



Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Centro de Investigación del Cáncer

(CSIC-USAL)

***Regulación de la acetiltransferasa
Tip60/KAT5 por la quinasa VRK1 en la
respuesta al daño génico***

TESIS DOCTORAL

Raúl García González

Salamanca, España

2021



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

CERTIFICA:

Que la memoria de tesis doctoral titulada “**Regulación de la acetiltransferasa Tip60/KAT5 por la quinasa VRK1 en la respuesta al daño génico**”, presentada por el graduado en biotecnología **Raúl García González**, 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 ser 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 10 de junio de 2021.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena

Esta memoria ha sido realizada siendo **RAÚL GARCÍA GONZÁLEZ**, como autor de la misma, beneficiario de una ayuda destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador otorgada por la Junta de Castilla y León y cofinanciada por el Fondo Social Europeo, bajo el amparo de la Orden de 10 de noviembre de 2016.

Por su parte, la investigación en el laboratorio ha sido financiada por los siguientes proyectos:

FUNCIONES DE LA QUINASA VRK1 HUMANA EN LA PATOGÉNESIS DEL CÁNCER Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Investigador principal: Pedro A. Lazo-Zbikowski

Financiación: Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad

Referencia del proyecto: **SAF2016-75774R**

REGULACIÓN POR VRK1 DE LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA EN PATOGÉNESIS DEL CÁNCER Y NEURODEGENERACIÓN.

Investigador principal: Pedro A. Lazo-Zbikowski

Financiación: Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación

Referencia del proyecto: **PID2019-105610RB-I00**

MANIPULACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA COMO ESTRATEGIA DE LETALIDAD SINTÉTICA EN ONCOLOGÍA.

Investigador principal: Pedro A. Lazo-Zbikowski

Financiación: Consejería de Educación, Junta de Castilla y León

Referencia del proyecto: **CSI264P20**

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. ADN y cromatina	3
2. La epigenética como factor fundamental en la homeostasis celular	6
2.1. Principio mecanístico de la epigenética	7
2.2. Tipos de modificaciones epigenéticas	7
2.2.1. Metilación del ADN	7
2.2.2. Regulación del posicionamiento de los nucleosomas	9
2.2.3. Modificaciones covalentes de histonas	10
2.2.3.1. Acetilación de histonas	10
2.2.3.2. Metilación de histonas	14
2.2.3.3. Fosforilación de histonas	18
2.2.3.4. Ubiquitinación de histonas	18
2.3. Regulación del epigenoma celular	19
2.4. Epigenética asociada a diferentes procesos celulares	24
2.4.1. Replicación del genoma y epigenética	24
2.4.2. Transcripción y epigenética	24
2.4.3. Daño génico y epigenética	24
3. Daño génico	25
3.1. Agentes causantes del daño génico	25
3.1.1. Agentes exógenos del daño	25
3.1.2. Agentes endógenos del daño	26
3.2. Tipos de lesiones asociadas al daño génico	26
4. Respuesta al daño génico y epigenética	27
4.1. Reparación <i>in situ</i>	27
4.2. Reparación por escisión de bases	27
4.3. Reparación por escisión de nucleótidos	27
4.4. <i>Mismatch repair</i>	27
4.5. Reparación de roturas de cadena sencilla	28
4.6. Reparación de roturas de doble cadena	28
4.6.1. Sensibilización al daño	28
4.6.1.1. Epigenética en la sensibilización al daño	29
4.6.2. Mediación del daño	30
4.6.2.1. Epigenética en la mediación del daño	30
A. Reclutamiento de 53BP1 y promoción de la NHEJ	31
B. Reclutamiento de BRCA1 y promoción de la HR	31
4.6.3. Resolución del daño	32
4.6.3.1. Recombinación homóloga (HR)	32
4.6.3.2. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	34
4.6.3.3. Mecanismos alternativos de la resolución del daño asociado a DSBs	36
4.7. Actuales limitaciones en el conocimiento del papel de la epigenética durante la reparación del daño génico	36

5. La quinasa VRK1	37
5.1. La familia de quinasas VRK	37
5.2. Estructura de VRK1	37
5.3. Regulación de la actividad de VRK1	38
5.4. Funciones de VRK1	38
5.4.1. VRK1 como regulador epigenético	39
5.4.2. VRK1 como medidor de la respuesta al daño génico	39
5.4.3. VRK1 como modulador del desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso	40
6. La acetiltransferasa Tip60	41
6.1. La familia MYST de acetiltransferasas y estructura de Tip60	41
6.2. Funciones de Tip60	44
6.2.1. Tip60 como regulador de la transcripción	44
6.2.2. Tip60 como regulador de la DDR	46
6.3. Regulación de la actividad de Tip60	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Cultivo y manipulación de líneas celulares	57
1.1. Cultivo de líneas celulares	57
1.2. Supresión de la expresión génica mediante pequeños ARN de interferencia	57
1.3. Transfección transitoria de ADN plasmídico de expresión eucariota en líneas celulares	57
1.4. Inhibición de la actividad de proteínas y complejos proteicos en células eucariotas	58
1.4.1. Inhibición de las acetiltransferasas Tip60 y p300-CBP	58
1.4.2. Inhibición de ATM y PIKKs	58
1.4.3. Inhibición de la familia JNK	59
1.4.4. Inhibición de la síntesis proteica <i>de novo</i>	59
1.4.5. Inhibición del proteasoma	59
1.5. Inducción de daño génico	59
1.5.1. Daño génico con doxorubicina	59
1.5.2. Daño génico con radiación ionizante	59
2. Técnicas de manipulación de ADN	60
2.1. Purificación y cuantificación de ADN plasmídico a partir de bacterias <i>E. coli</i>	60
2.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa	60
2.3. Mutagénesis dirigida	61
2.4. Transformación de plásmidos en bacterias <i>E. coli</i> y secuenciación	61
3. Técnicas de manipulación de proteínas	62
3.1. Purificación de proteínas a partir de bacterias <i>E. coli</i>	62
3.2. Obtención de extractos proteicos a partir de células eucariotas en cultivo	62
3.3. Extracción de proteínas a partir de fraccionamiento nucleoplasma-cromatina	63
3.4. Extracción ácida de histonas a partir de células eucariotas en cultivo	63
3.5. Cuantificación de extractos proteicos e inmunoprecipitación de proteínas	64
3.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	64
3.7. Tinción de proteínas en gel con azul de <i>Coomassie</i>	65
3.8. Transferencia húmeda y <i>western blot</i> de proteínas	65
3.9. Tinción de proteínas en membrana con rojo <i>Ponceau</i>	66
4. Ensayos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal	66
5. Ensayos de interacción de proteínas	67
5.1. Ensayo <i>in vitro</i> de interacción de proteínas	67
5.2. Ensayo <i>in vivo</i> de interacción de proteínas	68

6. Ensayos de actividad quinasa	68
6.1. Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad quinasa	68
6.2. Ensayos <i>in vivo</i> de la actividad quinasa	69
7. Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad acetiltransferasa	69
8. Ensayos de estabilidad proteica	69
9. Estudios <i>in silico</i> de predicción de sitios de fosforilación	70
10. Programas y tests estadísticos	70
RESULTADOS	79
1. Efecto de VRK1 sobre la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 en respuesta a daño génico	81
1.1. El inhibidor de Tip60/KAT5 MG149 disminuye los niveles de H4K16ac en respuesta a daño génico	81
1.2. El silenciamiento de VRK1 mimetiza el efecto del inhibidor MG149 en respuesta a daño génico	82
2. VRK1 y la acetiltransferasa Tip60	84
2.1. Interacción de VRK1 y Tip60	84
2.1.1. VRK1 y Tip60 interaccionan <i>in vitro</i>	84
2.1.2. VRK1 y Tip60 interaccionan <i>in vivo</i> formando un complejo basal	84
2.1.3. El complejo Tip60-VRK1 se estabiliza en los primeros minutos de la respuesta a daño génico	88
2.2. Fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 en el contexto del daño génico	89
2.2.1. VRK1 fosforila a Tip60 <i>in vitro</i>	89
2.2.2. VRK1 fosforila a Tip60 <i>in vivo</i> en respuesta al daño génico	90
2.2.3. La fosforilación de Tip60 durante la DDR es independiente del agente causante del daño	92
2.2.4. La fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 y su actividad acetiltransferasa de histonas son independientes de ATM y previas a su activación	93
3. Implicaciones biológicas de la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 en respuesta a daño génico	96
3.1. La fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 modula la actividad catalítica de Tip60 a nivel de las histonas	96
3.2. La fosforilación de Tip60 asociada a VRK1 promueve la acumulación de la acetiltransferasa en la cromatina tras la inducción de daño génico	97
3.3. VRK1 protege a Tip60 de su degradación vía proteasoma	99
3.3.1. El silenciamiento de <i>VRK1</i> disminuye la vida media de Tip60 en la célula	99
3.3.2. Las ubiquitin-ligasas Mdm2 y RNF8 promueven la degradación de Tip60	100
3.3.3. Tip60 se poli-ubiquitina mediante cadenas formadas por la unión de monómeros de proteína a través de su lisina 48	101
3.3.4. VRK1 reduce los niveles de Tip60 ubiquitinada en respuesta a daño génico	102
3.4. Implicación de VRK1 en la actividad acetiltransferasa de Tip60 sobre sustratos no cromatínicos que participan en la DDR	104
3.4.1. VRK1 es fundamental para la acetilación de ATM mediada por Tip60 y su posterior activación en respuesta a daño génico	104
3.4.2. La quinasa VRK1 no es necesaria para la acetilación de p53 mediada por Tip60 durante la respuesta al daño génico	110
4. Identificación del residuo de Tip60 fosforilado por VRK1 en respuesta a daño génico	112
4.1. VRK1 no fosforila a la serina 86 ni a la serina 90 de Tip60 en el contexto del daño génico bajo las condiciones establecidas	112
4.2. Las serinas 155, 190 y 199 y la treonina 158 de Tip60 son residuos candidatos a ser fosforilados por VRK1	114
4.3. Los mutantes de Tip60 T158A y S199A no se fosforilan tras dos horas de inducción de daño génico con doxorubicina	116

4.4. La treonina 158 y la serina 199 son los únicos residuos de Tip60 fosforilados en respuesta a daño génico	117
4.5. La fosforilación en la T158 de Tip60 es previa a la fosforilación de la S199 durante la respuesta al daño génico	118
4.6. La fosforilación de Tip60 en su residuo S199 es dependiente de la fosforilación previa en la T158 pero no viceversa	119
4.7. VRK1 fosforila a Tip60 en la T158 pero no en la S199 durante la respuesta al daño génico	119
4.8. La fosforilación de la S199 de Tip60 durante la respuesta al daño génico no es llevada a cabo por ATM ni por miembros de la familia de quinasas JNK	121
5. Caracterización de las fosforilaciones de Tip60 identificadas en respuesta a daño génico	123
5.1. Efecto de las fosforilaciones en la treonina 158 y la serina 199 sobre la estabilidad de Tip60 ...	123
5.2. Implicación de las fosforilaciones en la T158 y S199 en la unión de Tip60 a la cromatina	127
5.3. Efecto de las fosforilaciones en la T158 y S199 sobre la actividad acetiltransferasa de Tip60 ..	128
5.3.1. Efecto de las fosforilaciones en la T158 y S199 sobre la autoacetilación de Tip60	129
5.3.2. Efecto de las fosforilaciones en la T158 y S199 de Tip60 sobre la acetilación de la H4K16 durante la DDR	130
5.3.3. Implicación de la fosforilación de Tip60 sobre sus residuos T158 y S199 en la acetilación de ATM	131
6. Efecto de mutantes patogénicos de VRK1 sobre la fosforilación de Tip60/KAT5 a lo largo de la respuesta al daño génico	133
DISCUSIÓN	135
1. Papel de VRK1 en el desarrollo de la respuesta al daño génico a través de la fosforilación de Tip60	138
2. Implicaciones de la fosforilación mediada por VRK1 sobre el comportamiento de Tip60 a lo largo de la respuesta al daño génico	141
3. Identificación de los residuos de fosforilación de Tip60 durante la respuesta al daño génico	146
4. Efecto de las fosforilaciones de Tip60 identificadas sobre la funcionalidad de la acetiltransferasa a lo largo de la DDR	149
5. Defectos de la reparación del daño génico en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas asociadas a VRK1	154
6. VRK1 como regulador del epigenoma celular. Perspectivas futuras	156
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
AGRADECIMIENTOS	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Información sobre el genoma de diferentes organismos modelo y del <i>H. sapiens</i>	3
Tabla 2: Listado e información sobre las diferentes variantes de histonas canónicas existentes	5
Tabla 3: <i>Writers</i> y <i>erasers</i> implicados en la acetilación y deacetilación de histonas canónicas	12
Tabla 4: <i>Writers</i> y <i>erasers</i> implicados en la metilación y demetilación de histonas canónicas	17
Tabla 5: Miembros de la familia de acetiltransferasas MYST en los principales organismos modelo	41
Tabla 6: Nombre y principales características de las líneas celulares utilizadas en este trabajo	71
Tabla 7: Listado y uso de oligonucleótidos utilizados en la tesis doctoral	72
Tabla 8: Listado de los plásmidos de ADN recombinante utilizados en la tesis doctoral y sus aplicaciones	73
Tabla 9: Información de los diferentes inhibidores utilizados en la tesis doctoral	76
Tabla 10: Lista de los anticuerpos empleados en la tesis doctoral con su correspondiente dilución para <i>western blot</i> e inmunofluorescencia	76
Tabla 11: Lista de los anticuerpos secundarios empleados en la tesis doctoral para <i>western blot</i> e inmunofluorescencia	78
Tabla 12: <i>Scores</i> asignados por la herramienta bioinformática <i>NetPhos 3.1</i> . a diferentes residuos de Tip60 candidatos a ser fosforilados por algún miembro de la familia de las caseína quinasas 1	115
Tabla 13: <i>HTP</i> y <i>LTP Scores</i> asignados por la herramienta bioinformática <i>Phosphosite Plus</i> a diferentes residuos de Tip60	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metilación de la citosina	8
Figura 2: Acetilación/deacetilación de lisinas	10
Figura 3: Metilación/demetilación de histonas	14
Figura 4: Representación de los diferentes <i>crossstalks</i> en cis y <i>crossstalks</i> en trans existentes entre diferentes modificaciones epigenéticas de histonas	20
Figura 5: Sucesión de eventos derivados del epigenoma celular responsables del mantenimiento de la homeostasis celular frente a la alteración de dichos eventos como consecuencia de una desregulación del epigenoma	21
Figura 6: Dualidad de reguladores epigenéticos como oncoproteínas y proteínas supresoras de tumores	23
Figura 7: Mecanismos de resolución de DSBs asociados al proceso de HR	33
Figura 8: Mecanismos de resolución de DSBs asociados al proceso de NHEJ	35
Figura 9: Representación esquemática de la estructura de la quinasa humana VRK1	37
Figura 10: Mutaciones de VRK1 asociadas a pacientes con enfermedades neurodegenerativas y su localización a lo largo de la estructura de VRK1	40
Figura 11: Mecanismo catalítico <i>ping-pong</i> propuesto para la acetilación de sustratos por parte de la familia de acetiltransferasa MYST	42
Figura 12: Estructura de Tip60 y del complejo NuA4	43
Figura 13: Papel de Tip60 en la determinación del destino celular dependiente de la ruta de transducción de p53	45
Figura 14: El inhibidor de Tip60 MG149 reduce significativamente los niveles de H4K16ac	81
Figura 15: El silenciamiento de <i>VRK1</i> mimetiza el efecto de MG149 sobre la H4K16ac	82
Figura 16: Papel de la actividad quinasa de VRK1 sobre la acetilación de la H4K16 en respuesta a daño génico	83
Figura 17: Interacción <i>in vitro</i> de VRK1 y Tip60	84
Figura 18: Interacción <i>in vivo</i> de Tip60-V5 y VRK1 endógeno	85
Figura 19: Interacción <i>in vivo</i> de Tip60 endógeno y VRK1 endógeno	86
Figura 20: Análisis de la región de interacción de VRK1 con Tip60	87
Figura 21: Interacción de Tip60-V5 con VRK1 catalíticamente inactiva	87
Figura 22: Dinámica de interacción de Tip60 y VRK1 en respuesta a daño génico	88
Figura 23: Fosforilación <i>in vitro</i> de Tip60 por VRK1	89
Figura 24: Fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico	90
Figura 25: VRK1 es responsable de la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño	91
Figura 26: La actividad quinasa de VRK1 es imprescindible para la fosforilación de Tip60 en el contexto del daño génico	92
Figura 27: Tip60 se fosforila tras el tratamiento con radiación ionizante	92
Figura 28: La fosforilación de Tip60 es independiente de ATM	93
Figura 29: La fosforilación de Tip60 en respuesta a daño depende de VRK1 en células <i>ATM</i> ^{-/-}	94

Figura 30: La inhibición de ATM no interfiere con la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico	94
Figura 31: La acetilación de la H4K16 en respuesta a daño no depende de ATM	95
Figura 32: La fosforilación de Tip60 y la acetilación de la H4K16 en respuesta a daño siguen cinéticas similares	96
Figura 33: El silenciamiento de <i>VRK1</i> previene la actividad de Tip60 <i>in vitro</i>	97
Figura 34: El silenciamiento de <i>VRK1</i> imposibilita la autoacetilación de Tip60	97
Figura 35: <i>VRK1</i> promueve la acumulación nuclear de Tip60 en respuesta a daño génico	98
Figura 36: <i>VRK1</i> posibilita la acumulación de Tip60 en la cromatina en respuesta a daño génico	98
Figura 37: Tip60 interacciona con las subpoblaciones nucleoplasmática y cromatínica de <i>VRK1</i>	99
Figura 38: El silenciamiento de <i>VRK1</i> favorece la degradación de Tip60 vía proteasoma	100
Figura 39: Diferentes ubiquitin-ligasas promueven la degradación vía proteasoma de Tip60	101
Figura 40: RNF8 ubiquitina a Tip60 para promover su degradación proteasomal	101
Figura 41: Cadenas de poli-ubiquitina formadas por uniones de monómeros a través de sus lisinas 48 marcan a Tip60 para su degradación	102
Figura 42: <i>VRK1</i> protege a Tip60 de la ubiquitinación en respuesta a daño génico	103
Figura 43: La inhibición de la actividad catalítica de Tip60 impide la autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico	104
Figura 44: La acetilación de ATM es necesaria para su posterior autofosforilación en respuesta a daño génico	105
Figura 45: <i>VRK1</i> es necesario para la fosforilación de ATM en respuesta a daño génico	106
Figura 46: El silenciamiento de <i>VRK1</i> impide la acetilación y posterior autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico	107
Figura 47: La acetilación de ATM mediada por Tip60 es previa e independiente a la autofosforilación de la quinasa	108
Figura 48: La acetilación y la autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico dependen de la actividad quinasa de <i>VRK1</i>	108
Figura 49: La fosforilación de Tip60 mediada por <i>VRK1</i> es necesaria para la fosforilación de sustratos de ATM durante la DDR	110
Figura 50: La actividad quinasa de <i>VRK1</i> es necesaria para la función de ATM durante la DDR	110
Figura 51: <i>VRK1</i> no interfiere en la acetilación de p53 mediada por Tip60 durante la respuesta al daño génico	111
Figura 52: Mutantes de Tip60 no fosforilables en la S86 o S90 mantienen la interacción con <i>VRK1</i> de forma idéntica a Tip60 <i>wild type</i>	112
Figura 53: Fosforilación <i>in vitro</i> de mutantes S86A y S90A por <i>VRK1</i>	113
Figura 54: Fosforilación <i>in vivo</i> de mutantes S86A y S90A de Tip60 por <i>VRK1</i>	114
Figura 55: Análisis de expresión de los mutantes de Tip60 S155A, T158A, S190A y S199A generados por mutagénesis dirigida y transfectados en células A549 a diferentes dosis crecientes	116
Figura 56: Análisis de la fosforilación de diferentes mutantes de Tip60 en respuesta a daño génico	116
Figura 57: Análisis de expresión de los mutantes simples de Tip60 T158D y S199D y los dobles mutantes T158A/S199D, T158D/S199A, T158A/s199A y T158D/S199D	117
Figura 58: Análisis de la fosforilación de mutantes de Tip60 para los residuos T158 y S199	117

Figura 59: Estudio de la fosforilación en dobles mutantes de Tip60	118
Figura 60: Análisis de la fosforilación de los residuos T158 y S199 de Tip60 a lo largo del tiempo durante la DDR	118
Figura 61: Estudio de la interdependencia existente entre las fosforilaciones de los residuos T158 y S199 de Tip60 durante la DDR	119
Figura 62: VRK1 es responsable de la fosforilación de la T158 y no de la S199 de Tip60 en respuesta a daño génico	120
Figura 63: VRK1 no es necesario para la cinética de fosforilación de la S199 en Tip60-T158D pero es fundamental para la fosforilación del mutante S199D a lo largo de la DDR	120
Figura 64: ATM no fosforila a la S199 de Tip60 en respuesta a daño génico	121
Figura 65: JNK no fosforila a la S199 de Tip60 durante la DDR	122
Figura 66: Efecto de VRK1 sobre la estabilidad de mutantes de Tip60	123
Figura 67: La fosforilación de la T158 de Tip60 interviene en la estabilidad de la acetiltransferasa	124
Figura 68: La fosforilación de la T158 previene la degradación de Tip60 vía proteasoma	125
Figura 69: La fosforilación de la T158 protege a Tip60 de su ubiquitinación	126
Figura 70: La fosforilación en la T158 es responsable de la acumulación de Tip60 en la cromatina durante la DDR	127
Figura 71: La fosforilación en la S199 es suficiente para inducir la actividad acetiltransferasa de Tip60 <i>in vitro</i>	128
Figura 72: La fosforilación en la S199 posibilita la autoacetilación de Tip60 en respuesta a daño	129
Figura 73: Las fosforilaciones en la T158 y S199 son necesarias para la acetilación de la H4K16 por Tip60 en respuesta a daño génico	131
Figura 74: La acetilación de ATM durante la DDR depende de una doble fosforilación de Tip60 en sus residuos T158 y S199	132
Figura 75: Variantes neuropatogénicas de VRK1 no fosforilan a Tip60 en respuesta a daño génico	133
Figura 76: Representación esquemática que muestra el papel que podría tener la inhibición de VRK1 en terapias combinadas para el tratamiento de tumores que hayan desarrollado resistencia primaria o adquirida al tratamiento con quimio o radioterapia	140
Figura 77: Representación esquemática de las principales funciones que VRK1 y Tip60 desempeñan durante la respuesta al daño génico	143
Figura 78: Representación esquemática de las dinámicas de fosforilación de Tip60 <i>wild type</i> y diferentes mutantes de Tip60 en respuesta a daño génico tanto en presencia como en ausencia de VRK1	148
Figura 79: Esquema del modelo planteado acerca de la estabilización de Tip60 en respuesta a daño mediada por la fosforilación de la T158 a través de VRK1	151
Figura 80: Esquema del modelo planteado en este trabajo acerca de la regulación que VRK1 ejerce sobre Tip60 a lo largo de la DDR	153
Figura 81: Modelo de regulación de la acetilación de la H4K16 mediada por VRK1	156
Figura 82: Modelo hipotético de la regulación ejercida por VRK1 sobre el <i>crosstalk</i> existente entre la acetilación de la H4K16 y la dimetilación de la H4K20	157
Figura 83: Modelo hipotético de la regulación ejercida por VRK1 sobre el <i>crosstalk</i> existente entre la acetilación de la H4K16 y la trimetilación de la H3K36 durante la DDR	157

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

Ac-CoA: acetil-coenzima A
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADP: adenosina difosfato
a-EJ: *alternative end joining*
APS: persulfato amónico
ARN: ácido ribonucleico
ARNi: ARN de interferencia
ARN pol II: ARN polimerasa II
ATF2: *activating transcription factor 2*
ATM: *ataxia-telangiectasia mutated*
ATR: *ataxia-telangiectasia and Rad3 related protein kinase*
ATP: adenosina trifosfato

B

BAB: dominio básico-ácido-básico
BAF: *barrier-to-autointegration factor*
BARD1: *BRCA1-associated RING domain protein 1*
BER: *base excision repair*
BRCA1: *breas cancer associated 1*
BRD: bromodominio
BSA: *bovine serum albumin*

C

CDKs: quinasas dependientes de ciclinas
CENP-A: *histone H3-like centromeric Protein A*
CHD: *chromodomain-helicase-DNA binding*
CK1: *casein kinase 1*
CREB: *CRE-binding protein*
CtIP: *CtBP interacting protein*

D

DAPI: 4', 6'-diamidino-2-fenilindol
DBD: *DNA-binding domain*
DDR: *DNA damage response*
DMEM: *Dulbecco's modified-Minimum Essential Medium*
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA-PKcs: *DNA-dependent protein Kinase, catalytic subunit*
DNMTs: *DNA methyltransferases*
DSB: double-strand breaks
DTT: ditotreitól

E

EDTA: ácido etilenediamina Tetracético
EP300: *E1A-associated protein p300*

F

FAD: flavin adenine dinucleótido
FBS: *fetal bovine serum*

G

g: fuerza de la gravedad
GDP: guanosina difosfato
GNAT: *GCN5-related N-Acetyltransferase*

H

H2A.Bbd: *H2A Barr body deficient*
HATs: acetiltransferasas de histonas
HDACs: deacetilasas de histonas
HDMs: demetilasas de histonas
HJ: uniones *Holliday*
HR: *homologous recombination*
HSA: *helicase-SANT*

I

IF: inmunofluorescencia

INO80: *inositol requiring 80*

IP: inmunoprecipitación

IR: radiación ionizante

ISWI: *imitation switch*

J

JMJC: *Jumonji C*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

K

KAT: lisina acetiltransferasa

kDa: kiloDalton

KDMs: demetilinas de lisina

L

LSDs: demetilinas lisina-específicas

M

M: molar

MAPKs: *mitogen-activated protein kinases*

MDC1: *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

MEK1: *mitogen-activated protein kinase 1*

MMR: *mismatch repair*

Mre11: *meiotic recombination 11*

MRN: complejo Mre11-Rad50-NBS1

MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60

N

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido

NBS1: *Nijmegen breakage syndrome 1*

ncARNs: ARNs no codificantes

NER: *nucleotide excision repair*

NES: *nuclear exportation signal*

NHEJ: *non-homologous end joining*

NLS: *nuclear localization signal*

P

PARP: *poly-ADP ribose polymerase*

PBS: *phosphate buffer salinum*

PCNA: *ploriferating cell nuclear antigen*

PIC: complejo de pre-iniciación

PIKK: *phosphoinositole 3-kinase-like Kinases*

PKMTs: metiltransferasas de lisina

Plk: *polo-like kinase*

PMSF: *phenyl methyl mulfonyl fluoride*

PRC1: complejo repressor *Polycomb 1*

PRMTs: metiltransferasas de arginina

R

Ran: *Ras-associated nuclear protein*

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPA: *replication protein A*

rpm: revoluciones por minuto

S

SAGA: *Spt-Ada-GCN5 acetyltransferase*

SAH: S-adenosil-homocisteína

SAHA: *suberoylanilide hydroxamic acid*

SAM: S-adenosil-metionina

SDS: sulfato dodecil sódico

SDS-PAGE: *SDS-polyacrilamide gel Electrophoresis*

SEC: complejo de superelongación

ARNi: pequeño ARN de interferencia

SIRT: sirtuinas

SSA: *single strand annealing*

SSB: *single-strand breaks*

SWI/SNF: *switch/sucrose-non-fermenting*

T

TBS-T: *Tris buffer salinum-Tween-20*

Tip60: *Tat-interactive protein 60 kDa*

TSH2B: *testis-specific histone H2B*

U

UV: radiación ultravioleta

u.a.: unidades arbitrarias

V

VRK: *Vaccinia-related kinase*

W

WB: *western blot*

Otras abreviaturas

53BP1: *p53-binding protein 1*

INTRODUCCIÓN

1. ADN Y CROMATINA

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la biomolécula constituyente del material genético, responsable de posibilitar todos los procesos biológicos de la célula y de transmitir dicha información genética a la descendencia (Avery et al., 1944). Teniendo en cuenta esto, se puede entender el genoma como la totalidad del material genético asociado al ADN que posee una célula, incluyendo no sólo las regiones codificantes (que, por ejemplo, en el caso del ser humano -tabla 1- constituyen únicamente el 1-1,5% del genoma), sino también aquellas regiones no codificantes. Entre estas últimas se incluyen los intrones (25% del genoma), secuencias de ADN repetitivo y duplicado (60%) y pseudogenes (14-13,5%), siendo todas ellas fundamentales para regular la expresión diferencial de las regiones codificantes de acuerdo con las necesidades celulares (Makalowski, 2001). Además, en el caso de células eucariotas, el genoma incluye tanto el ADN nuclear como el ADN contenido en diferentes orgánulos celulares de origen procariota, como mitocondrias o plastos.

Tabla 1. Información sobre el genoma de diferentes organismos modelo y del *H. sapiens*. Datos obtenidos a partir de la base de datos genómica del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con referencias R64 (*S. cerevisiae*), WBcel235 (*C. elegans*), Release 6 plus ISO1 MT (*D. melanogaster*), GRCm39 (*M. musculus*) y GRCh38.p13 (*H. sapiens*) y del proyecto GENCODE, orientado a identificar y caracterizar de forma precisa todos los genes de las especies *H. sapiens* y *M. musculus* (Frankish et al., 2019).

CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE ORGANISMOS MODELO					
Organismo	Tamaño (Mb)	Región codificante (%)	Nº de genes codificantes	Nº de cromosomas	Contenido C+G (%)
<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)	12	70	~ 6.000	16	38,4
<i>C. elegans</i> (Nemátodo)	97	25	~ 19.000	6	35,5
<i>D. melanogaster</i> (Mosca de la fruta)	180	13	~ 13.600	4	42,1
<i>M. musculus</i> (Ratón)	3.000	1 - 1,5	~ 22.000	20	42,5
<i>H. sapiens</i> (Ser humano)	3.000	1 - 1,5	~ 19.800	23	40,4

El ADN nuclear, también denominado ADN cromosómico, se encuentra formando parte de la cromatina, una estructura ribonucleoproteica altamente compleja y conservada en organismos eucariotas que posibilita su empaquetamiento en el interior del núcleo de forma totalmente organizada (Li y Zhu, 2015). Las unidades estructurales básicas de la cromatina son los nucleosomas (Kornberg, 1974), los cuales están conformados por octámeros de proteínas histonas en torno a los cuales se acopla una sección de ADN de 146 pares de bases. Esto es posible gracias a las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato (carga negativa) del ácido desoxirribonucleico y los residuos de lisina (carga positiva) de las proteínas. De esta manera, el ADN se estabiliza alrededor de dicho octámero, en torno al cual gira 1,65 veces, formando lo que se conoce como *core* del nucleosoma. Las histonas que conforman dicho octámero son 4 (H2A, H2B, H3 y H4), de forma que cada una de éstas aparece por duplicado en el complejo formando heterodímeros (2 heterodímeros de H2A-H2B y 2 heterodímeros de H3-H4). Durante la formación de los nucleosomas en la fase S del ciclo celular, a lo largo de la cual la replicación del ADN tiene lugar, cada uno de los heterodímeros H2A-H2B se incorpora de manera independiente al complejo, mientras que los dímeros H3-H4 forman previamente un tetrámero a través de la interacción de las histonas H3 que contiene cada uno de ellos. Una vez formado, este tetrámero se une a cada uno de los dímeros mediante interacciones H2B-H4, lo cual estabiliza el *core* del nucleosoma. Cada uno de estos octámeros de histonas están separados entre sí por una sección de ADN de 20 pares de bases envuelto alrededor de una quinta histona H1, seguido de otra sección de ADN espaciador libre de unos 50 pares de bases de longitud. Todo ello conforma una fibra de cromatina de unos 10 nm de diámetro, lo cual posibilita reducir la longitud del ADN nuclear unas 6 veces. En este punto, la fibra de cromatina de 10 nm experimenta a su vez un nuevo grado de empaquetamiento a través de interacciones entre histonas H1 para generar así una fibra de cromatina de 30 nm de diámetro mucho más reducida en longitud.

Posteriormente, a partir de plegamientos de la fibra de 30 nm sobre sí misma, se constituye la conocida como eucromatina, una estructura que, ahora sí, garantiza el mantenimiento del material genético en el núcleo celular al mismo tiempo que posibilita el desarrollo de procesos biológicos tales como la transcripción, replicación del ADN o reparación de lesiones génicas. La eucromatina constituye alrededor del 90% del material genético durante la interfase celular. El 10% de material genético restante es heterocromatina, la cual se caracteriza por presentar un grado de compactación aún mayor. Esta región es transcripcionalmente inactiva y contiene secuencias de ADN altamente repetitivas (Babu y Verma, 1987). Finalmente, cuando las células entran en mitosis, la totalidad de la cromatina experimenta el mayor grado de compactación posible, lo cual genera los cromosomas metafásicos, en los cuales el ADN se encuentra condensado unas 10.000 veces (Batty y Gerlich, 2019).

Las 4 histonas que forman parte del *core* del nucleosoma son el resultado de la evolución a partir de un único precursor evolutivo y, por lo tanto, presentan una estructura altamente conservada. Dicha estructura se caracteriza por presentar un dominio de ensamblaje central (*histone-fold domain*) que permite la unión entre histonas para formar los octámeros y que está formado por tres hélices α (α 1, de 11 aminoácidos; α 2, de 27 aminoácidos; y α 3, de 11 aminoácidos) separadas entre sí por dos pequeños bucles (L1 y L2) de 10 y 8 aminoácidos, respectivamente (Arents y Moudrianakis, 1995; Baxevanis et al., 1995). Así, la diferencia entre cada una de las 4 histonas viene determinada principalmente por sus extremos C'- y N'- terminales, de longitud variable, que quedan expuestos hacia el exterior de los nucleosomas.

Junto con las histonas canónicas ya mencionadas, sintetizadas e incorporadas en el nucleosoma durante la fase S del ciclo celular, en organismos superiores, el proceso evolutivo ha permitido diversificar aún más la familia de histonas. Así, han apareciendo otras variantes que, ocasionalmente, pueden sustituir a alguna de las canónicas y pasar a formar parte de los nucleosomas, esta vez de forma independiente a la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula (Henikoff y Smith, 2015) (tabla 2). Multitud de estudios sobre las histonas alternativas identificadas han demostrado que éstas están implicadas en la regulación de diversos procesos celulares, logrando una adaptación, diferenciación y control exhaustivos de la estructura de la cromatina en función de los requerimientos celulares en cada momento. Para la histona H3 se han descrito un total de 8 variantes diferentes: CENP-A, H3.2, H3.3, H3.1 (específica de mamíferos), H3.1t y H3.5 (específicas de testículos de mamíferos) y H3.X y H3.Y (únicas de primates). De entre todas ellas, cabe destacar la función de CENP-A, que sustituye a la histona H3 canónica a nivel de los centrómeros, jugando un papel fundamental para la correcta unión de los microtúbulos que forman el huso acromático a los cinetocoros, de forma que la segregación de los cromosomas sea óptima durante la mitosis (Amor et al., 2004). La histona H3.3, por su parte, es capaz de incorporarse en los nucleosomas de forma progresiva a lo largo de la vida celular, llegando a representar en torno al 25% de la histona H3 total presente en la cromatina en células diferenciadas que no se dividen. Esta variante es importante en la regulación de la transcripción al incorporarse principalmente en aquellas regiones que son transcripcionalmente activas con el fin de inducir cambios conformacionales en la cromatina que favorezcan el proceso (Schwartz y Ahmad, 2005). En cuanto al resto de variantes de la histona H3, no existen datos definitivos acerca de sus funciones tras su incorporación a los nucleosomas, aunque se piensa que también están implicadas en regular la transcripción de forma más precisa (Hake y Allis, 2006; Schenk et al., 2011).

Por su parte, la histona H2B cuenta con dos variantes no canónicas, ambas específicas de testículos: H2BFWT (también llamada H2B.W) y TSH2B (también llamada H2B tipo 1A), mientras que para la histona H2A se han descrito un total de 7 variantes: H2A.X, H2A.Z.1, H2A.Z.2, H2A.Bbd (también llamada H2A.B, única de vertebrados), macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2 (estas tres últimas con un extremo C-terminal extendido que forma un dominio globular y únicas de vertebrados). De entre todas ellas, caben destacar las variantes H2A.Z.1 y H2A.Z.2, esenciales para el correcto desarrollo de la mayoría de los organismos. Ambas muestran diferentes patrones de distribución en la cromatina (Redon et al., 2002) y se han asociado a gran variedad de procesos nucleares, tales como activación o represión transcripcional, conformación de la heterocromatina, control del ciclo celular, segregación cromosómica o reparación del daño génico (Henikoff y Smith, 2015). Por su parte, la histona H2A.X, tal y como se explicará en detalle más adelante, juega un papel fundamental en la reparación de roturas de doble cadena en el ADN.

Por último, cabe destacar que para la histona H4 no se han descrito variantes no canónicas en organismos eucariotas superiores.

Tabla 2. Listado e información sobre las diferentes variantes de histonas canónicas existentes.

TABLA DE VARIANTES HISTONAS DEL CORE NUCLEOSOMAL				
HISTONA CANÓNICA	VARIANTE	FUNCIÓN	ORGANISMOS	LOCALIZACIÓN EN LA CROMATINA
H3	cenH3 (CENP-A en <i>H. sapiens</i>)	Estabilizar huso mitótico Segregación de los cromosomas	Eucariotas	Centrómeros de los cromosomas
	H3.1	Sin función específica conocida	Mamíferos	Heterocromatina
	H3.2	Sin función específica conocida	Eucariotas (excepto levaduras)	Heterocromatina
	H3.3	Reemplazamiento de H3 en fases de no replicación del ADN Regulación transcripcional	Eucariotas	Favorablemente eucromatina
	H3.1t	Sin función específica conocida Espermatogénesis	Mamíferos (testículos)	Desconocida
	H3.X	Control de la progresión del ciclo celular	Primates	Ubicua
	H3.Y	Control de la progresión del ciclo celular	Primates	Ubicua
	H3.5	Espermatogénesis	Mamíferos (testículos)	Favorablemente eucromatina
H2B	H2BFWT (H2B.W)	Espermatogénesis	Primates (testículos)	Telómeros
	TSH2B (H2B tipo 1)	Espermatogénesis	Mamíferos (testículos)	Heterocromatina pericéntrica. Nucleoprotamina
H2A	H2A.X	Respuesta al daño génico	Eucariotas	Roturas de doble cadena
	H2A.Z.1	Regulación transcripcional Control del ciclo celular Segregación cromosómica Respuesta al daño génico	Eucariotas	Ubicua
	H2A.Z.2	Regulación transcripcional Control del ciclo celular Segregación cromosómica Respuesta al daño génico	Eucariotas	Ubicua
	H2A.Bbd (H2A.B)	Regulación transcripcional	Vertebrados	Favorablemente eucromatina
	macroH2A1.1	Represión transcripcional Silenciamiento del cromosoma X	Vertebrados	Heterocromatina
	macroH2A1.2	Represión transcripcional Silenciamiento del cromosoma X	Vertebrados	Heterocromatina
	macroH2A2	Represión transcripcional Silenciamiento del cromosoma X	Vertebrados	Heterocromatina

La histona H1, a pesar de no formar parte del *core* del nucleosoma, también cuenta con una serie de variantes que pueden ser incorporadas en la región espaciadora de los nucleosomas sustituyendo a la histona canónica. Estas variantes se diferencian fundamentalmente en la longitud y composición de la cola C-terminal de la proteína, la cual juega un papel imprescindible en la estabilización de la cromatina (John P. H. Th'ng et al., 2005). Un total de 11 variantes de H1 han sido descritas para el ser humano: H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 y H1.X, expresadas en células somáticas únicamente durante la fase S del ciclo celular, H1.0, con capacidad de ser expresada e incorporada a la cromatina en cualquier fase del ciclo de células somáticas, llegando a constituir hasta el 80% de la histona H1 total presente en células diferenciadas, H1T, H1T2, H1LS1, únicamente expresadas en las células espermáticas y H1oo, propia de los oocitos (Happel y Doenecke, 2009). Teniendo en cuenta esto, se cree que las células son capaces de incorporar distintas variantes de histonas H1 en los nucleosomas en función de sus requerimientos celulares para así llevar a cabo un control preciso de la transcripción celular. Sin embargo, las funciones específicas que cada una de éstas ejercen en la regulación transcripcional están aún poco estudiadas (Biterge y Schneider, 2014).

