expandida, haciendo que no pueda acumularse en los agregados de poliQ y

● ● ● **Discusión sección B**

que VCP no se quede atrapada en ellos. Se necesitan más experimentos para comprobar si VRK1 regula a VCP de forma independiente, impidiendo que pueda unirse a los agregados poliQ. Aunque preliminares, estos datos aportan información sobre el mecanismo molecular de la enfermedad, puesto que hemos encontrado una quinasa que discrimina entre Ataxina1 *wt* y *expandida* y que libera a VCP de los agregados de poliQ, una marca fundamental en este tipo de enfermedades neurodegenerativas.

La Ser239 identificada por MALDI-TOFF, por su secuencia, es candidata a ser fosforilada por alguna proteína miembro de la familia CK1, por ERK1 o por Cdc2/Cdk5. Se publicaron trabajos donde identificaron a la quinasa NLK (*Nemo-like* quinasa) como posible responsable de la fosforilación de Ataxina1 en este residuo (Ju, Kokubu *et al.* 2013). NLK y Ataxina1 interactúan, y la fosforilación por NLK en Ser239 aumenta la patogénesis de SCA1 de la misma manera que la eliminación de la expresión de NLK suprime la patología. Sin embargo, se desconoce el mecanismo que subyace de esta fosforilación. Asimismo, se sabe que NLK no afecta a la actividad de Ataxina1, pero se postula que afecte a la actividad transcripcional del complejo que Ataxina1 forma con Capicua. Aún así, se desconoce si NLK es la quinasa que fosforila a Ataxina1 en el cerebelo, o si hay otras quinasas capaces de fosforilar este residuo.

Como VRK1 es miembro de la familia de quinasas CK1, y además hemos visto que el resultado de la fosforilación de Ataxina1 por nuestra quinasa es un aumento de la estabilidad, lo que contribuiría positivamente a la patología al igual que las observaciones con NLK, nos centramos en el residuo Ser239 como candidato a ser fosforilado por VRK1. Vimos que la interacción entre VRK1 y Ataxina1[30Q] aumenta cuando la Ser239 no puede fosforilarse, y no lo hace cuando es la Ataxina1 *expandida* la que está mutada en ese residuo. Este resultado sugiere que el residuo Ser239 puede ser diana de fosforilación de VRK1. También nos llamó la atención que VRK1 interactúe fuertemente con la Ataxina1 fosfomimética en Ser776. Nuestra hipótesis es que VRK1 interactúa con Ataxina1 para fosforilarla en Ser239, fosforilación que regula positivamente la del residuo Ser776, promoviendo la estabilidad de Ataxina1 mediante su unión a las proteínas 14-3-3. Al no poderse fosforilar la Ser239, disminuye también la fosforilación de la Ser776, lo que debilita la interacción con las 14-3-3, promoviendo la degradación. Cuando la Ser239 se encuentra constitutivamente fosforilada, la Ser776 también, y la proteína es más estable. Proponemos por tanto un bucle de regulación positiva mediado por la fosforilación de Ser776, cuando está constitutivamente fosforilada (E776), VRK1 se une más a Ataxina1, aumentando su actividad sobre la misma, y por tanto su estabilidad. Cuando Ser776 no puede fosforilarse, VRK1 fosforila igual a la Ser239, pero la interacción disminuye con respecto a E776 porque se rompe ese bucle de regulación positiva (Figura 59).

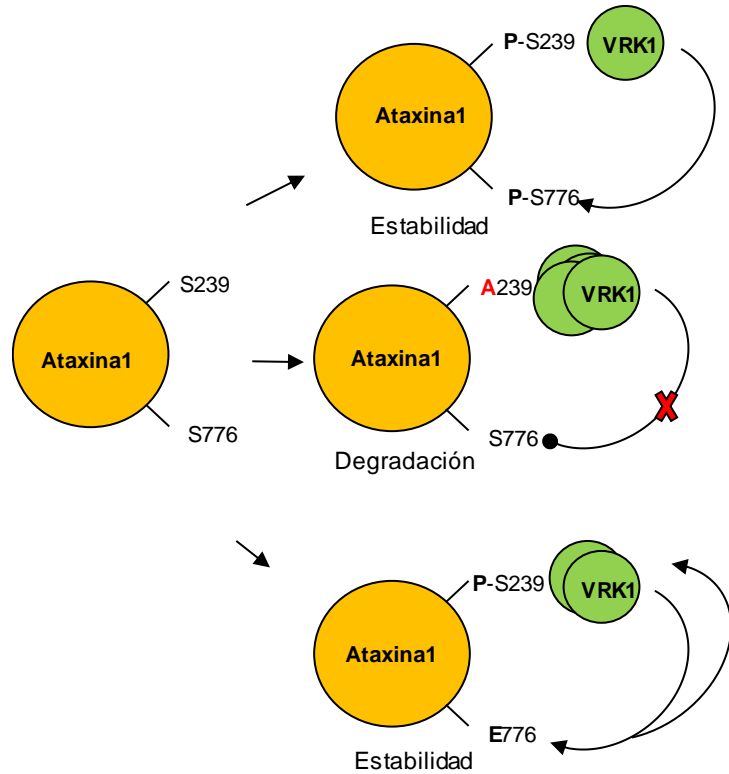


Figura 59: VRK1 regula la estabilidad de Ataxina1 mediante la fosforilación de S776 a través de la fosforilación de S239. Cuando VRK1 fosforila a Ataxina1 en S239, S776 puede ser fosforilada por otra quinasa, lo que aumenta la estabilidad de la proteína. Si Ataxina1 presenta una mutación no fosforilable en S239, VRK1 no puede fosforilarla, por lo que aumenta su interacción con Ataxina1 sin éxito, S776 tampoco se fosforila y la proteína se degrada. Si S776 se encuentra constitutivamente fosforilada, hay un bucle de regulación positiva sobre la fosforilación de S239 por VRK1, lo que hace que aumente la interacción de la quinasa y la estabilidad de la proteína.

Para comprobar nuestra hipótesis, estudiamos la estabilidad de los distintos mutantes de fosforilación. Ataxina1 no fosforilable en el residuo S239 es mucho más inestable que la *wt* y la fosfomimética en S239 es igual de estable que la *wt*. En el caso de Ataxina1 expandida, vimos que siendo la estabilidad mucho menor que la *wt*, cuando es fosfomimética en S239 es igual de estable y cuando es no fosforilable, es más inestable. Por tanto, este resultado es consistente con nuestra hipótesis.