Tal y como se ha descrito en los párrafos anteriores, la gran variedad de histonas existente juega un papel fundamental en la regulación de la estructura cromatínica y, por consiguiente, en la correcta regulación de la funcionalidad genómica. En base a esto, la incorporación de unas u otras variantes y las posteriores remodelaciones y modificaciones de la cromatina asociadas a cada una de ellas constituyen un proceso altamente regulado. De hecho, alteraciones en este proceso pueden conducir al desarrollo de cáncer y otras enfermedades. Así, por ejemplo, mutaciones en la histona H3.3 se asocian con el desarrollo de glioblastoma infantil (Liu et al., 2014), mientras que una sobreexpresión de esta misma variante se asocia al desarrollo de cáncer de esófago (Graber et al., 1996). Por otro lado, en determinados melanomas se ha observado una pérdida de expresión de histonas macroH2A, mientras que el restablecimiento de sus niveles suprime el desarrollo de metástasis (Kapoor et al., 2010). Niveles elevados de H2A.Z se asocian a un mal pronóstico en cáncer de mama estrógeno positivo (Hua et al., 2008) y la sobreexpresión de la histona centromérica CENP-A puede resultar en el desarrollo de ciertas aneuploidías asociadas a diferentes tipos de cáncer (Dalal, 2009). Por último, mutaciones o alteraciones en los niveles de expresión de la histona H2A.X pueden conducir a una reparación defectiva del daño génico, promoviendo la aparición y acumulación de nuevas mutaciones asociadas al desarrollo de cáncer (Banáth et al., 2004; Yu et al., 2006).

Hasta ahora, se ha mostrado el papel que las histonas tienen en el mantenimiento de la homeostasis celular a través de la regulación de la estructura cromatínica y la consecuente modulación de la funcionalidad genómica. El mecanismo específico por el cual las diferentes variantes de histonas regulan de forma precisa esta estructura cromatínica y los diferentes procesos asociados a ella viene determinado por la epigenética, aspecto que se desarrolla de forma específica en el siguiente apartado.

2. LA EPIGENÉTICA COMO FACTOR FUNDAMENTAL EN LA HOMEOSTASIS CELULAR

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el genoma contiene toda la información genética necesaria para el desarrollo de los procesos celulares. La transmisión de dicha información genética durante la división celular ha de realizarse de forma fehaciente, asegurando que ésta no se vea alterada durante el proceso para posibilitar un correcto desarrollo de las células hijas. Esto implica, desde un punto de vista general, que todas las células de un mismo organismo van a presentar el mismo genoma y, consecuentemente, la misma información genética. Sin embargo, cada una de ellas ha de ser capaz de diferenciarse en un tipo celular específico así como de responder y adaptarse de forma individual a su entorno. Estos procesos de especialización y acomodación celular están determinados por el epigenoma, que se define como el conjunto de modificaciones químicas y cambios en la disposición de la cromatina heredables que no afectan a la secuencia nucleotídica del ADN y que posibilitan la adaptación de la célula a las condiciones específicas en las que se encuentra en cada momento (Goldberg et al., 2007). Teniendo en cuenta esto, cabe destacar que, a diferencia del genoma, que es idéntico para cada una de las células que conforman un organismo, el epigenoma es único y específico de cada célula. Dicho de otra manera, mientras el genoma aporta individualidad a cada uno de los organismos de una especie, el epigenoma aporta individualidad a cada una de las células de un organismo. Además, el epigenoma de una célula varía significativamente en función de las condiciones en las que se encuentra sometida en cada momento.

2.1. PRINCIPIO MECANÍSTICO DE LA EPIGENÉTICA

El mecanismo de acción por el cual el epigenoma posibilita la adaptación y homeostasis celulares consiste en modular, a través de las marcas epigenéticas que lo definen en cada momento, tanto la estructura de la cromatina como las interacciones que ésta establece con diferentes proteínas. Como resultado, la cromatina adquiere una conformación espacial y temporal específica que va a permitir el desarrollo preciso, controlado y eficiente de diferentes procesos celulares, tales como la replicación del ADN, la regulación transcripcional o la reparación del daño génico (Greally, 2018).

2.2. TIPOS DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

A lo largo del tiempo se han descrito diferentes modificaciones químicas y estructurales de la cromatina que contribuyen a establecer el epigenoma de una célula. Las principales modificaciones epigenéticas existentes son la metilación del ADN, los cambios en el posicionamiento de los nucleosomas, las modificaciones covalentes de histonas y las modificaciones asociadas a ARNs no codificantes (ncRNAs, de sus siglas en inglés). Algunas de estas modificaciones, tales como la metilación del ADN o las modificaciones covalentes de histonas, dependen de la actividad de diferentes enzimas y complejos proteicos encargados de incorporar, eliminar y “leer” la propia modificación epigenética. Así, según la función que ejerzan, estos moduladores epigenéticos se clasifican en tres grandes grupos: *writers*, *readers* y *erasers* (Biswas y Rao, 2018). En primer lugar, los *writers* son aquellos moduladores epigenéticos responsables de promover la incorporación de una modificación epigenética concreta sobre la cromatina. Por lo tanto, estos *writers* están representados por enzimas capaces de catalizar modificaciones químicas tales como la metilación del ADN o la metilación, acetilación, fosforilación, sumorilación y otras modificaciones covalentes de histonas. Por su parte, los *readers* son capaces de reconocer dicha modificación y desencadenar una determinada respuesta celular. En este sentido, los *readers* pueden ser tanto enzimas como proteínas y complejos proteicos que no desarrollan ninguna actividad catalítica pero que tienen capacidad para modificar la estructura cromatínica tanto por sí mismos como a través del reclutamiento de modificadores de la cromatina adicionales. En cualquier caso, todos los *readers* de una determinada modificación epigenética se van a caracterizar por contar con un dominio específico altamente conservado (como, por ejemplo, cromodominios, bromodominios, etc.) capaz de reconocer dicha modificación. Por último, los *erasers* son los responsables de revertir una determinada modificación epigenética cuando las condiciones celulares así lo requieran. Así, los *erasers* constituyen proteínas con actividades enzimáticas opuestas a los *writers*.

2.2.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de las citosinas de los desoxirribonucleótidos, formando 5-metil citosinas (figura 1). Este proceso está catalizado por las denominadas ADN metiltransferasas (DNMTs, de sus siglas en inglés), que constituyen los *writers* de esta modificación epigenética y utilizan a la S-adenosil-metionina (SAM) como donador del grupo metilo. La actividad catalítica de las DNMTs se concentra principalmente en citosinas localizadas en dinucleótidos CpG que, a su vez, suelen acumularse de forma repetitiva en las denominadas islas CpG (propias de regiones promotoras y/o del primer exón), así como en regiones del genoma portadoras de elementos transponibles (transposones). Como resultado, se generan zonas hipermetiladas en las que los grupos metilo sobresalen de la doble hélice del ADN posibilitando la unión de los *readers*, representados fundamentalmente por represores transcripcionales, por proteínas que al mismo tiempo actúan como *writers* (tales como deacetilasas de histonas, que se explican en el apartado 2.2.3.) y por complejos remodeladores de la cromatina (apartado 2.2.2.) (Lewis et al., 1992; Nan et al., 1993; Ng y Adrian, 1999). Esto se traduce en una compactación de la cromatina y una represión transcripcional programada de diferentes regiones genómicas. El patrón global de metilación del ADN se mantiene más o menos estable y es heredable durante la división celular, generando lo que se conoce como impronta genómica, fundamental para el correcto desarrollo y diferenciación de las células hijas (Riggs, 1975).

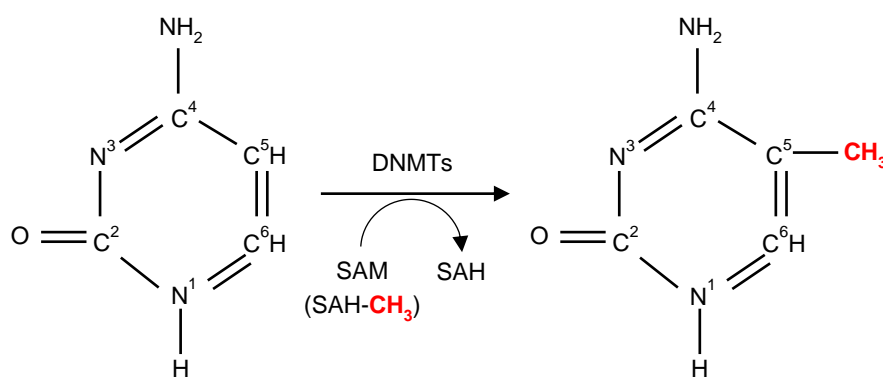


Figura 1. Metilación de la citosina. Enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) catalizan la metilación de la citosina mediante la adición de un grupo metilo (marcada en rojo) en el carbono 5 de la base nitrogenada, obteniendo como resultado 5-metilcitosina. La S-adenosil-metionina (SAM) actúa como donador del grupo metilo, liberándose en el proceso S-adenosil-homocisteína (SAH).

En mamíferos, existen 5 DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, aunque diferentes estudios parecen indicar que únicamente DNMT1, DNMT3a y DNMT3b actúan como *writers* e intervienen en el mantenimiento del patrón global de metilación del ADN. En este sentido, DNMT1 actuaría como metiltransferasa de mantenimiento, restaurando el patrón de metilación de las nuevas hebras sintetizadas durante la replicación en base al patrón de las hebras molde. Las dos últimas (DNMT3a y DNMT3b), por el contrario, actúan como metiltransferasas *de novo*, generando el patrón de metilación del ADN durante la embriogénesis y desarrollo de las células germinales. A pesar de que, tal y como se ha mencionado anteriormente, el patrón de metilación global del ADN se mantiene más o menos estable, se sabe que, durante el desarrollo embrionario, existen ciclos de metilación y demetilación sujetos a dinámicas muy activas (Monk et al., 1987). De la misma manera, diferentes estudios han demostrado procesos de demetilación en determinadas regiones cromatínicas de células diferenciadas, generalmente asociadas a zonas promotoras con una concentración relativamente baja de dinucleótidos CpG (Bestor et al., 2015). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la existencia de ningún *eraser* que actúe como demetilasa y sea capaz de revertir, de forma directa, la metilación de las citosinas llevadas a cabo por las DNMTs. Esto es debido, probablemente, a la dificultad que supone la ruptura del enlace carbono-carbono generado en el proceso. Así, el proceso de demetilación del ADN está sujeto a dos mecanismos diferentes. Por un lado, existe un proceso de “dilución” de las marcas de metilación a lo largo de sucesivas replications del ADN en las cuales las nuevas hebras generadas no son metiladas en determinadas regiones por la DNMT1. Por otro lado, se han desarrollado rutas complejas capaces de modificar la 5-metilcitosina (o de bases próximas a ella) de forma que dicha modificación induzca un proceso de reparación del ADN mediante escisión de bases. Como consecuencia, a lo largo de este proceso, la 5-metilcitosina es eliminada y sustituida por una citosina no metilada. Las modificaciones químicas descritas que desencadenan el proceso son la oxidación directa de la 5-metilcitosina mediante las denominadas enzimas TET (del inglés, *Ten-Eleven Translocations*) y la desaminación de la 5-metilcitosina o de una base cercana mediante la activación de desaminasas inducidas por activación (AID, del inglés *Activation Induced Deaminase*) (Bochtler et al., 2017). En cualquier caso, el proceso de metilación del ADN constituye una modificación epigenética altamente regulada que contribuye de manera significativa al mantenimiento de la homeostasis celular.

2.2.2. Regulación de la conformación y posicionamiento de los nucleosomas

Cambios en la conformación de los nucleosomas, en base a la incorporación de las diferentes variantes de histonas anteriormente descritas, así como en la disposición relativa de los mismos, permiten modificar la estructura de la cromatina, contribuyendo de esta manera al establecimiento del epigenoma celular. Teniendo en cuenta esto, ambos fenómenos constituyen mecanismos altamente regulados a través de dos procesos que implican la actuación de diferentes proteínas y complejos proteicos.

Por un lado, la incorporación y eliminación de las diferentes variantes de histonas está mediado por las chaperonas de histonas, las cuales constituyen proteínas o complejos proteicos capaces de unirse específicamente a variantes de histonas concretas y promover su incorporación o liberación de los nucleosomas de forma independiente de ATP. Actualmente, existe un gran número de chaperonas de histonas identificadas. Algunas de las mejor caracterizadas son FACT, capaz de unirse tanto al complejo H2A-H2B como a las variantes H3.3 o H2A.X y promover su incorporación a la cromatina, NAP1 con especificidad por el complejo H2A-H2B, ATRX que regula negativamente la incorporación de macroH2A a la cromatina o el complejo ATRX/DAXX, que interacciona con H3.3 y favorece su incorporación entorno a los centrómeros, en los telómeros y en las regiones repetitivas (Buschbeck y Hake, 2017; Quenet, 2018). El mecanismo de acción de dichas chaperonas es muy variado, implicando procesos tales como la regulación del tráfico de histonas entre el núcleo y el citoplasma, la interacción con otras proteínas estructurales y enzimas que facilitan o dificultan su incorporación a los nucleosomas o la interacción directa con otras histonas ya cargadas en los nucleosomas (Elsässer y D'Arcy 2012). En cualquier caso, una vez que ejercen su acción, las chaperonas se liberan de las histonas y nunca pasan a formar parte de la estructura estable de la cromatina.

Junto con la regulación de la composición nucleosomal dependiente de chaperonas, la modulación estructural de la cromatina también está mediada por remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Estos complejos proteicos utilizan la energía liberada de la hidrólisis de ATP, proceso llevado a cabo por su subunidad ATPasa (perteneciente a la familia de ATPasas SNF2), para ejercer su función. Así, aprovechando esta energía, los remodeladores de cromatina son capaces de romper las interacciones electrostáticas establecidas entre las histonas y el ADN y liberar de la cromatina tanto variantes de histonas individuales como nucleosomas completos ya ensamblados o dímeros H2A-H2B, los cuales van a poder ser sustituidos por otras histonas, octámeros o dímeros de variantes de histonas, respectivamente (Narlikar et al., 2013). Se han descrito cuatro familias distintas de complejos remodeladores de la cromatina: la familia SWI/SNF (del inglés *switch/sucrose-non-fermenting*), la familia ISWI (del inglés, *imitation switch*), la familia CHD (*chromodomain-helicase-DNA binding*) y la familia INO80 (*inisol requiring 80*) (Tyagi et al., 2016). Así, la principal diferencia entre las 4 familias deriva del tipo de dominios que, evolutivamente, la subunidad ATPasa, común para todas ellas, ha adquirido con el propósito de unirse a la cromatina y promover su remodelación. Por un lado, los miembros de la familia SWI/SNF presentan un bromodominio en el extremo C-terminal de la subunidad ATPasa, el cual posibilita la unión del complejo a los residuos de lisina acetilados en las colas N-terminales de las histonas. Por su parte, los miembros de la familia ISWI presentan tres dominios diferentes, denominados HAND, SANT y SLIDE, en el extremo C-terminal de la ATPasa, los cuales posibilitan la unión directa del complejo al ADN y la posterior remodelación de la cromatina. La familia CHD se caracteriza por presentar 2 cromodominios en el extremo N-terminal de la subunidad ATPasa, posibilitando la unión a lisinas metiladas situadas en las colas N-terminales de las histonas. Por último, los miembros de la familia INO80 se caracterizan por presentar una inserción en el dominio ATPasa a través del cual se unen las helicasas del tipo RuVB, posibilitando su posterior unión a la cromatina. Además, cabe destacar que, independientemente de la familia a la que pertenezcan, los remodeladores de la cromatina conforman complejos macroproteicos constituidos por múltiples subunidades asociadas a la subunidad ATPasa. Así, la diferencia entre los miembros de una misma familia viene determinada por el tipo de subunidades que contienen, las cuales van a determinar el tipo concreto de remodelación cromatínica que lleven a cabo y las variantes de histonas y nucleosomas que vayan a incorporar en dicha remodelación (Tyagi et al., 2016).

2.2.3. Modificaciones covalentes de histonas

Las modificaciones covalentes de histonas son un conjunto de alteraciones químicas que, de manera post-traduccional, se añaden en residuos específicos de las colas N-terminales libres de las histonas que conforman los nucleosomas. Como resultado, estas modificaciones son capaces de modular por sí mismas la estructura cromatínica al alterar tanto el patrón de interacción de los nucleosomas como el tipo de interacciones proteicas establecidas por la cromatina. En la actualidad se han identificado gran variedad de modificaciones de histonas, cada una de las cuales cuenta con *writers* y *erasers* específicos capaces de controlar los niveles globales y locales de dicha modificación en función de las necesidades celulares. Algunas de las modificaciones covalentes de histonas mejor caracterizadas son la acetilación, la metilación, la fosforilación o la ubiquitinación, las cuales se detallarán a continuación. Otras modificaciones covalentes también descritas son la ADP-ribosilación, sumorilación, propionilación, butirilación, malonilación, succinilación o la hidroxilación, entre otras.

2.2.3.1. Acetilación de histonas

La acetilación de histonas consiste en la unión covalente de un grupo acetilo en el grupo ϵ -amino de algunas de las lisinas de las colas N-terminales de las histonas (figura 2). Como resultado, la acetilación tiene dos efectos fundamentales sobre la cromatina. Por un lado, neutraliza la carga básica asociado al grupo ϵ -amino de las lisinas, lo cual desestabiliza la interacción histona-ADN, incrementando así la movilidad nucleosomal. Por otro, posibilita el reclutamiento de proteínas y complejos proteicos capaces de reconocer específicamente los residuos acetilados. Todo ello se traduce en una relajación local de la cromatina en aquellas regiones acetiladas y en un reclutamiento de maquinarias proteicas implicadas en diferentes procesos, tales como la replicación del ADN, la regulación transcripcional o la reparación del daño génico (Choi y Howe, 2009; Wang et al., 2008; Yang, 2004a).

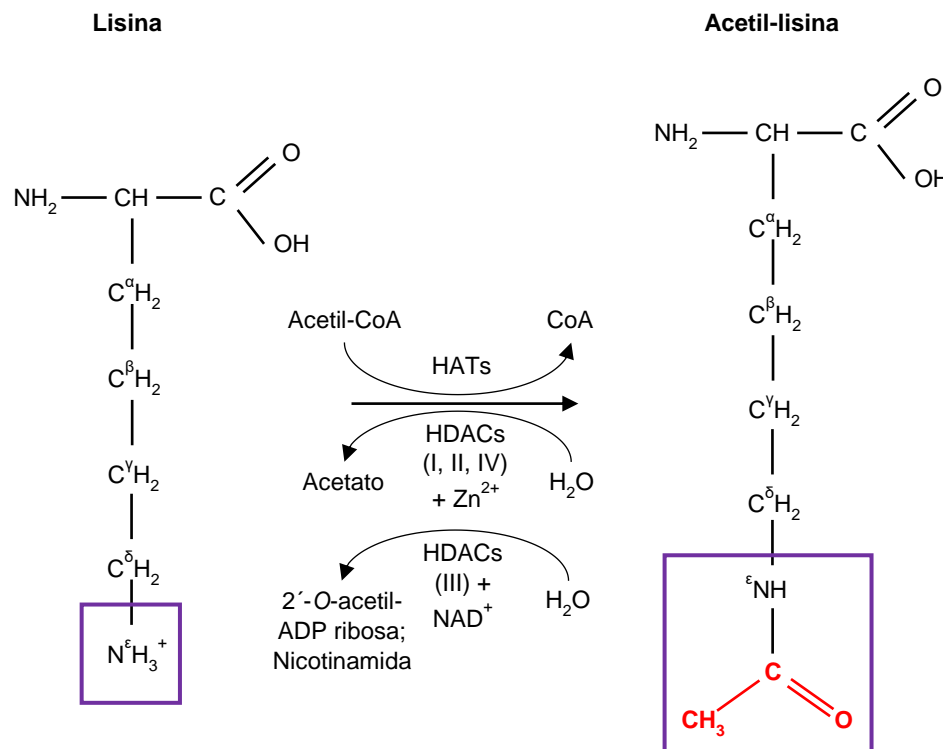


Figura 2. Acetilación/deacetilación de lisinas. La acetilación de residuos de lisinas en la cola N-terminal de las histonas es una de las modificaciones epigenéticas más importantes. Las acetiltransferasas (HATs) de histonas actúan como *writers*, catalizando la adición de un grupo acetilo (marcado en rojo) sobre el grupo ϵ -amino (marcado en morado) de la lisina. La acetil-coenzima A actúa como donador del grupo acetilo, liberándose en el proceso coenzima A. Por su parte, las deacetilasas (HDACs) de histonas actúan como *erasers* de esta reacción, catalizando en presencia de agua la liberación del grupo acetilo. Las HDACs de las clases I, II y IV utilizan ion cinc como cofactor en este proceso, liberando en la reacción acetato, mientras que las sirtuinas (HDACs de clase III), utilizan NAD^+ como cofactor y liberan nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP ribosa.

El proceso de acetilación está catalizado por las acetiltransferasas de histonas (HATs, de sus siglas en inglés), constituyendo los *writers* de esta modificación epigenética. Durante el proceso de acetilación, las HATs utilizan la acetil-coenzima A (acetil-CoA) como donador del grupo acetilo, liberando en el proceso coenzima A. En función de su localización celular, las HATs se han clasificado en dos grandes grupos: HATs de tipo A, que muestran localización nuclear, y HATs de tipo B, que muestran localización citoplasmática y están implicadas en la acetilación de histonas sintetizadas *de novo*. Por su parte, las HATs de tipo A se clasifican en 5 grandes familias en función de su homología: **Familia GNAT** (*GCN5-related N-acetyltransferase*), representada por PCAF, Gnc5 y ELP3; **Familia MYST**, que incluye a Tip60 (KAT5), MOZ, MORF, HBO1, HMOF o Sas2; **Familia CBP/p300**, también conocida como EP300, que incluye a los dos miembros que le dan nombre, CBP y p300; **Familia de HAT asociadas a factores de transcripción**, que incluye miembros tales como TAF1 o TIFIIIC90; y **Familia de acetiltransferasas asociadas a coactivadores**, conformada por proteínas de diferente naturaleza, como por ejemplo receptores de esteroides o coactivadores, con actividad acetiltransferasa. Dentro de esta última destacan p600, SRC1 o CLOCK (Sun et al., 2015).

A pesar de la gran variedad de HATs existente, la redundancia en la actividad entre miembros de una misma familia de HATs y, más significativamente, entre miembros de diferentes familias es muy limitada. Esta especificidad por residuos específicos de lisinas viene determinada por diferentes componentes de los complejos multiproteicos de los que forman parte, capaces de reconocer e interaccionar tanto con motivos aminoacídicos específicos como con otras proteínas estructurales concretas que puedan encontrarse asociadas a la cromatina (DesJarlais y Tummino, 2016; Yang, 2004a). En la tabla 3 se detallan los diferentes residuos de lisina de las histonas canónicas mejor caracterizados como sustratos de acetilación y la(s) acetiltransferasa(s) específica(s) encargadas de catalizar dicha modificación. Asimismo, cabe destacar que, entre todas las familias de acetiltransferasas mencionadas, MYST cobra especial importancia para el desarrollo de esta tesis doctoral, desarrollando de forma más extensa sus propiedades en general y las del miembro Tip60 en particular en el apartado 6 de la introducción de este manuscrito.

Tabla 3. Writers y erasers implicados en la acetilación y deacetilación, respectivamente, de lisinas situadas en las colas N-terminales de las diferentes histonas canónicas.

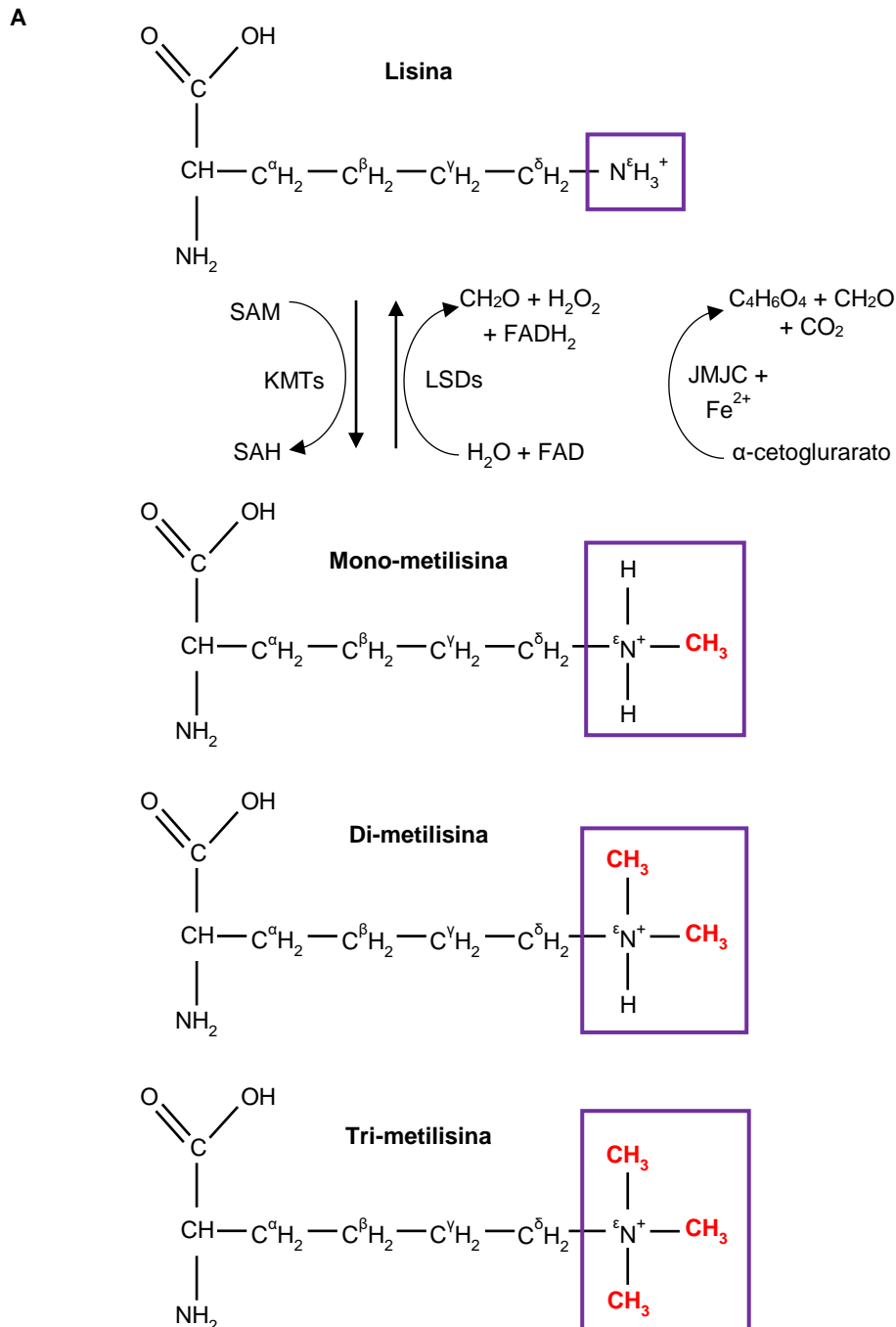
HATs Y HDACs IMPLICADAS EN LA ACETILACIÓN/DEACETILACIÓN DE DIFERENTES RESIDUOS DE HISTONAS			
HISTONA	RESIDUO	WRITER	ERASER
H2A	Lys5	CBP, p300, HAT1	Desconocido
H2B	Lys5	p300	Desconocido
	Lys12	CBP, p300	Desconocido
	Lys15	CBP, p300	Desconocido
	Lys20	CBP, p300	Desconocido
H3	Lys4	Desconocida	Desconocida
	Lys9	GCN5, pCAF, SRC1	SIRT6
	Lys14	GCN5, pCAF, CBP, p300, MOZ, MORF, Tip60, SRC1	Desconocido
	Lys18	GCN5, pCAF, CBP, p300	Desconocido
	Lys23	GCN5, pCAF, p300	Desconocido
	Lys36	GCN5, pCAF	Desconocido
	Lys56	CBP, p300	Desconocido
H4	Lys5	ATF2, HAT1, CBP, p300, Tip60, HBO1	Desconocido
	Lys8	CBP, p300, Tip60, HBO1	Desconocido
	Lys12	HAT1, CBP, p300, Tip60, HBO1	Desconocido
	Lys16	MOF, Tip60	SIRT1
	Lys91	HAT1	Desconocido

Tal y como se ha dicho anteriormente, las marcas de acetilación generadas en las histonas pueden ser reconocidas por diferentes *readers*, capaces de desencadenar y amplificar cascadas de señalización celular específicas. Independientemente de su naturaleza, todos estos *readers* se caracterizan por presentar bromodominios en su estructura, ya que son las regiones de la proteína capaces de reconocer específicamente dicha marca epigenética (Yang, 2004a). Este dominio fue identificado mediante alineamiento de secuencias de diferentes reguladores potenciales de la transcripción (Haynes et al., 1992) y posteriores estudios estructurales y ensayos de interacción demostraron su especificidad por lisinas acetiladas (Sano y Ishii, 2001; Barlev et al., 2001; Polesskaya et al., 2001). En términos mecanísticos, esta unión acetil-lisina/bromodominio viene determinada por interacciones electrostáticas y ensamblajes estructurales altamente específicos que implican no solo el residuo acetilado, sino también residuos localizados en torno al primero con los que el bromodominio también establece contacto (Yang, 2004a).

Junto con las HATs, las deacetilasas de histonas (HDACs, de sus siglas en inglés), a modo de *erasers*, contribuyen al mantenimiento de los estados globales y locales de acetilación de la cromatina (figura 2). Por tanto, la actividad de las HDACs, opuesta a la de las HATs, promueve un proceso de compactación de la cromatina al estabilizar la unión histona-DNA y restringir el movimiento de los nucleosomas (Seto y Yoshida, 2014). En humanos, se han identificado un total de 18 HDACs, las cuales se clasifican en cuatro clases en función de su homología: **clase I**, formada por las HDACs 1, 2, 3 y 8, que presentan similitud con la proteína Rpd3 de levaduras; **clase II**, formada por las HDACs 4, 5, 6, 7, 9 y 10, las cuales derivan evolutivamente de la proteína Hda1 de levaduras; **clase III**, formada por las deacetilasas conocidas como sirtuinas SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 y SIRT7, con un origen común con la proteína Sir2 de levaduras; y **clase IV**, formada por un único miembro, la HDAC11, la cual comparte similitudes tanto con los miembros de la clase I como con los miembros de la clase II. A diferencia de las HATs, que muestran un mecanismo catalítico común para la acetilación de las lisinas, las HDACs muestran diferentes mecanismos catalíticos de deacetilación, lo cual posibilita clasificarlas, a su vez, en dos grandes superfamilias: **superfamilia de las arginasas/deacetilasas**, a la cual pertenecen las clases I, II y IV de deacetilasas, y la **superfamilia con dominio de unión NAD/FAD tipo desoxihipusina sintasa**, al cual pertenece la clase III. En el caso de las HDACs pertenecientes a la primera superfamilia (conocidas también como HDACs clásicas), el mecanismo catalítico consiste en promover la liberación del grupo acetilo en forma de acetato en un proceso mediado por la hidrólisis de una molécula de agua, que actúa como donador de hidrógeno al acetato, y por un ion zinc, que actúa como cofactor, esencial en el proceso de hidrólisis (Wu et al., 2011). Por su parte, las sirtuinas pertenecientes a la clase III de HDACs utilizan NAD⁺ como cofactor y, en presencia de agua, catalizan una compleja ruta de deacetilación en la que se libera nicotinamida (que actúa como inhibidor de las propias sirtulinas) y 2'-O-acetil-ADP ribosa (Seto y Yoshida, 2014). Además, a diferencia de las HATs, la especificidad que muestran las HDACs hacia residuos de acetil-lisina no es tan elevada, especialmente entre miembros de la misma clase y/o superfamilia, para los que actividades redundantes sobre dianas comunes están ampliamente descritas (Grozinger et al., 1999; Johnson et al., 2002).

2.2.3.2. Metilación de histonas

Esta modificación epigenética consiste en la unión covalente de grupos metilo en las colas N-terminales de las histonas. La metilación de histonas, a diferencia de la acetilación, que solo ocurre en residuos de lisina, puede tener lugar tanto en residuos de lisina, a nivel del grupo ϵ -amino, como en argininas, a nivel de sus grupos ω -amino. En el caso de la metilación de lisinas, las características químicas del grupo amino sobre el que tiene lugar la modificación posibilitan que el proceso pueda implicar la adición de uno (monometilación), dos (dimetilación) o tres (trimetilación) grupos metilo (figura 3, A). Por su parte, las argininas pueden experimentar monometilación o dimetilación, que, a su vez, puede ser simétrica (si los dos grupos metilo se incorporan sobre distintos grupos ω -amino), o asimétrica (si los grupos metilo se incorporan sobre el mismo grupo ω -amino) (figura 3, B). Sin embargo, estos residuos de arginina no experimentan en ningún caso trimetilación (Wesche et al., 2017).



B

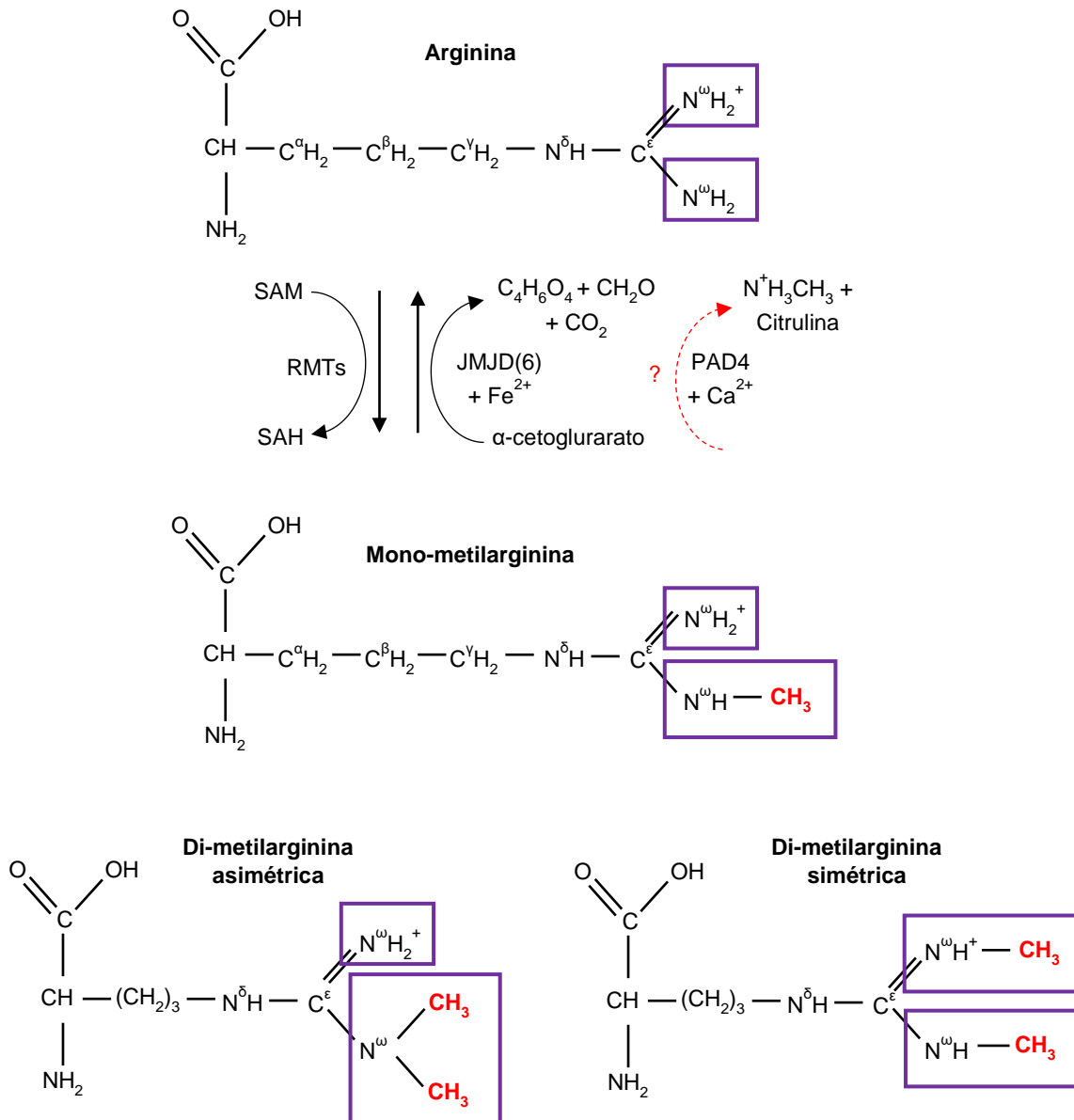


Figura 3. Metilación/demetilación de histonas. (A) Reacciones de metilación y demetilación de residuos de lisina llevadas a cabo por metiltransferasas de histonas (KMTs) y diferentes familias de demetilinas (LSDs y JMJC), respectivamente. Las KMTs pueden encadenar la adición de uno a tres grupos metilo sobre el grupo ϵ -amino de las lisinas, obteniendo como resultado lisinas mono-, di- o trimetiladas. **(B)** Reacciones de metilación y demetilación de residuos de arginina mediante metiltransferasas de arginina (RMTs) como writers y miembros de la familia JMJC como erasers. Las RMTs pueden catalizar la adición de un solo grupo metilo sobre uno de los grupos ω -amino de la arginina o, alternativamente, la adición de dos grupos metilo sobre el mismo grupo ω -amino (dimetilación asimétrica) o grupos ω -amino diferentes (dimetilación simétrica). En la actualidad, se discute un proceso alternativo de demetilación de argininas in vivo que implica su deiminación a través de la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4), generando citrulina como residuo aminoacídico intermedio.

Los *writers* implicados en la metilación de histonas son las metiltransferasas de histonas (HMTs). Estas enzimas presentan especificidad por el residuo diana, distinguiéndose por lo tanto metiltransferasas de lisina (KMTs), responsables de catalizar la reacción sobre residuos de lisina, y metiltransferasas de arginina (RMTs), que metilan únicamente dicho aminoácido. La capacidad catalítica de los diferentes miembros de cada una de estas familias varía en función del grado de metilación que son capaces de conferir al residuo diana. Así, en el caso de la familia de las KMTs, que cuenta con 51 miembros (Arrowsmith et al., 2012), miembros como SET7 o SET9 únicamente catalizan reacciones de monometilación, mientras que otros como EZH2 o G9a son capaces de monometilar, dimetilar o trimetilar. De igual manera, dentro de la familia de RMTs, con un total de 8 miembros, la RMT7 únicamente cataliza la monometilación, mientras que el resto de miembros son capaces de catalizar monometilación o dimetilación. Éstas últimas se clasifican a su vez en dos clases en función del tipo de dimetilación que llevan a cabo. Así, las RMTs de tipo I son capaces de catalizar, además de la monometilación, la dimetilación asimétrica (RMT1, RMT2, RMT3, RMT4, RMT6 y RMT8), mientras que las RMTs de tipo II, median la dimetilación simétrica (RMT5) (DesJarlis y Tummino, 2016). Más allá de estas especificidades, todas las KMTs y RMTs llevan a cabo el mismo mecanismo catalítico, basado en la transferencia directa del grupo metilo de la S-adenosil-metionina (SAM), liberando en el proceso S-adenosil-homocisteína (SAH).

Como consecuencia de la metilación de histonas, los residuos modificados incrementan en mayor o menor medida su volumen e hidrofobicidad, según el grado de metilación (mono-, di- o trimetilación). Esto modifica la estabilidad de los nucleosomas, lo que a su vez se traduce en una regulación de la estructura cromatínica. Además, las diferentes marcas de metilación generadas constituyen puntos de anclaje para *readers* específicos (Hyun et al., 2017). El reconocimiento de residuos metilados por parte de estos *readers* es posible gracias a una variedad de dominios con capacidad para interactuar con dichas marcas epigenéticas. Entre dichos dominios caben destacar los dominios PHD, los cromodominios, los dominios TUDOR o los dominios MBT (Adams-Cioba y Min, 2009). Diferentes estudios han demostrado que cada uno de estos dominios reconoce de forma precisa y diferencial marcas de mono-, di- o trimetilación concretas sobre residuos de lisina o arginina también específicos, lo cual indica que dicha especificidad viene determinada no sólo por el grado de metilación, sino también por el motivo aminoacídico en torno al cual se encuentra el residuo modificado (Kim et al., 2006; Black et al., 2012).

Tal y como ocurría con la acetilación, el patrón de metilación de histonas es fundamental a la hora de desencadenar unas u otras cascadas de señalización según los requerimientos celulares. En este aspecto, las demetilinasas de histonas (HDMs) actúan como *erasers* de esta modificación epigenética, desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. El proceso de demetilación está principalmente caracterizado e identificado para residuos de lisina. En este caso, las HDMs se clasifican en dos grandes familias (figura 3): familia de demetilinasas específicas de lisina (familia LSD, de sus siglas en inglés) y familia Jumonji C (JMJC). Los miembros de la familia LSD (LSD1 y LSD2) promueven la demetilación de la lisina mediante dos reacciones secuenciales de oxidación-reducción que implican la utilización de flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y una molécula de agua, respectivamente, liberándose en el proceso flavin-adenin-dinucleótido en estado reducido (FADH₂), dióxido de hidrógeno (H₂O₂) y formaldehído (CH₂O). Por su parte, los 18 miembros (de un total de 30) de la familia JMJC con capacidad demetilasa portan un dominio JMJC que posibilita catalizar, en presencia de α -cetoglutarato y utilizando ion Fe²⁺ como cofactor, la liberación del grupo metilo en forma de formaldehído a través de una reacción de dioxigenación, generándose en el proceso succinato (C₄H₆O₄) y CO₂ (Kooistra y Helin, 2012).

A diferencia de las demetilinasas de lisinas, ampliamente estudiadas y caracterizadas, la existencia de demetilinasas específicas implicadas en la demetilación de residuos de arginina ha sido puesta en duda. Sin embargo, en los últimos años, diferentes estudios han demostrado la reversibilidad de las marcas de metilación de argininas en las histonas a través de, al menos, dos mecanismos diferentes. El primero de estos mecanismos, descrito mediante estudios *in vitro* por Thompson y Fast en 2006, identifica a la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4) como un mediador del proceso de demetilación de argininas monometiladas, promoviendo su deiminación. Esto genera un residuo de citrulina (neutro) y libera en el proceso metilamina (N⁺H₃CH₃) (Wang et al., 2004). Sin embargo, la enzima y la reacción completa que posibilitan la posterior conversión de citrulina a arginina no metilada siguen siendo desconocidas, sugiriendo que este mecanismo de demetilación realmente no tiene lugar a nivel celular (Sylvestersen et al., 2014).

El segundo mecanismo de demetilación de argininas implica diferentes demetilinas inicialmente identificadas como demetilinas de lisina. Específicamente, se ha identificado al miembro JMJD6 de la familia Jumonji C como una demetilina capaz de promover, siguiendo el mismo mecanismo catalítico que en la demetilación de lisinas, la conversión de dimetilargininas simétricas y asimétricas a argininas no metiladas (Chang et al., 2007). Más recientemente, diferentes experimentos *in vitro* han permitido identificar otras demetilinas de lisina más allá de JMJD6 como enzimas con actividad catalítica hacia argininas metiladas (Walport et al., 2016). Sin embargo, la actividad *in vivo* de estos miembros identificados aún necesita ser demostrada.

Los diferentes *writers* y *erasers* responsables de la metilación y demetilación de histonas, respectivamente, muestran una especificidad de sustrato relativamente elevada. Esta especificidad implica que diferentes HMTs y HDMs reconocen y catalizan las modificaciones correspondientes sobre residuos concretos de las colas N-terminales de las histonas. De esta forma, dichas modificaciones generalmente no pueden ser llevadas a cabo por otros miembros incluso de la misma familia, tal y como se muestra en la tabla 4 (Kooistra y Helin, 2012).

Tabla 4. *Writers* y *erasers* implicados en la metilación y demetilación, respectivamente, de lisinas y argininas situadas en las colas N-terminales de las diferentes histonas canónicas.

HMTs Y HDMs IMPLICADAS EN LA ACETILACIÓN/DEACETILACIÓN DE DIFERENTES RESIDUOS DE HISTONAS			
HISTONA	RESIDUO	WRITER	ERASER
H3	Arg2	CARM1, PRMT6	JMJD6
	Lys4	MLL, SET1, ASH1, SET7, SMYD2	LSD1, KDM2A-B, KDM5A-B, KDM5C, KDM5D
	Arg8	PRMT5	Desconocido
	Lys9	SUV39H1/2, G9a, CLL8, SETDB1	JMJD1A-C, JMJD2A-D
	Arg17	CARM1	Desconocido
	Arg26	CARM1	Desconocido
	Lys27	EZH1, EZH2	JMJD1A-B, JMJD3, KDM2B, KDM6A-B
	Lys36	NSD1, SET2, SMYD2, NSD2	KDM2A-B, KDM4A-D
	Lys79	DOT1L	Desconocido
H4	Arg3	PRMT1, PRMT5	JMJD6
	Lys20	MMSET, PR-SET7 (mono), SUV420H1 (di), SUV420H2 (tri)	Desconocido

2.2.3.3. Fosforilación de histonas

La fosforilación de histonas consiste en la adición de un grupo fosfato sobre diferentes residuos localizados en las colas N-terminales de las histonas. Las quinasas, *writers* de esta modificación epigenética, pueden ser serina-treonina quinasas, si catalizan la fosforilación sobre el grupo hidroxilo de la cadena lateral de dichos residuos, o tirosina quinasas, si son responsables de la adición de un grupo fosfato sobre este aminoácido (Rossetto et al., 2012). Junto con estas quinasas, ampliamente descritas y caracterizadas, algunos estudios sugieren la posibilidad de que residuos de histidina localizados en las colas N-terminales de las histonas también puedan ser fosforilados por quinasas específicas (Besant y Attwood, 2012). En contraposición a las quinasas, diferentes fosfatasas actúan como *erasers*, liberando el grupo fosfato.

En términos mecanísticos, la fosforilación de histonas implica la adición de una carga neta negativa sobre el residuo modificado. Esto se traduce en una desestabilización local de la cromatina, que adquiere una conformación más abierta a consecuencia de la repulsión electrostática que se establece con el ADN, también con carga neta negativa. Además, tal y como ocurría con las anteriores modificaciones epigenéticas, esta fosforilación sirve como punto de anclaje de otras proteínas y complejos proteicos que actúan como *readers*. El reconocimiento específico de los residuos fosforilados por parte de estos *readers* se ha asociado a diferentes dominios, tales como los módulos 14-3-3 (con capacidad de reconocer específicamente fosfoserinas y fosfotreoninas) o el dominio BRCT (del inglés *BRCA1 C-Terminus Domain*) (Taverna et al., 2007). Esto posibilita el desencadenamiento de cascadas de señalización fundamentales para el correcto desarrollo de diferentes procesos celulares tales como la replicación del ADN, la transcripción o la reparación del daño génico (Rossetto et al., 2012).

2.2.3.4. Ubiquitinación de histonas

Al igual que ocurre con proteínas no cromatínicas, la ubiquitinación de histonas consiste en la adición de uno o más monómeros de ubiquitina sobre residuos de lisina. Esta unión se establece específicamente entre la glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de la lisina en un proceso que implica la actuación en cadena de 3 enzimas: la enzima E1 de activación, responsable de incorporar una ubiquitina a la enzima E2 de conjugación que, una vez ubiquitinada, se une a la enzima E3 de ligación, responsable de catalizar la transferencia de la ubiquitina desde E2 al grupo ϵ -amino de la lisina. Una vez que la monoubiquitinación tiene lugar, el mismo complejo enzimático es capaz de catalizar la adición de más monómeros de ubiquitina sobre las ubiquitinas ya incorporadas a la cola N-terminal de las histonas. La ubiquitinación de proteínas en general y de histonas en particular es un proceso de elevada especificidad a nivel de sustrato, lo cual implica que diferentes residuos de lisina de las colas N-terminales de las histonas son reconocidos y ubiquitinados por diferentes sistemas E1-E2-E3, que fundamentalmente se diferencian por los miembros E2 y E3. Además, el sistema específico E1-E2-E3 también es el responsable de determinar el tipo de ubiquitinación (mono- o poli-) que tiene lugar sobre el residuo, así como el tipo de cadenas de ubiquitina que se forman en el caso de que se poliubiquitine (Windheim et al., 2008; Uckelmann y Sixma, 2017). En este último caso, la unión entre ubiquitinas a través de enlaces isopeptídicos puede tener lugar a nivel de diferentes residuos de lisina (K27, K48, K63, etc.). De esta manera, las cadenas de poli-ubiquitina formadas adquieren conformaciones diferentes y como consecuencia, diferentes *readers* con dominios de unión específicos (al menos se han descrito 20 tipos diferentes de estos dominios) reconocen dicha modificación y desencadenan diferentes procesos celulares. Entre estos *readers* cabe destacar las deubiquitininas, enzimas que, a su vez, actúan como *erasers* de la modificación catalizando la hidrólisis de las cadenas formadas, manteniendo los niveles de ubiquitinación de la cromatina estrictamente regulados a nivel espaciotemporal (Komander, 2009).

2.3. REGULACIÓN DEL EPIGENOMA CELULAR

La multitud de marcas epigenéticas existentes y la gran diversidad de respuestas celulares que pueden desencadenar requiere de un control exhaustivo, tanto espacial como temporal, que garantice la homeostasis celular. Este proceso de regulación del epigenoma celular es altamente complejo y, en gran medida, desconocido (Murr, 2010). A pesar de ello, se han descrito diferentes mecanismos que permiten mantener un sello epigenético específico en función de los requerimientos celulares.

Uno de los mecanismos de regulación epigenética mejor caracterizados es el *crosstalk* epigenético. Dicho mecanismo consiste en modular la implementación o liberación de determinadas modificaciones epigenéticas a través de otras modificaciones preexistentes, lo que implica la existencia de una “intercomunicación” entre marcas epigenéticas (Murr, 2010). De forma general, existen cuatro tipos diferentes de *crosstalk*: *crosstalk in situ*, *crosstalk* en cis y *crosstalk* en trans y *crosstalk* asociado a la metilación del ADN.

El *crosstalk in situ* permite regular las marcas epigenéticas a nivel de un mismo residuo de las colas N-terminales de las histonas sobre el que pueden incorporarse diferentes modificaciones covalentes. Este tipo de *crosstalk* se basa en un impedimento químico y estérico por el cual, la presencia de una determinada marca epigenética imposibilita la incorporación de otra modificación diferente, o viceversa (Latham y Dent, 2007). El *crosstalk in situ* es muy común en residuos de lisina que pueden ser tanto acetilados como metilados, de forma que la acetilación del mismo imposibilita su metilación y viceversa (Nakayama et al., 2001; Hassan y Zemleni, 2006). Además, este tipo de *crosstalk* ejerce una función reguladora muy importante, ya que dichas marcas excluyentes entre sí generalmente promueven y desencadenan procesos celulares opuestos, como por ejemplo compactación/descompactación de la cromatina o activación/represión transcripcional (Murr, 2010).

Por su parte, el *crosstalk* en cis consiste en una modulación de marcas epigenéticas concretas a partir de otras marcas epigenéticas incorporadas en residuos diferentes de la misma histona. En este caso, el *crosstalk* no se basa en impedimentos químicos, sino en dos aspectos que contribuyen a regular, positiva o negativamente, el reclutamiento de los moduladores epigenéticos implicados en incorporar o liberar la modificación sobre la que recae el *crosstalk*. Uno de estos aspectos son los cambios alostéricos y estructurales de las histonas asociados a la marca epigenética ya establecida, lo cual facilita o dificulta la unión de dichos factores epigenéticos (Rojas et al., 1999). Por otro lado, la marca epigenética preexistente también contribuye directamente a establecer este *crosstalk* en cis, ya que los moduladores epigenéticos específicos de la otra modificación pueden actuar, al mismo tiempo, como *readers* de la marca establecida (Cheung et al., 2000; Lo et al., 2000). Así, a diferencia del *crosstalk in situ*, que siempre es negativo (la adición de una marca impide la adición de otra), el *crosstalk* en cis puede ser tanto positivo, en el caso de que se recluten *writers* de la modificación epigenética sobre la que recae el *crosstalk*, promoviendo su incorporación, como negativo, si se reclutan *erasers* (Murr, 2010). Teniendo en cuenta esto, en la parte A de la figura 4 se representan algunos de los *crosstalk* en cis mejor caracterizados en la actualidad para diferentes histonas.

El tercer tipo de *crosstalk*, denominado *crosstalk* en trans, se caracteriza por implicar a modificaciones covalentes incorporadas en residuos de diferentes histonas. Así, una marca específica en la cola N-terminal de una histona puede promover o impedir la adición de otra marca epigenética en la cola N-terminal de otra histona no sólo del octámero del que forma parte, sino también de histonas localizadas en octámeros cercanos (figura 4, parte B). Diferentes estudios parecían indicar que el *crosstalk* en trans estaba sujeto a un mecanismo de regulación indirecta a través de la marca epigenética preexistente. En este sentido, dicha marca epigenética sería responsable de desencadenar una cascada de señalización que, a su vez, conduciría al reclutamiento de los *writers* o *erasers* de la modificación epigenética dependiente de la primera. Sin embargo, otros estudios más recientes han demostrado que, junto con esta regulación indirecta, el *crosstalk* en trans también puede estar sujeto a una regulación directa en la que la marca epigenética preexistente recluta directamente los moduladores epigenéticos específicos de la modificación subordinada, tal y como ocurre con el *crosstalk* en cis (Henry y Berger, 2002). En cualquier caso, e independientemente de si el mecanismo de intercomunicación entre marcas epigenéticas es directo o indirecto, el *crosstalk* en trans puede ser tanto positivo, en el caso de que se recluten *writers* de otra modificación epigenética promoviendo su incorporación, como negativo, si se reclutan *erasers* (Murr, 2010).

Por último, cabe destacar el *crosstalk* asociado a la metilación del ADN, un proceso en el que el patrón de metilación de una determinada región genómica viene determinado por las modificaciones covalentes de histonas que tienen lugar en ella (Murr, 2010). Así, se sabe que diferentes modificaciones epigenéticas de histonas, tales como la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3, son capaces de reclutar las ADN metiltransferasas implicadas en el marcaje de las citosinas del ADN con grupos metilo (Lehnertz et al., 2003), mientras que otras modificaciones (como la di o trimetilación de la lisina 4 de la histona H3) inhiben este reclutamiento (Meissner et al., 2008; Mohn et al., 2008). Teniendo en cuenta esto, se sabe que el grado de activación de diferentes *writers* de modificaciones covalentes de histonas juega un papel imprescindible en modular la metilación del ADN. Tal y como se ha dicho anteriormente, este grado de activación viene determinado en gran medida por los complejos multiproteicos de los que dichos *writers* forman parte. En este sentido, subunidades proteicas de los complejos *polycomb*, que incluyen en su estructura cuaternaria metiltransferasas de histonas como EZH1 o EZH2, juegan un papel fundamental en el *crosstalk* asociado a la metilación del ADN y, en última instancia, en la compactación de la cromatina y el silenciamiento génico (McCabe et al., 2009).

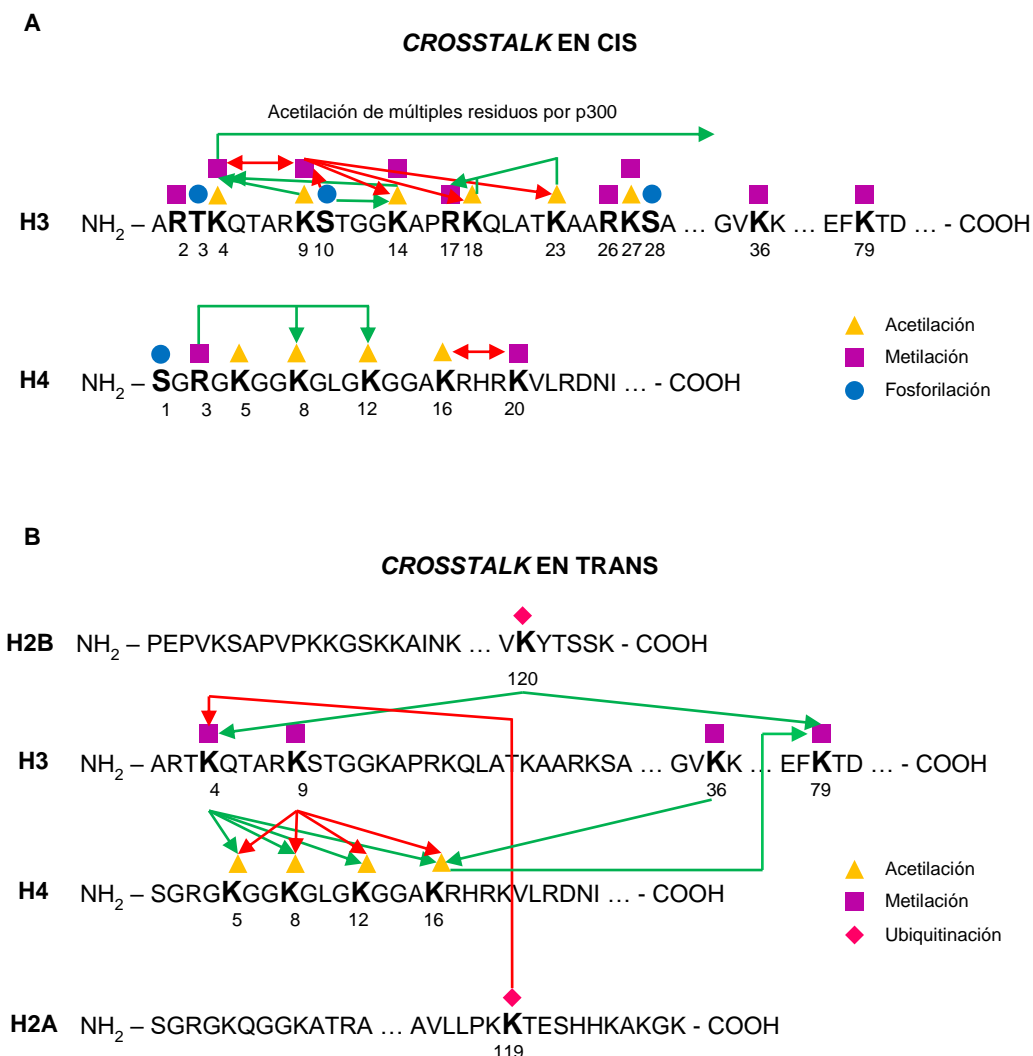


Figura 4. Representación de los diferentes *crosstalks* en cis (**A**) y *crosstalks* en trans (**B**) mejor caracterizados que existen entre diferentes modificaciones epigenéticas de las histonas. Las flechas verdes indican un *crosstalk* positivo (una modificación favorece la incorporación de la otra modificación), mientras que las flechas rojas indican un *crosstalk* negativo (una modificación imposibilita la incorporación de la otra modificación). Modificaciones mutuamente excluyentes se representan con una flecha roja de dos puntas.

Junto con los diferentes mecanismos de *crosstalk* entre marcas epigenéticas, existen otros procesos capaces de regular el epigenoma celular. Entre ellos, destaca el control de la transcripción tanto de diferentes moduladores de la cromatina como de *writers*, *readers* o *erasers* de modificaciones covalentes de histonas (Mercer y Mattick, 2013; Seto y Yoshida, 2014; Yuqing Yang et al., 2016). Además también existe un mecanismo de regulación orientado a controlar directamente la actividad catalítica de *writers* y *erasers*. En este aspecto, la fosforilación de dichos factores epigenéticos, asociada a determinadas quinasas, constituye un mecanismo muy eficiente en la regulación del epigenoma celular. Así, por ejemplo, la fosforilación de HDAC1 por las quinasas PKA y CK2 conduce a un aumento significativo de su actividad deacetilasa (Pflum et al., 2001) o las fosforilaciones en las serinas 86 y 90 de la acetiltransferasa Tip60 a través de GSK-3 y CDK9, respectivamente, favorecen su actividad acetiltransferasa a la hora de controlar la progresión del ciclo celular y promover apoptosis (Lemerrier et al., 2003; Charvert et al., 2011; Brauns-Schubert et al., 2018).

Alteraciones en el epigenoma celular, comúnmente asociadas a una desregulación de los mecanismos implicados en su modulación y mantenimiento, se han asociado con el desarrollo y/o progresión de diferentes enfermedades entre las cuales se incluyen Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Stoccoro y Coppede, 2018; Kwon et al., 2016), alteraciones cardíacas (Moore-Morris et al., 2018), enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o la psoriasis (Surace y Hedrich, 2019; Nemtsova et al., 2019), enfermedades metabólicas como diabetes u obesidad (Van Dijk et al., 2015) o cáncer. En relación a esta última, son multitud de estudios aquellos orientados a identificar alteraciones epigenéticas específicas según qué tipo de cáncer. Esto ha posibilitado establecer biomarcadores epigenéticos para diferentes cánceres, incluyendo mama, pulmón, colorrectal o diferentes tipos de leucemia, entre otros (Dumitrescu, 2018; Yüce y Ersoy, 2015; Zamani et al., 2016; Mansouri et al., 2018). De forma general, todas estas alteraciones epigenéticas derivan en modificaciones de la transcripción y/o la reparación del daño génico, lo que permite a las células alcanzar y estimular diferentes *hallmarks* del cáncer (figura 5). Así, por ejemplo, el silenciamiento de los supresores tumorales puede ser debido a una hipermetilación del ADN o a un aumento de actividad de diferentes *writers*, *readers* o *erasers*, como la metiltransferasa EZH2, asociada al complejo represor *polycomb*. De hecho, este último ejemplo, el aumento de actividad de EZH2, junto con la hipermetilación asociada de histonas, constituye un marcador epigenético para linfomas de células B y para diferentes tumores sólidos, como el cáncer de ovario (Lue y Amengual, 2018; Karakashev et al., 2018). De igual manera, una hiperactividad de HDACs identificada en hepatocarcinomas conduce a una disminución de los niveles de acetilación de histonas y esto, a su vez, a una inactivación de genes supresores de tumores y un incremento de la capacidad de invasión y metástasis (He et al., 2018). Otros ejemplos de alteraciones del epigenoma asociadas al cáncer son la desregulación del complejo remodelador de cromatina BAF (perteneciente a la familia SWI/SNF) en cáncer de próstata (Sandoval et al., 2018) o la alteración en la actividad de diferentes HATs y HDACs, lo que también provoca el desencadenamiento de diferentes *hallmarks* entre los cuales destacan la evasión de la apoptosis, el incremento de la inestabilidad genómica o la activación de oncogenes (Di Cerbo y Schneider, 2013).

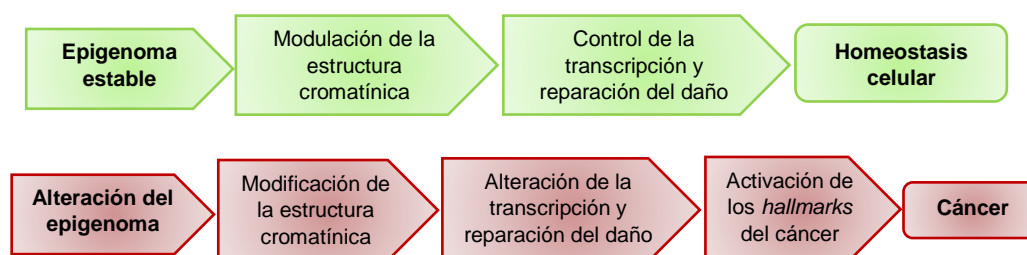


Figura 5. Sucesión de eventos derivados del epigenoma celular responsables del mantenimiento de la homeostasis celular frente a la alteración de dichos eventos como consecuencia de una desregulación del epigenoma, lo cual deriva en el desarrollo de cáncer.

Ante esta situación, durante los últimos años, han adquirido gran importancia las denominadas terapias epigenéticas, tratamientos orientados a revertir dichas modificaciones epigenéticas que actúan como *drivers* del cáncer. Para ello, estas terapias requieren establecer mapas epigenómicos tanto de células sanas como de células tumorales y, a partir de ellos, desarrollar diferentes fármacos que sean capaces de inhibir la síntesis o bloquear la actividad de aquellos reguladores epigenéticos implicados en el establecimiento de la modificación epigenética asociada al cáncer (Nebbioso et al., 2018). Así, por ejemplo, el Tazemetostat, un inhibidor de EZH2, se encuentra en fase 1 de evaluación clínica para el tratamiento de linfomas de células B y diferentes tumores sólidos en estado avanzado en los que la actividad de dicha metiltransferasa se encuentra alterada (Lue y Amengual, 2018; Nebbioso et al., 2018). Por su parte, la hiperactividad de HDACs descrita en hepatocarcinomas está tratando de atajarse con el desarrollo de Quisinostat, un inhibidor de estos moduladores epigenéticos, obteniendo resultados preliminares prometedores (He et al., 2018). Otros ejemplos de alguna de la multitud de terapias epigenéticas en desarrollo se basan en la utilización de diferentes inhibidores de HATs y HDACs, tales como LTK-14, inhibidor de las primeras, o SAHA (Vorinostat), un inhibidor de HDACs que ya ha sido aprobado para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T y que se encuentra en fases clínicas y preclínicas para el tratamiento de otros tipos de cáncer (Dell'Aversana et al., 2012; Di Cerbo y Schneider, 2013).

Una de las principales limitaciones en el desarrollo de estas terapias epigenéticas es la dualidad que pueden mostrar algunos de los reguladores epigenéticos, actuando al mismo tiempo como oncoproteínas y como proteínas supresoras de tumores (figura 6). Este fenómeno está bien caracterizado para las HATs, las cuales, como oncoproteínas, muestran una ganancia de función que deriva en una hiperacetilación de promotores oncogénicos y con ello una hiperactivación de oncogenes, mientras que, como proteínas supresoras de tumores, la pérdida de función asociada conlleva una hipoacetilación de la cromatina que se traduce a su vez en un silenciamiento de genes supresores de tumores. Por el contrario, las HDACs pueden conducir a un silenciamiento de genes supresores de tumores cuando actúan como oncoproteínas al favorecer una deacetilación de dichas regiones genómicas, o a una hiperactivación de oncogenes como consecuencia de una hiperacetilación de sus promotores cuando muestran una pérdida de función (Di Cerbo y Schneider, 2013). Esta misma interpretación se puede aplicar para HDMs y HMTs (figura 6). En este sentido, un ámbito aún por explorar en la terapia epigenética del cáncer es la utilización de activadores de HATs o HDACs para aquellos tumores en los que estas enzimas muestran una pérdida de función asociada a un silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores o a una activación transcripcional de oncogenes, respectivamente. Hasta la fecha, únicamente se han desarrollado algunos de estos activadores con resultados aún no concluyentes en el tratamiento del cáncer (Di Cerbo y Schneider, 2013).

Otras terapias epigenéticas se basan en el desarrollo de fármacos con capacidad de inhibir más de un tipo de reguladores epigenéticos, aumentando así el efecto terapéutico. En este sentido, se sabe que el compuesto natural psammaplina es capaz de inhibir tanto HDACs como DNMTs, mostrando una potencial y prometedora actividad anticancerígena en diferentes líneas celulares tumorales (Piña et al., 2003; Young Ahn et al 2007).

Por último, otro enfoque de terapias epigenéticas se orienta no a revertir las marcas epigenéticas promotoras del cáncer, sino a favorecer un proceso de acumulación de daño y muerte celular, tal y como hacen los agentes quimioterapéuticos clásicos. Para ello, se utilizan fármacos cuya diana son moduladores epigenéticos que intervienen en la reparación del daño génico. Desde este punto de vista, cabe destacar el fármaco olaparib, un inhibidor de PARP1. PARP1 es el *writer* implicado en la ADP-poli-ribosilación de la cromatina durante la respuesta al daño génico. Esta modificación epigenética, capaz de generar colas de ADP-ribosa de hasta 200 unidades, conduce a una reorganización estructural de la región dañada, un reclutamiento de la maquinaria de reparación y a una regulación de la expresión génica (Ciccarone et al., 2017). En base a esto, el tratamiento con olaparib promueve una acumulación de daño y sensibiliza a las células tumorales en tratamientos combinados con radiación ionizante (Kötter et al., 2014). De hecho, actualmente esta terapia es ampliamente utilizada en distintos tipos de cáncer, destacando cáncer de mama y ovario con mutaciones en *BRCA1/2* (Fong et al., 2009) o tumores con la expresión de ATM alterada (Williamson et al., 2010).

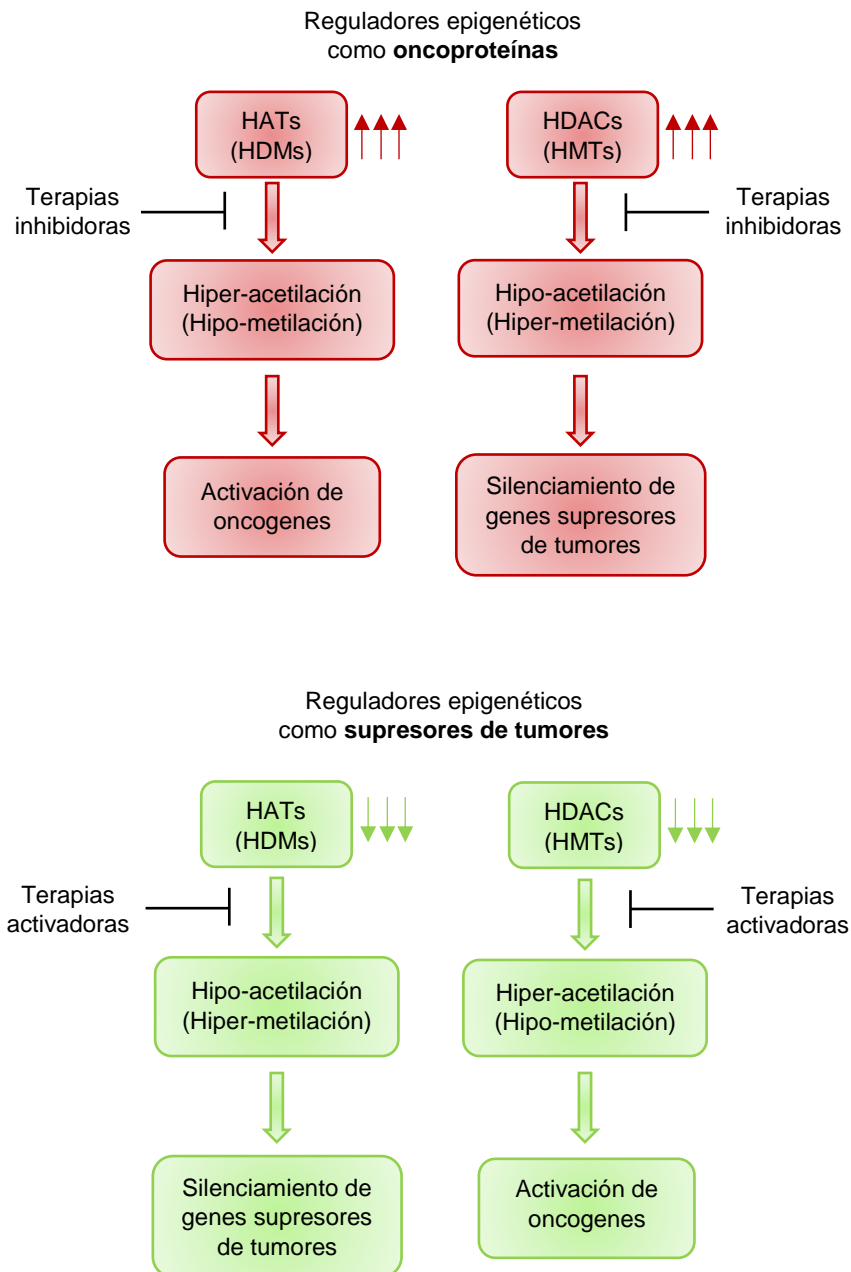


Figura 6. Dualidad de reguladores epigenéticos como oncoproteínas (parte superior) y proteínas supresoras de tumores (parte inferior). Diferentes writers y erasers epigenéticos pueden actuar como oncoproteínas, cuya mutación conduce a una ganancia de función capaz de derivar en cáncer, o como supresores de tumores, cuya mutación implica una pérdida de función, pero deriva, igualmente en el desarrollo de cáncer. Teniendo en cuenta esto, las terapias epigenéticas dirigidas hacia estos reguladores epigenéticos pueden implicar su inhibición, en el caso de que se comporten como oncoproteínas o la búsqueda de su activación, si actúan como supresores de tumores.

2.4. EPIGENÉTICA ASOCIADA A DIFERENTES PROCESOS CELULARES

De acuerdo con el principio mecanístico descrito en el apartado 2.1. de esta introducción, el propósito final de la epigenética es modular y regular diferentes procesos celulares, tales como la replicación, la transcripción o la respuesta al daño génico. En base a esto, a continuación, se hace una breve descripción de las diferentes funciones que la epigenética ejerce en cada uno de estos procesos.

2.4.1. Replicación del genoma y epigenética

La replicación del genoma es el proceso de duplicación del material genético llevado a cabo durante la fase S del ciclo celular con el propósito de asegurar la transmisión total y fehaciente de la información genética a las células hijas. Teniendo en cuenta la compleja organización del material genético, fundamental para el correcto desarrollo celular, la replicación implica no sólo una duplicación del ADN, sino también del resto de componentes que conforman la cromatina, incluyendo histonas (Bar-Ziv et al., 2016). Durante este proceso, las funciones de la epigenética consisten en modular la estructura de la cromatina con el propósito de que el proceso se desarrolle correctamente. Entre estas funciones, orquestadas de forma coordinada por diferentes factores epigenéticos, destacan el desensamblaje de los octámeros de histonas a la altura de la horquilla de replicación, la progresión de la propia horquilla de replicación, el reciclaje y ensamblaje de los nuevos octámeros de histonas en torno a las dobles hebras de ADN ya duplicadas y la restauración de las marcas epigenéticas con el objetivo de devolver la cromatina a su estado original (Alabert et al., 2017).

2.4.2. Transcripción y epigenética

La transcripción es fundamental para el correcto desarrollo, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis celular al regular, de forma altamente controlada, los genes que se expresan en cada momento de acuerdo con las necesidades celulares. La epigenética juega un papel imprescindible en este proceso. Por un lado, regula la estructura local de la cromatina para posibilitar la transcripción o silenciamiento de genes. En este sentido, un patrón de acetilación, asociado a una descompactación local de la cromatina y mayor accesibilidad de la maquinaria de transcripción, promueve de forma general la expresión génica. Por el contrario, un mayor grado de metilación del ADN y de las colas N-terminales de las histonas se asocia normalmente a un silenciamiento de la expresión génica en la zona afectada. Junto con este proceso, diferentes marcas epigenéticas también están implicadas en el reclutamiento de diferentes cofactores transcripcionales (tanto activadores como represores) que actúan como *readers* de las mismas, lo cual también contribuye enormemente a la regulación del proceso de expresión génica. Entre las marcas epigenéticas más comunes implicadas en el reclutamiento de estos cofactores transcripcionales se encuentran las acetilaciones y metilaciones en residuos específicos de histonas o la metilación directa del ADN (Heintzman et al., 2007; Heintzman et al., 2009; Ziller et al., 2013; Verdín y Ott, 2015). De igual manera, otros complejos proteicos que modulan la correcta iniciación, elongación y terminación de la transcripción, tales como el complejo de superelongación (SEC), también son reclutados a las zonas transcripcionalmente activas a través de determinadas marcas epigenéticas (Osley et al., 2006; Gates et al., 2017). Finalmente, cabe destacar que el procesamiento post-transcripcional de los ARN mensajeros, incluyendo el fenómeno de *splicing*, también viene regulado en gran medida por la epigenética (Dargemont y Babour, 2017).

2.4.3. Daño génico y epigenética

La función de la epigenética en relación al daño génico consiste en modular la estructura de la cromatina en aquellas regiones en las que se ha producido una lesión e inducir el reclutamiento de diferentes factores reparadores con el propósito de asegurar una correcta resolución de la misma (Downs y Cote, 2005). El trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha centrado en la regulación y función de modificadores epigenéticos específicos implicados en la reparación del daño. Teniendo en cuenta esto, el siguiente apartado de esta tesis doctoral desarrolla de forma más extensa la relación existente entre la respuesta al daño génico y la epigenética.

3. DAÑO GÉNICO

El descubrimiento del ADN como “principio transformante” responsable de contener la información genética esencial para el desarrollo de todos los procesos biológicos (Avery et al., 1944) y la elucidación de su estructura por Rosalind Franklin, aunque publicada por Watson y Crick (Watson y Crick, 1953), permitieron explicar el origen de múltiples patologías y defectos celulares. Así, se puede definir el daño génico como cualquier lesión o cambio a nivel del genoma capaz de provocar alteraciones en la homeostasis celular como resultado de modificaciones en la fisiología y correcto desarrollo de la célula (Basu, 2018; McNeely, 2020). Estas lesiones ocurren de forma continua en las células a lo largo de las diferentes etapas del ciclo celular. Así, por ejemplo, se calcula que, para un ser humano adulto con un total de 10^{13} células, decenas de miles de lesiones ocurren cada día en cada una de esas células (Jackson y Bartek, 2009; Ciccía y Elledge, 2010).

3.1. AGENTES CAUSANTES DE DAÑO GÉNICO

La naturaleza de las lesiones generadas en el ADN es muy variable, de forma que a lo largo del tiempo se han definido y establecido multitud de agentes causantes de daño génico. En la actualidad, estos agentes se pueden clasificar en dos grandes grupos: agentes exógenos y agentes endógenos de daño génico (Jackson y Bartek, 2009).

3.1.1. Agentes exógenos del daño

Los agentes exógenos constituyen todas aquellas fuentes externas al organismo que son capaces de alterar la estructura y estabilidad de la cromatina, modificando de esta manera el genoma. Una de las mayores fuentes de daño exógeno son las radiaciones de mayor energía del espectro electromagnético que existen a partir de la radiación ultravioleta (UV). Este tipo concreto de radiación genera diferentes fotoproductos en el ADN, entre los cuales destacan los dímeros de pirimidina (bien en la misma hebra de ADN o bien en hebras complementarias), alterando la estructura normal de los ácidos nucleicos (Ikehata y Ono, 2011). Con mayor frecuencia que la radiación UV, las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos γ) se asocian a lesiones aún más severas en el ADN. La elevada energía de este tipo de radiaciones induce la producción de altas cantidades de especies reactivas del oxígeno. Como resultado, estos compuestos son capaces de oxidar el ADN a nivel de sus bases nitrogenadas, lo que deriva en diferentes lesiones de la molécula (Santivasi y Xia, 2014). Otro tipo común de agentes exógenos de daño son compuestos químicos de distinta naturaleza, incluyendo agentes alquilantes, oxidantes, nitrosaminas, epóxidos alifáticos, etc. Estos compuestos pueden ser incorporados al organismo a través de diferentes vías, como la dieta o la aplicación tópica, y son capaces de inducir modificaciones en el ADN (generalmente aductos derivados de la formación de enlaces covalentes entre bases nitrogenadas) que alteran la información genética celular (Yu et al., 2018). En base a esto, los agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer representan también agentes exógenos de daño. Su suministro tiene como objetivo inducir la acumulación de gran cantidad de daño, aunque de forma inespecífica, en las células tumorales (con mayor tasa de división celular). Algunos de los agentes quimioterapéuticos más conocidos son el cisplatino o la doxorrubicina (también llamada adriamicina), de uso común en el tratamiento de diferentes tumores sólidos, linfomas y leucemias (Hortobágyi, 1997). Ésta última, empleada durante el desarrollo de esta tesis doctoral como agente inductor de daño, constituye un inhibidor de la ADN topoisomerasa II α , una enzima que regula la topología del ADN favoreciendo su relajación y descompactación de regiones súper-enrolladas que se generan en procesos como la replicación del ADN (Burden y Osheroff, 1998). Para ello, esta enzima genera un corte sobre las dos hebras del ADN en dichas regiones, quedando unida a cada una de ellas a través de los extremos 5' libres generados. Seguidamente, la enzima hace pasar otro segmento de ADN bicatenario intacto que también forma parte de la región súper-enrollada a través del hueco generado como consecuencia de la rotura de doble cadena. Al pasar por esta apertura, el ADN libera su súper-enrollamiento y pasa a estar en una conformación relajada. Finalmente, la topoisomerasa vuelve a ligar las dos hebras cortadas, devolviendo el ADN a su estructura intacta. Teniendo en cuenta esto, la doxorrubicina es capaz de unirse de forma no covalente al complejo ADN-topoisomerasa II formado tras el corte de las dos hebras de ADN y bloquea la actividad ligasa de la enzima, que no es capaz de unir los extremos 3' y 5' generados. Como resultado se generan y acumulan roturas de doble cadena a lo largo del ADN en células con alta tasa de replicación, lo cual induce la muerte celular (Pendleton et al., 2014).