Dada la importancia de este residuo en la estabilidad de la proteína, estudiamos el efecto sobre la formación de los agregados poliQ y su colocalización con VCP. En el caso de Ataxina1[30Q], no vimos ninguna consecuencia de los cambios en el estado de fosforilación en Ser239; en cambio, en la expandida vimos cambios sustanciales: el mutante no fosforilable S239A pierde las inclusiones nucleares, y por tanto también su colocalización con VCP, y en el caso del fosfomimético S239D, aunque las inclusiones siguen presentes, disminuyen de tamaño y no colocalizan con VCP. Parece que el

● **Discusión sección B**

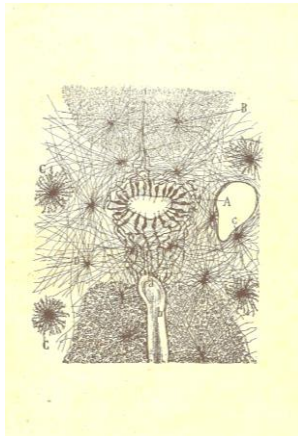
hecho de no permitir la fosforilación en este residuo, y por tanto según nuestra hipótesis tampoco en S776, deshace completamente las inclusiones nucleares. Este resultado pone una vez más de manifiesto la importancia de la fosforilación de Ataxina1 para su regulación, y proporciona una nueva perspectiva sobre el papel de la quinasa VRK1 como reguladora de Ataxina1. Es importante destacar que es necesario hacer experimentos de fosforilación de VRK1 sobre estos mutantes en S239 de Ataxina1 para determinar si realmente es ésta la diana de VRK1.

En cuanto a los dobles mutantes, vimos que ninguno de ellos es capaz de formar inclusiones nucleares. Ya habíamos visto que los mutantes en S776 no forman inclusiones, tanto el no fosforilable como el fosfomimético. Parece que la fosforilación clave para formar los agregados es la de S776. Es interesante el hecho de que ambos mutantes, S776A y S776E, no formen inclusiones nucleares. Hasta ahora solamente se han publicado trabajos sobre el efecto de S776A, pero ninguno sobre los agregados de poliQ en S776E. Consideramos que sería importante estudiar el efecto de este mutante para descartar que los cambios observados no se deban a cambios conformacionales en la proteína como consecuencia de las mutaciones, sino que dependan de la fosforilación, tanto para el residuo S776 como para el S239.

También sería importante explorar otros residuos, aparte del S239, que puedan ser dianas de VRK1.

CONCLUSIONES

“Al carro de la cultura española le falta la rueda de la ciencia”

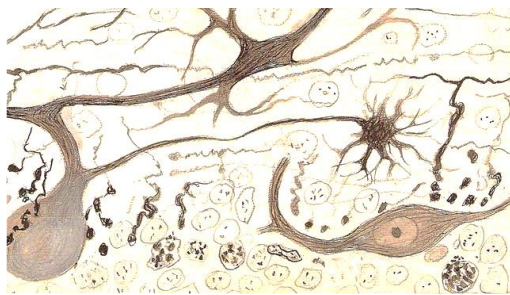


Santiago Ramón y Cajal

1. En función de su interacción intramolecular o con otras proteínas, los mutantes de VRK1 presentan distinta estabilidad, estableciéndose un grupo de variantes estables (R89Q, H119R y V236M) y otro de inestables (R133C, G135R, L195V, R321C, R358X).
2. Las mutaciones no generan especificidad de sustrato. Los mutantes R89Q y L195V presentan mayor capacidad de autofosforilación y de transfosforilación. El resto presenta una actividad quinasa residual.
3. Todas las variantes estudiadas de VRK1 presentan defectos en el ciclo celular tanto en heterocigosis como en homocigosis. Los mutantes H119R, R133C, G135R y R358X presentan defectos en motilidad y migración celular.
4. Ninguna de las variantes patogénicas de VRK1 induce respuesta al daño generado en el ADN. Todos los mutantes presentan defectos en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, salvo L195V.
5. Ataxina1 y VRK1 interaccionan solo si VRK1 presenta una correcta estructura tridimensional, en el núcleo de las células. La interacción es más intensa si Ataxina1 se encuentra expandida.
6. El silenciamiento de VRK1 provoca un descenso de los niveles de Ataxina1 *wild type* y expandida y afecta a los complejos multiproteicos donde se encuentra Ataxina1, pero no a las inclusiones nucleares.
7. VCP colocaliza con los agregados de poliglutamina de forma dependiente de VRK1. La inhibición del sistema UPS promueve la formación de estos agregados, que reclutan a VCP, deslocalizándolo de las mitocondrias.
8. VRK1 fosforila a Ataxina1 principalmente cuando no está expandida. El residuo diana de VRK1 podría ser la serina 239, siendo esta fosforilación importante para regular la del residuo serina 776. Ambos residuos son fundamentales para la estabilidad de Ataxina1. Ataxina1 expandida no fosforilable en serina 239 no forma inclusiones nucleares.

BIBLIOGRAFÍA

“Razonar y convencer, ¡qué difícil, largo y trabajoso!”



Santiago Ramón y Cajal

Ahmad, S. T., A. D. Rogers, M. J. Chen, R. Dixit, L. Adnani, L. S. Frankiw, S. O. Lawn, M. D. Blough, M. Alshehri, W. Wu, M. A. Marra, S. M. Robbins, J. G. Cairncross, C. Schuurmans and J. A. Chan (2019). "Capicua regulates neural stem cell proliferation and lineage specification through control of Ets factors." Nat Commun **10**(1): 2000.

Ahn, J. H., T. McAvoy, S. V. Rakhilin, A. Nishi, P. Greengard and A. C. Nairn (2007). "Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2979-2984.

Aihara, H., T. Nakagawa, K. Yasui, T. Ohta, S. Hirose, N. Dhomae, K. Takio, M. Kaneko, Y. Takeshima, M. Muramatsu and T. Ito (2004). "Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early Drosophila embryo." Genes Dev **18**(8): 877-888.

Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond and M. Mann (2005). "Nucleolar proteome dynamics." Nature **433**(7021): 77-83.

Atkinson, A., C. Castro, J.-P. Desvignes, K. Rihan, L. El-Bazzal, M. Bartoli, N. Bernard-Marissal, V. Delague, N. Lévy, E. Chouery-Khoury, K. Bertaux, S. Koussa, A. Mégarbané and R. Jabbour (2019). "Loss of cajal bodies in motor neurons from patients with novel mutations in VRK1."

Barcia-Sanjurjo, I., M. Vazquez-Cedeira, R. Barcia and P. A. Lazo (2013). "Sensitivity of the kinase activity of human vaccinia-related kinase proteins to toxic metals." J Biol Inorg Chem **18**(4): 473-482.

Barcia, R., S. Lopez-Borges, F. M. Vega and P. A. Lazo (2002). "Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1." Arch Biochem Biophys **399**(1): 1-5.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

Biton, S., A. Barzilai and Y. Shiloh (2008). "The neurological phenotype of ataxia-telangiectasia: solving a persistent puzzle." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1028-1038.

Blanco, S., L. Klimcakova, F. M. Vega and P. A. Lazo (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**(11): 2487-2504.