3.1.2. Agentes endógenos del daño

Los agentes endógenos del daño están representados por un conjunto tanto de procesos celulares como de compuestos derivados del metabolismo que son capaces de alterar la estructura del ADN.

Entre los procesos celulares más destacados que representan agentes endógenos del daño destacan la hidrólisis no enzimática del enlace glucosídico que se establece entre la desoxirribosa y la base nitrogenada de un nucleótido, generando sitios libres de bases (apurínicos o apirimidínicos) que distorsionan la estructura y estabilidad de la cromatina (Lindahl y Barnes, 2012). Otros procesos celulares asociados a daño endógeno son la metilación del ADN en posiciones atípicas del nucleótido, generando variantes como la 7-metilguanosa o la 3-metiladenina, o la desaminación de bases como la citosina, adenina, guanina o 5-metilcitosina, generando uracilo, hipoxantina, xantina y timidina, respectivamente. Todas estas variantes nucleotídicas, de nuevo, desestabilizan la estructura del ADN y pueden conducir a la aparición tanto de roturas de sus hebras como de mutaciones durante el proceso de replicación. Por último, estas lesiones también pueden generarse de forma espontánea como consecuencia de errores en la incorporación de nucleótidos durante la replicación o debido al funcionamiento defectuoso de enzimas como las ADN topoisomerasas I y II (Lindahl y Barnes, 2012).

En cuanto a los compuestos derivados del metabolismo que actúan como agentes endógenos del daño caben destacar las especies reactivas del oxígeno, como son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo, entre otros. Estos compuestos actúan como fuertes oxidantes del ADN, generando variantes nucleotídicas deletéreas tales como la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxo-G), lo cual, tal y como ocurría con las radiaciones ionizantes, deriva en la aparición de roturas de la cadena del ADN (Bruner et al., 2000).

3.2. TIPOS DE LESIONES ASOCIADAS AL DAÑO GÉNICO

El daño génico generado por los diferentes agentes descritos implica una alteración de la estructura normal del ADN y/o la cromatina, formando lo que se conocen como aductos de ADN. En general, estos aductos de ADN derivan en dos grandes tipos de lesiones asociadas al daño génico: los apareamientos erróneos de bases y las roturas del ADN. Los apareamientos erróneos (o *mismatches*) implican un emparejamiento de bases no complementarias entre las dos hebras de ADN como consecuencia tanto de modificaciones químicas en una de las bases como de errores en la lectura de la ADN polimerasa durante el proceso de replicación (Fishel y Lee, 2016). Como consecuencia de este error de emparejamiento, se generan bucles o *loops* en las hebras de ADN que, por un lado, desestructuran y desestabilizan la cromatina en mayor medida, y, por otro, conducen a la aparición de mutaciones. Por su parte, las roturas del ADN implican un corte en una (SSB, del inglés *single strand break*) o las dos hebras (DSB, del inglés *double strand break*) de ADN, generando una discontinuidad en la molécula conocida como *gap*, que altera en gran medida la funcionalidad del ADN (Chatterjee y Walker, 2017).

En cualquier caso, los dos tipos de alteraciones celulares resultantes del daño génico, ya sean apareamientos erróneos de bases o roturas en la(s) cadena(s) del ADN, suponen una enorme inestabilidad genómica que puede derivar en la pérdida de la homeostasis celular y el desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Por este motivo, las células han desarrollado la denominada respuesta al daño génico (DDR, de sus siglas en inglés *DNA damage response*), que se describe en el siguiente apartado de forma extensa.

4. RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO Y EPIGENÉTICA

La respuesta al daño génico (DDR) es un conjunto de complejas rutas de señalización orientadas a reparar las diferentes lesiones generadas en el ADN como consecuencia de los agentes inductores de daño génico (Chatterjee y Walker, 2017). El sistema de señalización asociado a la DDR depende en gran medida del tipo de lesión generada en el ADN y de las condiciones celulares bajo las que dicha lesión se ha producido. En base a esto, se han descrito diferentes mecanismos de reparación del daño génico, descritos a continuación.

4.1. REPARACIÓN *IN SITU*

La reparación *in situ* es un tipo de respuesta al daño que consiste en la eliminación directa de aductos pequeños de ADN, tales como bases alquiladas o metilaciones atípicas del ADN, previo a la generación de lesiones de mayor alcance. Este proceso implica la actividad de enzimas concretas capaces de catalizar la eliminación de los grupos o estructuras químicas adicionadas en el ADN, devolviendo el nucleótido modificado a su forma basal (Lindahl y Barnes, 2000; Zhang et al., 2017).

4.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

La reparación por escisión de bases (BER, de sus siglas en inglés *base excision repair*) es otro mecanismo de reparación orientado a la eliminación directa de las modificaciones químicas que se producen a nivel de una determinada base nitrogenada, como pueden ser la metilación, desaminación o hidroxilación, y que no producen distorsiones significativas en la doble hélice del ADN. Este proceso, a diferencia de la reparación *in situ*, implica la generación de roturas de cadena sencilla para liberar así el nucleótido modificado y, posteriormente, reponerlo y cerrar el hueco generado. Para ello, la ADN glucosilasa induce una primera ruptura del enlace glucosídico formado entre la desoxirribosa y la base nitrogenada del nucleótido modificado. De esta manera se genera un sitioapurínico o apirimidínico reconocido por una endonucleasa denominada APE1 que escinde el esqueleto glucídico del nucleótido, generando el *gap*. Llegados a este punto, se desencadena una de las dos rutas de reparación de roturas de cadena sencilla descritas en el apartado 4.5. (Wallace, 2014). Cabe destacar que el desencadenamiento de una u otra ruta depende de la enzima ADN glucosilasa responsable de liberar la base nitrogenada. En términos generales, las glucosilasas monofuncionales (únicamente tienen actividad glucosilasa) desencadenan la ruta corta de reparación de roturas de cadena sencilla, mientras que glucosilasas bifuncionales (además de la actividad glucosilasa, cuentan con actividad liasa) inducen la ruta larga de reparación (Dianov y Hübscher, 2013).

4.3. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS

La reparación por escisión de nucleótidos (NER, de sus siglas en inglés *nucleotide excision repair*) está orientado a eliminar el/los nucleótido/s modificado/s que generan lesiones voluminosas en el ADN, como pueden ser los dímeros de pirimidina asociados a la radiación UV o el daño causado por agentes quimioterapéuticos. Al igual que la BER, este mecanismo supone la generación de un *gap* a nivel de la hebra portadora de dichas lesiones. Sin embargo, en este caso, el proceso implica la apertura de la doble hélice a nivel del daño por medio de diferentes helicinas, generando una horquilla de unos 30 pares de bases. Seguidamente, a través de diferentes intermediarios que permiten reconocer la hebra modificada y estabilizar la estructura, las endonucleasas XPG (también conocida como ERCC5) y ERCC1/XPF cortan la cadena dañada por sus extremos 3' y 5' respectivamente. Esto genera un hueco de entre 24 y 32 pares de bases, estabilizado y protegido por las proteínas RPA (*replication protein A*) y PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), rellenado por las ADN polimerasas δ/ϵ y sellado por la ADN ligasa III (Chatterjee y Walker, 2017).

4.4. MISMATCH REPAIR

El *mismatch repair* (MMR) es un mecanismo de reparación del daño que tiene lugar cuando las modificaciones en los nucleótidos conducen a un apareamiento erróneo de bases. Para ello, diferentes complejos proteicos formados por miembros de la familia MSH (del inglés, *MutS homolog*) reconocen los apareamientos erróneos y la deformación estructural de la cromatina asociada a ellos. Estos complejos actúan como factores de reclutamiento de otras proteínas y complejos proteicos, tales como la exonucleasa 1, la endonucleasa FEN, el factor PCNA o las ADN polimerasas δ/ϵ , responsables de escindir la cadena portadora de los nucleótidos modificados causantes del apareamiento erróneo, estabilizar la estructura intermediaria de reparación y resintetizar dicha cadena con nucleótidos no modificados (Fishel y Lee, 2016).

4.5. REPARACIÓN DE ROTURAS DE CADENA SENCILLA

La reparación de roturas de cadena sencilla (SSB, de sus siglas en inglés) es el mecanismo orientado a reparar aquellos *gaps* generados en una de las hebras del ADN como consecuencia de estrés oxidativo, errores en la actividad de la ADN topoisomerasa o durante el proceso de reparación mediante escisión de bases. Este proceso de reparación adquiere gran importancia, puesto que la no corrección de SSBs conduce a un colapso de la replicación, parada de la transcripción e inestabilidad genómica que, a su vez, inducen muerte celular. La reparación de roturas de cadena sencilla incluye dos rutas de reparación diferentes, de forma que la activación de una u otra depende fundamentalmente de la fuente de daño causante de la lesión (Chatterjee y Walker, 2017).

La ruta de reparación corta de SSB (*short patch*) consiste en el reclutamiento directo de la ADN polimerasa β al *gap* generado, la cual cataliza la incorporación del nucleótido correspondiente que ha sido eliminado. Tras esto, la ADN ligasa 3 cataliza la ligación de dicho nucleótido a la hebra, quedando reparada la lesión.

En la ruta de reparación larga de SSB (*long patch*), el *gap* generado es marcado por PARP1 mediante ADP-polirribosilación. Esta marca es detectada por la exonucleasa FEN1 que, a partir del extremo 5' del *gap*, elimina entre 2 y 10 nucleótidos, generando un *gap* de mayor tamaño. Tras esto, la ADN polimerasa β , en combinación con las ADN polimerasas δ/ϵ , catalizan la adición de una nueva cadena de 2 a 10 nucleótidos complementaria a la hebra no modificada y la ADN ligasa 1 cierra la unión entre esta nueva cadena sintetizada y el resto de la hebra (Chatterjee y Walker, 2017).

4.6. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA

La reparación de roturas de doble cadena constituye el mecanismo de reparación más complejo de la respuesta al daño génico. La introducción de esta tesis doctoral se centra en este mecanismo de respuesta al daño, por ser las roturas de doble cadena las formas más deletéreas de daño génico sobre la cual se trabaja en los resultados posteriormente mostrados. De hecho, la incapacidad de reparar roturas de doble cadena se ha asociado con el desarrollo de diferentes enfermedades, tales como progeria, infertilidad, deficiencias en el sistema inmunitario o multitud de cánceres (Jackson y Barket, 2009). El proceso de reparación de DSB se puede dividir en 3 etapas diferentes: sensibilización al daño, mediación del daño y resolución del daño. En todas ellas, y más notablemente durante la sensibilización y mediación del daño, la epigenética juega un papel fundamental, tal y como se describe a continuación.

4.6.1. Sensibilización al daño

La sensibilización al daño es la primera etapa de la reparación de roturas de doble cadena y consiste en el reconocimiento de la lesión y reclutamiento de diferentes proteínas implicadas en disparar la cascada de señalización. De forma general, en el proceso de sensibilización intervienen dos tipos de proteínas sensoras: factores de transcripción y proteínas sensoras con actividad en la zona de la lesión (Bantele y Pfander, 2019). Los factores de transcripción son responsables de, en respuesta al daño, activar el *checkpoint* de daño génico, inducir la parada del ciclo celular y promover la expresión de proteínas que participarán en etapas posteriores de la respuesta al daño (Bantele y Pfander, 2019). Por otro lado, las proteínas sensoras con actividad en la zona de la lesión se reclutan rápidamente a la región de la cromatina donde se encuentra la DSB para poder iniciar el proceso de reparación. Una vez reclutadas, la función de estas proteínas puede ser estructural, permitiendo el reclutamiento de nuevas proteínas a la zona del daño, o enzimática, catalizando diferentes procesos que favorecen el proceso de reparación (Bantele y Pfander, 2019). Entre las proteínas sensoras con función enzimática destacan diferentes reguladores epigenéticos implicados en establecer un sello epigenético concreto en la zona del daño, descrito más detalladamente en el subapartado que sigue a este punto de la introducción. Otro componente sensor de gran importancia es el complejo MRN, altamente conservado en la evolución. Este complejo está formado por las proteínas Mre11 (*meiotic recombination 11*), con actividad endo- y exonucleasa, Rad50, con actividad ATPasa y NBS1, sin actividad catalítica (Lamarche et al., 2010). En conjunto, la función del complejo MRN durante la sensibilización al daño es unirse y proteger los extremos de ADN generados tras la rotura y actuar como proteína reclutadora de otras proteínas (Williams et al., 2010). Una de las proteínas que recluta el complejo MRN es ATM, que también desempeña una función fundamental durante esta etapa. ATM es una quinasa perteneciente a la familia PIKK (*phosphoinositole 3-kinase-like kinase*) que en condiciones basales forma un dímero inactivo. Tras la aparición de daño, este dímero es acetilado en la lisina 3016 por Tip60 (Sun et

al., 2007) y posteriormente se autofosforila en sus residuos de serina 367, 1893, 1981 y 2996 y treonina 1885, pasando a formar monómeros parcialmente activos (Kozlov et al., 2010).

Los monómeros de ATM son reclutados por MRN a la región del daño, adquiriendo una conformación completamente activa en la que desempeñan sus funciones como proteína sensora. Entre estas funciones, cabe destacar la fosforilación de los tres miembros del complejo MRN a través del cual la quinasa ha sido reclutada a la zona del daño. Las fosforilaciones de NBS1 en los residuos S278 y S343 (éste último también fosforilado por VRK1 (Monsalve et al., 2016)) y de Rad50 en el residuo S635 son fundamentales, entre otras cosas, para la activación de los *checkpoints* y parada del ciclo celular. Por su parte, la fosforilación de Mre11 a través de ATM (residuos S676, 678 y 681) es esencial en la resección del ADN, un proceso que consiste en generar, a partir del *gap* que aparece tras la rotura de la doble cadena, extremos monocatenarios 3' libres en cada una de las hebras mediante la actividad catalítica de la exonucleasa Exo1. Este proceso va a ser fundamental para el devenir de la DDR (Lavin et al., 2015). Otra de las principales funciones de ATM como proteína sensora es actuar como *writer* epigenético, tal y como se describirá en el siguiente subapartado. A pesar de la temprana actuación de las proteínas sensoras en respuesta a las DSBs, el mecanismo de señalización inicial y primigenio que permite conectar directamente la lesión en el ADN con la activación y reclutamiento de estas proteínas es aún poco conocido.

4.6.1.1. Epigenética en la sensibilización al daño

La epigenética tiene un papel fundamental en la primera etapa de la reparación de roturas de doble cadena. En este aspecto, el establecimiento de diferentes marcas epigenéticas locales en la cromatina a nivel del daño es esencial para el inicio y progresión de esta etapa. Una de las primeras marcas epigenéticas que tienen lugar en el proceso es llevada a cabo por la ATPasa p400, la cual actúa como un remodelador de la cromatina dependiente de ATP promoviendo el intercambio de la histona H2A por su variante H2A.Z. Esto genera unos nucleosomas menos estables, que derivan en una conformación cromatínica más laxa, favoreciendo una apertura parcial de la misma (Price y D'Andrea, 2013). Una vez establecido este cambio conformacional, se produce una acetilación de la lisina 16 de las histonas H4 (H4K16ac), que es comúnmente conocida como la principal marca epigenética asociada a la sensibilización del daño. Este proceso es catalizado, principalmente, por la acetiltransferasa Tip60 (KAT5) (Deem et al., 2012; Chen et al., 2015). El resultado de esta acetilación es una mayor relajación local de la cromatina, fundamental para que ésta adquiera una conformación abierta. Con ello se posibilita, por un lado, la exposición y accesibilidad a otras marcas epigenéticas, como las trimetilaciones de las lisinas 9 y 36 de la histona H3 (H3K9me3 y H3K36me3), que favorecen y estabilizan la unión de Tip60 a la cromatina, y por otro, la entrada de las diferentes proteínas y complejos reparadores, como los anteriormente mencionados MRN y ATM, o PARP1. En este sentido, la función epigenética de ATM durante la sensibilización del daño es fosforilar a la variante de histona H2AX en su serina 139, pasando a denominarse γ H2AX (Bekker-Jensen y Mailand, 2010). Junto con ATM, la quinasa VRK1 también actúa en este nivel de la respuesta al daño génico, siendo capaz de fosforilar a H2AX en este mismo residuo para amplificar y favorecer aún más la respuesta (Salzano et al., 2015). Como resultado, γ H2AX se establece como un punto de anclaje fundamental para el reclutamiento de nuevas proteínas, amplificando en gran medida la cascada de señalización que da inicio a la segunda etapa de la respuesta al daño génico (Bekker-Jensen y Mailand, 2010). Por su parte, PARP1 también desempeña una función epigenética fundamental. Una vez que la cromatina es acetilada en la H4K16 y adquiere una conformación abierta, esta proteína reconoce la rotura y se une directamente al ADN en la región dañada. Esta unión induce un cambio conformacional en PARP1 que incrementa significativamente su actividad catalítica (Langelier et al., 2012). Como consecuencia, se produce una ADP-polirribosilación en múltiples residuos de arginina, aspártico, glutámico, lisina y serina de las colas N-terminales de las histonas (Zhang et al., 2013; Leidecker et al., 2016). Esto, al igual que γ H2AX, constituye un punto de anclaje para nuevas proteínas implicadas en la reparación, amplificando aún más la respuesta y dando paso a la segunda etapa de la reparación de roturas de doble cadena (Tallis et al., 2014; Wei y Yu, 2016).

4.6.2. Mediación del daño

Durante la reparación de roturas de doble cadena, la mediación del daño se puede entender como el proceso de amplificación de la cascada de señalización mediante el reclutamiento de diferentes proteínas cuya función va a ser, principalmente, establecer y asegurar el tipo de mecanismo de reparación que se desarrollará posteriormente, durante la resolución del daño (Bantele et al., 2019).

Tal y como se ha dicho anteriormente, muchas de las marcas epigenéticas establecidas durante la sensibilización al daño (γ H2AX, H4K16ac o ADP-polinribosilación, entre otras) son fundamentales a la hora de desencadenar esta etapa de mediación al posibilitar el reclutamiento de proteínas mediadoras. Así, por ejemplo, la marca de γ H2AX promueve el reclutamiento y la acumulación de MDC1 (del inglés, *mediator of DNA damage checkpoint 1*), que se une a la histona fosforilada de forma dependiente a la acetilación de la H4K16 (Lou et al., 2006). Esta unión γ H2AX-MDC1 favorece, a su vez, el reclutamiento de nuevas unidades de ATM, que, por lo tanto, además de actuar como proteína sensora, también desempeña un papel como proteína mediadora. En este sentido, ATM, además de realizar funciones epigenéticas descritas en el subapartado 4.6.2.1., fosforila a la propia MDC1 en la treonina 4. Dicha fosforilación posibilita la dimerización de la proteína que, como consecuencia, se une a NBS1 del complejo MRN, estabilizando su unión a la zona dañada del ADN y amplificando así la respuesta (Liu et al., 2012). Junto con ATM, la unión γ H2AX-MDC1 y fosforilación de esta última también favorece el reclutamiento de otras proteínas mediadoras, tales como 53BP1 (*p53-binding protein 1*) o BRCA1 (*breast cancer associated 1*), las cuales establecen el nexo de unión entre las etapas de mediación y resolución del daño, determinando en última instancia el mecanismo de reparación que se activa. Teniendo en cuenta esto, el proceso de reclutamiento de estas proteínas mediadoras debe estar altamente controlado con el fin de garantizar el desarrollo de un correcto proceso de reparación. En este sentido, las modificaciones epigenéticas llevadas a cabo durante esta etapa juegan un papel fundamental.

4.6.2.1. Epigenética en la mediación del daño

Durante la mediación del daño, una de las principales funciones de la epigenética es promover la formación del complejo γ H2AX-MDC1. En este sentido, cabe destacar que la formación y estabilización de dicho complejo depende no sólo de la fosforilación de H2AX en la S139 (por la cual pasa a denominarse γ H2AX), sino también de la liberación de otras modificaciones epigenéticas de la propia histona. Entre ellas, es importante la pérdida de fosforilación en su tirosina 142, proceso catalizado por las fosfatasas EYA1 y 3. De hecho, se sabe que la no desfosforilación de este residuo de H2AX bloquea el desarrollo de la DDR y estimula la apoptosis al constituir un punto de unión de factores proapoptóticos (Cook et al., 2009). Una vez establecido y estabilizado, el complejo γ H2AX-MDC1 desencadena nuevas modificaciones epigenéticas a través del reclutamiento de ATM previamente descrito. Entre ellas, cabe destacar la fosforilación de nuevas histonas H2AX en torno a la zona del daño, estableciéndose un bucle de retroalimentación positiva por el cual, aumentan los niveles de γ H2AX que, a su vez, aumentan el reclutamiento de nuevas unidades de MDC1 y ATM. Este proceso garantiza la incorporación de suficiente maquinaria de reparación en la región dañada, lo que asegura la posterior resolución de la lesión (Deem et al., 2012).

Más allá del complejo γ H2AX-MDC1, multitud de reguladores epigenéticos actúan como proteínas mediadoras previo reclutamiento de las mismas a la zona del daño. Entre ellos se encuentra la acetiltransferasa GCN5, también reclutada de forma γ H2AX-dependiente, que se encarga de establecer nuevas marcas de acetilación sobre la histona H3. Estas marcas epigenéticas constituyen puntos de anclaje para complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, como miembros de la familia SWI/SNF, los cuales aumentarán en mayor medida la accesibilidad a la cromatina y facilitarán la progresión del bucle de retroalimentación positiva establecido por γ H2AX-MDC1-ATM. Además, otras HATs de las histonas H3 y H4, como p300 o CBP, también se acumulan en las zonas dañadas y cooperan con el complejo SWI/SNF, mediante la acetilación de sus dianas, en el proceso de relajación de la cromatina (Deem et al., 2012; Rai et al., 2006).

Junto con estas modificaciones epigenéticas, comunes y esenciales para la progresión de la DDR, durante la etapa de mediación del daño es necesario establecer otras modificaciones específicas que determinen, tal y como se ha indicado anteriormente, el tipo de reparación que se desarrollará durante la última etapa de resolución del daño. En este sentido, el reclutamiento de 53BP1 promueve la unión de

extremos no homólogos (NHEJ), mientras que el reclutamiento de BRCA1 induce una reparación por recombinación homóloga (HR). Teniendo en cuenta esto, a continuación se describen las modificaciones epigenéticas específicas que se establecen y liberan para el reclutamiento de cada una de estas proteínas mediadoras. Cabe destacar que el establecimiento de unas u otras marcas epigenéticas depende de diferentes factores, como la fase del ciclo celular en la que se ha producido el daño, la fuente del mismo o los cambios estructurales específicos establecidos en la cromatina a consecuencia de la lesión (Ceccaldi et al., 2016).

A. Reclutamiento de 53BP1 y promoción de la NHEJ

El reclutamiento de 53BP1 a la zona de daño implica gran variedad de modificaciones epigenéticas. Una de las más importantes a destacar es la eliminación de las marcas de H4K16ac establecidas durante la primera etapa de la DDR (Hsiao y Mizzen, 2013). Esta eliminación es esencial para el establecimiento de la dimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me₂), pues ambas modificaciones son mutuamente excluyentes y es esta última la que posibilita la unión de 53BP1, a través de los dominios TUDOR, a la cromatina. Así, una vez liberadas las marcas de H4K16ac, son las metiltransferasas SET8 y MMSET las que, como *writers* epigenéticos, son reclutadas específicamente a la cromatina. En primer lugar, SET8 monometila la H4K20 y, posteriormente, la fosforilación de la serina 102 de MMSET catalizada por ATM, posibilita la unión de esta metiltransferasa a MDC1 para catalizar la dimetilación (Pei et al., 2011; Dulev et al., 2014). Junto con la H4K20me₂, se sabe que otras modificaciones epigenéticas también promueven el reclutamiento y unión de 53BP1. Entre ellas destacan la propia fosforilación de H2AX, la dimetilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79me₂) a través de la metiltransferasa DOT1L, que también permite la unión de 53BP1 a través de sus dominios TUDOR (Wakeman et al., 2012), o la ubiquitinación de la lisina 15 de la histona H2A (H2AK15ub). Esta última modificación es catalizada por la ubiquitina ligasa E3 RNF168 y reconocida por el módulo Tudor-UDR de 53BP1 (Fradet-Turcotte et al., 2013). Por último, cabe destacar que, recientemente, otros estudios parecen indicar que la deacetilación de la lisina 18 de la histona H3 mediada por SIRT7 también es necesaria para la acumulación de 53BP1 en las DSBs (Vazquez et al., 2016).

Una vez establecidas estas modificaciones que posibilitan el reclutamiento de 53BP1, esta proteína puede ser fosforilada por ATM y VRK1 en las serinas 25 y 29 (Ward et al., 2003; Sanz-Garcia et al., 2012) y en la serina 1219 (proceso catalizado únicamente por ATM e indispensable para la estabilización de 53BP1 y progresión del proceso de reparación) (Lee et al., 2009). El patrón de fosforilación de 53BP1 posibilita el reclutamiento de RIF1, una proteína que se une a los extremos generados tras la rotura de doble cadena, bloqueando la resección del ADN y el reclutamiento de BRCA1, promoviendo así la reparación de NHEJ frente a la HR (Chapman et al., 2013).

B. Reclutamiento de BRCA1 y promoción de la HR

El reclutamiento de BRCA1, una ubiquitina ligasa E3, está mediado por el establecimiento de marcas epigenéticas específicas, algunas de ellas excluyentes a aquellas establecidas en el reclutamiento de 53BP1. En este sentido, el mantenimiento y acumulación de los niveles de H4K16ac favorece indirectamente la acumulación de BRCA1. Esto es debido a que dicha marca epigenética garantiza el mantenimiento de la H4K20 en estado no metilado. Bajo estas condiciones (ausencia de metilación), uno de los complejos formados por BRCA1 (BRCA1-BARD1) es capaz de unirse a la H4K20 (Tang et al., 2013).

Junto con la H4K16ac, la poliubiquitinación de la lisina 199 de las histonas H2A y H2AX, juega un papel fundamental en el reclutamiento de BRCA1 y, más concretamente, de otro de los complejos de los que forma parte, llamado complejo BRCA1-A. Esta poliubiquitinación es mediada por diferentes *writers* epigenéticos. En primer lugar, RNF2, miembro del complejo represor Polycomb 1, se une a NBS1 del complejo MRN reclutado y promueve la monoubiquitinación del residuo (Ginjala et al., 2011). A continuación, otras dos ubiquitina ligasas E3, RNF8 y RNF168, que reconocen e interaccionan con la proteína MDC1 fosforilada por ATM, catalizan la diubiquitinación y poliubiquitinación, respectivamente, de la lisina 199, estableciendo cadenas de poliubiquitina en la que los monómeros están unidos por su lisina 63. Estas cadenas de poliubiquitina reclutan directamente a la subunidad RAP80 del complejo BRCA1-A (Mailand et al., 2007; Doil et al., 2009).

Por su parte, el complejo BRCA1-C, que incluye en su estructura a la endonucleasa CtIP, es reclutado a la zona de daño a través de la fosforilación de dicha endonucleasa por parte de ATM y CDKs características de las fases S y G2 del ciclo. De esta manera, el complejo BRCA1-C se une a MRN, proceso que será fundamental durante la resolución del daño para inducir la resección del ADN (Chen et al., 2008).

Una vez reclutada a la cromatina a través de estos complejos, BRCA1 es fosforilada tanto por ATM como por otras quinasas como Chk1, estabilizando la unión y/o actividad de la ubiquitina ligasa de forma que ésta pueda desempeñar diferentes funciones. Por un lado, promueve la defosforilación de 53BP1 mediante el reclutamiento de la fosfatasa PP4C. Como consecuencia, RIF1 se libera de las DSBs, favoreciendo el proceso de resección del ADN y con ello la HR (Isono et al., 2017). Por otro lado, BRCA1 es capaz de mediar, especialmente a través del complejo BRCA1-C, el reclutamiento tanto de diferentes *erasers* implicados en la liberación de las marcas de metilación y ubiquitinación asociadas al reclutamiento de 53BP1 como de otras proteínas reparadoras implicadas en la resolución del daño por HR (Stolz et al., 2010).

Una vez desempeñadas estas funciones, BRCA1 es fosforilada por Chk2 (que, a su vez, es fosforilada en su residuo T68 y activada por ATM) en su serina 988, lo que promueve la disociación de la ubiquitina ligasa de los focos de reparación para favorecer y dar paso, así, a la fase de resolución del daño (Stolz et al., 2010).

4.6.3. Resolución del daño

Esta última etapa del proceso de reparación de DSBs consiste en la reparación de la ruptura generada, asegurando el mantenimiento de la estructura del ADN. Tal y como se ha dicho anteriormente, la resolución del daño implica diferentes mecanismos de reparación, de forma que el desarrollo de uno u otro va a venir determinado por el tipo de modificaciones epigenéticas y proteínas que han sido reclutadas a la zona dañada (Ceccaldi et al., 2016). En base a esto, los dos principales mecanismos de reparación son la unión de extremos no homólogos, mediada por 53BP1, y la recombinación homóloga mediada por BRCA1, que se describen brevemente a continuación. Ambos mecanismos constituyen procesos enzimáticos llevados a cabo por proteínas reparadoras que han sido previamente reclutadas. Por ello, durante esta etapa, la epigenética no juega un papel tan importante como lo hacía en las etapas anteriores.

4.6.3.1. Recombinación homóloga (HR)

La HR promovida por la proteína mediadora BRCA1 requiere de una resección del ADN que genere extremos 3' libres a nivel de la DSB en cada una de las hebras (Ceccaldi et al., 2016). Este proceso de resección es llevado a cabo, en primera instancia, por la endonucleasa CtIP del complejo BRCA1-C, la cual genera extremos 3' libres de una longitud reducida (alrededor de 20 pares de bases) y, posteriormente, por la exonucleasa Exo1 (Huertas y Jackson, 2009). Tal y como se ha mencionado anteriormente, este proceso de resección del ADN depende en gran medida de las CDKs específicas de las fases S/G2 del ciclo, al fosforilar diferentes sustratos como la endonucleasa CtIP o la exonucleasa Exo1 y posibilitar así su reclutamiento a la zona del daño (Tomimatsu et al., 2014). Los extremos 3' libres generados son entonces protegidos por la proteína RPA, evitando de esta manera que se formen estructuras secundarias no deseadas y que los extremos monocatenarios sean degradados. Llegados a este punto, entran en juego una serie de recombinasas (Rad51, Rad52 y Rad54) que llevan a cabo el proceso clave de la HR. De estas 3 proteínas, Rad51 proporciona la actividad catalítica y se recluta a los extremos 3' libres a través de los complejos BRCA1-BARD1 y BRCA2/DSS1. Por su parte, Rad52 se une a Rad51 para potenciar su actividad y Rad54 estabiliza esta unión. Como consecuencia, se forman unos filamentos nucleoproteicos en torno a los extremos 3' monocatenarios, en los que RPA ha sido desplazada por las recombinasas, provocando que dichos filamentos monocatenarios invadan el ADN bicatenario de la cromátida hermana. Esto genera una estructura conocida como lazo D (*D-loop*, del inglés, *displacement loop*) en el que las dos hebras de la cromátida hermana son separadas (Jasin y Rothstein, 2013). A su vez, dentro del lazo D se establecen una o dos de las denominadas uniones *Holliday*, constituidas por estructuras bicatenarias generadas por complementariedad de bases entre cada uno de los extremos 3' derivados del proceso de resección y su secuencia homóloga de la cromátida hermana (figura 7).

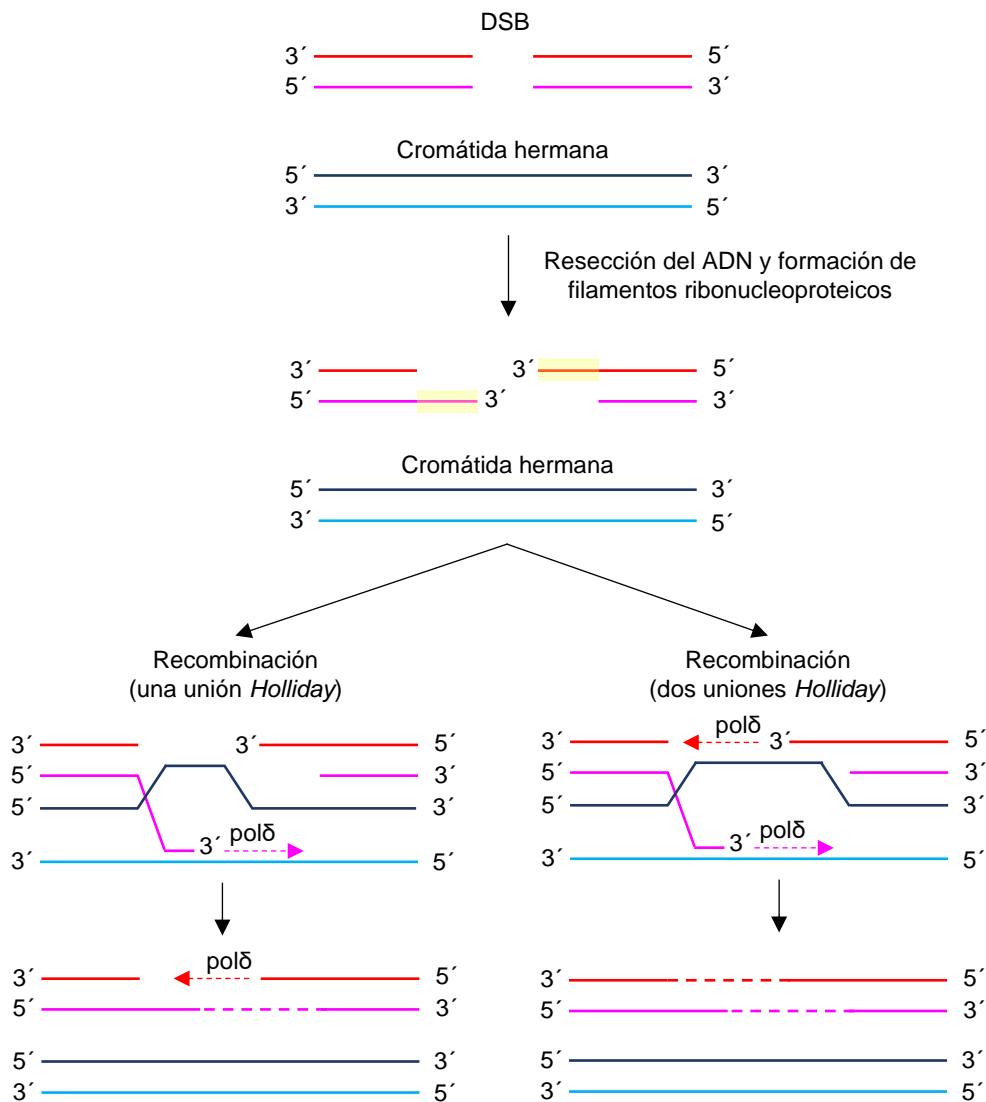


Figura 7. Mecanismos de resolución de DSBs asociados al proceso de HR. La HR puede implicar dos mecanismos de resolución diferentes: recombinación a través de una unión *Holliday* (parte inferior izquierda) o recombinación a través de dos uniones *Holliday* (parte inferior derecha).

En este momento, las secuencias homólogas actúan como hebras molde en un proceso de adición de nucleótidos en dirección 5' - 3' catalizado por la ADN polimerasa δ . Este proceso de polimerización permite sintetizar la secuencia nucleotídica complementaria al extremo 3' libre generado en la otra hebra durante el proceso de resección del ADN y unir, a través de la ADN ligasa I, dicha secuencia nucleotídica al extremo 5' libre que se generó tras la DSB (Jasin y Rothstein, 2013). Teniendo en cuenta esto, cabe destacar que, en el caso de que únicamente se establezca una unión *Holliday*, el proceso implica en primer lugar la polimerización de una de las hebras sobre el extremo 3' libre generado. De esta forma, una vez que dicha hebra en proceso de ser polimerizada, alcanza el otro extremo 3' libre generado tras la resección, actúa como molde para la síntesis de la secuencia nucleotídica sobre el extremo 3' que no estableció la unión *Holliday* (figura 7). Por último, una vez cerrado el *gap* en las dos hebras, la estructura asociada al lazo D es liberada gracias a la acción de la helicasa BLM y la topoisomerasa II α , quedando las cromátidas hermanas reestablecidas de forma independiente (Lilley, 2016).

El proceso de la HR, altamente dependiente de CDKs específicas de ciclo, sólo puede desarrollarse a partir de la fase S del ciclo celular en la cual la cromátida hermana está disponible para servir de molde durante la síntesis de las secuencias nucleotídicas en los extremos 3' libres generados. Además, este mecanismo de reparación asegura el mantenimiento de la estabilidad genómica al permitir la reparación de la DSB sin introducir modificaciones en la secuencia nucleotídica (Moynahan y Jasin, 2010).

4.6.3.2. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Este mecanismo de reparación, que se desarrolla bajo un bloqueo de la resección del ADN dependiente de 53BP1, media la unión directa de los extremos generados tras la DSBs (figura 8). Para ello, en primer lugar, dichos extremos son reconocidos por las proteínas Ku70 y Ku80, que forman un heterodímero. Las proteínas Ku reclutan entonces el complejo XRCC4-ADN ligasa IV a través de los dos dominios BRCT de dicha ligasa, que se unen directamente a la proteína Ku. Así, el complejo Ku-XRCC4-ADN ligasa IV promueve una ligación de los *gaps* generados en cada una de las hebras a nivel de la DSB. Dado que la DSB generada en ocasiones supone la pérdida de uno o más nucleótidos, este proceso no garantiza el mantenimiento de la estabilidad genómica, conduciendo habitualmente a deleciones (Chang et al., 2017). Por otro lado, más recientemente se ha descrito un mecanismo alternativo para la resolución de NHEJ (figura 8). Este mecanismo tiene lugar cuando la ligación directa de los extremos generados tras la DSB no es posible debido, generalmente, a determinadas modificaciones químicas o configuraciones estructurales del ADN que imposibilitan el reclutamiento directo del complejo XRCC4-ADN ligasa IV (Chang et al., 2017). En este caso, el reclutamiento de Ku a la zona del daño induce un reclutamiento de monómeros de DNA-PKcs (del inglés, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) que se unen al ADN para formar el denominado complejo DNA-PK. Este complejo DNA-PK posibilita por un lado, proteger y estabilizar los extremos, y por otro, tras un proceso de autofosforilación, reclutar y activar la actividad endonucleasa de la proteína Artemis que, además, cuenta con actividad exonucleasa independiente del complejo DNA-PK. Como consecuencia, Artemis genera unos pequeños extremos cohesivos (menos de 4 nucleótidos) a través de los cuales se establecen micro-homologías de complementariedad de bases entre las dos hebras (estas homologías pueden implicar únicamente un nucleótido) (Shibata et al., 2018). La estructura resultante de estas micro-homologías permite, ahora sí, el reclutamiento del complejo XRCC4-ADN ligasa IV, así como de las ADN polimerasas μ y λ (Ma et al., 2004). Como consecuencia, estas ADN polimerasas catalizan la adición de nucleótidos sobre los extremos generados que, finalmente, el complejo XRCC4-ADN ligasa IV une, cerrando la DSB. Esta vía de NHEJ está asociada no sólo a deleciones como consecuencia de la actividad de Artemis, sino también a inserciones causadas por la actividad de las ADN polimerasas que intervienen en el proceso (Chang et al., 2017).

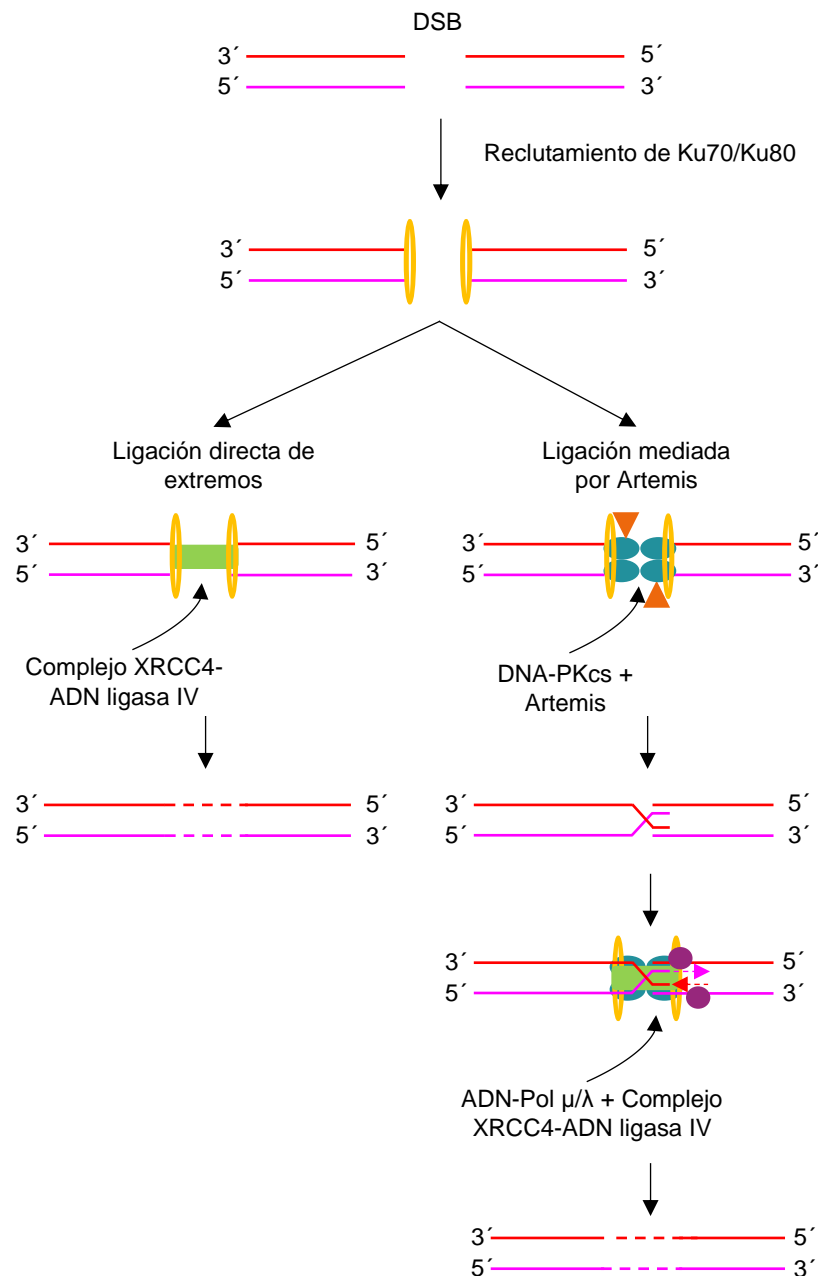


Figura 8. Mecanismos de resolución de DSBs asociados al proceso de NHEJ. La NHEJ puede implicar dos mecanismos de resolución diferentes: ligación directa de los extremos generados tras la DSB (izquierda) o ligación mediada por Artemis (derecha).

En cualquier caso, e independientemente de si el proceso es llevado a cabo a través de una ligación directa o es mediado por Artemis, la NHEJ causa mutaciones y se asocia con inestabilidad genómica. Ahora bien, dado que la NHEJ no requiere de hebras molde de la cromátida hermana para cerrar la DSB, este mecanismo de reparación es el prioritario en aquellas células que se encuentran en la fase G1/G0 del ciclo celular. Además, la NHEJ también puede desarrollarse durante las fases S/G2 del ciclo, compitiendo con el mecanismo de HR. De hecho, diferentes estudios han demostrado que, en G2, la NHEJ contribuye a la reparación del 70-75% de las DSBs generadas (Shibata y Jeggo, 2020). Esto se cree que es debido a que tanto las cinéticas de establecimiento de las marcas epigenéticas propias de la NHEJ como el propio mecanismo de reparación durante la fase de resolución son mucho más rápidas que aquellas asociadas a la HR (Ensminger y Löbrich, 2020).

4.6.3.3. Mecanismos alternativos de resolución del daño asociado a DSBs

Junto con la HR y la NHEJ y de forma minoritaria, el proceso de resolución de las DSBs puede ser llevado a cabo por otros dos mecanismos diferentes conocidos como **unión alternativa de extremos** (a-EJ, del inglés *alternative end joining*) y **anillamiento de cadenas sencillas** (SSA, del inglés *single strand annealing*) (Ceccaldi et al., 2016). Estos dos mecanismos de reparación minoritarios dependen, al igual que la recombinación homóloga, de un proceso de resección del ADN que genere extremos 3' libres en cada una de las hebras. Teniendo en cuenta esto, la actividad de BRCA1 durante la etapa de mediación también es importante en ambos procesos, que se cree que se ven favorecidos bajo situaciones específicas como un elevado número de lesiones o defectos en la progresión de la HR. En el caso del SSA, el proceso de reparación consiste en generar extremos 3' libres de elevado tamaño a nivel de regiones altamente repetitivas. Como consecuencia de estas repeticiones, los extremos 3' de ambas hebras muestran una complementariedad, estableciéndose una unión directa entre ellos que posibilita que uno actúe como molde para la incorporación de nucleótidos sobre el otro y viceversa. Esto conduce a pérdidas de secuencias nucleotídicas de un tamaño considerable y, por lo tanto, a la aparición de deleciones en el genoma (Bhargava et al., 2016). Por su parte, aunque el mecanismo aún no es del todo conocido, la a-EJ implica la unión de extremos 3' de pequeño tamaño (alrededor de 10 pares de bases) y, de igual manera que en la SSA, cada uno de los extremos 3' libres sirve de molde para la adición de nucleótidos sobre el otro extremo 3'. Sin embargo, la corta longitud de estos extremos 3' generados aumentan la inespecificidad de esta unión, que puede encontrar regiones complementarias en otras regiones del genoma, conduciendo a deleciones y/o inserciones cromosómicas (Sallmyr y Tomkinson, 2018).

4.7. ACTUALES LIMITACIONES EN EL CONOCIMIENTO DEL PAPEL DE LA EPIGENÉTICA DURANTE LA REPARACIÓN DEL DAÑO GÉNICO

Tal y como se ha descrito, la epigenética juega un papel fundamental a lo largo de las diferentes etapas de la respuesta al daño génico. La multitud de modificaciones epigenéticas implicadas en este proceso hacen de los mecanismos de regulación del epigenoma un factor fundamental para asegurar una correcta progresión de la DDR. Algunos de estos mecanismos de regulación, como pueden ser el *crosstalk* en cis o el *crosstalk* en trans, están relativamente bien caracterizados. Un ejemplo de esto es el *crosstalk* en cis existente entre la H4K16ac y la H4K20me2, de forma que el establecimiento de la primera de estas modificaciones imposibilita la adición de la otra modificación. Sin embargo, más allá de estos sistemas de *crosstalk*, el mecanismo de regulación de las diferentes enzimas epigenéticas (*writers*, *readers* y *erasers*), a través del cual es posible establecer un patrón epigenético concreto durante la DDR, es aún poco conocido y necesita ser estudiado. En este sentido, las quinasas son candidatas a regular el patrón de actividad de los diferentes reguladores epigenéticos en el contexto del daño génico, ya que la fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona responsable de regular multitud de proteínas en rutas de señalización específicas. De forma más concreta y, tal y como se plantea en los objetivos de esta tesis doctoral, VRK1 es una quinasa candidata a regular la actividad de diferentes *writers* y *erasers* epigenéticos durante la DDR, entre los cuales se incluyen Tip60 (KAT5). En base a esto, y siendo ambas proteínas, VRK1 y Tip60, los protagonistas de esta tesis doctoral, en los siguientes apartados de la introducción se hace una descripción más detallada de cada una de estas proteínas.

5. LA QUINASA VRK1

5.1. La familia de quinasas VRK

La quinasa humana VRK1 (*Vaccinia-related kinase 1*) es la proteína mejor caracterizada de la familia de quinasas VRK, la cual cuenta con otros dos miembros: VRK2 y la pseudoquinasa VRK3. Esta familia comparte ancestro común con la familia de las caseína quinasas de tipo 1 (CK1) y fue categorizada en 1997 por Nezu y sus colaboradores a raíz del estudio de los miembros VRK1 y VRK2. En este aspecto, el nombre de la familia es debido a su homología con la quinasa B1R del virus *Vaccinia*, implicada en la replicación del genoma viral (Nezu et al., 1997).

Desde el punto de vista evolutivo, se cree que esta familia de quinasas surgió a partir de un único gen VRK que se triplicó a lo largo de la evolución en la rama de los vertebrados. Por lo tanto, en organismos invertebrados sólo existe un único gen VRK, a diferencia de los tres de vertebrados (Klerkx et al., 2009). Por su parte, no se han encontrado genes ortólogos en levaduras, aunque sí se conocen dos genes en estos organismos (*Hrr25* en *Saccharomyces cerevisiae* y *Hhp1* en *Schizosaccharomyces pombe*) que codifican proteínas CK1 implicadas en respuesta al daño con funciones similares a las de VRK1 (Dhillon y Hoekstra, 1994; Ho et al., 1997). En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* existe un único ortólogo, VRK-1, que juega un papel importante en la proliferación normal de la línea germinal, regula la actividad de CEP-1, ortólogo de p53, y fosforila a BAF (del inglés, *barrier-to-autointegration factor*) en un proceso fundamental para la división celular (Waters et al., 2010; Gorjánác et al., 2007). En *Drosophila melanogaster*, otro importante organismo modelo, también existe un ortólogo de VRK1, denominado NHK-1, con un papel fundamental durante la mitosis, fase en la que fosforila a la histona H2A en la treonina 119 y a BAF (Aihara et al., 2004; Lancaster et al., 2007). Por último, los ratones (*Mus musculus*) cuentan con los tres ortólogos de las proteínas VRK1, VRK2 y VRK3 encontradas en humanos, los cuales son expresados principalmente durante la etapa embrionaria y en órganos con alta tasa de proliferación como el hígado, el bazo o el timo fetal (Zelko et al., 1998; Vega et al., 2003).

5.2. Estructura de VRK1

Cada uno de los genes que codifican para los tres miembros de la familia de quinasas VRK se encuentra en regiones genómicas diferentes. Así, el gen que codifica para la pseudoquinasa VRK3 se localiza en la región 19q13.33, el gen VRK2 en la región 2p16.1 y el gen VRK1 en la región 14q32.2. Centrando el interés en este último, codifica para una proteína VRK1 de 396 aminoácidos (45 kDa de peso molecular). Esta quinasa es ubicua, expresándose en todos los tejidos, aunque de forma mayoritaria en tejidos altamente proliferativos (Klerkx et al., 2009). La estructura de la proteína se ha establecido de forma bien definida, tal y como se representa en la figura 9 (Nichols y Traktman, 2004; Shin et al., 2011). De acuerdo con esta estructura, VRK1 presenta el dominio quinasa en su extremo N-terminal, dentro del cual se puede distinguir el sitio de unión al ATP entre los residuos 43 y 71, y el dominio quinasa activo entre los residuos 173 y 185. Este último está altamente conservado entre especies. Por su parte, la región C-terminal cuenta con un dominio básico-acido-básico (dominio BAB) entre los residuos 356 y 396 y las secuencias de localización nuclear (NLS; 356-360) y exporte nuclear (NES; 285-310). La NLS posibilita una localización mayoritaria de VRK1 en el núcleo, siendo, de hecho, una de las quinasas más abundantes a nivel nuclear. Además, también se encuentran subpoblaciones de VRK1 en el citoplasma y en el aparato de Golgi.

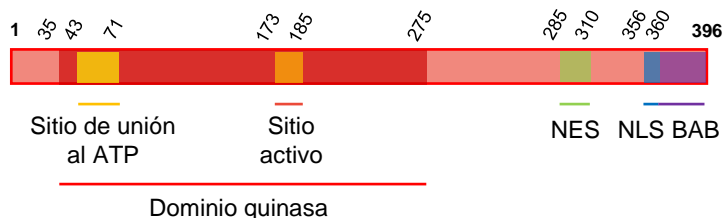


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de la quinasa humana VRK1.

La estructura terciaria de VRK1 muestra un plegamiento del extremo C-terminal a nivel de la denominada región bisagra (formada por los residuos E313 y K314) que permite orientar el dominio BAB hacia el sitio catalítico, con el que establece una serie de interacciones críticas tanto para la estabilidad estructural como para la actividad catalítica 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, haciendo del dominio BAB fundamental para la actividad biológica de la quinasa (Shin et al., 2011). Por otro lado, cabe destacar que, a diferencia de la mayoría de quinasas, VRK1 carece de un *loop* de activación situado en el dominio catalítico que posibilite la autofosforilación y consecuente activación de la quinasa. En su caso, VRK1 presenta una hélice (α C4) en su dominio quinasa que contribuye a mantener una conformación cerrada con actividad quinasa basal (Scheeff et al., 2009).

5.3. Regulación de la actividad de VRK1

A pesar de la conformación cerrada que confiere, a través de la hélice α C4, niveles de actividad basales, la capacidad de transfosforilación de VRK1 está altamente regulada a través de diferentes mecanismos. Uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de VRK1 tiene lugar a nivel transcripcional, de forma que, en función de los requerimientos celulares, diferentes factores de transcripción regulan la expresión de esta quinasa. Entre ellos, destacan factores de transcripción asociados a la proliferación celular (como por ejemplo Myc o E2F1) que aumentan los niveles de expresión de *VRK1* (Santos et al., 2006; Kang et al., 2008) o p53, que reduce dichos niveles de expresión (Lazo, 2017). Otros moduladores transcripcionales que también se han descrito que promueven la expresión de *VRK1* son el factor de transcripción aberrante EWS-FLI1 asociado al sarcoma de Ewing (Riggi et al., 2014) o SOX2, que coopera junto con la quinasa en la expresión del gen *CCND1* (codificante de la ciclina D1, fundamental para la progresión del ciclo celular entre la fase G1 y S) (Moura et al., 2016).

Junto con la regulación transcripcional de VRK1, la regulación post-traducciona también es otro de los mecanismos implicados en el control de su actividad quinasa. Este mecanismo implica la incorporación de modificaciones post-traduccionales que inducen un cambio conformacional en la proteína, haciéndola catalíticamente más activa o inactiva. Entre estas modificaciones destacan especialmente algunas que tienen lugar en respuesta a daño génico, como son la autofosforilación en la treonina 355, que regula de forma negativa su actividad quinasa, promoviendo la parada del ciclo celular y la apoptosis (Barcia et al., 2002) o la fosforilación de la treonina 378 por las quinasas ATM y ATR, que favorece la interacción del dominio BAB tanto con diferentes sustratos como con la región N-terminal de la quinasa tras el plegamiento inducido por la región bisagra, potenciando así su actividad (Stokes et al., 2007).

Por último, cabe destacar que la actividad de VRK1 también está sujeta a una regulación mediada por interacciones proteicas a través de los complejos que la quinasa establece con diferentes proteínas. En general, dichas interacciones facilitan un cambio conformacional a nivel de su extremo C-terminal que, tal y como se ha mencionado anteriormente, potencia significativamente la actividad catalítica de la proteína. En este sentido, cabe destacar la regulación de la actividad de VRK1 asociada a su interacción con diferentes histonas nucleosomales, entre ellas H3 o H2A1.2. (Kim et al., 2011). Este mecanismo de regulación es esencial durante la respuesta al daño génico, ya que permite una rápida respuesta de VRK1 instantes después de la aparición del daño al interactuar con diferentes variantes de histonas que quedan expuestas por la lesión, situando a la quinasa como un componente sensor muy temprano en la DDR. Por el contrario, se ha visto que la interacción de VRK1 con otras proteínas, como la GTPasa Ran, regula negativamente la actividad de la quinasa (Sanz-García et al., 2008).

5.4. Funciones de VRK1

A lo largo del tiempo, el conocimiento de la importancia que VRK1 tiene a nivel celular ha incrementado de manera significativa. Tal es así que, actualmente, se conocen multitud de funciones de VRK1 asociadas a un correcto desarrollo y supervivencia celulares. Entre ellas destacan la regulación del ciclo celular y de diferentes factores de transcripción, la modulación de la DDR, la mediación en la rotura de la envuelta nuclear, el control epigenético mediante la fosforilación de diferentes histonas, el ensamblaje de los cuerpos de Cajal o el correcto desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso (Valbuena et al. 2011; Martin-Doncel et al., 2019; Campillo-Marcos et al., 2021). De entre todas estas funciones, y en relación con el trabajo realizado en esta tesis doctoral, a continuación se desarrolla de forma más específica su participación en la modulación epigenética de la cromatina, la regulación de la DDR y el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.

5.4.1. VRK1 como regulador epigenético

Tal y como se viene desarrollando en la introducción de este trabajo, la epigenética permite regular la estructura cromatínica, lo cual resulta imprescindible para procesos como la replicación del ADN, la transcripción o la respuesta al daño génico. En este sentido, VRK1 puede actuar como *writer* epigenético, fosforilando diferentes residuos de las colas N-terminales de las histonas. Así, se sabe que esta quinasa fosforila directamente a la histona H3 en sus residuos treonina 3 (también fosforilado por la proteína Haspina) y serina 10. Ambas modificaciones post-traduccionales son fundamentales para la correcta progresión del ciclo celular o para la relajación de la cromatina (en el caso de la serina 10 fosforilada) durante la transcripción (Kang et al., 2007). Además, VRK1 fosforila en menor medida a H2A, H2B y H4 en procesos que contribuyen a la condensación de la cromatina y, por consiguiente, a la transición G2/M durante la progresión del ciclo celular (Kang et al., 2007).

Más allá de estas funciones de fosforilación, en los últimos años se ha visto que VRK1 también es capaz de regular otras modificaciones epigenéticas, como puede ser la acetilación de histonas (Salzano et al., 2015). Teniendo en cuenta esto y dado que VRK1 es una quinasa sin capacidad acetiltransferasa o deacetilasa, se piensa que esta proteína actúa como regulador de la actividad de diferentes *writers* y *erasers* epigenéticos en procesos tan importantes como la transcripción o la respuesta al daño génico. En base a esta hipótesis se desarrolla el trabajo posteriormente expuesto en esta tesis doctoral.

5.4.2. VRK1 como mediador de la respuesta al daño génico

Junto con la hipótesis planteada de que VRK1 pueda modular la actividad de diferentes reguladores epigenéticos en el contexto del daño génico, diferentes estudios han demostrado que esta quinasa ejerce otras funciones no epigenéticas imprescindibles para la correcta progresión de la DDR. Así, se sabe que VRK1 fosforila, junto con ATM, a la serina 139 de la variante de histonas H2AX en las regiones del ADN en las que se ha producido daño, proceso fundamental para la acumulación de esta proteína en la zona del daño y formación de focos que permitan disparar la cascada de señalización (Salzano et al., 2015).

Junto con H2AX, VRK1 también fosforila otras proteínas mediadoras, como puede ser NBS1, que forma parte del complejo MRN. En base a esto, diferentes estudios han demostrado que VRK1 forma un complejo basal con NBS1 y que, tras la aparición del daño, la quinasa fosforila directamente al miembro del complejo MRN en su serina 343. El silenciamiento de VRK1 mostró una reducción significativa del número de focos de NBS1 tras la inducción del daño génico, lo que sitúa a esta fosforilación como una modificación post-traduccionales importante para la estabilización de NBS1 durante la progresión de la DDR (Monsalve et al., 2016).

Además, tal y como se ha explicado en el apartado 4.6.2.1. de esta introducción, junto con ATM, VRK1 participa en la fosforilación de 53BP1, lo que resulta esencial a la hora de permitir la posterior reparación de DSBs mediante el mecanismo de NHEJ (Sanz-García et al., 2012). De hecho, la ausencia de VRK1 compromete la formación de focos de 53BP1 en las zonas de daño, un efecto independiente de ATM, demostrando de nuevo la importancia de VRK1 en la correcta progresión de la DDR.

Por último, cabe destacar que junto con la fosforilación y estabilización de las diferentes proteínas mediadoras mencionadas, VRK1 ejerce un papel importante en la regulación de la actividad de diferentes factores de transcripción fundamentales para el control y detención del ciclo celular tras la aparición de daño génico. En este sentido, conviene remarcar la relación existente entre VRK1 y p53. Se ha demostrado que ambas proteínas forman un complejo basal capaz de activarse de manera prácticamente inmediata tras la aparición de daño génico, lo cual conduce a una fosforilación y consecuente activación de p53 por parte de la quinasa. Esto posibilita, en gran medida, el bloqueo de la progresión del ciclo celular. Además, tras su activación, p53 también es capaz de activar un bucle de retroalimentación negativo a través del cual el propio factor de transcripción pierde progresivamente su estado de fosforilación en favor de un estado de poliubiquitinación que posibilita su degradación vía proteasoma. Al mismo tiempo, durante este proceso, se promueve la degradación lisosomal de VRK1 (Lazo, 2017). Esto permite, en gran medida, la reactivación del ciclo celular una vez que el daño génico se haya resuelto.

Teniendo en cuenta la importancia de VRK1 durante la respuesta al daño génico, cabe esperar que alteraciones en esta quinasa puedan conducir al desarrollo de patologías tan importantes como el cáncer (Valbuena et al., 2011). En este contexto, VRK1 actúa como un supresor tumoral, de forma que alteraciones en la quinasa conducen a una pérdida de función que, a su vez, favorecen una acumulación de daño y de mutaciones promotoras de la transformación celular (Salzano et al., 2014). Sin embargo, otros estudios han demostrado que VRK1 también puede actuar como *driver* oncogénico. En este sentido, alteraciones en VRK1 conducen a una ganancia de función que también promueve la transformación celular. Ahora bien, este papel como oncoproteína está asociado no a su función como mediador de la DDR, sino a su función como promotor de la progresión del ciclo y la división celular (Campillo-Marcos et al., 2021). Esta dualidad de VRK1 como supresor tumoral y oncoproteína hace que esta quinasa pueda utilizarse como biomarcador con distintos pronósticos en función del tipo de cáncer. Así, por ejemplo, en cáncer colorrectal VRK1 constituye un biomarcador de buen pronóstico a la quimioterapia neoadyuvante (del Puerto-Nevado et al., 2016). Sin embargo, la sobreexpresión de esta proteína en mieloma múltiple (Liu et al., 2016), en tumores de mama (Molitor y Traktman, 2013), de pulmón (Kim et al., 2013), hígado (Lee et al., 2015), glioma (Ben et al., 2018), cabeza y cuello (Santos et al., 2006) y esófago (Liu et al., 2017) implica un mal pronóstico.

5.4.3. VRK1 como modulador del desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso

Una mutación en homocigosis de VRK1 (R358X/R358X) detectada en 2009 en tres pacientes de una familia consanguínea de origen judío-Ashkenazi con microcefalia, hipoplasia pontocerebelar, atrofia espinal muscular y ataxia, permitió situar a VRK1 como una proteína importante en el correcto desarrollo del sistema nervioso (Renbaum et al., 2009). A partir de este estudio, investigaciones posteriores han permitido identificar un total de alrededor de 20 mutaciones diferentes de VRK1 que conducen a cuadros clínicos similares a los descritos (figura 10) (Martín-Doncel et al., 2019).

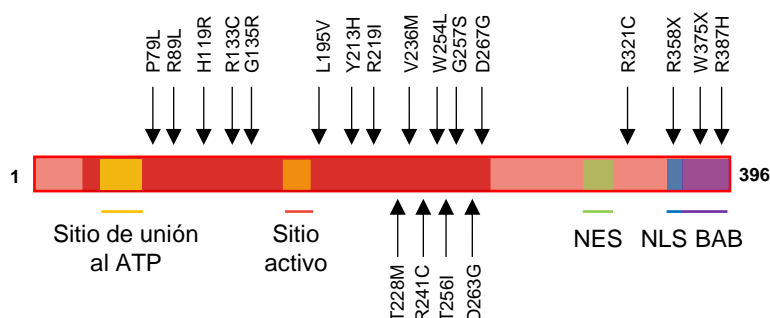


Figura 10. Mutaciones de VRK1 asociadas a pacientes con enfermedades neurodegenerativas y su localización a lo largo de la estructura de VRK1.

A pesar de estos resultados prometedores, el papel concreto que juega VRK1 en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso es aún desconocido. En este sentido, diferentes hipótesis están siendo actualmente investigadas, entre las cuales cobran fuerza la implicación de la quinasa en la formación de los cuerpos de Cajal (Cantarero et al., 2015) o en la correcta progresión de los precursores neurales durante el desarrollo embrionario (Vinograd-Byk et al., 2015). También se ha propuesto que mutaciones de VRK1 alteren la estabilidad y degradación de una proteína conocida como Ataxina1 que, en su forma expandida, causa cuadros clínicos similares a los observados en pacientes con VRK1 mutado (Orr, 2012). Además, las importantes funciones que VRK1 desempeña durante la DDR también abren la posibilidad de que estas mutaciones en la quinasa conduzcan a una acumulación de daño de manera especialmente significativa en neuronas motoras que ponga en entredicho su homeostasis y viabilidad celular. En base a esto, de nuevo, el papel de VRK1 en la DDR cobra una especial importancia, permitiendo establecer una posible asociación entre los defectos de la respuesta a daño observados en la investigación básica con cuadros clínicos específicos bien caracterizados.

6. LA ACETILTRANSFERASA TIP60

Tip60 (del inglés, *Tat-interactive protein 60 kDa*), también conocida como KAT5, es una acetiltransferasa que actúa tanto de *writer* epigenético de histonas como de modificador post-traduccional de sustratos no cromatínicos en diferentes procesos celulares (Ghobashi y Kamel, 2018). Esta acetiltransferasa es codificada por el gen *KAT5*, localizado en la región cromosómica 11q13.1. Tip60 fue identificada en 1995 por el grupo de investigación de Chinnadurai como una proteína celular que interacciona con la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1, de sus siglas en inglés) (Kamine et al., 1995). Hasta la fecha se sabía que Tat era un importante transactivador de la expresión génica de HIV-1 en células infectadas, pero el mecanismo de acción de dicha proteína no estaba bien caracterizado. A raíz del descubrimiento de la interacción entre ambas proteínas, se pudo identificar a Tip60 como un regulador esencial de la actividad llevada a cabo por la proteína vírica. Para ello, Tip60 interacciona con el extremo N-terminal de Tat, acetilándola y activándola. Como consecuencia, Tat favorece la fosforilación de diferentes factores de transcripción de la célula infectada que potencian la transcripción del genoma vírico (Creaven et al., 1999; Zhang et al., 2012). Actualmente, se sabe que Tip60 pertenece a la familia MYST de acetiltransferasas y que es esencial para modular gran cantidad de procesos celulares más allá de su actividad durante la infección vírica de HIV-1.

6.1. LA FAMILIA MYST DE ACETILTRANSFERASAS Y ESTRUCTURA DE TIP60

La familia MYST es una de las 5 grandes familias de acetiltransferasas de tipo A (de localización nuclear) que están implicadas en la regulación epigenética de las células. Esta familia está conformada por 5 miembros en humanos (Tip60, MOZ, MORF, HBO1 y HMOF) con un origen y homología comunes (Sun et al., 2015) y con diferentes ortólogos para cada uno de ellos en otros organismos, tal y como se muestra en la tabla 5. En este sentido, todos los miembros de la familia cuentan con un dominio MYST altamente conservado y con una estructura secundaria conformada por 13 láminas β y 7 hélices α (Yan et al., 2000). El dominio MYST, fundamental para la actividad acetiltransferasa de la proteína, cuenta con un motivo de dedo de zinc que permite la unión de las proteínas al ADN y con el sitio catalíticamente activo, dentro del cual, a su vez, se localiza un motivo de unión a acetil-CoA similar al encontrado en la familia GNAT de acetiltransferasas (Utley y Cote, 2003). Junto con este dominio común, los diferentes miembros de la familia van a contar con otros dominios particulares, como pueden ser cromodominios o dominios PHD, que otorgan funciones y propiedades específicas a cada uno de ellos (Yang, 2004b; Avvakumov y Cote, 2007).

Tabla 5. Miembros de la familia de acetiltransferasas MYST en los principales organismos modelo.

FAMILIA DE ACETILTRANSFERASAS MYST				
Miembros de la familia MYST	KAT5	KAT6	KAT7	KAT8
<i>S. cerevisiae</i>	Esa1	Sas3 (Ybf2)	-	Sas2
<i>S. pombe</i>	Mst1	Mst2	-	-
<i>C. elegans</i>	mys-1	mys-3 y mys-4	-	mys-2
<i>D. melanogaster</i>	dTip60	ENOK y CG184	CHM	MOF
<i>M. musculus</i>	Tip60	MOZ y MORF	HBO1	MOF
<i>H. sapiens</i>	Tip60	MOZ y MORF	HBO1	HMOF

Catalíticamente, todos los miembros de la familia de acetiltransferasas MYST llevan a cabo un proceso químico específico durante la acetilación de sus sustratos, diferente al desarrollado por otras familias de acetiltransferasas. De acuerdo con este mecanismo catalítico, conocido como mecanismo *ping-pong*, el sitio activo de las proteínas incorpora la acetil-CoA y, tras esto, el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína reacciona con la molécula de acetil-CoA, generando un residuo intermediario de cisteína acetilada al mismo tiempo que la CoA se libera. Tras esto, el residuo de lisina del sustrato diana se puede incorporar al sitio activo, siendo desprotonada por un residuo de glutamato de la acetiltransferasa. Esto posibilita que el residuo de lisina reaccione con la cisteína acetilada, transfiriéndose dicho grupo acetilo al sustrato (figura 11) (Yan et al., 2002; Berndsen y Denu, 2008).

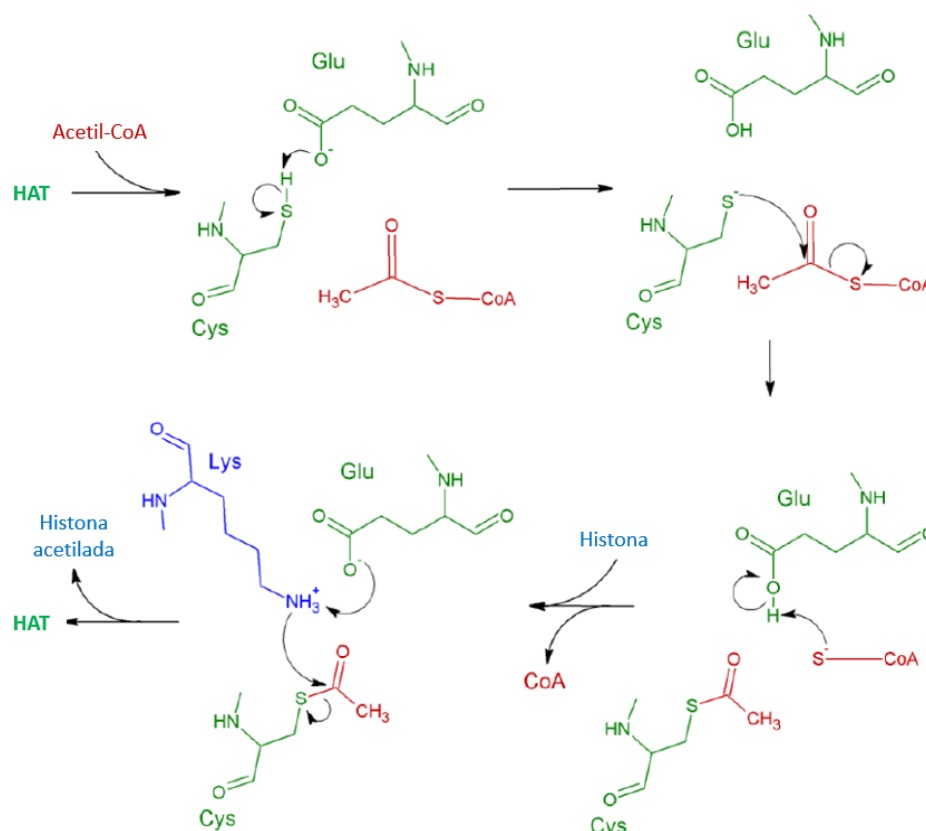


Figura 11. Mecanismo catalítico ping-pong propuesto para la acetilación de sustratos por parte de la familia de acetiltransferasas MYST. En primer lugar, la acetil coenzima A (Ac-CoA) (rojo) se une al sitio activo de la HAT. El grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína (verde) del sitio activo ataca el grupo acetilo de la Ac-CoA, lo que genera un residuo intermediario de cisteína acetilada. La CoA se libera y el residuo de lisina del sustrato (azul), como por ejemplo una histona, se incorpora al sitio activo. Un residuo de glutamato del sitio activo (verde) desprotona entonces el residuo de lisina, que seguidamente ataca al residuo de cisteína acetilado. Esto resulta en la acetilación del sustrato. Figura adaptada de Yan et al., 2002.

Centrando el interés en Tip60, se sabe que contiene el dominio MYST conservado en su zona C-terminal. Junto con este dominio común, Tip60 presenta en su zona N-terminal un cromodominio, fundamental para su unión a la cromatina a través de residuos de lisina metilados y una secuencia de localización nuclear (NLS) en la zona media de la proteína (residuos 219-222), fundamental para su interacción con la importina α y la consecuente localización nuclear de esta acetiltransferasa (figura 12, A). Conservando estos dominios intactos, es importante mencionar que actualmente se han descrito cuatro isoformas diferentes de Tip60, las cuales son generadas como consecuencia de procesamientos alternativos a partir de los 14 exones del gen *KAT5* que codifica para la proteína (Sapountzi et al., 2006). De estas 4 isoformas, la isoforma 1 incorpora el intrón 1 durante la traducción, lo que implica una expansión de 33 aminoácidos en el extremo N-terminal que resulta en una proteína de 546 aminoácidos y un peso molecular de 61 kDa (Sapountzi et al., 2006). La isoforma 2, por su parte carece de esta expansión, generando una proteína de 513 aminoácidos y un peso molecular de 58 kDa. Esta isoforma representa la variante mejor caracterizada. La tercera isoforma carece del exón 5, lo que resulta en una delección de 52 aminoácidos entre el cromodominio y el dominio MYST, generando una proteína de 461 aminoácidos y un

peso molecular de 53 kDa (Sapountzi et al., 2006). Por último, la cuarta isoforma implica por un lado la incorporación de la expansión del intrón 1 descrita para la isoforma 1 y la pérdida del exón 5 descrita para la isoforma 3, generando una proteína de 494 aminoácidos y un peso molecular de 56 kDa. Dadas estas 4 variantes de Tip60, se ha especulado la posibilidad de que cada una de ellas lleve a cabo distintas funciones celulares. Sin embargo, no existen resultados concluyentes a favor de esta hipótesis en la bibliografía (Legube y Trouche, 2003). Por otro lado, cabe destacar que durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizará la isoforma 2 como canónica, siendo los residuos indicados a lo largo de la misma los correspondientes a esta variante.

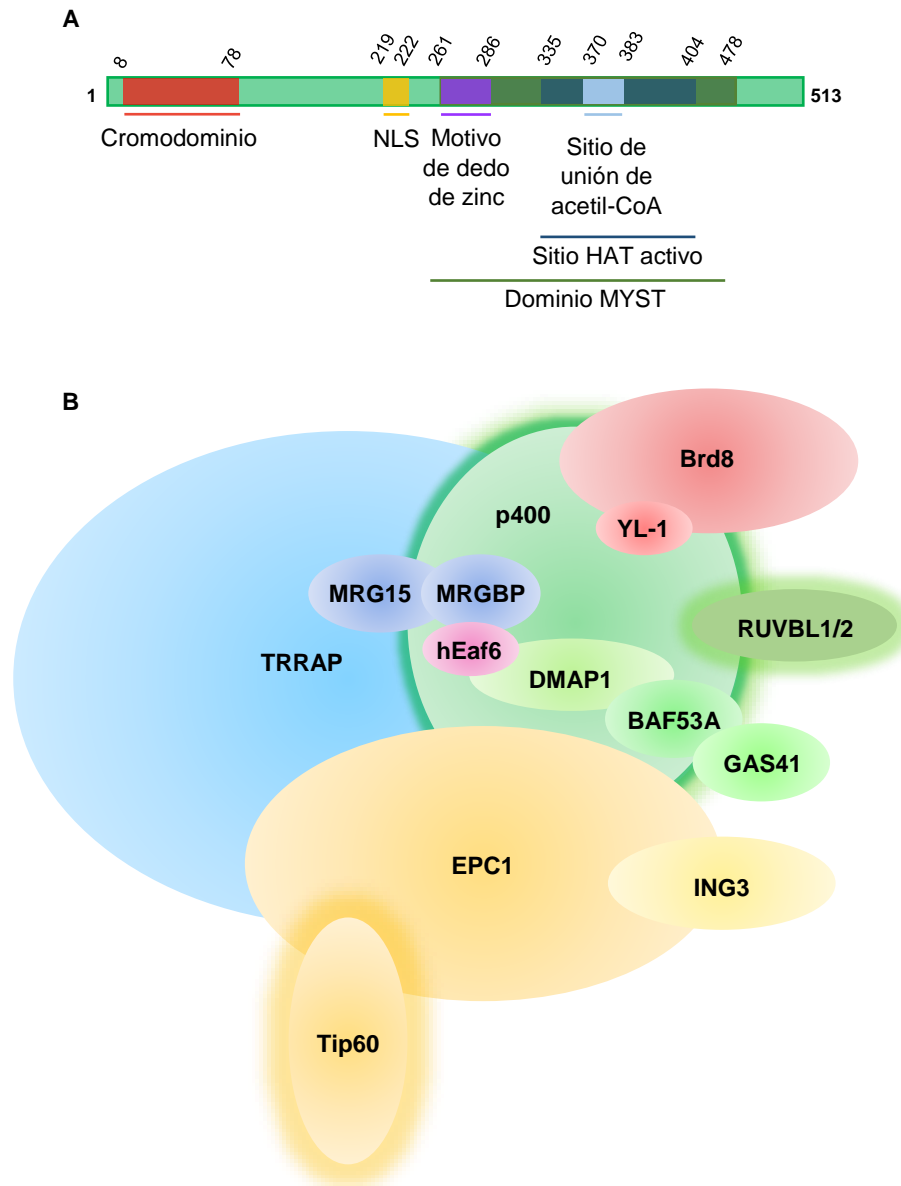


Figura 12. (A) Representación esquemática de la estructura de la acetiltransferasa Tip60. La estructura de Tip60 representada corresponde a la isoforma 2 canónica de la proteína. **(B)** Estructura esquemática del complejo NuA4. En sombreado aparecen las subunidades proteicas del complejo con actividad catalítica (Tip60, p400 y RUVBL1 y RUVBL2). Figura adaptada de Doyon y Cote, 2004.