Bolger, T. A., X. Zhao, T. J. Cohen, C. C. Tsai and T. P. Yao (2007). "The neurodegenerative disease protein ataxin-1 antagonizes the neuronal survival function of myocyte enhancer factor-2." J Biol Chem **282**(40): 29186-29192.

Brittle, A. L., Y. Nanba, T. Ito and H. Ohkura (2007). "Concerted action of Aurora B, Polo and NHK-1 kinases in centromere-specific histone 2A phosphorylation." Exp Cell Res **313**(13): 2780-2785.

Butland, S. L., R. S. Devon, Y. Huang, C. L. Mead, A. M. Meynert, S. J. Neal, S. S. Lee, A. Wilkinson, G. S. Yang, M. M. Yuen, M. R. Hayden, R. A. Holt, B. R. Leavitt and B. F. Ouellette (2007). "CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome." BMC Genomics **8**: 126.

Campillo-Marcos, I. and P. A. Lazo (2019). "Olaparib and ionizing radiation trigger a cooperative DNA-damage repair response that is impaired by depletion of the VRK1 chromatin kinase." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 203.

Cantarero, L., M. Sanz-Garcia, H. Vinograd-Byk, P. Renbaum, E. Levy-Lahad and P. A. Lazo (2015). "VRK1 regulates Cajal body dynamics and protects coilin from proteasomal degradation in cell cycle." Sci Rep **5**: 10543.

Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.

Chen, H. K., P. Fernandez-Funez, S. F. Acevedo, Y. C. Lam, M. D. Kaytor, M. H. Fernandez, A. Aitken, E. M. Skoulakis, H. T. Orr, J. Botas and H. Y. Zoghbi (2003). "Interaction of Akt-

phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1." Cell **113**(4): 457-468.

Choi, Y. H., C. H. Park, W. Kim, H. Ling, A. Kang, M. W. Chang, S. K. Im, H. W. Jeong, Y. Y. Kong and K. T. Kim (2010). "Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells." PLoS One **5**(12): e15254.

Chung, M. Y., L. P. Ranum, L. A. Duvick, A. Servadio, H. Y. Zoghbi and H. T. Orr (1993). "Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I." Nat Genet **5**(3): 254-258.

Crespo-Barreto, J., J. D. Fryer, C. A. Shaw, H. T. Orr and H. Y. Zoghbi (2010). "Partial loss of ataxin-1 function contributes to transcriptional dysregulation in spinocerebellar ataxia type 1 pathogenesis." PLoS Genet **6**(7): e1001021.

Cummings, C. J., E. Reinstein, Y. Sun, B. Antalffy, Y. Jiang, A. Ciechanover, H. T. Orr, A. L. Beaudet and H. Y. Zoghbi (1999). "Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice." Neuron **24**(4): 879-892.

de Chiara, C., C. Giannini, S. Adinolfi, J. de Boer, S. Guida, A. Ramos, C. Jodice, D. Kioussis and A. Pastore (2003). "The AXH module: an independently folded domain common to ataxin-1 and HBP1." FEBS Lett **551**(1-3): 107-112.

de Chiara, C., R. P. Menon, F. Dal Piaz, L. Calder and A. Pastore (2005). "Polyglutamine is not all: the functional role of the AXH domain in the ataxin-1 protein." J Mol Biol **354**(4): 883-893.

de Chiara, C., M. Rees, R. P. Menon, K. Pauwels, C. Lawrence, P. V. Konarev, D. I. Svergun, S. R. Martin, Y. W. Chen and A. Pastore (2013). "Self-assembly and conformational heterogeneity of the AXH domain of ataxin-1: an unusual example of a chameleon fold." Biophys J **104**(6): 1304-1313.

Dhillon, N. and M. F. Hoekstra (1994). "Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair." EMBO J **13**(12): 2777-2788.

Dumaz, N. and D. W. Meek (1999). "Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2." EMBO J **18**(24): 7002-7010.

Dundr, M., M. D. Hebert, T. S. Karpova, D. Stanek, H. Xu, K. B. Shpargel, U. T. Meier, K. M. Neugebauer, A. G. Matera and T. Miseli (2004). "In vivo kinetics of Cajal body components." J Cell Biol **164**(6): 831-842.

Duvick, L., J. Barnes, B. Ebner, S. Agrawal, M. Andresen, J. Lim, G. J. Giesler, H. Y. Zoghbi and H. T. Orr (2010). "SCA1-like disease in mice expressing wild-type ataxin-1 with a serine to aspartic acid replacement at residue 776." Neuron **67**(6): 929-935.

El-Bazzal, L., K. Rihan, N. Bernard-Marissal, C. Castro, E. Chouery-Khoury, J. P. Desvignes, A. Atkinson, K. Bertaux, S. Koussa, N. Levy, M. Bartoli, A. Megarbane, R. Jabbour and V. Delague (2019). "Loss of Cajal bodies in motor neurons from patients with novel mutations in VRK1." Hum Mol Genet.

Feng, S. Y., L. Y. Li, S. M. Feng and Z. Y. Zou (2019). "A novel VRK1 mutation associated with recessive distal hereditary motor neuropathy." Ann Clin Transl Neurol **6**(2): 401-405.

Fernandez, I. F., S. Blanco, J. Lozano and P. A. Lazo (2010). "VRK2 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling and inversely correlates with ErbB2 in human breast cancer." Mol Cell Biol **30**(19): 4687-4697.

Finetti, P., N. Cervera, E. Charafe-Jauffret, C. Chabannon, C. Charpin, M. Chaffanet, J. Jacquemier, P. Viens, D. Birnbaum and F. Bertucci (2008). "Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis." Cancer Res **68**(3): 767-776.