Más allá de su estructura secundaria y terciaria, *in vivo*, Tip60 aparece formando parte de un complejo multiproteico que define su estructura cuaternaria (figura 12, B). Este complejo, denominado NuA4 (del inglés, *Nucleosome Acetyltransferase of histone H4*), fue inicialmente caracterizado en levaduras y se encuentra tanto estructural como funcionalmente conservado entre eucariotas. En humanos está conformado por, al menos, 15 subunidades (Tip60, p400, TRRAP, Brd8, EPC1, DMAP1, ING3, YL-1, RUVBL1, RUVBL2, BAF53a, MRG15, GAS41, MRGBP y hEaf6), 12 de las cuales guardan homología con las 13 subunidades identificadas en el complejo de levaduras (Doyon y Cote, 2004). De todas ellas, sólo p400, actuando como remodelador de la cromatina con actividad ATPasa perteneciente a la familia SWI/SNF, las helicasas RUVBL1 y RUVBL2 y Tip60 cuentan con actividad catalítica.

Por su parte, la subunidad TRRAP, que forma parte de la familia de las PIKKs pero carece de actividad catalítica, es de gran importancia en el complejo al actuar como proteína andamio fundamental para la integración y mantenimiento del mismo (House et al., 2014). El resto de subunidades, aunque no tan ampliamente caracterizadas, se cree que cooperan de forma conjunta para proporcionar al complejo una funcionalidad altamente regulada (Doyon y Cote, 2004). Así, por ejemplo, ING3, actúa como coactivador transcripcional dependiente de p53 (Nagashima et al., 2003) mientras que GAS41 (del inglés, *glioma-amplified sequence*) puede actuar como represor de esa misma ruta transcripcional mediada por p53 (Park y Roeder, 2006).

6.2. FUNCIONES DE TIP60

Desde el descubrimiento de Tip60 como un cofactor de la proteína Tat del virus HIV-1, se han descrito otras muchas funciones de la proteína ligadas a su actividad acetiltransferasa que son fundamentales para el correcto desarrollo de diferentes procesos celulares. Entre dichas funciones destacan su implicación en la regulación transcripcional o en la modulación de la DDR y de la epigenética asociada a la misma.

6.2.1. Tip60 como regulador de la transcripción

El hecho de que Tip60 constituya un *writer* epigenético con capacidad de acetilar diferentes residuos de histonas, sitúan a esta proteína como un potente candidato a regular la transcripción génica. De hecho, numerosos estudios han demostrado el papel de Tip60 como regulador transcripcional gracias a la acetilación de regiones promotoras. En base a esto, la relajación parcial de la cromatina asociada a dicha acetilación posibilita el acceso tanto de los factores de transcripción como de la maquinaria transcripcional, desencadenando así este proceso de expresión génica (Ginsburg et al., 2009; Kim et al., 2012). Por lo tanto, desde un punto de vista meramente epigenético, Tip60 actúa como un coactivador transcripcional.

Junto con la modulación epigenética de la transcripción, otros estudios han demostrado que el papel de Tip60 en este proceso es mucho más amplio al modular no solo la estructura de la cromatina, sino también la actividad de diferentes factores de transcripción. Esta función de Tip60 implica la interacción y/o acetilación de dichos factores transcripcionales que, como consecuencia, pueden ser reclutados a regiones genómicas concretas para regular así la expresión de diferentes genes. En este sentido, a diferencia de la función epigenética en la que Tip60 actúa como coactivador transcripcional, la acetiltransferasa puede actuar como coactivador o como correpresor transcripcional (Hlubek et al., 2001). Un ejemplo del primer caso es la modulación del receptor de estrógenos α (ER α). Tip60 interacciona directamente con este factor de transcripción, dirigiéndolo a regiones cromosómicas en las que la propia Tip60 acetila la lisina 5 de la histona H2A y desencadena así la actividad de ER α (Jeong et al., 2011). Por otro lado, cabe destacar el papel que Tip60 ejerce sobre p53 en lo que resulta un aspecto fundamental para determinar el destino de la célula entre parada del ciclo celular o inducción de apoptosis. Ambas posibilidades, parada del ciclo y apoptosis, están desencadenadas por rutas de transducción de señales que convergen en p53. En este punto, p53 puede activar diferentes genes efectores, incluyendo, por ejemplo, aquellos que codifican para p21, un inhibidor de ciclina/cdk que permite la parada del ciclo, o aquellos que codifican para PUMA o BAX, inductores de la apoptosis. Así, el destino celular final depende del balance entre la expresión de genes pro-apoptóticos y genes inductores de la parada de ciclo (Vousden, 2002). Teniendo en cuenta esto, la regulación de la actividad de p53 sobre los genes diana debe de estar estrictamente regulada, asegurando así el desarrollo de la respuesta celular adecuada. La acetilación de p53 por parte de Tip60 en su lisina 120 parece ejercer dos funciones fundamentales a favor de la inducción de apoptosis y en detrimento de la parada del ciclo celular (figura 13). Por un lado, p53 acetilado aumenta su especificidad por regiones promotoras de genes proapoptóticos, aumentando así sus niveles en dichas regiones (Tyteca et al., 2006;

Sykes et al., 2006). Por otro lado, dicha acetilación conduce al reclutamiento de coactivadores específicos que son necesarios para la transcripción de genes pro-apoptóticos, incapaces de ser transcritos con la única presencia de p53 en sus regiones promotoras (Sykes et al., 2006). En contraposición a la actividad de Tip60, la deacetilasa SIRT1 (también conocido como Sir2 α , homólogo en mamíferos de la deacetilasa SIR2 de levaduras) parece ejercer el efecto contrario sobre p53, promoviendo su deacetilación de la lisina 120 y favoreciendo así el arresto del ciclo celular en detrimento de la apoptosis (figura 13) (Luo et al., 2001). La importancia de esta regulación de p53 dependiente de Tip60 se puede justificar en base al hecho de que mutaciones en el residuo diana de p53 acetilado por Tip60 (K120) se han descrito clínicamente como *drivers* del cáncer (Tyteca et al., 2006).

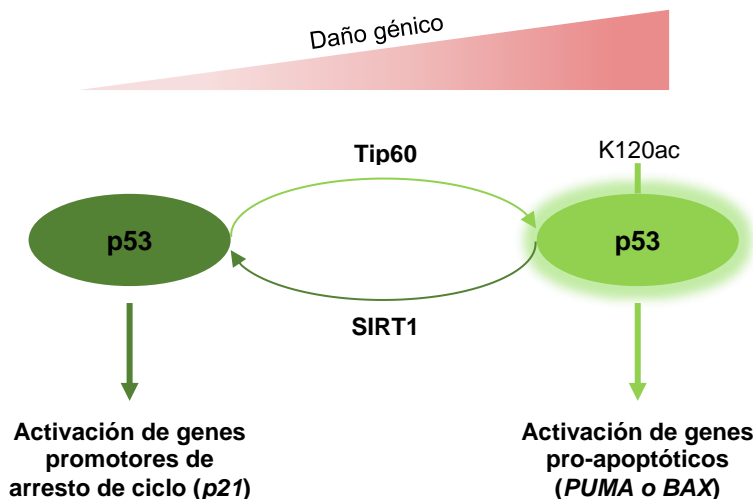


Figura 13. Papel de Tip60 en la determinación del destino celular dependiente de la ruta de transducción de p53. Ante un daño génico escaso, los niveles de p53 acetilado por Tip60 son bajos, lo cual favorece la transcripción de genes implicados en la parada del ciclo celular. Por el contrario, ante un daño génico significativo para el cual la célula no puede hacer frente, los niveles de p53 acetilado en su residuo K120, a través de un proceso catalizado por Tip60, aumentan significativamente. Esto favorece la especificidad de p53 por promotores de genes pro-apoptóticos y, al mismo tiempo, permite el reclutamiento de coactivadores necesarios para la transcripción de dichos genes. Como resultado se desencadena la apoptosis celular. Figura adaptada de Tyteca et al., 2006.

Como corepresor, se sabe que Tip60 inhibe la actividad de otros activadores transcripcionales (Gavaravarapu y Kamine, 2000; Hlubek et al., 2001). El mecanismo de acción de este proceso de inhibición no está del todo establecido y, de acuerdo con diferentes estudios, se piensa que puede ser de forma directa o de forma indirecta. En el primer caso, Tip60 interaccionaría directamente con el factor de transcripción y sería la propia interacción la que impediría una posterior fosforilación y activación del mismo. Este mecanismo se ha descrito, por ejemplo, para la inhibición de CREB por Tip60 (Gavaravarapu y Kamine, 2000). En el caso de inhibir a activadores transcripcionales de forma indirecta, el mecanismo de acción de Tip60 consiste en interaccionar simultáneamente tanto con el propio activador transcripcional como con una proteína inhibidora del mismo. De esta manera, Tip60 actúa como proteína puente para que sea dicho inhibidor el que bloquee la actividad transcripcional del primero. Un ejemplo de este fenómeno se ha descrito para la inhibición de STAT3. En este caso, Tip60 interacciona con la deacetilasa HDAC7, que, por lo tanto, se recluta a regiones cromosómicas en las que Tip60 se encuentra concentrada. Como resultado de este reclutamiento, HDAC7 entra en contacto con el factor de transcripción STAT3, que también interacciona con la acetiltransferasa. Llegados a este punto, HDAC7 inhibe la actividad de STAT3, lo que resulta en un bloqueo de la transcripción (Xiao et al., 2003).

6.2.2. Tip60 como regulador de la DDR

Tal y como se ha descrito en el apartado 4 de esta introducción, Tip60 juega un papel fundamental en las diferentes etapas de la respuesta al daño génico. La primera evidencia de esta importante función de Tip60 fue descrita en el año 2000, cuando la sobreexpresión de un alelo negativo dominante de Tip60 resultaba en una disminución drástica de la reparación de DSBs (Ikura et al., 2000). A raíz de este descubrimiento, se han descrito multitud de funciones de Tip60 en el contexto de daño génico. Dentro de estas, pueden distinguirse tanto funciones epigenéticas como funciones enzimáticas no asociadas a la modificación directa de la cromatina.

Respecto a la función epigenética de Tip60 en la DDR, esta acetiltransferasa actúa como *writer* contribuyendo al establecimiento de un patrón de marcas epigenéticas específico en torno a la región cromatínica dañada. Este patrón epigenético es fundamental para la correcta iniciación, desarrollo y resolución de la respuesta al daño génico y requiere ser modulado y modificado de forma estricta a lo largo de las diferentes etapas del proceso. En este sentido, ya se ha mencionado que, durante la etapa de iniciación de la DDR, Tip60 es imprescindible para la acetilación de residuos de lisina 16 de las histonas H4, lo cual va a posibilitar tanto la descompactación de la cromatina como el reclutamiento de nuevas proteínas iniciadoras y mediadoras de la respuesta (Murr et al., 2005; Deem et al., 2012). La acetilación de la H4K16, constituye, por lo tanto, un marcador fundamental de la inducción de daño génico. Sin embargo, diferentes estudios han revelado otras funciones epigenéticas de Tip60 durante la DDR. Entre ellas, destaca la acetilación de la variante H2AX en la lisina 5 durante la etapa de mediación del daño. Esta acetilación, independiente de la fosforilación de la histona en su residuo S139, es necesaria para la posterior ubiquitinación de la misma en su lisina 199. Esto va a posibilitar el reclutamiento de BRCA1 y la reparación por HR así como una posterior liberación de la variante de histona una vez resuelto el daño, lo que es fundamental para el restablecimiento de la estructura cromatínica basal (Ikura et al., 2007). En este sentido, el mantenimiento y amplificación de las marcas de H4K16ac asociadas a Tip60 en detrimento del establecimiento de marcas de H4K20me2 también son fundamentales para el reclutamiento de BRCA1 y la HR, tal y como se ha explicado anteriormente (Tang et al., 2013).

Por otro lado, entre las funciones no epigenéticas de Tip60 durante la DDR cabe destacar la acetilación de ATM. ATM es una serina-treonina quinasa de la familia PIKK (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase*) que juega un papel central en la coordinación e integración de la DDR con el fin de reparar correctamente el daño (Lavin, 2008). En condiciones normales, ATM se encuentra formando un dímero inactivo. Tras producirse un daño en el ADN, el reclutamiento de Tip60 a la zona dañada permite acetilar a ATM en su lisina 3016 (Sun et al., 2005), lo que a su vez conduce a un fenómeno de autofosforilación de la quinasa en las serinas 367, 1893 y, especialmente, en la serina 1981, por la cual pasa a constituir monómeros catalíticamente activos. Por lo tanto, el papel de Tip60 en la integración de la DDR mediada por ATM es fundamental (Squatrio et al., 2006). Cabe destacar que esta función de Tip60 sobre la activación de ATM parece ser llevada a cabo por una subpoblación de la acetiltransferasa diferente al que está implicado en sus funciones epigenéticas. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que la interacción de Tip60 con ATM y TRRAP (otro miembro de la familia de las PIKKs, catalíticamente inactivo, que forma parte del complejo NuA4) son mutuamente excluyentes (Sun et al., 2005), por lo que Tip60 no puede estar formando parte del complejo NuA4 cuando lleva a cabo la acetilación de ATM. Además, y en base a esto, otra subpoblación de Tip60 también está involucrada en la acetilación de la DNA-PKcs, otro miembro de la familia de quinasas PIKK, durante la DDR (Jiang et al., 2005). En este caso, al igual que ocurre con ATM, dicha acetilación también permite la activación de la DNA-PKcs que ejercerá diferentes funciones, incluyendo la fosforilación e inhibición de ATM o la inducción en fase S de la reparación por HR en detrimento de la NHEJ (Yue et al., 2020).

Por último, de acuerdo con la función previamente descrita que Tip60 ejerce sobre la actividad de p53, esta acetiltransferasa también estaría actuando durante la DDR controlando el destino celular tras la aparición de daño génico. Así, ante la acumulación de gran cantidad de daño, incapaz de ser resuelto durante la DDR, Tip60 promueve la acetilación de p53 para inducir apoptosis celular (Tyteca et al., 2006).

6.3. REGULACIÓN DE TIP60

Teniendo en cuenta la multitud de procesos celulares en los que Tip60 participa, se hace evidente que es necesaria una regulación estricta de su actividad acetiltransferasa. De hecho, alteraciones en su capacidad catalítica a menudo implican el desarrollo de diferentes enfermedades, incluyendo Alzheimer o cáncer (Pirooznia et al., 2012; Sapountzi et al., 2006). Por lo tanto, cómo la actividad de Tip60 es regulada en función de los requerimientos celulares constituye un factor fundamental para el entendimiento tanto de los diferentes procesos celulares en los que participa como del desarrollo de enfermedades humanas. En base a esto, en los últimos años diferentes estudios se han centrado en elucidar la regulación de la actividad acetiltransferasa de Tip60.

En primer lugar, un factor fundamental que puede influir en la actividad de esta proteína es el macrocomplejo del que forma parte. El hecho de que NuA4 cuente con numerosas subunidades proteicas parece indicar que la actividad de las diferentes subunidades puede estar estrechamente sujeta a la actividad de otros miembros del complejo. Así, por ejemplo, se sabe que TRRAP actúa como módulo de reclutamiento del complejo hacia regiones cromatínicas específicas que podrían favorecer la actividad de Tip60 (Brown et al., 2001). De igual manera, el cromodominio de la subunidad MRG15 se cree que también puede estar interviniendo en el reclutamiento de Tip60 a regiones concretas de la cromatina (Doyon et al., 2004; Reid et al., 2004). Este sistema de regulación de Tip60 está orientado a promover o limitar la accesibilidad de Tip60 a sus sustratos con el fin de inducir o prevenir, respectivamente, la acetilación de los mismos. Sin embargo, al igual que ocurre con multitud de enzimas, Tip60 debe estar sujeta a mecanismos de regulación más estrictos que permitan modular directamente su capacidad catalítica. El principal mecanismo de regulación de la actividad acetiltransferasa de Tip60 está asociado a un proceso de autoacetilación. En base a este mecanismo, Tip60 presenta una actividad catalítica basal a través de la cual, según los requerimientos celulares, puede catalizar la autoacetilación de su lisina 327, próxima al sitio activo del dominio MYST. Como consecuencia de esta autoacetilación, Tip60 aumenta su capacidad de *cis*- y *trans*- acetilación. El hecho de que la autoacetilación de Tip60 aumente su actividad es probablemente debido a pequeños cambios estructurales a nivel de su región catalítica, aunque este mecanismo que relaciona autoacetilación con actividad debe ser estudiado de forma más precisa (Yang et al., 2012). Por otro lado, un estudio ha demostrado que Tip60 está sujeta a una regulación estricta de sus niveles de autoacetilación a través de un mecanismo opuesto de deacetilación. Como resultado, existe un balance altamente regulado entre niveles de Tip60 acetilada y Tip60 deacetilada que determina en última instancia la actividad de la proteína. Este proceso de deacetilación es llevado a cabo por SIRT1 y, como resultado, Tip60 se degrada vía proteasoma (Wang y Cheng., 2010; Peng et al., 2012). Por último, cabe destacar que, más recientemente, se han identificado otros residuos de autoacetilación de Tip60, pudiendo contribuir de forma similar a la regulación de su actividad acetiltransferasa (Yang et al., 2012; Yi et al., 2014).

El mecanismo de regulación por autoacetilación de Tip60 no proporciona un control completo de su actividad acetiltransferasa, más aún teniendo en cuenta que un estado deacetilado de la acetiltransferasa también cuenta con una actividad acetiltransferasa basal (Yang et al., 2012). En base a esto, debe existir un mecanismo previo que regule la actividad acetiltransferasa basal y, por consiguiente, su actividad autocatalítica. En este sentido, algunos estudios sugieren que los diferentes dominios de la acetiltransferasa pueden ejercer un control preciso de su actividad catalítica. Por ejemplo, se ha demostrado que la unión del cromodominio de Tip60 a residuos de lisina metilados de las colas N-terminales de la histona H3 (H3K36me3, concretamente) es importante para regular la propia actividad acetiltransferasa. Según estos estudios, esta unión induce un cambio conformacional en la proteína que facilita el proceso de autoacetilación y aumenta, de esta manera, su actividad enzimática. Además, este proceso también facilitaría el acercamiento de la enzima a su sustrato diana, modulando no solo su autoacetilación sino también la acetilación del sustrato. Este sistema de regulación establece un *crosstalk* en trans positivo entre la H3K36me3 y la H4K16ac que resulta ser fundamental durante la DDR (Li y Wang, 2017).

Por otro lado, diferentes modificaciones post-traduccionales pueden ejercer funciones reguladoras de la actividad enzimática de Tip60. Entre ellas, la fosforilación ha sido ampliamente descrita en multitud de estudios como un mecanismo reversible y preciso en la regulación de la capacidad catalítica de numerosas enzimas (Cohen, 2000; Gomase y Tagore, 2008). Teniendo en cuenta la multitud de funciones de Tip60 y la necesidad no sólo de controlar su actividad, sino también de coordinarla con otros muchos *writers* y *erasers* epigenéticos, se hace factible que este proceso de fosforilación constituya un mecanismo candidato

a regular la actividad de la acetiltransferasa. De hecho, se sabe que Tip60 es fosforilada por diferentes quinasas en el contexto de la regulación transcripcional. En 2003, Khochbin y su equipo (Lemerrier et al., 2003) identificaron que la fosforilación de la acetiltransferasa en sus residuos serina 86 y serina 90 era fundamental para promover su actividad acetiltransferasa en este contexto. De acuerdo con su estudio, la serina 90 es fosforilada por CDK1 (también llamada Cdc2), tras su unión a la ciclina B en la transición entre G2 y mitosis, posibilitando la parada del ciclo celular. Por su parte, otro grupo de investigación identificó a GSK-3 (del inglés, *glycogen synthase kinase-3*) como la quinasa responsable de fosforilar a la serina 86. Dicha fosforilación es fundamental para regular el proceso de acetilación de p53 mediado por Tip60 e inducir apoptosis, tal y como se ha descrito en el apartado 6.2.1. (Charvet et al., 2011). De acuerdo con otra investigación realizada en 2016 por Yingxi Xu y sus colaboradores (Xu et al., 2014), otra fosforilación en Tip60 también es esencial para inducir esta ruta transcripcional de apoptosis mediada por p53. En este caso se describe que tras la acumulación de daño génico, la quinasa p38 α es activada y fosforila a Tip60 en su residuo T158, modificación que también parece ser fundamental para la acetilación de p53 y el desencadenamiento de la apoptosis. Por último, otro estudio más reciente también ha identificado una nueva fosforilación en Tip60 necesaria para modular la maquinaria de transcripción. Dicha fosforilación tiene lugar en la serina 90, pero en este caso no es llevada a cabo por CDK1 en la fase G2/M del ciclo, sino por la CDK9 en combinación con la ciclina T1 en lo que es conocido como complejo P-TEFb (del inglés, *positive transcription elongation factor b*) (Brauns-Schubert et al., 2018). P-TEFb juega un papel fundamental en la etapa de elongación del proceso de transcripción al permitir que la ARN polimerasa II supere la pausa próxima al promotor (una parada del procesamiento que la ADN polimerasa II experimenta en una región de entre 20 y 50 pares de bases aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción) (Peterlin y Price, 2006; Bacon y D'Orso, 2019). Teniendo en cuenta esto, Tip60 actúa como intermediario en este proceso, de forma que al ser fosforilada por P-TEFb, aumenta su afinidad tanto por la trimetilación de residuos de la histona H3 como por la ARN polimerasa II. Al mismo tiempo, dicha fosforilación en la S90 de Tip60 posibilita la posterior fosforilación en la S86 por GSK-3, previamente descrita, lo que también aumenta la actividad catalítica de Tip60. Ambos fenómenos, el aumento de la afinidad por la ARN polimerasa II y la posibilidad de ser fosforilada en su residuo S86 adquiriendo una mayor capacidad catalítica, conducen en primer lugar a la liberación de la ADN polimerasa de la región en la que su procesividad ha sido bloqueada y, en segundo lugar, a la activación transcripcional de los genes diana (Brauns-Schubert et al., 2018).

Al igual que en el contexto transcripcional, la importancia de Tip60 durante el desarrollo de la DDR hace que su actividad también necesite estar sujeta a un control preciso y eficaz tras la aparición de daño génico. Tal y como se ha descrito anteriormente, durante la etapa de mediación de la DDR, Tip60 juega un papel fundamental a la hora de establecer el tipo de reparación que se va a llevar a cabo. Así, un reclutamiento de 53BP1 asociado a una pérdida de H4K16ac y una ganancia de H4K20me2 en la zona del daño promueven la reparación por unión de extremos no homólogos. Por el contrario, el mantenimiento de la H4K16ac y, consecuentemente, de la H4K20 sin metilar posibilita el reclutamiento de BRCA1 y la reparación por recombinación homóloga. En base a esto, un reciente estudio ha elucidado el mecanismo que permite regular el patrón epigenético entre la acumulación marcas de H4K16ac (e inducción de HR) o marcas de H4K20me2 (e inducción de NHEJ). Dicho mecanismo de regulación epigenética se basa en una fosforilación de Tip60 en sus residuos S86 y S90 en un proceso dependiente de ciclo. Así, durante las fases S y G2 del ciclo en las que la recombinación homóloga es viable, Tip60 es fosforilada en primer lugar en su serina 90 (probablemente por una quinasa dependiente de ciclo no identificada en el estudio), lo que a su vez posibilita una posterior fosforilación en la S86 por GSK-3, tal y como se ha descrito en estudios anteriores. Dichas fosforilaciones conducen a un incremento de la actividad de Tip60 que favorece la acetilación de la H4K16. Como resultado, se induce una acumulación de BRCA1 en detrimento de 53BP1 en las regiones de daño y con ello, la reparación por HR. De hecho, este mismo estudio prueba que mutaciones en los sitios de fosforilación de Tip60 descritos conducen a una pérdida de este patrón de acetilación, así como a sensibilidad al daño génico e inestabilidad cromosómica, confirmando que dichas fosforilaciones son indispensables para el desencadenamiento de la HR (Li et al., 2018).

Más allá de determinar el tipo de reparación que se lleva a cabo, Tip60 tiene otros papeles fundamentales en el desarrollo de la DDR, más concretamente en la etapa de sensibilización al daño. En este sentido, su rol como *writer* epigenético posibilita la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 tras la inducción del daño, siendo ésta una modificación epigenética vital para el desencadenamiento de la respuesta al daño. Posteriormente, Tip60 también es capaz de acetilar y activar ATM que, como proteína

mediadora, amplificará la cascada de señalización y facilitará en gran medida la reparación del daño génico. Sin embargo, cómo la actividad de Tip60 es regulada en estas primeras etapas de la DDR aún no ha sido estudiado. En este contexto, y atendiendo a los datos preexistentes, es viable la posibilidad de que Tip60 también esté sujeta a un proceso de fosforilación que regule de forma controlada su actividad en los primeros instantes tras la aparición del daño génico. De esta manera, se posibilitaría la progresión de la respuesta desde la etapa de sensibilización al daño, en la que Tip60 debe mostrarse catalíticamente activa para posibilitar la descompactación de la cromatina, hasta la resolución del daño o inducción de apoptosis, pasando por puntos intermedios en los que dicha actividad deba verse reducida. En base a esto, se planteó la hipótesis y objetivos de esta tesis doctoral, descritos en el siguiente apartado.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diferentes estudios han demostrado el importante papel que la quinasa humana VRK1 desempeña a lo largo de diferentes etapas de la DDR. Entre ellos, cabe destacar una publicación en la que se demuestra que el silenciamiento de dicha quinasa imposibilita la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 tras la inducción del daño génico (Salzano et al., 2015). Dada la incapacidad de VRK1 de catalizar por sí misma este proceso de acetilación, se deduce que la quinasa está mediando este proceso de forma indirecta. Por otro lado, ya se ha mencionado anteriormente que la regulación de diferentes moduladores epigenéticos como Tip60 aún está poco caracterizada y estudiada, especialmente en el contexto del daño génico, en el que dicha regulación debe ser independiente de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula. En este sentido, quinasas dependientes del ciclo como la CDK1, anteriormente descrita como factor regulador de Tip60 en el control de la progresión del ciclo celular, quedarían descartadas. Teniendo en cuenta todo esto, para el desarrollo de esta tesis doctoral, se planteó la siguiente hipótesis:

VRK1 es responsable de regular y promover la actividad acetiltransferasa de Tip60 durante el desarrollo de la respuesta al daño génico.

En base a esta hipótesis, los principales objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Determinar el efecto que VRK1 tiene sobre la actividad acetiltransferasa, estabilidad y localización de Tip60 durante la respuesta al daño génico.
2. Estudiar si dicho efecto está asociado a la actividad quinasa de VRK1.
3. Identificar el/los residuo/s de Tip60 fosforilados por VRK1 durante la respuesta al daño génico.
4. Determinar el principio mecánico por el cual dicha/s fosforilación/es modulan la actividad acetiltransferasa de Tip60.
5. Estudiar si mutantes patogénicos de VRK1 muestran defectos en la regulación de Tip60 en el contexto del daño génico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

1.1. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

La mayor parte de los resultados mostrados en esta tesis doctoral se han obtenido a partir del trabajo con diferentes líneas celulares que variaban según los requerimientos de cada experimento. Dichas líneas celulares vienen especificadas en la tabla 6. Cabe destacar que aquellas líneas celulares estables, con capacidad para expresar de forma permanente diferentes variantes murinas de *VRK1*, fueron generadas en el laboratorio gracias al trabajo de Patricia Morejón García utilizando la técnica de transducción viral. El cultivo y mantenimiento de las líneas celulares a lo largo de diferentes pases se llevó a cabo en frascos de cultivo (*Flasks; Falcon*) a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. El medio de crecimiento utilizado para todas ellas fue *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; *Gibco-Life Technologies-Invitrogen*) suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS; *Gibco-Life Technologies-Invitrogen*) previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, 2mM de L-glutamina (*Gibco-Life Technologies-Invitrogen*) y los antibióticos penicilina (50 unidades/ml) y estreptomina (50 µg/ml) (*Pen Strep; Gibco-Life Technologies-Invitrogen*). Una vez que las células alcanzaban el 70-90% de confluencia al ser observadas bajo el microscopio óptico invertido *Zeiss Axiovert 25*, éstas eran levantadas de los frascos mediante la retirada del medio de cultivo y su incubación durante 2-3 minutos a 37°C con tripsina-EDTA (*TrypLE Express; Gibco-Life Technologies-Invitrogen*) para proceder así a la realización del pase correspondiente mediante diluciones.

A su vez, la siembra y crecimiento de las líneas celulares para el desarrollo de los experimentos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y utilizando el mismo medio de cultivo sobre placas de cultivo (*Falcon*) de 60 o 100 milímetros de diámetro según los requerimientos.

1.2. SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES MEDIANTE PEQUEÑOS ARN DE INTERFERENCIA

En ciertos experimentos era necesario bloquear la expresión de un determinado gen (*VRK1* o *KAT5* en el caso de esta tesis doctoral) con el fin de evitar la actividad de la proteína para la cual codifica y poder analizar así las consecuencias de la ausencia de dicha proteína en las células. Esta supresión génica se llevó a cabo aprovechando el mecanismo celular Dicer-RISC (Wang et al., 2009) por el cual la célula es capaz de degradar ARNs bicatenarios. Para ello, se utilizan pequeños ARN de interferencia (ARNi, del inglés *small interfering RNA*) que se transfectaban en las células y que iban dirigidos específicamente contra el ARN mensajero codificado por el gen a silenciar o, alternativamente y como control negativo, ARNi que no son diana de ningún gen. Las secuencias nucleotídicas 5' → 3' de dichos ARN de interferencia, proporcionados por la casa comercial *Dharmacon RNA Technologies*, se indican en la tabla 7.

El proceso de transfección de los ARNi se llevó a cabo utilizando Lipotransfectina (*Solmegas*), un reactivo que contiene subunidades lipídicas capaces de formar liposomas de naturaleza catiónica que incorporan los ARNi en ambientes acuosos. Los liposomas se fusionan con la membrana celular, también de naturaleza lipídica, y liberan dichos ARNs de interferencia en el interior celular. Teniendo en cuenta esto se diluían, por cada placa de cultivo de 100 mm de diámetro a silenciar, 8 µl de ARNi a una concentración inicial de 20 µM (o bien, 6 µl de ARNi 20 µM por cada placa de cultivo de 60 mm de diámetro a silenciar) en 1 volumen de medio *Opti-MEM* (*Gibco-Life Technologies-Invitrogen*). De forma paralela, se diluían 16 µl de *Lipotransfectina* por cada placa de cultivo de 100 mm de diámetro (o, alternativamente, 12 µl por cada placa de 60 mm) en 1 volumen de medio *Opti-MEM*. Ambos volúmenes se mezclaban y se incubaban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla de 2 volúmenes se añadía por goteo en las células cultivadas en medio DMEM sin antibiótico (con el fin de prevenir la incorporación del mismo en los liposomas y seguidamente en el interior celular, lo que comprometería la viabilidad celular) a una confluencia del 10-15% y se homogeneizaba con el medio.

1.3. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE ADN PLASMÍDICO DE EXPRESIÓN EUCARIOTA EN LÍNEAS CELULARES

Una vez que las líneas celulares sembradas en placas de cultivo alcanzaban en torno al 20-30% de confluencia (aproximadamente 24-36 horas después de la siembra) y para aquellos experimentos en los que era necesario sobreexpresar determinadas proteínas, se llevaba a cabo la transfección de plásmidos, previamente purificados tal y como se detalla en el apartado 2 de los materiales y métodos, que contenían el ADN codificante de la proteína de interés y con capacidad de ser expresado en células eucariotas. El

conjunto de plásmidos de expresión eucariota utilizados en esta tesis doctoral viene indicado en la tabla 8. La técnica de transfección se llevó a cabo utilizando el compuesto polietilenimina lineal (PEI; *Polysciences, Inc.*). La polietilenimina constituye un polímero catiónico capaz de incorporar ADN en el interior de las partículas que forma y de adherirse a los proteoglicanos cargados negativamente de la superficie celular. De esta manera, el complejo PEI-ADN es incorporado al interior de la célula por endocitosis. Teniendo en cuenta esto, el procedimiento de transfección consistía en mezclar 1 volumen de NaCl 150 mM al que se le ha incorporado el PEI a una concentración de 1 mg/mL con 1 volumen de NaCl 150 mM que contiene una determinada cantidad de ADN plasmídico de interés, la cual varía según la capacidad de expresión de la proteína codificada por el mismo. Dicha mezcla se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se añadía por goteo a las células en cultivo y se homogeneizaba con el medio de cultivo.

1.4. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS Y COMPLEJOS PROTEICOS EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Ciertos experimentos realizados durante el trabajo de esta tesis doctoral requerían inhibir la actividad enzimática de determinadas proteínas y/o complejos proteicos de las células en cultivo. Para ello, se utilizaron diferentes inhibidores químicos, listados en la tabla 9, dirigidos específicamente contra las proteínas en cuestión. Concretamente, las proteínas/complejos que han sido inhibidos en diferentes experimentos han sido las acetiltransferasas Tip60 y p300-CBP, la quinasa ATM y la familia de quinasas PIKK, la proteína quinasa JNK, los ribosomas en su proceso de elongación traduccional y el complejo proteasoma. El tratamiento específico de los cultivos celulares en los que se inhibió cada una de estas proteínas se detalla a continuación.

1.4.1. Inhibición de las acetiltransferasas Tip60 y p300-CBP

Uno de los principales propósitos de esta tesis doctoral era estudiar el papel regulador de la quinasa VRK1 sobre la acetiltransferasa Tip60 durante la respuesta al daño génico. Por ello, la inhibición de la actividad de Tip60, así como de otras acetiltransferasas, en células en cultivo resultaba fundamental para poder comparar los efectos de dichas inhibiciones con aquellos que ocurren debido a la ausencia de VRK1 en las células.

El compuesto MG-149 (*Axon Medchem*) se ha descrito como un potente inhibidor específico de Tip60, por lo que fue utilizado en esta tesis para bloquear la actividad acetiltransferasa de esta proteína. El tratamiento con este inhibidor, disuelto en DMSO, se realizó sobre células en cultivo que se encontraban a una confluencia del 70-80% a una concentración de 1 μ M durante 24 horas (o, alternativamente, a 2 μ M durante 12 horas), tras las cuales, las células eran lisadas tal y como se detalla en el apartado 3.3. de los materiales y métodos.

Por otro lado, la inhibición de la acetiltransferasa p300-CBP también resultó útil en determinados experimentos. En estos casos, se utilizó el inhibidor específico C646 (*Selleckchem*), disuelto en DMSO, a una concentración de 5 μ M durante 24 horas o 10 μ M durante 12 horas sobre células en cultivo a una confluencia del 70-80%.

1.4.2. Inhibición de ATM y PIKKs

ATM juega un papel importante durante la respuesta al daño génico, siendo útil inhibir su actividad, así como la de la familia de quinasas a la que pertenece, en ciertos experimentos de este trabajo para obtener así diferentes conclusiones. Teniendo en cuenta esto, la inhibición específica de ATM se llevó a cabo utilizando el compuesto KU55933 (*Tocris Bioscience*), capaz de bloquear su actividad quinasa. Las células en cultivo para las cuales se inhibió ATM fueron tratadas con KU55933 a una concentración de 10 μ M durante 3 horas.

Por su parte, la inhibición de la familia de PI3K y quinasas relacionadas (PIKKs, del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*) a la cual pertenece ATM se llevó a cabo utilizando cafeína (*Sigma-Aldrich*) a una concentración de 10 mM durante 3 horas una vez que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia.

1.4.3. Inhibición de la familia JNK

En el desarrollo de esta tesis doctoral, la inhibición de la familia JNK fue utilizada con el propósito de identificar posibles enzimas implicadas en la fosforilación de sustratos como Tip60. Para ello, se utilizó el inhibidor irreversible JNK-IN-8 (*Selleckchem*), específico frente a los 3 miembros de la familia, JNK-1, JNK-2 y JNK-3. El tratamiento con dicho inhibidor se realizó incubando las células durante 6 horas a una concentración de 3 μ M.

1.4.4. Inhibición de la síntesis proteica *de novo*

Los ensayos de estabilidad descritos más en detalle en el apartado 9 de materiales y métodos de este trabajo requerían bloquear la síntesis proteica con el fin de posibilitar el estudio de la vida media de las proteínas de interés. Para ello, se utilizó la cicloheximida (*Sigma-Aldrich*), un compuesto producido por la bacteria *Streptomyces griseus* que interfiere con la actividad peptidil transferasa de los ribosomas, bloqueando la elongación traduccional. El tratamiento de las células en cultivo con cicloheximida se llevó a cabo a una concentración de 50 μ g/ml a lo largo de diferentes tiempos, indicados específicamente en cada experimento.

1.4.5. Inhibición del proteasoma

Diferentes experimentos de estabilidad proteica y ubiquitinación de proteínas realizados en este trabajo requirieron bloquear la actividad del proteasoma, una de las maquinarias celulares encargadas de degradar proteínas previamente marcadas con colas de poliubiquitina. En estos ensayos, la inhibición del proteasoma se llevó a cabo utilizando MG-132 (*Calbiochem*), compuesto que se une a los sitios activos de las subunidades β del proteasoma 20S y bloquea su actividad proteolítica. La concentración de MG-132 utilizada fue 25 μ M durante 12 horas o 15 μ M durante 24 horas según los requerimientos de cada experimento.

1.5. INDUCCIÓN DE DAÑO GÉNICO

Con el fin de estudiar el papel de VRK1 sobre Tip60 durante la respuesta al daño génico, las células en cultivo fueron tratadas con diferentes agentes inductores de daño, tales como son la doxorubicina y la radiación gamma ionizante. En cualquier caso, e independientemente de las posibles técnicas de manipulación descritas en los párrafos anteriores a las que fueran necesarias someter las células en los diferentes experimentos, la inducción de daño génico siempre fue el último de los tratamientos realizados. De esta manera, se aseguraba que la respuesta al daño inducida bien por doxorubicina o bien por radiación ionizante estuviera condicionada por la modificación del comportamiento celular asociado a dichas técnicas.

1.5.1. Daño génico con doxorubicina

Tal y como se ha explicado en la introducción de este trabajo, la doxorubicina es un agente quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer cuyo mecanismo de acción se basa en la inducción de daño génico mediante la inhibición de la ADN topoisomerasa II α , causando roturas de doble cadena en la cromatina. La doxorubicina (*Fisher BioReagents*) constituyó el principal mecanismo de inducción de daño génico en este trabajo y se realizó tratando las células en cultivo con el compuesto a una concentración final de 3 μ M para experimentos de inmunofluorescencia, o 10 μ M para experimentos de *western blot*. Los tiempos de tratamiento variaban según los experimentos y aparecen indicados en cada uno de ellos.

1.5.2. Daño génico con radiación ionizante

De forma alternativa a la doxorubicina, las células fueron sometidas a dosis de 3 Gy de radiación ionizante usando el irradiador *Gammacell 1000 Elite* con fuente de Cs¹³⁷, que emite radiación gamma de E=662 KeV.

2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

2.1. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE BACTERIAS *E. coli*

La transfección transitoria de ADN descrita en el apartado 1.3. de los materiales y métodos de esta tesis doctoral requiere una previa obtención de los vectores plasmídicos capaces de expresar la proteína de interés, los cuales se encuentran incorporados en bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*). Teniendo en cuenta esto, la purificación del ADN plasmídico a gran escala (*Maxi-prep*) a partir de las bacterias se realizó utilizando el kit comercial *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* (*Thermo Fisher scientific*) de acuerdo con el protocolo proporcionado por la casa comercial.

Brevemente, las bacterias que contienen los plásmidos de interés se dejaron crecer en 400 mL de medio de cultivo LB (*Lysogeny Broth*) hasta alcanzar una densidad óptica de 2-3 para una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, las bacterias se precipitaron a 2.500 g durante 10 minutos en centrifugas *AvantiTM J-25* (*Beckman Coulter, Inc.*) y se lisaron utilizando la solución de lisis proporcionada en el kit, precipitando los restos bacterianos mediante centrifugación a 48.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante resultante de esta centrifugación, que contiene el ADN plasmídico, se mezcló con un volumen de etanol al 96% y dicha mezcla se transfirió a una columna de membrana sílica, que se centrifugó a 2.000 g durante 3 minutos. De esta forma, el plásmido quedaba retenido en la membrana, la cual se lavó 3 veces con una solución de lavado proporcionada. Finalmente, el ADN plasmídico retenido en la columna se liberó utilizando una solución de elución también proporcionada por la casa comercial.

En ocasiones fue conveniente llevar a cabo una purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (*Mini-prep*). En estos casos, el proceso de obtención de los plásmidos se realizó utilizando el kit comercial *NucleoSpin plasmid* (*Macherey-Nagel*), siguiendo las indicaciones de la compañía. En este caso, se hacía crecer 1 mL de cultivo, el cual se precipitaba posteriormente mediante centrifugación a 11.000 g durante 30 segundos. El *pellet* de bacterias precipitadas se lisaba entonces a temperatura ambiente y se centrifugaban durante 5 minutos a 11.000 g. De nuevo, el sobrenadante se hacía pasar por una columna con membrana sílica capaz de retener el ADN plasmídico. Dicha membrana se lavó 3 veces a 11.000 g durante 2 minutos para posteriormente eluir y purificar los plásmidos utilizando la solución TE (10 mM Tris pH 8,0 y 1 mM EDTA).

Una vez purificado el ADN plasmídico, bien mediante *Maxi-preps* o bien mediante *Mini-preps*, se determinaba la concentración del mismo en la muestra midiendo su absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *NANODrop* (*NANODrop Technologies*).

2.2. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA

Las muestras de ADN plasmídico purificadas se sometieron a un proceso de electroforesis con el objetivo de asegurar la pureza de la misma. Mediante esta técnica, los fragmentos de ADN se separaban en función su tamaño y carga neta asociada a sus grupos fosfato, de forma que posibles impurezas de ADN diferentes al plásmido de interés pudieran ser detectadas. Para ello, las muestras se cargaban en geles de agarosa del 1% m/v preparados en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8,0 y 1 mM EDTA), los cuales se sumergían previamente en este mismo tampón con bromuro de etidio diluido a una concentración de 0,5 µg/mL. Una vez cargadas en el gel, las muestras se sometían a una corriente eléctrica de 50-70 voltios, lo cual posibilitaba la migración del ADN hacia el polo positivo de la fuente de electroforesis. Durante este proceso, el bromuro de etidio disuelto en el tampón de electroforesis se intercala entre las bases nitrogenadas de los fragmentos de ADN, lo cual posibilitaba la posterior visualización de los mismos al exponer el gel a luz UV bajo la cual el bromuro de etidio emite fluorescencia. Para este proceso de visualización, se utilizó una cámara digital acoplada al analizador de imagen *Gel Doc TM* (*Bio-Rad*), imprimiendo la imagen resultante en papel térmico. Por último, cabe destacar que junto con las muestras de ADN plasmídico se corría paralelamente 5 µL del marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use* (*Thermo Fisher Scientific*) con el fin de determinar el tamaño de los diferentes fragmentos de ADN separados en el proceso.

2.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Durante la realización de esta tesis doctoral fue necesario provocar diferentes mutaciones específicas en nucleótidos puntuales sobre genes de interés que posteriormente codificaran para determinados mutantes de la proteína. Para ello, se llevó a cabo la técnica de mutagénesis dirigida sobre el ADN plasmídico, previamente purificado, que contenía el gen diana. Las mutagénesis dirigidas se realizaron siguiendo el protocolo recomendado por el sistema comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*, el cual se basa en realizar ciclos de amplificación del ADN plasmídico mediante PCR utilizando como *primers* oligonucleótidos que contienen parte de la secuencia del gen con la modificación a incorporar. Teniendo en cuenta esto, se preparó una mezcla que contenía 50 ng del ADN plasmídico a mutar (molde), 10 μ M de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*) con la mutación (ver Tabla 7), 0,2 mM de una mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs; *Hoffman – La Roche*) y una unidad de *PFU DNA polymerase (Diotools, B&M Labs)*, todo ello disuelto en tampón de PCR 1x (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM MgSO₄, 1% Tritón X-100 y BSA 1 mg/mL) a un volumen final de 30 μ L. Así, una vez preparada la mezcla, ésta se sometió al proceso de PCR durante 25-30 ciclos, especificándose a continuación las etapas, temperaturas y duraciones de cada una de ellas para un ciclo completo:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 8 minutos. Aplicable únicamente al primer ciclo del proceso.
- Desnaturalización: 94°C durante 45 segundos.
- Hibridación de *primers*: 68°C durante 1 minuto.
- Elongación: 72°C durante 13 minutos.

Tras la PCR, el ADN molde se eliminó utilizando la enzima *DpnI (Thermo Fisher Scientific)*, una endonucleasa que fragmenta el ADN metilado y hemimetilado, pero no las copias mutadas carentes de estas modificaciones, obteniendo así un producto de PCR que únicamente tiene vectores plasmídicos mutados.

2.4. TRANSFORMACIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS *E. coli* Y SECUENCIACIÓN

Una vez obtenidos los productos de PCR durante el proceso de mutagénesis dirigida, los plásmidos portadores del gen de interés mutado eran incorporados en cepas competentes DH5 α de *E. Coli* con el fin de posibilitar una posterior purificación y transfección de dichos plásmidos en células eucariotas. Este proceso se realizó siguiendo la técnica de transformación bacteriana, que consiste en someter las bacterias a un choque térmico con el fin de generar poros en su pared y membrana celular a través de los cuales se incorpora el ADN plasmídico al interior de las células bacterianas. Teniendo en cuenta esto, el producto resultante de la PCR durante el proceso de mutagénesis se mezcló con las bacterias competentes y dicha mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo. Seguidamente, la mezcla se sometió al choque térmico a 42°C durante 45 segundos para inmediatamente después devolver las bacterias al hielo durante 5 minutos. Una vez hecha la transformación, las bacterias se dejaron crecer en medio LB sin antibiótico durante 1 hora a 37°C, para posteriormente plaquearlas en una placa Petri con LB-agar y con el antibiótico para el cual el plásmido de interés que contiene el gen mutado es capaz de conferir resistencia. Las placas se incubaron durante 12 horas a 37°C, de forma que las colonias aisladas obtenidas eran aquellas que habían incorporado el vector durante la transformación. Estas colonias se hacían crecer de nuevo durante 12 horas a 37°C en medio LB líquido, obteniendo stocks de bacterias portadoras del vector mutado que eran almacenados a -80°C.

Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos incorporados por las bacterias durante el proceso de transformación son realmente portadores del gen de interés mutado, se llevó a cabo un proceso de secuenciación. Para ello, se purificó el ADN plasmídico tal y como se ha especificado anteriormente en el apartado 2.1. de los materiales y métodos. Una vez purificado, los plásmidos eran sometidos a un proceso de amplificación mediante PCR utilizando como *primers* oligonucleótidos que flanquean ambos lados el gen de interés insertado. Este proceso fue llevado a cabo por la unidad de genómica del centro, que posteriormente enviaba las secuencias de nucleótidos obtenidas. Dichas secuencias eran finalmente analizadas utilizando el programa bioinformático *Chromas*, versión 2.6.5 (*Technelysium Pty Ltd, DNA Sequencing Software*), confirmando o no el éxito de la mutagénesis.

3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE BACTERIAS *E. coli*

A la hora de realizar los experimentos de interacción y fosforilación *in vitro* de proteínas, descritos más adelante, fue necesario purificar las proteínas recombinantes a estudiar a partir de bacterias de cepas BL21 de *E. coli* portadoras del plásmido que contiene el gen capaz de codificar dichas proteínas. Los plásmidos utilizados como vectores de clonación para este proceso fueron pGEX-4T-GST o pTAT-V5-His(6x), portadores de la secuencia codificante para variantes de VRK1 o Tip60, respectivamente. Ambos vectores, de expresión bacteriana, portan el operón *lac* inducible que es activado, promoviendo la expresión de la secuencia génica, con la presencia de lactosa o de su análogo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en el medio de cultivo.

Teniendo en cuenta esto, en primer lugar, se preparó un preinóculo de las bacterias BL21 de interés, dejándolo crecer durante 12 horas a 37°C en medio de cultivo LB con el antibiótico correspondiente para el cual el plásmido portador de la secuencia codificante proporciona resistencia. Una vez crecido el preinóculo, se hizo una dilución 1/10 del mismo en LB y se dejó crecer hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 0,6-0,8 para una longitud de onda de 600 nm. Llegados a este punto, se procedió a inducir la expresión de la proteína de fusión mediante la adición de IPTG (*Roche Applied Science*) a una concentración de 0,1 mM en el medio de cultivo, el cual fue incubado durante 3 horas a 37°C. Transcurridas estas 3 horas en las que la proteína de fusión se ha expresado, las bacterias fueron precipitadas mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos y seguidamente resuspendidas en tampón de lisis (1% Tritón X-100, 0,2 μ g/mL lisozima, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 5 mM ditiotreitól (DTT), 10 μ g/mL aprotinina y 10 μ g/mL leupeptina, todo ello disuelto en PBS 1X) y sonicadas para favorecer su lisis mediante la utilización del sonicador *Vibra Cell (Sonics)*. La sonicación se llevó a cabo a lo largo de 5 pulsos de intensidad media y duración 10 segundos, con intervalos de pausas de 10 segundos entre cada pulso. Tras esto, se dejaron las bacterias 30 minutos en hielo para completar la lisis y posteriormente las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 30 minutos para precipitar el debris celular. El sobrenadante, en el cual se encuentran disueltas las proteínas de fusión, se incubó durante 4 horas a 4°C en agitación suave bien con 100 μ l de resina *Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare)* en el caso de purificar proteínas de fusión con GST o bien con 100 μ l de la resina *TALON Metal Affinity Resin (Clontech)*, la cual muestra afinidad para proteínas de fusión portadoras del tag de histidinas. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con tampón de lisis 3 veces mediante centrifugaciones de 5 minutos a 3.000 rpm y 4°C. Cabe destacar que, en el caso de las proteínas de fusión con el tag de histidinas, el proceso de lavado se realizó con dicho tampón de lisis incorporando imidazol 50 mM, de forma que el imidazol a esta concentración compitiera con uniones inespecíficas a la resina y mejorara la calidad del lavado. Después, se procedió a la elución de las proteínas unidas a la resina. En el caso de la purificación de proteínas con GST esta elución se realizó incubando la muestra en agitación suave durante 8 horas a 4°C con 100-200 μ l de un tampón específico que contiene glutatión 10 mM (concentración a la cual el glutatión compite con la proteína de fusión y la libera de la columna) disuelto en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Por su parte, las proteínas de fusión con el tag de histidinas se eluyeron incubando la muestra durante 8 horas a 4°C con 100-200 μ l del tampón de lisis en el que previamente se disolvió imidazol a una concentración saturada de 500 mM, posibilitando así liberar la proteína de la resina. Transcurridas las 8 horas de elución, las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 3 minutos, precipitando la resina y rescatando las proteínas en la fracción soluble. Finalmente, con el objetivo de asegurar la presencia de la proteína de interés en el tampón de elución, se realizó una electroforesis de una pequeña fracción de la muestra en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (ver apartado 3.6. de materiales y métodos) y una posterior tinción del gel con azul de *Coomassie* (ver apartado 3.7.). Al mismo tiempo, se determinó la concentración de la proteína en la muestra mediante técnicas colorimétricas utilizando el reactivo *Bradford* del kit *Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)*, tal y como se describe en el apartado 3.5. de los materiales y métodos.

3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS A PARTIR DE CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO

Para analizar *in vivo* diferentes proteínas de interés, en primer lugar era necesario obtener extractos proteicos de las células en cultivo sobre las cuales se lleva a cabo el estudio. Para ello, las células se lisaron con tampón de lisis suave (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1 mM EDTA, todo ello disuelto en agua *miliQ*), previamente complementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptina y 10 μ g/mL aprotinina) e inhibidores de fosfatasa (1 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄ -

ortovanadato sódico-). La suspensión se incubó durante 20 minutos en hielo, tras los cuales se centrifugó a 13.200 rpm durante 20 minutos a 4°C con el objetivo de precipitar y eliminar el *debris* celular. De esta manera, las proteínas solubles de interés fueron rescatadas en el sobrenadante, del cual, posteriormente, se midió la concentración proteica de acuerdo con el apartado 3.5. de los materiales y métodos.

3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE FRACCIONAMIENTO NUCLEOPLASMA-CROMATINA

En ciertos experimentos de este trabajo fue necesario analizar y comparar la distribución de ciertas proteínas en dos fracciones nucleares diferentes: el nucleoplasma y la cromatina. En este caso, el proceso de obtención de proteínas siguió un protocolo diferente al descrito en el apartado anterior, con el fin de posibilitar una correcta separación entre ambas fracciones. Dicho protocolo se basó en la técnica descrita por Brauns-Schubert y colegas (Brauns-Schubert et al., 2018). Las células en cultivo fueron lisadas e incubadas en hielo durante 8 minutos utilizando el tampón de lisis citosólico (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,34 mM sacarosa, 10% glicerol, 20 μM MG132, 0,1% Tritón X-100, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptina, 10 μg/mL aprotinina, 1 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄, todo ello disuelto en agua *miliQ*). Posteriormente, se centrifugó el lisado celular a 1.300 g durante 5 minutos, lo cual permitió separar la fracción citoplasmática (sobrenadante), que fue descartada, de la fracción nuclear (precipitado). Dicha fracción nuclear fue entonces resuspendida en tampón de extracción nucleoplasmático (400 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 μM MG132, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptina, 10 μg/mL aprotinina, 1 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄, todo ello disuelto en agua *miliQ*) e incubada en hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 1.000 g durante 2 minutos, lo que permitió precipitar la cromatina y conservar la fracción nucleoplasmática en el sobrenadante. Esta fracción nucleoplasmática fue transferida a un nuevo tubo, determinando la concentración proteica de la misma mediante el método *Bradford* descrito en el apartado 3.5. para su posterior análisis por *western blot*. Por su parte, la fracción cromatínica precipitada se lavó 3 veces en el tampón de extracción nucleoplasmático descrito anteriormente mediante centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos. Después de los lavados, la cromatina se resuspendió en tampón de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptina, 10 μg/mL aprotinina, 1 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄) y se sonicó a 4°C en 5 pulsos de 30 segundos, con intervalos de espera de 30 segundos entre cada pulso, utilizando para ello el sonicador *Vibra Cell (Sonics)*. Este proceso posibilitó la fragmentación del ADN y la liberación de las proteínas cromatínicas asociadas. Finalmente, se determinó la concentración proteica de esta fracción cromatínica mediante el método *Bradford*.

3.4. EXTRACCIÓN ÁCIDA DE HISTONAS A PARTIR DE CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO

De forma alternativa a las técnicas de obtención proteica descritas en los dos apartados anteriores, en aquellos experimentos en los que fue necesario analizar mediante *western blot* las histonas y las modificaciones covalentes asociadas a las mismas, la purificación de estas proteínas cromatínicas se realizó mediante la técnica de extracción ácida descrita anteriormente por Shechter et al., 2007. Para ello, una vez que las células en cultivo fueron sometidas a los tratamientos correspondientes, éstas se levantaron con tripsina-EDTA (*TrypLE Express; Gibco-Life Technologies-Invitrogen*) y se centrifugaron durante 10 minutos a 300 g, descartando el sobrenadante. A continuación, el precipitado de células se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis hipotónico (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ y 1mM DTT), previamente suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptina y 10 μg/mL aprotinina). Esta suspensión se incubó en agitación ligera a 4°C durante 30 minutos, lo cual permitió una lisis celular tanto hipotónica como mecánica y, transcurrido este tiempo, se sometió a una centrifugación de 10.000 g durante 10 minutos, lo cual posibilitó precipitar y aislar los núcleos celulares. Seguidamente, estos núcleos se resuspendieron en 400 μl de H₂SO₄ a una normalidad de 0,4 N, obteniendo una solución homogénea que se incubó durante, al menos, 1 hora en agitación ligera a 4°C. Este proceso permitió liberar las histonas de la cromatina, de forma que, transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos, precipitando el *debris* nuclear y obteniendo un sobrenadante en el que se encontraban disueltas las histonas. Así, este sobrenadante se pasó a un nuevo tubo sobre el cual se llevó a cabo la precipitación de las histonas mediante la adición, gota a gota, de ácido tricloroacético a una concentración del 33%. Las muestras, que adquirirían en este punto un aspecto lechoso, se incubaron entonces en hielo durante al menos 1 hora y, seguidamente, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos para posibilitar la sedimentación de las histonas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con acetona fría mediante centrifugación a 16.000 g durante 5 minutos, lo cual permitía eliminar

los posibles restos de ácido presentes en las soluciones. Por último, se dejó secar el precipitado de histonas durante al menos 20 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de agua *miliQ*. La concentración de histonas en las muestras fue entonces determinada mediante el método *Bradford* (apartado 3.5.).

3.5. CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS E INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEINAS

Tras la obtención de extractos proteicos por cualquiera de las 3 metodologías explicadas en los apartados anteriores, se procedió a determinar la concentración de proteína en los mismos. De esta manera se podrían preparar posteriormente muestras con una cantidad equitativa de proteína para cada uno de los puntos de estudio. Tal y como se ha mencionado anteriormente, el proceso de cuantificación y determinación de la concentración en los extractos proteicos se llevó a cabo mediante el método *Bradford*, que se basa en el empleo de azul brillante G-250 Coomassie, proporcionado en el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)*. Este compuesto torna de un color pardo a uno azulado al unirse a las proteínas de la muestra, alterando su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm. Teniendo en cuenta esto, se preparó una curva patrón de concentraciones crecientes y conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) para las cuales se estableció una absorbancia específica a 595 nm utilizando el espectrofotómetro *U-2001 (Hitachi)*. Posteriormente, añadiendo la misma cantidad de reactivo a cada una de las muestras, se midió la absorbancia para dicha longitud de onda y, mediante interpolación, se pudo determinar la concentración de proteína en las mismas. Una vez determinada la concentración, se prepararon extractos proteicos con la misma cantidad de proteína total para cada una de las muestras, se les añadió 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 hirvieron a 100°C durante 5 minutos. De esta manera, dichos extractos quedaban listos para ser sometidos a electroforesis (apartado 3.6.) y analizados.

De forma paralela, para ciertos experimentos fue necesario aislar, a partir de los extractos proteicos, una proteína concreta de interés. Este proceso se llevó a cabo mediante la técnica de inmunoprecipitación. Así, una vez cuantificados los extractos proteicos tal y como se ha descrito, se prepararon muestras de entre 1000 y 2000 μ g/mL en un volumen total de 1 mL. A estas muestras se añadió un anticuerpo específico dirigido bien frente a la proteína endógena de interés o bien frente a un epítipo concreto que presente la proteína de fusión transfectada. La muestra se incubó entre 8 y 12 horas en agitación ligera a 4°C. Cabe destacar que la concentración de los diferentes anticuerpos utilizados en el proceso de inmunoprecipitación variaba de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por la casa comercial para el desarrollo de esta técnica, pero como norma general oscilaban en diluciones de entre 1:50 y 1:500. Tras el periodo de incubación con el anticuerpo, las muestras se incubaron durante 8 horas a 4°C con 60 μ L de la resina *Protein G Agarose Resin 4 Rapid Run (Agarose Bead Technologies)*, previamente equilibrada al 50% con tampón de lisis suave (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1 mM EDTA, todo ello disuelto en agua *miliQ*). Esta resina se caracteriza por presentar monómeros de proteína G de *Streptococcus* unidos a perlas de agarosa, de forma que la proteína G reconoce y se une específicamente a la región Fc constante de los anticuerpos añadidos a la muestra. Transcurrida la incubación con la resina, las muestras se centrifugaron a 2.200 rpm durante 2 minutos, de forma que el complejo agarosa-proteína G-anticuerpo-proteína de interés precipitaba. Se eliminaba así el sobrenadante que contiene el resto de proteínas presentes en el extracto, y el precipitado se lavaba 3 veces con tampón de lisis suave mediante nuevas rondas de centrifugación a 2.200 rpm durante 2 minutos. Finalmente, el complejo unido a la resina se resuspendió 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 hirvió durante 5 minutos a 100°C, quedando la proteína de interés lista para ser sometida a electroforesis y analizada por *western blot*.

3.6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO

Una vez preparados y hervidos los extractos proteicos totales o las inmunoprecipitaciones de la proteína de interés con tampón de carga, las muestras de los diferentes experimentos fueron sometidas a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecylsulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*). Esta técnica permite separar las proteínas en función de su tamaño, de forma que cuanto mayor masa molecular tengan, menor será su migración a lo largo del gel cuando se someten a una corriente eléctrica. Para ello, la utilización del dodecilsulfato sódico (SDS) es fundamental, ya que este detergente aniónico desnaturaliza las proteínas y se une a ellas, confiriéndoles una carga neta negativa uniforme gracias a sus grupos sulfato. De esta forma, la propia carga neta de la

proteína queda enmascarada por las múltiples moléculas de SDS y se alcanza una relación carga/masa uniforme que permite la migración de las proteínas hacia el polo positivo del campo eléctrico en función de su masa molecular, tal y como se ha dicho anteriormente.

Teniendo en cuenta esto, se prepararon geles separadores con concentraciones variables de acrilamida y bis-acrilamida en función del tamaño de la/s proteína/s de interés a analizar, con el fin de conferir mayor o menor porosidad y, por lo tanto, menor o mayor resistencia a la migración de dichas proteínas. De forma general, proteínas con masas moleculares inferiores a 30 kDa se corrieron en geles de 12,5% acrilamida y 0,33% bis-acrilamida. Por su parte, proteínas con masas de entre 30 y 150 kDa se corrieron en geles de 10% acrilamida y 0,27% bis-acrilamida, mientras que proteínas mayores de 150 kDa se corrieron en geles de 7,5% acrilamida y 0,2% bisacrilamida. Ambos compuestos, acrilamida y bis-acrilamida, independientemente de su concentración en el gel, se disolvieron en una solución tampón de 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 y 3,5 mM SDS a la hora de preparar el gel, añadiendo persulfato de amonio (APS) como agente iniciador de la polimerización y N, N, N', N'-tetrametilenodiamina (TEMED) como catalizador de la formación de radicales libres que favorecen la polimerización. Sobre los geles separadores, se preparó un gel concentrador, compuesto por acrilamida al 4,8% y bis-acrilamida al 0,128% en una solución tampón de 0,125 mM Tris-HCl, pH 6,8, y 3,5 mM SDS, con una serie de pocillos. Así, una vez preparados los geles, éstos se sumergieron en tampón de carrera compuesto por 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicina y 1,7 mM SDS y las muestras se cargaron sobre los diferentes pocillos del gel concentrador. Además, junto con las muestras, se cargó en uno de los pocillos 5 µl del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad)*. Las muestras se sometieron entonces a una corriente eléctrica de entre 90 y 110 voltios y se dejaron correr hasta que el frente se saliera del gel.

3.7. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL CON AZUL DE COOMASSIE

Para ciertos experimentos y, especialmente, tras la purificación de proteínas a partir de bacterias *E. coli* (apartado 3.1.), fue necesario visualizar y asegurar la presencia de la proteína de interés en geles de poli-acrilamida sometidas al proceso de electroforesis. Para ello, se preparó el reactivo azul de *Coomassie*, capaz de unirse a las proteínas, con 0,5% *Coomassie brilliant blue R250 (Merck)*, 50% metanol (*Sigma-Aldrich*) y 10% ácido acético glacial (*Merck*) y se añadió directamente a los geles de poli-acrilamida, dejándose incubar en agitación suave durante 10-15 minutos. Posteriormente, el gel se lavó con una solución que contiene 50% metanol y 10% ácido acético glacial, con el fin de eliminar los restos de azul de *Coomassie*. De esta manera se hacían visibles así las bandas de proteínas y se podía determinar la presencia o ausencia de la proteína de interés. Finalmente, con el propósito de tener una imagen digital del gel, éste se escaneó en el equipo *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)*.

3.8. TRANSFERENCIA HÚMEDA Y WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS

Una vez que las proteínas fueron corridas y separadas mediante electroforesis y para aquellos experimentos en los que dichas proteínas debían ser analizadas por *western blot*, se procedió a transferir las proteínas de los geles de poli-acrilamida a membranas PVDF *Immobilon-FL (Millipore)*. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Gordon y sus colegas (Towbin et al., 1979). En primer lugar, las membranas se activaron durante 2 minutos mediante su inmersión en metanol (*Sigma-Aldrich*) y, posteriormente, se equilibraron durante 2 minutos en agua *MiliQ*. Una vez activadas, el gel de poli-acrilamida se puso en contacto directo con la membrana en el interior de un casete en el que gel y membrana se encontraban flanqueados por fragmentos de papel absorbente (*Whatman Blotting Papers, Sigma-Aldrich*) y esponjas, favoreciendo de esta manera el proceso de transferencia. Los casetes se incorporaron así en una cubeta en las que quedaban sumergidos en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicina y 10-20% metanol, en función del peso molecular de las proteínas a analizar -menor tamaño de la proteína, mayor concentración de metanol-, todo ello disuelto en agua *miliQ*) y se sometieron a una corriente eléctrica de 90 voltios durante 1-2 horas a una temperatura de 4°C, o alternativamente, a 40 voltios durante toda la noche. De esta manera, las proteínas quedaban transferidas e incorporadas en la membrana, manteniendo la distribución que habían adquirido durante la electroforesis.

Una vez realizada la transferencia húmeda, se procedió a realizar el análisis por *western blot*. Para ello, las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo al 5% disuelta en tampón TBS-T (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl y 0,1% Tween-20 (*Sigma-Aldrich*), todo ello disuelto en agua *miliQ*), o alternativamente, en BSA al 5%, también disuelta en TBS-T. El bloqueo de las membranas se

realizó durante, al menos, 45 minutos, tras los cuales éstas fueron lavadas 3 veces en TBS-T cada 10 minutos. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 8-12 horas a 4°C o durante 2-4 horas a temperatura ambiente con el/los anticuerpo/s primario/s capaces de detectar la proteína o la modificación proteica de interés. Para ello, los anticuerpos eran disueltos en TBS-T o, alternativamente, en leche al 5% o BSA al 5% en TBS-T, según las recomendaciones de la casa comercial. Los anticuerpos utilizados en este trabajo y la dilución a la que se emplearon aparecen especificados en la tabla 10. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se volvieron a lavar de nuevo 3 veces en TBS-T para posteriormente ser incubadas durante 1 hora en oscuridad con el/los anticuerpo/s secundario/s. Estos anticuerpos estaban conjugados con un fluorocromo capaz de emitir fluorescencia cuando se excitan a una longitud de onda determinada. Los anticuerpos secundarios utilizados y la dilución a la que se emplearon aparecen especificados en la tabla 11. Transcurrida la hora de incubación con el/los anticuerpo/s secundario/s, la membrana se lavó nuevamente 3 veces con TBS-T cada 10 minutos y se procedió al revelado. Para ello, se utilizó el equipo *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)*, que era el responsable de excitar el fluorocromo asociado a los anticuerpos secundarios y detectar la fluorescencia emitida por éste, generando una señal directamente asociada a la proteína o modificación proteica reconocida por los anticuerpos primarios. Finalmente, para aquellos experimentos en los que fue necesario, se determinó la intensidad de las bandas obtenidas mediante la utilización del *software ImageJ (NIH)*.

3.9. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA CON ROJO PONCEAU

De forma alternativa a la detección de proteínas mediante *western blot*, para ciertos experimentos en los que únicamente interesaba conocer la cantidad total de una proteína que había sido transferida a la membrana PVDF *Immobilon-FL (Millipore)*, se llevó a cabo un proceso de tinción con reactivo rojo *Ponceau*, un colorante azoico que tiñe reversiblemente las proteínas y no afecta a la aplicación de métodos posteriores, como el propio *western blot*. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 10-15 minutos con una solución compuesta por 0,2% *Ponceau S* (ácido 3-Hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-fenilazo)-2,7-naftalenodisulfónico], 3% ácido sulfosacílico, 3% ácido trifluoroacético y 1% ácido acético. Tras este periodo de incubación, las membranas se lavaron con agua *miliQ* para eliminar los restos de la solución, haciéndose visibles de esta manera las bandas de proteínas.

4. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

A lo largo de esta tesis doctoral se desarrollaron diferentes experimentos de inmunofluorescencia orientados a analizar, a nivel de célula individual, tanto la localización subcelular de determinadas proteínas de interés como las modificaciones covalentes asociadas a ellas. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo el cultivo de las líneas celulares tal y como se ha descrito en el apartado 1 de los materiales y métodos, pero con la particularidad de que, sobre las placas de cultivo, se depositaron entre 4 y 6 cubreobjetos de vidrio (*Thermo Scientific*) con la intención de que las células crecieran sobre ellos y posteriormente se pudieran analizar en el microscopio confocal. Una vez hechos los tratamientos correspondientes al experimento, se aspiró el medio de las placas y los cubreobjetos se depositaron individualmente sobre placas de cultivo de 24 pocillos (*Falcon*). Seguidamente se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 3% en PBS 1X. Esto permitía fijar las células a los propios cubreobjetos. Transcurridos los 30 minutos de fijación, los cubreobjetos se lavaron con 200 mM glicina disuelta en agua *miliQ* durante 15 minutos. Este lavado permitía reducir la toxicidad causada por los grupos aldehídos libres durante la fijación. Tras esto, las células ya fijadas se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS 1X durante 30 minutos. Por último, se bloqueó el proceso de permeabilización mediante la incubación de los cubreobjetos en una solución de BSA al 1% en PBS 1X con azida sódica (agente bacteriostático) a una dilución 1:10.000 durante al menos 2 horas.

Concluido el proceso de fijación y permeabilización de las células, se procedió a realizar el marcaje de las proteínas y/o de las modificaciones covalentes de interés. Para ello, se utilizaron anticuerpos primarios específicos para estas proteínas/modificaciones, los cuales se incubaron sobre los cubreobjetos de forma secuencial y con 3 lavados de 10 minutos en PBS 1X entre ambas incubaciones. Esta incubación se realizaba diluyendo previamente el anticuerpo en una solución de BSA al 1% en PBS 1X con azida sódica (1:10.000) bien durante 12 horas a 4°C o bien durante 6 horas a temperatura ambiente. El conjunto

de anticuerpos primarios utilizados y las diluciones empleadas para cada uno de ellos para esta técnica aparecen especificados en la tabla 10, de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. Tras la incubación del segundo anticuerpo primario, se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X, eliminando así los restos de anticuerpo libre, para posteriormente incubar los cubreobjetos durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (tabla 11) marcados con los fluorocromos cianina Cy2 (verde), Cy3 (rojo) o Cy5 (rojo lejano), según las condiciones del experimento, en una dilución 1:10.000 en BSA al 1% en PBS 1X. Cabe destacar que, dado que los fluorocromos asociados a estos anticuerpos secundarios son fotosensibles, el proceso de incubación de los mismos, así como las etapas restantes del proceso se llevaron a cabo en oscuridad. Transcurrida la hora de incubación de los anticuerpos secundarios, los cubreobjetos se lavaron nuevamente con PBS 1X en 3 etapas de 10 minutos de duración y, a continuación, se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente, con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido en PBS a una concentración de 1µg/mL. Esto permitía teñir los núcleos celulares y facilitar la localización de las proteínas a estudiar. Por último, los cubreobjetos se lavaron 3 veces más con PBS 1X y se montaron sobre los portaobjetos (*Thermo Scientific*) con *MOWIOL 4-88 (Calbiochem)*. Llegados a este punto, se procedió a analizar las muestras a través del microscopio confocal *Leica TCS SP5 DMI-6000B*, utilizando como fuentes de excitación un láser de argón (longitud de onda de excitación a 488 nm) para la detección de fluorescencia verde (emisión a 510 nm) asociada al secundario con Cy2, láser HeNe Green (excitación a 561 nm) para la detección de fluorescencia roja (emisión a 570 nm) asociada al secundario con Cy3, láser HeNe Red (longitud de onda de excitación de 633 nm) para la detección del rojo lejano asociado al Cy5 (emisión a 670 nm) y láser diodo 405 (excitación a 405 nm) para la detección de la fluorescencia asociada al DAPI (emisión a 456 nm). Cabe destacar que, dentro de un mismo experimento, la intensidad y ganancia de dichos láseres, así como la compensación de los fotomultiplicadores se mantuvieron constantes para las diferentes muestras, de forma que se pudiesen comparar las fotos correspondientes a las diferentes condiciones de forma fidedigna. Una vez encontrados mediante observación directa a través del microscopio, con una lente de 63 aumentos, campos ópticos con el suficiente número de células, se capturaron digitalmente imágenes con un *zoom* de 1.5 aumentos sobre el campo detectado, una resolución de 1024 x 1024 y una velocidad de escaneo de 600 Hz. Las imágenes tomadas fueron entonces analizadas a través del programa *ImageJ (NIH)*, con el cual se analizó y cuantificó, en el caso que fuera necesario, la intensidad de fluorescencia nuclear asociada a los diferentes anticuerpos primarios.

5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

A lo largo de este trabajo, se realizaron diferentes experimentos cuyo objetivo era determinar si dos proteínas de interés interactuaban entre sí. El estudio de estas interacciones se realizó siguiendo dos perspectivas: ensayos interacción *in vitro* de las proteínas, que permite determinar si las proteínas tienen la capacidad, en base únicamente a su estructura, de interactuar entre sí cuando ambas se incuban conjuntamente; y ensayos de interacción *in vivo*, que permite concluir si dicha interacción es posible y tiene lugar en el contexto celular bajo determinadas condiciones.

5.1. ENSAYO *IN VITRO* DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la realización de estos ensayos de interacción, en primer lugar, se purificaron las proteínas de interés a estudiar de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.1. Una vez purificadas y determinada su concentración, ambas proteínas se incorporaron en un tubo de 1,5 mL a las cantidades que se especifica en cada uno de los experimentos sobre tampón de interacción (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl disueltos en PBS 1X) en un volumen final de 25 µL. De forma paralela, como control negativo, se añadió en otro tubo de 1,5 mL una mezcla de proteína GST libre, también purificada, con la proteína sustrato con el objetivo de descartar que la interacción, en caso de producirse, tenga lugar a través de la región GST de la proteína de fusión. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Tras la incubación, se añadió 80 µL de resina *Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare)* previamente equilibrada con tampón de lisis (1% Tritón X-100, 0,2 µg/mL lisozima, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 5 mM DTT, 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL leupeptina, todo ello disuelto en PBS 1X) y la muestra se incubó durante otras 8 horas a 4°C en agitación, lo cual previene uniones inespecíficas de proteínas a la resina. Durante este tiempo, la proteína de fusión con GST purificada, se une a la resina a través del glutatión, de forma que, si la proteína sustrato interactúa con la primera, también quedaría unida de forma indirecta a la resina. Transcurridas estas 8 horas, se realizó un proceso

de *pull-down* basado en la precipitación del complejo sefarsa - glutatión - GST - proteína de fusión - proteína de interacción (en caso de que interaccione) mediante una centrifugación a 2.800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el precipitado fue lavado 3 veces con tampón de lisis para, finalmente, cargar 10 µL del mismo en geles de poliacrilamida y analizar la presencia de ambas proteínas por *western blot*.

5.2. ENSAYO *IN VIVO* DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los ensayos de interacción *in vivo* suponían crecer las células en placas de cultivo y someterlas a los tratamientos especificados en cada experimento. Tras ello, las células se lisaron en tampón de lisis, obteniendo y cuantificando extractos proteicos, a partir de los cuales se prepararon muestras de 1.000-2.000 µg en un volumen total de 1 mL. Sobre estas muestras se realizó una inmunoprecipitación de una de las proteínas de interés a analizar mediante la utilización de un anticuerpo específico para dicha proteína o para algún epítipo de la misma, tal y como se ha descrito en el apartado 3.5. de este trabajo. De esta forma, si la proteína inmunoprecipitada interacciona con la otra proteína de interés, ésta también será coimmunoprecipitada en el proceso. Finalmente, el inmunoprecipitado fue cargado en un gel de poliacrilamida y analizado por *western blot*, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente cada una de las proteínas.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

Los estudios de actividad quinasa realizados en este trabajo de tesis doctoral están orientados a determinar si una determinada proteína quinasa (en este caso VRK1 o mutantes de VRK1) es capaz de fosforilar un determinado sustrato, como por ejemplo Tip60. En base a esto, se desarrollaron 2 tipos de ensayos de actividad quinasa en función de las condiciones bajo las cuales tenía lugar, en caso de producirse, el proceso de fosforilación.

6.1. ENSAYOS *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD QUINASA

Este tipo de estudios de la actividad quinasa tienen como objetivo determinar si la proteína quinasa de interés es capaz de fosforilar por sí misma al sustrato cuando ambas proteínas se incuban conjuntamente en un ambiente que favorece el proceso de fosforilación. Para ello, se llevaron a cabo 2 tipos de ensayos complementarios. El primer ensayo se basa en el uso de ATP frío saturado como único agente donador del grupo fosfato en el proceso de fosforilación. Así, tras la purificación de las proteínas recombinantes (en nuestro caso GST-VRK1 *wild type* o variantes de la misma, como quinasa y His-Tip60, como sustrato) a partir de cultivos bacterianos, tal y como se ha descrito anteriormente, 10 µg de la quinasa se incubaron junto con 6µg del sustrato, manteniendo un ratio equimolar, en un tampón específico para caseína quinasas (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl) suplementado con ATP frío a una concentración de 2 mM. La mezcla se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue procesada con tampón de carga y cargada en un gel de SDS-poliacrilamida para posibilitar la separación de ambas proteínas. Tras un posterior proceso de transferencia de las proteínas a membranas PVDF, la posible fosforilación del sustrato fue analizada mediante *western blot* utilizando un anticuerpo específico (tabla 10) dirigido contra este tipo de modificación post-traduccional. De igual manera, tras los análisis de la fosforilación, la cantidad total de quinasa y proteína sustrato presentes en la membrana fue analizada también mediante anticuerpos específicos o, alternativamente, mediante tinción con rojo *Ponceau*.

El segundo tipo de estudio *in vitro* de la actividad quinasa es un ensayo radiactivo basado en la incorporación de ³²P radiactivo en el sustrato durante el proceso de fosforilación. Este tipo de ensayo se llevó a cabo cuando no se pudieron utilizar anticuerpos específicos para detectar la fosforilación del sustrato y/o la eficacia del anticuerpo para la detección de esta modificación no fue óptima. En este caso, las proteínas recombinantes utilizadas en el estudio, purificadas de igual manera que en el caso anterior, también se incubaron conjuntamente en un tampón específico de caseína quinasas (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl), pero en este caso suplementado con ATP frío a una concentración de 5 µM y 5 µCi (0,1 µM) de [γ-³²P] ATP radiactivo, todo ello en un volumen final de 30-40 µL. La mezcla se incubó durante 1 hora en agitación a 37°C y, posteriormente, fue procesada con tampón de carga, corrida mediante electroforesis SDS-PAGE y transferida a membranas PVDF. Con el fin de detectar la radiactividad asociada a las proteínas fosforiladas, la membrana se expuso a una película de rayos X (*Fujifilm*) durante varios minutos u horas en oscuridad y, posteriormente, la película fue revelada.

Por último, una vez analizadas las bandas de fosforilación, se determinó las cantidades totales de proteínas mediante tinción de la membrana con rojo *Ponceau*.

6.2. ENSAYOS *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD QUINASA

Los ensayos de fosforilación *in vivo* permitían determinar si la fosforilación previamente identificada mediante un ensayo *in vitro* también ocurre en el contexto celular bajo determinadas condiciones de interés. Para ello, las células en cultivo se expusieron a dichas condiciones y posteriormente se lisaron en tampón de lisis suave. Tras esto, aplicando a la proteína de interés los procedimientos de inmunoprecipitación, electroforesis, transferencia húmeda y *western blot* de proteínas descritos anteriormente, y utilizando anticuerpos dirigidos frente a residuos fosforilados, se determinó el grado de fosforilación *in vivo* del sustrato. Por último, también se determinó mediante *western blot*, a modo de control de carga, los niveles totales de dicha proteína mediante la utilización de un anticuerpo dirigido contra la misma (tabla 10).