- Finsterer, J. (2009). "Ataxias with autosomal, X-chromosomal or maternal inheritance." Can J Neurol Sci **36**(4): 409-428.
- Fournier, M. V., K. J. Martin, P. A. Kenny, K. Khaja, I. Bosch, P. Yaswen and M. J. Bissell (2006). "Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer." Cancer Res **66**(14): 7095-7102.
- Frezza, C., S. Cipolat and L. Scorrano (2007). "Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts." Nature Protocols **2**: 287.
- Gilliland, G., H. M. Berman, H. Weissig, I. N. Shindyalov, J. Westbrook, P. E. Bourne, T. N. Bhat and Z. Feng (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research **28**(1): 235-242.
- Gonzaga-Jauregui, C., T. Lotze, L. Jamal, S. Penney, I. M. Campbell, D. Pehlivan, J. V. Hunter, S. L. Woodbury, G. Raymond, A. M. Adesina, S. N. Jhangiani, J. G. Reid, D. M. Muzny, E. Boerwinkle, J. R. Lupski, R. A. Gibbs and W. Wiszniewski (2013). "Mutations in VRK1 associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly." JAMA Neurol **70**(12): 1491-1498.
- Gorjanacz, M., E. P. Klerkx, V. Galy, R. Santarella, C. Lopez-Iglesias, P. Askjaer and I. W. Mattaj (2007). "Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly." EMBO J **26**(1): 132-143.
- Guermah, M., V. B. Palhan, A. J. Tackett, B. T. Chait and R. G. Roeder (2006). "Synergistic functions of SII and p300 in productive activator-dependent transcription of chromatin templates." Cell **125**(2): 275-286.
- Guo, X., X. Sun, D. Hu, Y. J. Wang, H. Fujioka, R. Vyas, S. Chakrapani, A. U. Joshi, Y. Luo, D. Mochly-Rosen and X. Qi (2016). "VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease." Nat Commun **7**: 12646.
- Hancock, J. M. and M. Simon (2005). "Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution." Gene **345**(1): 113-118.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." FASEB J **9**(8): 576-596.
- Haraguchi, T., T. Koujin, M. Segura-Totten, K. K. Lee, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, K. L. Wilson and Y. Hiraoka (2001). "BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4575-4585.
- Hearst, S. M., M. E. Lopez, Q. Shao, Y. Liu and P. J. Vig (2010). "Dopamine D2 receptor signaling modulates mutant ataxin-1 S776 phosphorylation and aggregation." J Neurochem **114**(3): 706-716.
- Higgins, J. M. (2001). "Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases." Protein Sci **10**(8): 1677-1684.
- Hong, S., S. Ka, S. Kim, Y. Park and S. Kang (2003). "p80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product." Biochim Biophys Acta **1638**(1): 35-42.
- Hong, S., S. Lee, S. G. Cho and S. Kang (2008). "UbcH6 interacts with and ubiquitinates the SCA1 gene product ataxin-1." Biochem Biophys Res Commun **371**(2): 256-260.
- Huang, S., S. Yang, J. Guo, S. Yan, M. A. Gaertig, S. Li and X. J. Li (2015). "Large Polyglutamine Repeats Cause Muscle Degeneration in SCA17 Mice." Cell Rep **13**(1): 196-208.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell **80**(2): 225-236.
- Huttlin, E. L., M. P. Jedrychowski, J. E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S. A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M. E. Sowa and S. P. Gygi (2010). "A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression." Cell **143**(7): 1174-1189.

- Jafar-Nejad, P., C. S. Ward, R. Richman, H. T. Orr and H. Y. Zoghbi (2011). "Regional rescue of spinocerebellar ataxia type 1 phenotypes by 14-3-3epsilon haploinsufficiency in mice underscores complex pathogenicity in neurodegeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 2142-2147.
- Jorgensen, N. D., J. M. Andresen, S. Lagalwar, B. Armstrong, S. Stevens, C. E. Byam, L. A. Duvick, S. Lai, P. Jafar-Nejad, H. Y. Zoghbi, H. B. Clark and H. T. Orr (2009). "Phosphorylation of ATXN1 at Ser776 in the cerebellum." J Neurochem **110**(2): 675-686.
- Ju, H., H. Kokubu and J. Lim (2014). "Beyond the glutamine expansion: influence of posttranslational modifications of ataxin-1 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1." Mol Neurobiol **50**(3): 866-874.
- Kahlem, P., H. Green and P. Djian (1998). "Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerization of Huntingtin containing expanded polyglutamine." Mol Cell **1**(4): 595-601.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen and J. Ahringer (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-237.
- Kang, T. H. and K. T. Kim (2006). "Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase." Nat Cell Biol **8**(8): 863-869.
- Kang, T. H. and K. T. Kim (2008). "VRK3-mediated inactivation of ERK signaling in adult and embryonic rodent tissues." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 49-58.
- Kang, T. H., D. Y. Park, Y. H. Choi, K. J. Kim, H. S. Yoon and K. T. Kim (2007). "Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells." Mol Cell Biol **27**(24): 8533-8546.
- Khalil, B. and J. C. Lievens (2017). "Mitochondrial quality control in amyotrophic lateral sclerosis: towards a common pathway?" Neural Regen Res **12**(7): 1052-1061.
- Kim, S., D. Y. Park, D. Lee, W. Kim, Y. H. Jeong, J. Lee, S. K. Chung, H. Ha, B. H. Choi and K. T. Kim (2014). "Vaccinia-related kinase 2 mediates accumulation of polyglutamine aggregates via negative regulation of the chaperonin TRiC." Mol Cell Biol **34**(4): 643-652.
- Kim, W., G. Chakraborty, S. Kim, J. Shin, C. H. Park, M. W. Jeong, N. Bharatham, H. S. Yoon and K. T. Kim (2012). "Macro histone H2A1.2 (macroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase." J Biol Chem **287**(8): 5278-5289.
- Kim, Y. S., S. H. Kim, J. Shin, A. Harikishore, J. K. Lim, Y. Jung, H. N. Lyu, N. I. Baek, K. Y. Choi, H. S. Yoon and K. T. Kim (2014). "Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1." PLoS One **9**(10): e109655.
- Klement, I. A., P. J. Skinner, M. D. Kaytor, H. Yi, S. M. Hersch, H. B. Clark, H. Y. Zoghbi and H. T. Orr (1998). "Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice." Cell **95**(1): 41-53.
- Klerkx, E. P., P. A. Lazo and P. Askjaer (2009). "Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family." Histol Histopathol **24**(6): 749-759.
- Kobayashi, T., A. Manno and A. Kakizuka (2007). "Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates." Genes Cells **12**(7): 889-901.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kurz, E. U., P. Douglas and S. P. Lees-Miller (2004). "Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species." J Biol Chem **279**(51): 53272-53281.

- Lai, S., B. O'Callaghan, H. Y. Zoghbi and H. T. Orr (2011). "14-3-3 Binding to ataxin-1(ATXN1) regulates its dephosphorylation at Ser-776 and transport to the nucleus." *J Biol Chem* **286**(40): 34606-34616.
- Lam, Y. C., A. B. Bowman, P. Jafar-Nejad, J. Lim, R. Richman, J. D. Fryer, E. D. Hyun, L. A. Duvick, H. T. Orr, J. Botas and H. Y. Zoghbi (2006). "ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology." *Cell* **127**(7): 1335-1347.
- Lancaster, O. M., C. F. Cullen and H. Ohkura (2007). "NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the Drosophila oocyte nucleus." *J Cell Biol* **179**(5): 817-824.
- Landrum, M. J., J. M. Lee, M. Benson, G. Brown, C. Chao, S. Chitpiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, J. Hoover, W. Jang, K. Katz, M. Ovetsky, G. Riley, A. Sethi, R. Tully, R. Villamarin-Salomon, W. Rubinstein and D. R. Maglott (2016). "ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D862-868.
- Lek, M., K. J. Karczewski, E. V. Minikel, K. E. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. H. O'Donnell-Luria, J. S. Ware, A. J. Hill, B. B. Cummings, T. Tukiainen, D. P. Birnbaum, J. A. Kosmicki, L. E. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. N. Cooper, N. DeFlaux, M. DePristo, R. Do, J. Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. I. Kurki, A. L. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. M. Peloso, R. Poplin, M. A. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. A. Rose, D. M. Ruderfer, K. Shakir, P. D. Stenson, C. Stevens, B. P. Thomas, G. Tiao, M. T. Tusie-Luna, B. Weisburd, H. H. Won, D. Yu, D. M. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. C. Florez, S. B. Gabriel, G. Getz, S. J. Glatt, C. M. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarroll, M. I. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. M. Neale, A. Palotie, S. M. Purcell, D. Saleheen, J. M. Scharf, P. Sklar, P. F. Sullivan, J. Tuomilehto, M. T. Tsuang, H. C. Watkins, J. G. Wilson, M. J. Daly, D. G. MacArthur and C. Exome Aggregation (2016). "Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans." *Nature* **536**(7616): 285-291.
- Li, M., Y. Wang, X. B. Zheng, M. Ikeda, N. Iwata, X. J. Luo, S. A. Chong, J. Lee, M. Rietschel, F. Zhang, B. Muller-Myhsok, S. Cichon, D. R. Weinberger, M. Mattheisen, T. G. Schulze, N. G. Martin, P. B. Mitchell, P. R. Schofield, J. J. Liu, B. Su and D. S. C. Moo (2012). "Meta-analysis and brain imaging data support the involvement of VRK2 (rs2312147) in schizophrenia susceptibility." *Schizophr Res* **142**(1-3): 200-205.
- Li, N., L. Wang, X. Sun, Z. Lu, X. Suo, J. Li, J. Peng and R. Peng (2019). "A novel mutation in VRK1 associated with distal spinal muscular atrophy." *J Hum Genet* **64**(3): 215-219.
- Lim, J., J. Crespo-Barreto, P. Jafar-Nejad, A. B. Bowman, R. Richman, D. E. Hill, H. T. Orr and H. Y. Zoghbi (2008). "Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1." *Nature* **452**(7188): 713-718.
- Lopez-Borges, S. and P. A. Lazo (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**(32): 3656-3664.
- Lopez-Sanchez, I., M. Sanz-Garcia and P. A. Lazo (2009). "Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation." *Mol Cell Biol* **29**(5): 1189-1201.
- Lopez-Sanchez, I., A. Valbuena, M. Vazquez-Cedeira, J. Khadake, M. Sanz-Garcia, A. Carrillo-Jimenez and P. A. Lazo (2014). "VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage." *FEBS Lett* **588**(5): 692-700.
- Mandrusiak, L. M., L. K. Beitel, X. Wang, T. C. Scanlon, E. Chevalier-Larsen, D. E. Merry and M. A. Trifiro (2003). "Transglutaminase potentiates ligand-dependent proteasome dysfunction induced by polyglutamine-expanded androgen receptor." *Hum Mol Genet* **12**(13): 1497-1506.
- Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "Evolution of protein kinase signaling from yeast to man." *Trends Biochem Sci* **27**(10): 514-520.

- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Manto, M. and D. Marmolino (2009). "Cerebellar ataxias." Curr Opin Neurol **22**(4): 419-429.
- Masino, L., G. Kelly, K. Leonard, Y. Trottier and A. Pastore (2002). "Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins." FEBS Lett **513**(2-3): 267-272.
- Matilla, A., E. D. Roberson, S. Banfi, J. Morales, D. L. Armstrong, E. N. Burrig, H. T. Orr, J. D. Sweatt, H. Y. Zoghbi and M. M. Matzuk (1998). "Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation." J Neurosci **18**(14): 5508-5516.
- Meyer, H., M. Bug and S. Bremer (2012). "Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system." Nat Cell Biol **14**(2): 117-123.
- Molitor, T. P. and P. Traktman (2014). "Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes." Mol Biol Cell **25**(6): 891-903.
- Monsalve, D. M., T. Merced, I. F. Fernandez, S. Blanco, M. Vazquez-Cedeira and P. A. Lazo (2013). "Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression." Cell Death Dis **4**: e513.
- Moura, D. S., I. Campillo-Marcos, M. Vazquez-Cedeira and P. A. Lazo (2018). "VRK1 and AURKB form a complex that cross inhibit their kinase activity and the phosphorylation of histone H3 in the progression of mitosis." Cell Mol Life Sci **75**(14): 2591-2611.
- Nezu, J., A. Oku, M. H. Jones and M. Shimane (1997). "Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase." Genomics **45**(2): 327-331.
- Nguyen, T. P., S. Biliciler, W. Wiszniewski and K. Sheikh (2015). "Expanding Phenotype of VRK1 Mutations in Motor Neuron Disease." J Clin Neuromuscul Dis **17**(2): 69-71.
- Nichols, R. J. and P. Traktman (2004). "Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family." J Biol Chem **279**(9): 7934-7946.
- Nichols, R. J., M. S. Wiebe and P. Traktman (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**(5): 2451-2464.
- Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2007). "Dynamic mutations as digital genetic modulators of brain development, function and dysfunction." Bioessays **29**(6): 525-535.
- Nolen, B., S. Taylor and G. Ghosh (2004). "Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation." Mol Cell **15**(5): 661-675.
- Orr, H. T. (2012). "SCA1-phosphorylation, a regulator of Ataxin-1 function and pathogenesis." Prog Neurobiol **99**(3): 179-185.
- Orr, H. T. and H. Y. Zoghbi (2007). "Trinucleotide repeat disorders." Annu Rev Neurosci **30**: 575-621.
- Park, C. H., B. H. Choi, M. W. Jeong, S. Kim, W. Kim, Y. S. Song and K. T. Kim (2011). "Protein kinase Cdelta regulates vaccinia-related kinase 1 in DNA damage-induced apoptosis." Mol Biol Cell **22**(8): 1398-1408.
- Park, C. H., H. G. Ryu, S. H. Kim, D. Lee, H. Song and K. T. Kim (2015). "Presumed pseudokinase VRK3 functions as a BAF kinase." Biochim Biophys Acta **1853**(7): 1738-1748.
- Paulson, H. L. (2007). "Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3." Semin Neurol **27**(2): 133-142.

Paulson, H. L., V. G. Shakkottai, H. B. Clark and H. T. Orr (2017). "Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments." Nat Rev Neurosci **18**(10): 613-626.

Pawson, T. and J. D. Scott (2005). "Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting." Trends Biochem Sci **30**(6): 286-290.

Peeters, K., T. Chamova and A. Jordanova (20

14). "Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies." Brain **137**(Pt 11): 2879-2896.

Prigent, C. and S. Dimitrov (2003). "Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?" J Cell Sci **116**(Pt 18): 3677-3685.

Renbaum, P., E. Kellerman, R. Jaron, D. Geiger, R. Segel, M. Lee, M. C. King and E. Levy-Lahad (2009). "Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene." Am J Hum Genet **85**(2): 281-289.

Riggi, N., B. Knoechel, S. M. Gillespie, E. Rheinbay, G. Boulay, M. L. Suva, N. E. Rossetti, W. E. Boonseng, O. Oksuz, E. B. Cook, A. Formey, A. Patel, M. Gymrek, V. Thapar, V. Deshpande, D. T. Ting, F. J. Hornicek, G. P. Nielsen, I. Stamenkovic, M. J. Aryee, B. E. Bernstein and M. N. Rivera (2014). "EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma." Cancer Cell **26**(5): 668-681.

Ross, C. A., E. H. Aylward, E. J. Wild, D. R. Langbehn, J. D. Long, J. H. Warner, R. I. Scahill, B. R. Leavitt, J. C. Stout, J. S. Paulsen, R. Reilmann, P. G. Unschuld, A. Wexler, R. L. Margolis and S. J. Tabrizi (2014). "Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics." Nat Rev Neurol **10**(4): 204-216.

Ruan, Q., Q. Wang, S. Xie, Y. Fang, Z. Darzynkiewicz, K. Guan, M. Jhanwar-Uniyal and W. Dai (2004). "Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle." Exp Cell Res **294**(1): 51-59.

Salzano, M., M. Sanz-Garcia, D. M. Monsalve, D. S. Moura and P. A. Lazo (2015). "VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage." Epigenetics **10**(5): 373-383.

Salzano, M., M. Vazquez-Cedeira, M. Sanz-Garcia, A. Valbuena, S. Blanco, I. F. Fernandez and P. A. Lazo (2014). "Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) confers resistance to DNA-damaging agents in human breast cancer by affecting DNA damage response." Oncotarget **5**(7): 1770-1778.

Santos, C. R., M. Rodriguez-Pinilla, F. M. Vega, J. L. Rodriguez-Peralto, S. Blanco, A. Sevilla, A. Valbuena, T. Hernandez, A. J. van Wijnen, F. Li, E. de Alava, M. Sanchez-Cespedes and P. A. Lazo (2006). "VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma." Mol Cancer Res **4**(3): 177-185.

Sanz-Garcia, M., I. Lopez-Sanchez and P. A. Lazo (2008). "Proteomics identification of nuclear Ran GTPase as an inhibitor of human VRK1 and VRK2 (vaccinia-related kinase) activities." Mol Cell Proteomics **7**(11): 2199-2214.

Sanz-Garcia, M., D. M. Monsalve, A. Sevilla and P. A. Lazo (2012). "Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) is an upstream nucleosomal kinase required for the assembly of 53BP1 foci in response to ionizing radiation-induced DNA damage." J Biol Chem **287**(28): 23757-23768.

Sanz-Garcia, M., M. Vazquez-Cedeira, E. Kellerman, P. Renbaum, E. Levy-Lahad and P. A. Lazo (2011). "Substrate profiling of human vaccinia-related kinases identifies coilin, a Cajal body nuclear protein, as a phosphorylation target with neurological implications." J Proteomics **75**(2): 548-560.

Schaefer, M. H., E. E. Wanker and M. A. Andrade-Navarro (2012). "Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks." Nucleic Acids Res **40**(10): 4273-4287.

Scheeff, E. D., J. Eswaran, G. Bunkoczi, S. Knapp and G. Manning (2009). "Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site." Structure **17**(1): 128-138.

- Schober, C. S., F. Aydiner, C. J. Booth, E. Seli and V. Reinke (2011). "The kinase VRK1 is required for normal meiotic progression in mammalian oogenesis." Mech Dev **128**(3-4): 178-190.
- Schut, J. W. and W. Haymaker (1951). "Hereditary ataxia: a pathologic study of five cases of common ancestry." J Neuropathol Clin Neurol **1**(3): 183-213.
- Schymkowitz, J., J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau and L. Serrano (2005). "The FoldX web server: an online force field." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W382-388.
- Sevilla, A., C. R. Santos, R. Barcia, F. M. Vega and P. A. Lazo (2004). "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**(55): 8950-8958.
- Sevilla, A., C. R. Santos, F. M. Vega and P. A. Lazo (2004). "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**(26): 27458-27465.
- Shchemelinin, I., L. Sefc and E. Necas (2006). "Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases." Folia Biol (Praha) **52**(3): 81-100.
- Sherman, M. Y. and A. L. Goldberg (2001). "Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases." Neuron **29**(1): 15-32.
- Shiloh, Y. and Y. Ziv (2013). "The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(4): 197-210.
- Shin, J., G. Chakraborty, N. Bharatham, C. Kang, N. Tochio, S. Koshiba, T. Kigawa, W. Kim, K. T. Kim and H. S. Yoon (2011). "NMR solution structure of human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) reveals the C-terminal tail essential for its structural stability and autocatalytic activity." J Biol Chem **286**(25): 22131-22138.
- Sohn, H., B. Kim, K. H. Kim, M. K. Kim, T. K. Choi and S. H. Lee (2014). "Effects of VRK2 (rs2312147) on white matter connectivity in patients with schizophrenia." PLoS One **9**(7): e103519.
- Steinberg, S., S. de Jong, C. Irish Schizophrenia Genomics, O. A. Andreassen, T. Werge, A. D. Borglum, O. Mors, P. B. Mortensen, O. Gustafsson, J. Costas, O. P. Pietilainen, D. Demontis, S. Papiol, J. Huttenlocher, M. Mattheisen, R. Breuer, E. Vassos, I. Giegling, G. Fraser, N. Walker, A. Tuulio-Henriksson, J. Suvisaari, J. Lonnqvist, T. Paunio, I. Agartz, I. Melle, S. Djurovic, E. Strengman, Group, G. Jurgens, B. Glenthøj, L. Terenius, D. M. Hougaard, T. Orntoft, C. Wiuf, M. Didriksen, M. V. Hollegaard, M. Nordentoft, R. van Winkel, G. Kenis, L. Abramova, V. Kaleda, M. Arrojo, J. Sanjuan, C. Arango, S. Sperling, M. Rossner, M. Ribolsi, V. Magni, A. Siracusano, C. Christiansen, L. A. Kiemenev, J. Veldink, L. van den Berg, A. Ingason, P. Muglia, R. Murray, M. M. Nothen, E. Sigurdsson, H. Petursson, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, I. A. Rubino, M. De Hert, J. M. Rethelyi, I. Bitter, E. G. Jonsson, V. Golimbet, A. Carracedo, H. Ehrenreich, N. Craddock, M. J. Owen, M. C. O'Donovan, C. Wellcome Trust Case Control, M. Ruggeri, S. Tosato, L. Peltonen, R. A. Ophoff, D. A. Collier, D. St Clair, M. Rietschel, S. Cichon, H. Stefansson, D. Rujescu and K. Stefansson (2011). "Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia." Hum Mol Genet **20**(20): 4076-4081.
- Stokes, M. P., J. Rush, J. Macneill, J. M. Ren, K. Sprott, J. Nardone, V. Yang, S. A. Beausoleil, S. P. Gygi, M. Livingstone, H. Zhang, R. D. Polakiewicz and M. J. Comb (2007). "Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19855-19860.
- Stoll, M., H. Teoh, J. Lee, S. Reddel, Y. Zhu, M. Buckley, H. Sampaio, T. Roscioli, M. Farrar and G. Nicholson (2016). "Novel motor phenotypes in patients with VRK1 mutations without pontocerebellar hypoplasia." Neurology **87**(1): 65-70.
- Studer, R. A., F. R. Opperdoes, G. A. Nicolaes, A. B. Mulder and R. Mulder (2014). "Understanding the functional difference between growth arrest-specific protein 6 and protein S: an evolutionary approach." Open Biol **4**(10).

- Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris, P. Bork, L. J. Jensen and C. V. Mering (2019). "STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets." *Nucleic Acids Res* **47**(D1): D607-D613.
- Tanaka, A., M. M. Cleland, S. Xu, D. P. Narendra, D. F. Suen, M. Karbowski and R. J. Youle (2010). "Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin." *J Cell Biol* **191**(7): 1367-1380.
- Tesli, M., K. V. Wirgenes, T. Hughes, F. Bettella, L. Athanasiu, E. S. Hoseth, M. Nerhus, T. V. Lagerberg, N. E. Steen, I. Agartz, I. Melle, I. Dieset, S. Djurovic and O. A. Andreassen (2016). "VRK2 gene expression in schizophrenia, bipolar disorder and healthy controls." *Br J Psychiatry* **209**(2): 114-120.
- Tewey, K. M., T. C. Rowe, L. Yang, B. D. Halligan and L. F. Liu (1984). "Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II." *Science* **226**(4673): 466-468.
- Tong, X., H. Gui, F. Jin, B. W. Heck, P. Lin, J. Ma, J. D. Fondell and C. C. Tsai (2011). "Ataxin-1 and Brother of ataxin-1 are components of the Notch signalling pathway." *EMBO Rep* **12**(5): 428-435.
- 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**(9): 4350-4354.
- Traktman, P. and K. Boyle (2004). "Methods for analysis of poxvirus DNA replication." *Methods Mol Biol* **269**: 169-186.
- Tsuda, H., H. Jafar-Nejad, A. J. Patel, Y. Sun, H. K. Chen, M. F. Rose, K. J. Venken, J. Botas, H. T. Orr, H. J. Bellen and H. Y. Zoghbi (2005). "The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins." *Cell* **122**(4): 633-644.
- Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-541.
- Valbuena, A., S. Blanco, F. M. Vega and P. A. Lazo (2008). "The C/H3 domain of p300 is required to protect VRK1 and VRK2 from their downregulation induced by p53." *PLoS One* **3**(7): e2649.
- Valbuena, A., I. Lopez-Sanchez and P. A. Lazo (2008). "Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression." *PLoS One* **3**(2): e1642.
- Valbuena, A., I. Lopez-Sanchez, F. M. Vega, A. Sevilla, M. Sanz-Garcia, S. Blanco and P. A. Lazo (2007). "Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations." *Arch Biochem Biophys* **465**(1): 219-226.
- Valbuena, A., M. Sanz-Garcia, I. Lopez-Sanchez, F. M. Vega and P. A. Lazo (2011). "Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division." *Cell Signal* **23**(8): 1267-1272.
- van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis." *Oncogene* **20**(19): 2453-2464.
- van der Waal, M. S., A. T. Saurin, M. J. Vromans, M. Vleugel, C. Wurzenberger, D. W. Gerlich, R. H. Medema, G. J. Kops and S. M. Lens (2012). "Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B." *EMBO Rep* **13**(9): 847-854.
- Vazquez-Cedeira, M. and P. A. Lazo (2012). "Human VRK2 (vaccinia-related kinase 2) modulates tumor cell invasion by hyperactivation of NFAT1 and expression of cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* **287**(51): 42739-42750.
- Vega, F. M., P. Gonzalo, M. L. Gaspar and P. A. Lazo (2003). "Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development." *FEBS Lett* **544**(1-3): 176-180.

- Vega, F. M., A. Sevilla and P. A. Lazo (2004). "p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1." Mol Cell Biol **24**(23): 10366-10380.
- Vij, N. (2008). "AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential." J Cell Mol Med **12**(6A): 2511-2518.
- Vinograd-Byk, H., T. Sapir, L. Cantarero, P. A. Lazo, S. Zeligson, D. Lev, T. Lerman-Sagie, P. Renbaum, O. Reiner and E. Levy-Lahad (2015). "The spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia gene VRK1 regulates neuronal migration through an amyloid-beta precursor protein-dependent mechanism." J Neurosci **35**(3): 936-942.
- Voogd, J. and M. Glickstein (1998). "The anatomy of the cerebellum." Trends Neurosci **21**(9): 370-375.
- Waters, K., A. Z. Yang and V. Reinke (2010). "Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C. elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53." Dev Biol **344**(2): 1011-1025.
- Wee, C. D., L. Kong and C. J. Sumner (2010). "The genetics of spinal muscular atrophies." Curr Opin Neurol **23**(5): 450-458.
- Wellington, C. L. and M. R. Hayden (1997). "Of molecular interactions, mice and mechanisms: new insights into Huntington's disease." Curr Opin Neurol **10**(4): 291-298.
- Whan, V., M. Hobbs, S. McWilliam, D. J. Lynn, Y. S. Lutzow, M. Khatkar, W. Barendse, H. Raadsma and R. L. Tellam (2010). "Bovine proteins containing poly-glutamine repeats are often polymorphic and enriched for components of transcriptional regulatory complexes." BMC Genomics **11**: 654.
- Wiebe, M. S., R. J. Nichols, T. P. Molitor, J. K. Lindgren and P. Traktman (2010). "Mice deficient in the serine/threonine protein kinase VRK1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia." Biol Reprod **82**(1): 182-193.
- Xie, S., Q. Wang, Q. Ruan, T. Liu, M. Jhanwar-Uniyal, K. Guan and W. Dai (2004). "MEK1-induced Golgi dynamics during cell cycle progression is partly mediated by Polo-like kinase-3." Oncogene **23**(21): 3822-3829.
- Xu, S., G. Peng, Y. Wang, S. Fang and M. Karbowski (2011). "The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover." Mol Biol Cell **22**(3): 291-300.
- Zelko, I., R. Kobayashi, P. Honkakoski and M. Negishi (1998). "Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice." Arch Biochem Biophys **352**(1): 31-36.
- Zhang, C., A. Browne, D. Child, J. R. Divito, J. A. Stevenson and R. E. Tanzi (2010). "Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein." J Biol Chem **285**(12): 8515-8526.
- Zhuang, X., E. Semenova, D. Maric and R. Craigie (2014). "Dephosphorylation of barrier-to-autointegration factor by protein phosphatase 4 and its role in cell mitosis." J Biol Chem **289**(2): 1119-1127.
- Zoghbi, H. Y. and H. T. Orr (2009). "Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1." J Biol Chem **284**(12): 7425-7429

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, mi agradecimiento más sincero es para mi director de Tesis, el Dr. Pedro A. Lazo. Gracias Pedro por permitirme estar en tu laboratorio y aprender del equipo que entonces lo formaba a tu lado. Gracias por enseñarme a trabajar bien y por confiar en mí. Gracias también a la Dra. Ana M^a Rojas Mendoza por tu aportación a este trabajo.

Los que habéis hecho posible esta tesis habéis sido mis grandes compañeros de batalla. Ángel, Ana, Sara, mil gracias por tomaros mis experimentos como vuestros y preocuparos tantísimo. Gracias por escucharme y darme tantos consejos e ideas clave, y por vuestra profesionalidad, sois los mejores. Pero sobre todo gracias por ser mis amigos desde el principio, sobre todo Ángel que me conoció cuando era un bebé en el CIC. Por todos esos momentos de puerta cerrada, vaya donde vaya siempre os echaré de menos. Gracias a Carlos, Sonia y Eugenia por vuestro buen humor y toda vuestra ayuda y apoyo, sois pilares del CIC.

Gracias a mi Patri por cuidar tanto de mí, por estar de tarde de vez en cuando para echar unos ratitos, por los flanes y demás cositas, tu sonrisa y tu buen humor, por tu gran fuerza y amistad, que me la llevo puesta también donde vaya. Espero haber aprendido mucho de ti.

A mi familia del CIC, que es muy grande: Martiña, mi madre, gracias por tu paciencia, que ahora soy capaz de valorarla más que nunca, y por confiar en que consiguiera aprender lo suficiente como para hacer cosas por mí misma. Por enseñarme todo lo que sabías tan despacio y tan bien, gracias a ti me enganché a la ciencia. A mis titos predilectos, Diana, aunque estuvimos poco tiempo, un rato hablando contigo era un rato en paz, gracias por ser tan inspiradora. David, por ayudarme y por confiar en mí para ayudarte, por enseñarme a trabajar limpio, y por todos los consejos de tito. Aún te sigo echando de menos detrás de mí. Y a mi Larousse, lo primero de todo tengo que agradecerte todos esos ataques de risa, que aún hoy me acuerdo de algunas cosas y me vuelven a dar. Gracias por haber tenido siempre tiempo de ayudarme a diseñar experimentos, y por apoyarme cuando metía la pata, y en todas las cosas dentro y fuera del laboratorio. A Marcella por todos los buenos momentos. A mis pequeñas florecillas, tan grandes ahora, que han pasado por aquí dejando un trocito de ellas, Gemon, Teresa, Eugenia, Martel. A mi hermano Nacho, por aguantar todo tipo de vientos conmigo, porque los que vengan ahora para los dos sean todos buenos. Gracias por tener siempre un momento para desahogarnos, espero que cuando nos acordemos de esto lo hagamos felices. Y a mi hermanita Eva, que va a ser una grande del 4 como mis titos y le va a ir todo genial, gracias por haberme ayudado, y por tener tanta luz. A Adrivanio por hacernos la vida más fácil con los ordenadores. A Raúl, por los buenos ratos. Y a mis amigas Helen y Patri. Gracias por millones de cosas, sobre todo ahora por haber tenido las ganas de haberos leído este tocho y haberme ayudado a entenderlo, y por acompañarme en la desesperación y en los momentos más chernobileros, y también en los más divertidos. Helen gracias por dejarme tu ordenador y no gracias por convertirme en una ardilla de frutos secos. Por confiar en mí tan bien y por seguirme enseñando a trabajar limpio, y gracias por enseñarme que pase lo que pase, hay que seguir siendo uno mismo. Y More, por enseñarme dietas alternativas, mascotas alternativas, bebidas alternativas, incluso horarios de sueño alternativos, por ser tan

pura y por enseñarme que al final, lo que hay que hacer es lo que uno quiere hacer. Gracias por tanta confianza y por unos pocos buenos ataques de risa, y por quererme tanto.

Sergio, por alimentarme con esos tomates que me han cambiado la vida. Por escuchar y apoyar siempre, por hacerme pensar y conocerme a mí misma un poco mejor. Y gracias por ser amigo, de los de verdad. Donde vaya te estaré esperando.

A mis colegas Óscar, Antonio, JAM, Sara, Curro, Santi, Elena, Alberto, Nerea y Jorge por los buenos momentos a lo largo de este tiempo, al final lo que importa son los colegas.

A mis Lengüitos, por millones de cosas. Primero gracias por acogerme en el clan, por dárme todo y hacerme sentir en casa. Por tantos momentos inolvidables, y por todos los que quedan. Pero sobre todo, por evitar que me volviera loca durante todos estos años, y por ser capaces de hacerme desconectar del todo. Yago, Ángel, Juanki, Julián, Aitor, Bea´s, Claudia, Félix, Guille, Marisa, Miguel, Nayra, Óscar, Manu, Paz, este trabajo es vuestro también. GRACIAS.

Gracias a Elena por darme un objetivo, y por enseñarme que por encima de todos los experimentos que se van a la basura, las horas en vano, los dolores de cabeza y un largo etcétera, el objetivo sigue ahí, y es lo más importante. Y gracias por las risas y los buenos ratos, y por los que quedan.

Siempre gracias a Araceli, por apostar por mí desde que me enseñaste de qué iba eso de la genética, hasta que te tuviste que leer también este tocho. Gracias por escucharme y aconsejarme, por ponerme los pies en la tierra de vez en cuando, por enseñarme que nuestros hobbies son muy importantes también y hay que cuidarlos mucho, y por ser amiga durante tantos años. Desde luego que esta tesis es también tuya.

Gracias a Arturo, en lo relativo a este tocho, por tomártela en serio conmigo desde el principio de los principios hasta el final de los finales, por ayudarme tanto que a veces te importaba a ti más que a mí, y por creer en mí sin dudar. Y gracias por tu paciencia, por cuidar muy bien de mí y por tanto apoyo, pero sobre todo gracias por levantar las manos y dejarte llevar. Vamos a por la siguiente aventura.

Y finalmente, muchas gracias a mis familias, la de Barcelona, la de Salamanca y la de Cáceres. En especial, gracias a mi tía y a mi abuela, por la fe ciega y ese "orgullo de abuelas" que siempre me ha hecho la más valiente, y a mis padres, por apoyarme y animarme a hacer lo que sea que quisiera hacer, incluso a meterme en un programa de doctorado, y por minimizar los fracasos y levantarme con tanta fuerza que casi ni me daba cuenta de que me había caído. Por enseñarme que todo se puede, y que aunque los gitanos tengamos malos principios, tenemos buenos finales.

"No te olvides de ser feliz" 