7. ENSAYOS *IN VITRO* DE ACTIVIDAD ACETILTRANSFERASA

De igual manera que el análisis de fosforilación *in vitro* llevado a cabo por VRK1, en este trabajo también ha sido necesario estudiar si determinadas variantes de la acetiltransferasa Tip60 son capaces de ejercer su función catalítica *in vitro*. Dado que dichas variantes de Tip60 se encontraban en plásmidos de expresión eucariota, el proceso de purificación de la enzima difería del llevado a cabo en los ensayos de fosforilación. En este caso, células eucariotas eran transfectadas con los plásmidos que expresaban las variantes de interés. Tras esto, estas células fueron sometidas a determinadas condiciones bajo las cuales se pretende analizar la posterior actividad acetiltransferasa *in vitro* y se lisaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Llegados a este punto, las variantes de la acetiltransferasa expresadas a través de los plásmidos correspondientes se inmunoprecipitaron. A partir del inmunoprecipitado, se llevó a cabo un proceso de elución que permitía liberar la proteína de interés de la resina a la que se encontraba unida. Este proceso de elución consistió en incubar la muestra durante 1 minuto con 30 μL de un buffer de elución conformado por 0.1 M de glicina-HCl, pH 2.5. Este buffer disocia de forma eficaz la interacción proteína-anticuerpo (unido a la resina) sin afectar permanentemente a la estructura de la primera. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante, portador de la proteína de interés, se recogió. Inmediatamente después, el pH de la solución fue reestablecido a un valor de 8.5 mediante la adición de Tris-HCl, 1 M, a una concentración de 1/10 (3 μL). Finalmente, la concentración de proteína purificada fue cuantificada de acuerdo con el apartado 3.5. de materiales y métodos.

Con la acetiltransferasa ya purificada, se procedió a la realización del ensayo de actividad acetiltransferasa. Para ello, se utilizó el kit comercial *HAT Activity Colorimetric Assay (Sigma-Aldrich)* y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante. Brevemente, se diluyeron 20 μg de acetiltransferasa en 40 μL de agua que, posteriormente, se mezclaron con 50 μL de buffer de actividad acetiltransferasa 2X, 5 μL de sustrato 1, 5 μL de sustrato 2 y 8 μL de enzima generadora de NADH (todo ello proporcionado en el kit). El volumen total resultante se incubó en un pocillo de una placa p96 y se incubó durante 1-4 horas a 37°C. De esta manera, cuanto mayor fuera la actividad acetiltransferasa de la proteína, mayor sería la coloración amarillenta que se genera en la muestra para el tiempo de incubación. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de 440 nm, utilizando para ello el lector de placas Infinite 200 PRO (*TECAN Life Sciences*). El nivel de absorbancia obtenido, equivalente al grado de actividad acetiltransferasa, fue finalmente representado y analizado estadísticamente.

8. ENSAYOS DE ESTABILIDAD PROTEICA

La vida media de determinadas proteínas asociada al contexto de daño génico ha sido uno de los principales aspectos analizados en esta tesis doctoral. Para ello, se realizaron ensayos de estabilidad proteica basados en bloquear la síntesis proteica *de novo* en la célula. Así, tal y como se ha descrito en el apartado 1.4.4. de los materiales y métodos, el bloqueo de la síntesis *de novo* de proteínas se realizó tratando las células en cultivo con cicloheximida a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a lo largo de diferentes tiempos. De esta forma, cuanto mayor fuera el tiempo de tratamiento con cicloheximida, mayor sería también el tiempo en el que los niveles proteicos no podían ser reestablecidos en la célula, quedando nuestra proteína de interés expuesta a un proceso de degradación progresivo con el que se podía determinar la vida media. Teniendo en cuenta esto, era fundamental que los tratamientos con cicloheximida

se realizaran de tal manera que todos ellos finalizaran a la vez, ya que sólo de esta manera asegurábamos que la densidad celular para cada punto fuera exactamente la misma y, por tanto, la cantidad de proteína analizada posteriormente no se viera afectada por esta variable. Así, una vez realizados los tratamientos, las células eran lisadas con tampón de lisis suave, obteniendo extractos proteicos a partir de los cuales se analizaba los niveles de la proteína de interés mediante *western blot* a lo largo de los diferentes tiempos de tratamiento con cicloheximida.

9. ESTUDIOS *IN SILICO* DE PREDICCIÓN DE SITIOS DE FOSFORILACIÓN

El descubrimiento de un proceso de fosforilación de proteínas en el contexto de daño génico requirió la utilización de diferentes programas bioinformáticos que ayudaran a identificar el residuo (o los residuos) de las proteínas sobre el cual dicha fosforilación tenía lugar. Uno de los programas utilizados fue NetPhos 3.1 (Blom et al., 2004) el cual es capaz de predecir sitios de fosforilación en residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas eucariotas e identificar al mismo tiempo, de entre 17 quinasas o familias de quinasas (ATM, CKI, CKII, CaM-II, DNAPK, EGFR, GSK3, INSR, PKA, PKB, PKC, PKG, RSK, SRC, cdc2, cdk5 y p38MAPK), aquella candidata a llevar a cabo dicha fosforilación. Para ello, el programa utiliza un conjunto de redes neuronales integradas que analizan la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, la cual era previamente cargada en formato *FASTA*.

El otro programa de identificación de residuos de fosforilación utilizado en este trabajo fue PhosphoSitePlus, versión 6.5.9.3. (Hornbeck et al., 2015). En este caso, el programa actúa como base de datos, recogiendo todas las modificaciones post-traduccionales (incluyendo fosforilaciones) que han sido observadas y descritas experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* a través de diferentes técnicas tales como espectrometría de masas, *western blot* con anticuerpos dirigidos específicamente frente a un residuo modificado, etc. Teniendo en cuenta esto, PhosphoSitePlus constituye una herramienta más específica y fidedigna que NetPhos 3.1, siendo de gran utilidad para una búsqueda más concreta y precisa de residuos candidatos a ser fosforilados.

10. PROGRAMAS Y TESTS ESTADÍSTICOS

En el desarrollo de esta tesis doctoral, diferentes programas y test estadísticos fueron utilizados con el propósito de aportar significación y fiabilidad a los resultados obtenidos. De forma general, el programa *IBM SPSS Statistics 23-26 (International Business Machines Corporation, IBM)* fue el utilizado a la hora de realizar gráficas comparativas (tanto diagramas de barras como *box-plots*) así como para realizar los diferentes contrastes de hipótesis que permitieran determinar si los resultados asociados a diferentes condiciones dentro de un experimento eran significativamente diferentes o no. Teniendo en cuenta esto, cabe destacar que los test estadísticos utilizados fueron la T de Student para aquellas muestras paramétricas que seguían una distribución normal o, alternativamente, la U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. A su vez, el estudio de la normalidad de dichas muestras se realizó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov, estableciendo para ello como hipótesis nula la normalidad y como hipótesis alternativa la no normalidad de la muestra.

Tabla 6. Nombre y principales características de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.

TABLA DE LÍNEAS CELULARES				
Nombre	Organismo	Procedencia	Especificaciones	Medio de cultivo
HEK-293T	<i>H. sapiens</i>	Embrionarias de riñón	-	DMEM
A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	-	DMEM
HT-144	<i>H. sapiens</i>	Melanoma	<i>ATM -/-</i>	DMEM
pLenti-C-HA-IRES-BSD-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1-wt</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[K179E]-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1[K179E]</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[R89Q]-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1[R89Q]</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[R133C]-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1[R133C]</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[L195V]-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1[L195V]</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD
pLenti-C-HA-IRES-BSD-muVRK1[V236M]-A549	<i>H. sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Línea transformada con vector lentiviral. Expresa <i>muVRK1[V236M]</i>	DMEM, 5 µg/µL BSD

Tabla 7. Listado y uso de oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral. Sobre los oligonucleótidos utilizados para la realización de mutagénesis se destaca el triplete que codifica para el residuo mutado. (*) Las mutagénesis de dobles mutantes se realizaron sobre vectores portadores de mutantes simples previamente generados, utilizando para ello los oligonucleótidos indicados, capaces de mutar el residuo no modificado. (Mutag. = mutagénesis; Sec. = secuenciación; silenc. = silenciamiento por ARN de interferencia).

TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS			
Nombre	Uso	Diana (mutación)	Secuencia 5' → 3'
S86A Forward	Mutag.	Tip60 (S86A)	CTAAGAACGGACTTCTCTGGGGCCCGTCCTGGCTCTCCAGAGA
S86A Reverse			TCTCTGGAGAGCCAGGACGGCCCCAGGAAGTCCGTTCTTAG
S90A Forward	Mutag.	Tip60 (S90A)	CCTGGGTCCCGTCCTGGCGCTCCAGAGAGAGAGGGTGCCGGC
S90A Reverse			GCCGGCACCTCTCTCTGGAGCGCCAGGACGGGACCCAGG
S86/90A Forward	Mutag.	Tip60* (S86/90A)	CCTGGGTCCCGTCCTGGCGCTCCAGAGAGAGAGGGTGCCGGC
S86/90A Reverse			GCCGGCACCTCTCTCTGGAGCGCCAGGACGGGACCCAGG
S155A Forward	Mutag.	Tip60 (S155A)	ACGGAAGGTGGAGGTGGTTGCACCAGCAACTCCAGTGCCGAGC
S155A Reverse			GCTGGGCACTGGAGTTGCTGGTGC AACCACCTCCACCTTCCGT
T158A Forward	Mutag.	Tip60 (T158A)	AGGTGGTTTCACCAGCAGCTCCAGTGCCAGCGAGACAGCCC
T158A Reverse			GGGCTGTCTCGCTGGGCACTGGAGCTGCTGGTGA AACACCT
T158D Forward	Mutag.	Tip60 (T158D)	AGGTGGTTTCACCAGCAGATCCAGTGCCAGCGAGACAGCCC
T158D Reverse			GGGCTGTCTCGCTGGGCACTGGATCTGCTGGTGA AACACCT
S190A Forward	Mutag.	Tip60 (S190A)	GCCAGGACGGAAGCGAAAAGCGAATTGTTGGGCACTGATGAG
S190A Reverse			CTCATCAGTGCCCAAACAATTGCGTTTTTCGCTTCCGTCCTGGC
S199A Forward	Mutag.	Tip60 (S199A)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
S199A Reverse			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGCGTCCTCATCAGTGCCC
S199D Forward	Mutag.	Tip60 (S199D)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
S199D Reverse			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGTCTGTCCTCATCAGTGCCC
T158A/S199A Fwrd.	Mutag.	Tip60* (T158/S199A)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
T158A/S199A Rvrs.			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGCGTCCTCATCAGTGCCC
T158D/S199D Fwrd.	Mutag.	Tip60* (T158/S199D)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
T158D/S199D Rvrs.			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGTCTGTCCTCATCAGTGCCC
T158A/S199D Fwrd.	Mutag.	Tip60* (T158A/S199D)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
T158A/S199D Rvrs.			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGTCTGTCCTCATCAGTGCCC
T158D/S199A Fwrd.	Mutag.	Tip60* (T158D/S199A)	GGGCACTGATGAGGACGCCAGGACAGCTCTGATGGAATACCG
T158D/S199A Rvrs.			CGGTATTCCATCAGAGCTGTCCTGGCGTCCTCATCAGTGCCC
T7 Forward	Sec.	Tip60 (WT y mutantes)	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Reverse			GCTAGTTATTGCTCAGCGGT
siCtrl (ON-TARGET plus siControl Non-targeting ARNi)	Silenc.	Control negativo silenciamiento VRK1 y KAT5	UGGUUUACAUGUCGACUAA
siVRK1-02	Silenc.	VRK1 humano	CAAGGAACCUUGUGUUGAA
siVRK1-03	Silenc.	VRK1 humano	GGAAUGGAAAGUAGGAUUA
siTip60	Silenc.	KAT5 humano	No proporcionado por la casa comercial (<i>Horizon Discovery</i>) Referencia: J-006301-08-00200

Tabla 8. Listado de los plásmidos de ADN recombinante utilizados en este trabajo y sus aplicaciones.

TABLA DE PLÁSMIDOS DE ADN RECOMBINANTE		
Construcción	Vector	Aplicación
GST-VRK1	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
GST-VRK1[K179E]	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
GST	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S86A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S90A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S86/90A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S155A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158D]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S190A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S199A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[S199D]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158A/S199A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158A/S199D]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158D/S199A]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-His6x[T158D/S199D]	pET28a-LIC	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
GST-VRK1[R89Q]	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
GST-VRK1[R133C]	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>

TABLA DE PLÁSMIDOS DE ADN RECOMBINANTE		
Construcción	Vector	Aplicación
GST-VRK1[L195V]	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
GST-VRK1[V236M]	pGEX4T1-GST	Expresión y purificación de la proteína de fusión en <i>E. coli</i>
Tip60-V5	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S86A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S90A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S86/90A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S155A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158D]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S190A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S199A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[S199D]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158A/S199A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158A/S199D]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158D/S199A]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Tip60-V5[T158D/S199D]	pCDNA3.1/V5-His TOPO TA	Expresión en células eucariotas transfectadas
HA-VRK1	pCELF-HA	Expresión en células eucariotas transfectadas
HA-VRK1[K179E]	pCELF-HA	Expresión en células eucariotas transfectadas
VRK1-Myc	pCDNA 3.1	Expresión en células eucariotas transfectadas

TABLA DE PLÁSMIDOS DE ADN RECOMBINANTE		
Construcción	Vector	Aplicación
VRK1-Myc[1-332]	pCDNA 3.1	Expresión en células eucariotas transfectadas
VRK1-Myc[1-267]	pCDNA 3.1	Expresión en células eucariotas transfectadas
GST-VRK1	pCELF-GST	Expresión en células eucariotas transfectadas
GST-VRK1[267-396]	pCELF-GST	Expresión en células eucariotas transfectadas
RNF8-HA	pCDNA3.1	Expresión en células eucariotas transfectadas
Mdm2-HA	pCELF-HA	Expresión en células eucariotas transfectadas
Ubiquitina-His	pCDNA3 His6x	Expresión en células eucariotas transfectadas
Ubiquitina-His[K48R]	pCDNA3 His6x	Expresión en células eucariotas transfectadas
Ubiquitina-His [K63R]	pCDNA3 His6x	Expresión en células eucariotas transfectadas
Ubiquitina-His[K48]	pCMV5-His6x	Expresión en células eucariotas transfectadas
Ubiquitina-His[K63]	pCMV5-His6x	Expresión en células eucariotas transfectadas

Tabla 9. Información de los diferentes inhibidores utilizados a lo largo de este trabajo.

TABLA DE INHIBIDORES				
Inhibidor	Diana	Concentración / Tiempo de uso	Referencia	Casa comercial
MG-149	Tip60 (KAT5)	2 μ M / 12 horas	1785	<i>Axon MedChem</i>
C646	p300-CBP	10 μ M / 12 horas	S7152	<i>SelleckChem</i>
KU55933	ATM	10 μ M / 3 horas	3544/10	<i>Tocris Bioscience</i>
Cafeína	PIKK Quinasas	10 mM / 3 horas	58-08-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
JNK-IN-8	JNK-1, JNK-2 y JNK-3	3 μ M / 6 horas	S4901	<i>Selleckchem</i>
Cicloheximida	Ribosoma 60S (actividad peptidil- transferasa)	50 μ g/mL / Variable	C7698	<i>Sigma-Aldrich</i>
MG-132	Proteasoma	25 μ M / 12 horas	474790	<i>Calbiochem</i>

Tabla 10. Lista de anticuerpos primarios empleados con su correspondiente dilución para western blot e inmunofluorescencia.

TABLA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Tipo	Dilución de uso (WB/IF)	Clon/ Referencia	Casa comercial
Anti-VRK1	Monoclonal de ratón	1:1000 1:200	1F6	Producción propia
Anti-VRK1	Monoclonal de ratón	1:1000 1:200	1B5	Producción propia
Anti-VRK1	Policlonal de conejo	1:1000 -	VC	Producción propia
Anti-VRK1 (N- term)	Policlonal de conejo	1:1000 1:200	- HPA000660	<i>Sigma-Aldrich</i>
Anti-Tip60	Policlonal de conejo	1:500 1:200	- ab151432	<i>Abcam</i>
Anti-V5	Monoclonal de ratón	1:1000 1:300	V5-10 V8012	<i>Sigma-Aldrich</i>
Anti-V5	Policlonal de conejo	1:1000 -	- V8137	<i>Sigma-Aldrich</i>
Anti-FosfoSerina	Monoclonal de ratón	1:500 -	4A4 05-1000	<i>Merck Millipore</i>

TABLA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Tipo	Dilución de uso (WB/IF)	Clon/ Referencia	Casa comercial
Anti- β -actina	Monoclonal de ratón	1:1000 -	AC15 A5441	<i>Sigma-Aldrich</i>
Anti-Acetil H4K16	Monoclonal de conejo	1:1000 1:300	EPR1004 ab109463	<i>Abcam</i>
Anti-H3	Policlonal de conejo	1:1000 -	- 9715	<i>Cell Signaling</i>
Anti-53BP1	Policlonal de conejo	- 1:200	- NB100-304	<i>Novus Biologicals</i>
Anti-PARP	Monoclonal de ratón	1:1000 -	C2-10 556362	<i>BD Pharmigen</i>
Anti-HA Tag	Policlonal de conejo	1:1000 -	- H6908	<i>Sigma-Aldrich</i>
Anti-His Tag	Monoclonal de ratón	1:1000 -	H-3 sc-8036	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-GST	Monoclonal de ratón	1:1000 -	B-14 sc-138	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-pT68 Chk2	Policlonal de conejo	1:1000 -	- 2661S	<i>Cell Signaling</i>
Anti-Chk2	Monoclonal de ratón	1:1000 -	1C12 3440S	<i>Cell Signaling</i>
Anti-pT18 p53	Policlonal de conejo	1:1000 -	- 2529	<i>Cell Signaling</i>
Anti-AcetilK120 p53	Policlonal de conejo	1:500 -	- HW186	<i>Signaling Antibody</i>
Anti-p53	Monoclonal de ratón	1:1000 -	Pab-1801 sc98	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-p53	Monoclonal de ratón	1:1000 -	DO-1 sc126	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-p53	Policlonal de conejo	1:1000 -	- sc6243	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-Ubiquitina	Policlonal de conejo	1:1000 -	- ab19247	<i>Abcam</i>
Anti-pS1981 ATM	Monoclonal de ratón	1:300 1:200	10H11.E12 Q2669086	<i>Merck Millipore</i>
Anti-ATM	Policlonal de conejo	1:500 -	- 819-844	<i>Calbiochem</i>
Anti-Acetil Lisina	Policlonal de conejo	1:500 -	- 9441S	<i>Cell Signaling</i>

TABLA DE ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Tipo	Dilución de uso (WB/IF)	Clon Referencia	Casa comercial
Anti-JNK1/3	Policlonal de conejo	1:1000 -	- sc474	<i>Santa Cruz Biotech.</i>
Anti-c-Jun	Monoclonal de conejo	1:1000 -	60A8 9165	<i>Cell Signaling</i>
Anti-pS63 c-Jun	Policlonal de conejo	1:1000 -	-	<i>ThermoFisher Scientific</i>

Tabla 11. Lista de anticuerpos secundarios empleados en este trabajo para western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

TABLA DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Anticuerpo	Uso	Dilución de uso	Referencia	Casa comercial
Cabra Anti-Conejo IgG, DyLight 800	WB	1:10000	35571	<i>ThermoFisher Scientific</i>
Cabra Anti-Ratón IgG, DyLight 680	WB	1:10000	35518	<i>ThermoFisher Scientific</i>
Cy2-Cabra Anti-Conejo (Emisión en verde)	IF	1:1000	111-225-144	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy2-Cabra Anti-Ratón (Emisión en verde)	IF	1:1000	115-225-146	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy3-Cabra Anti-Conejo (Emisión en rojo)	IF	1:1000	111-165-144	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy3-Cabra Anti-Ratón (Emisión en rojo)	IF	1:1000	115-165-146	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy5-Cabra Anti-Conejo (Emisión en rojo lejano)	IF	1:1000	111-175-144	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy5-Cabra Anti-Ratón (Emisión en rojo lejano)	IF	1:1000	115-175-146	<i>Jackson ImmunoResearch</i>

RESULTADOS

1. EFECTO DE VRK1 SOBRE LA ACETILACIÓN DE LA LISINA 16 DE LA HISTONA H4 EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

1.1. EL INHIBIDOR DE TIP60/KAT5 MG149 DISMINUYE LOS NIVELES DE H4K16ac EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

La acetilación de la histona H4 en su residuo lisina 16 (H4K16ac) constituye uno de los marcadores más tempranos de la respuesta al daño génico, siendo fundamental para posibilitar la descompactación local de la cromatina y la posterior cascada de señalización que permita reparar la lesión. Sin embargo, esta modificación epigenética está asociada también a otros procesos celulares tales como la replicación o la transcripción, de forma que la acetiltransferasa encargada de catalizar la modificación de este residuo puede variar en función del proceso. Con el fin de identificar la enzima implicada en la acetilación de la H4K16 durante la respuesta al daño génico, utilizamos dos inhibidores de diferentes acetiltransferasas: por un lado MG149, descrito como un inhibidor de Tip60 (KAT5), y por otro C646, inhibidor de p300-CBP. Así, cultivos celulares de A549, previamente privados de suero durante 48 horas con el fin de eliminar interferencias con las señales mitogénicas, fueron tratados respectivamente con dosis eficaces de estos inhibidores durante 12 horas. Además, transcurridas 10 horas de tratamiento, las células también fueron tratadas con doxorrubicina durante las 2 horas restantes con el fin de inducir daño génico y poder estudiar el efecto de dichos inhibidores sobre la acetilación de la H4K16. Como resultado, observamos por inmunofluorescencia (figura 14, A y B) que la inhibición de Tip60 mediada por MG149 imposibilitaba dicha acetilación, mientras que el inhibidor de p300-CBP C646 no interfería sobre los elevados niveles de H4K16ac asociados al daño génico. Esto sitúa a Tip60 como la acetiltransferasa candidata a llevar a cabo el proceso de acetilación de la H4K16 durante la respuesta temprana al daño génico. Además, estos resultados fueron confirmados mediante un análisis por *western blot*, en el que, de nuevo, la inhibición de Tip60 con MG149 reducía de forma significativa los niveles de H4K16ac asociados a daño con respecto a aquellos observados en células que sólo eran tratadas con doxorrubicina (figura 14, C).

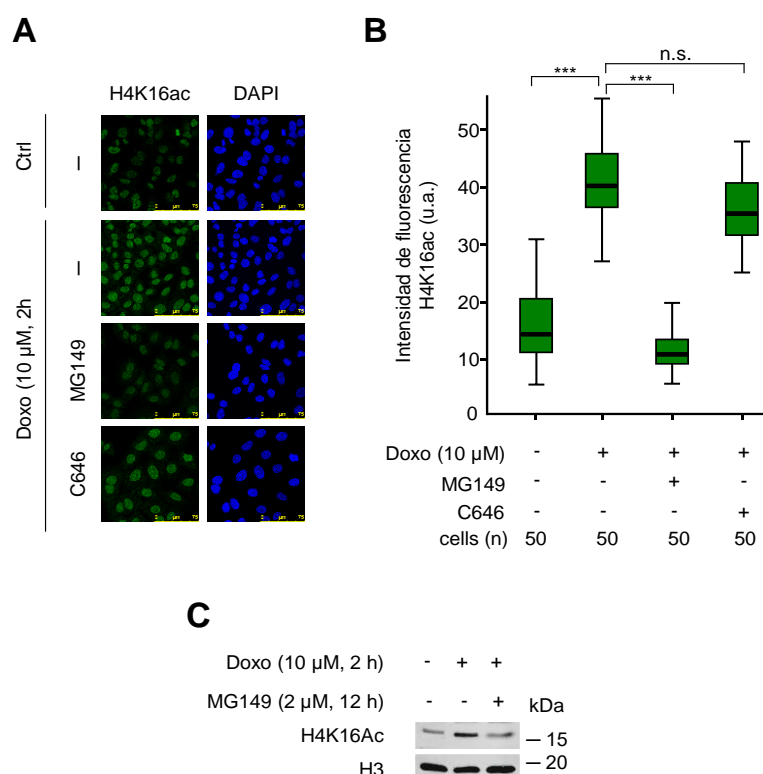


Figura 14. El inhibidor de Tip60 MG149 reduce significativamente los niveles de H4K16ac asociados a daño génico. **A.** Fluorescencia asociada a la acetilación de H4K16 tras la inducción de daño génico (doxorubicina, 3 µM, 2 horas), previo tratamiento con MG149 (inhibidor de la HAT Tip60; 2 µM, 12 horas) o con C646 (inhibidor de la HAT p300-CBP; 10 µM; 12 horas) en células A549. **B.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de H4K16ac. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney, siendo *** el equivalente a un p-valor < 0,001 y n.s. el equivalente a un p-valor ≥ 0,05. **C.** Efecto de la inhibición de Tip60 con MG149 (2 µM, 12 horas) sobre los niveles de H4K16ac asociados a daño analizados por western blot a partir de extractos de histonas.

1.2. EL SILENCIAMIENTO DE VRK1 MIMETIZA EL EFECTO DEL INHIBIDOR MG149 EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de la quinasa VRK1 causa una reducción de los niveles de acetilación de la H4K16 asociados a la inducción de daño génico con radiación ionizante (Salzano et al., 2015). Para corroborar estos resultados, decidimos analizar nuevamente por inmunofluorescencia los niveles de H4K16ac en respuesta al daño génico inducido por doxorrubicina (figura 15, A y B). Como se puede observar, cuando la expresión de *VRK1* se bloqueaba mediante dos ARNi específicos, la acetilación de la H4K16 tras dos horas de tratamiento con doxorrubicina se reducía significativamente en comparación con aquellos observados en células tratadas que sí expresan *VRK1*. Posteriormente, realizamos este mismo estudio mediante *western blot* aumentando el intervalo de tiempos de tratamiento con doxorrubicina con el fin de descartar que la acetilación tras el silenciamiento de *VRK1* ocurra a tiempos anteriores o posteriores al utilizado en el experimento anterior (figura 15, C). De nuevo, el residuo 16 de la histona H4 no se acetilaba en respuesta a daño para ninguno de los tiempos analizados cuando se silenciaba la expresión de *VRK1*. Por lo tanto, el silenciamiento de *VRK1* mimetiza el efecto del inhibidor de Tip60 MG149. En otras palabras, *VRK1* es esencial para desencadenar la descompactación local de la cromatina en la zona del daño al posibilitar la acetilación de la H4K16.

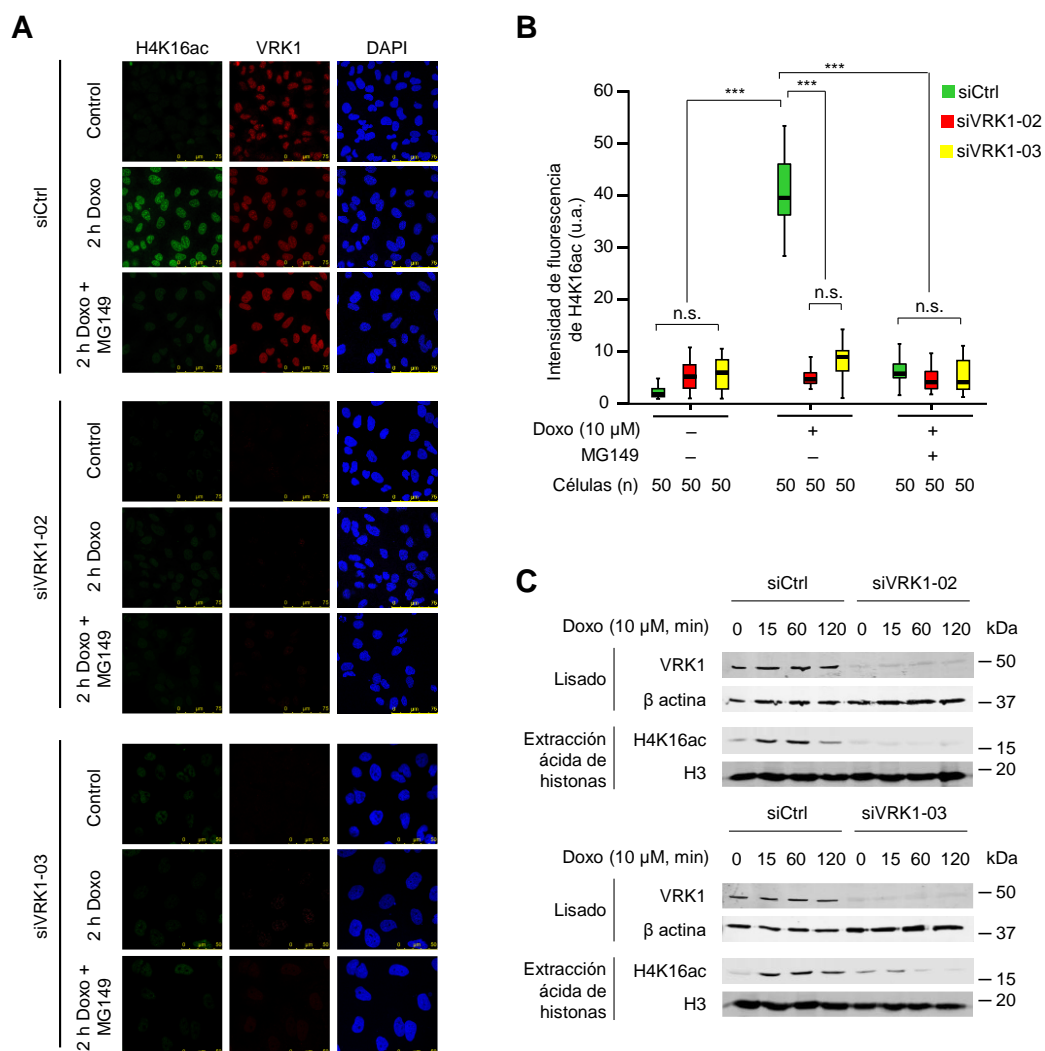


Figura 15. El silenciamiento de VRK1 mimetiza el efecto de MG149 sobre la H4K16ac. **A.** Fluorescencia asociada a la acetilación de H4K16 tras la inducción de daño génico (doxorrubicina, 3 μ M, 2 horas) previo silenciamiento de VRK1. La línea celular utilizada fue A549. **B.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de H4K16ac. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001; n.s., p-valor \geq 0,05. **C.** Niveles de acetilación de la H4K16 en extractos de histonas obtenidos tras el silenciamiento de VRK1 en células A549 sometidas a diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina (10 μ M).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se quiso averiguar si esta acetilación de la H4K16 depende directamente de la actividad quinasa de VRK1. Para ello, se desarrollaron dos líneas estables de A549 capaces de expresar VRK1 *wild type* murina (mVRK1-WT) o VRK1-K179E murina (mVRK1-K179E), catalíticamente inactiva. En estas líneas, se bloqueó la expresión de la proteína VRK1 humana endógena mediante un ARNi que no interfería en la expresión de las variantes murinas, de forma que el efecto sobre la acetilación de la H4K16 sólo dependía de estas últimas. Mediante inmunofluorescencia se determinó que, en ausencia del VRK1 humano endógeno, únicamente la variante mVRK1-WT es capaz de recuperar los niveles elevados de H4K16ac cuando se induce daño génico, no siendo así para la variante mVRK1-K179E, que mantiene niveles basales bajos de H4K16ac en respuesta a daño (figura 16).

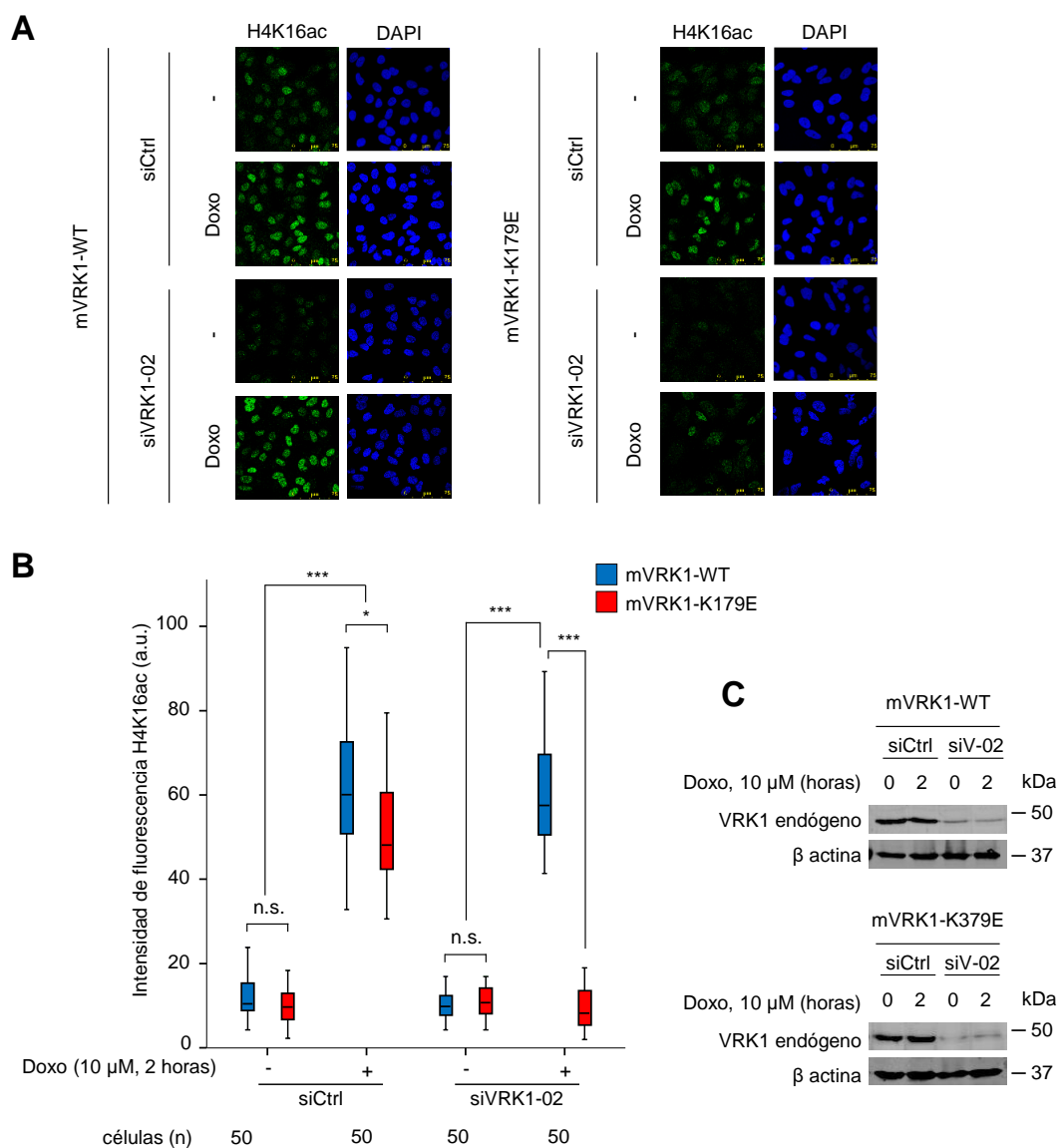


Figura 16. Papel de la actividad quinasa de VRK1 sobre la acetilación de la H4K16 en respuesta a daño génico. **A.** Fluorescencia asociada a la acetilación de H4K16 mediada por las variantes murinas de VRK1 mVRK1-WT (izquierda) y mVRK1-K179E (derecha) en respuesta a daño génico con doxorubicina (3 μ M, 2 horas). La línea celular utilizada fue A549 **B.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de H4K16ac correspondientes a las diferentes condiciones de la parte A. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p -valor < 0,001; *, p -valor < 0,05; n.s., p -valor \geq 0,05. **C.** Controles de silenciamiento del VRK1 endógeno para las diferentes condiciones del estudio.

2. VRK1 Y LA ACETILTRANSFERASA TIP60

De acuerdo con los resultados descritos en el apartado anterior, VRK1 es fundamental para la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 en respuesta a daño génico. Sin embargo, el hecho de que VRK1 sea una quinasa y, por lo tanto, no tenga actividad acetiltransferasa, implica que esta modificación epigenética debe estar regulada de manera indirecta, presumiblemente mediante el control de la actividad de la acetiltransferasa que cataliza dicha acetilación, Tip60. En base a esto, se decidió estudiar la relación existente entre VRK1 y Tip60 en el contexto del daño génico.

2.1. INTERACCIÓN DE VRK1 Y TIP60

En el caso de que VRK1 esté regulando a Tip60 de forma directa durante la DDR, cabría esperar que ambas proteínas interaccionasen entre sí. Por lo tanto, fue la interacción entre VRK1 y Tip60 el primer aspecto que se analizó durante este estudio.

2.1.1. VRK1 y Tip60 interaccionan *in vitro*

A la hora de analizar la interacción *in vitro* de VRK1 y Tip60, se llevó a cabo un proceso de purificación de ambas proteínas a partir de bacterias *E. coli*. Una vez purificadas, una cantidad fija de VRK1-GST (1000 ng) se incubó con cantidades crecientes de His-Tip60 (de 0 a 3000 ng) y mediante *pull down* de VRK1-GST, se analizó la presencia de Tip60 en el precipitado (figura 17). Los resultados indicaron que Tip60 interacciona *in vitro* con VRK1 de manera dosis-dependiente hasta que ambas proteínas alcanzan concentraciones equimolares, momento en el que dicha interacción parece estabilizarse. Además, la ausencia de His-Tip60 en el *pull down* de GST libre confirma que dicha interacción es a través de Tip60-VRK1 y no de Tip60-GST.

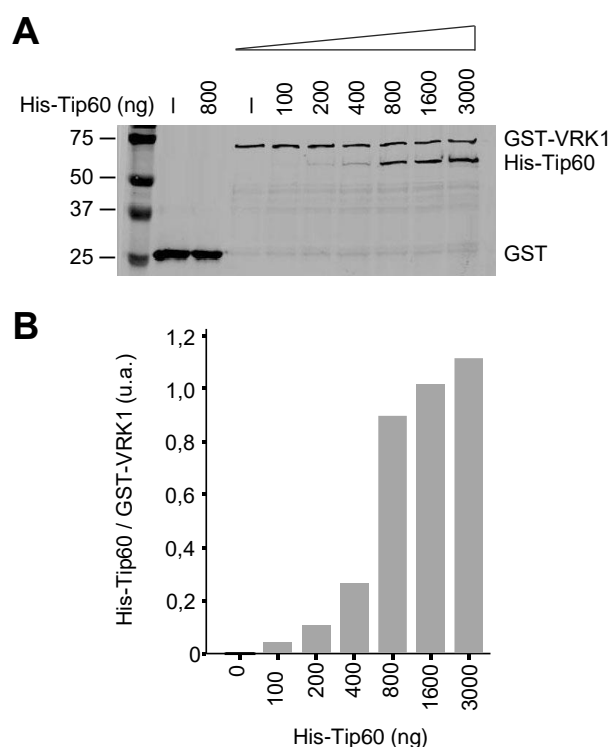


Figura 17. Interacción *in vitro* de VRK1 y Tip60. **A.** Pull down de GST-VRK1 (1000 ng) y co-precipitación de His-Tip60 de manera dosis-dependiente. **B.** Cantidad relativa de His-Tip60 que interacciona con GST-VRK1. Los valores equivalen al cociente resultante de dividir la intensidad de banda de His-Tip60 entre la intensidad de banda de GST-VRK1 para cada punto del estudio.

2.1.2. VRK1 y Tip60 interaccionan *in vivo* formando un complejo basal

Una vez demostrado que VRK1 y Tip60 interaccionan *in vitro*, quisimos analizar si esta interacción también tenía lugar en el contexto celular. Para ello, se transfectaron cantidades crecientes de pCDNA3.1/Tip60-V5 (de 0 a 8 μ g) en células tumorales A549 y se realizaron inmunoprecipitaciones tanto del Tip60-V5 transfectado como de VRK1 endógeno.

Tal y como se muestra en la figura 18, ambas proteínas interaccionaban entre sí independientemente de cuál sea la proteína inmunoprecipitada. Además, cabe destacar que en el caso de inmunoprecipitar VRK1, la interacción es dosis-dependiente. Por el contrario, cuando Tip60-V5 era la proteína inmunoprecipitada, la interacción entre ambas proteínas parece estabilizarse a partir de los 2-4 μg de proteína transfectada. Esto indicaría que VRK1 actúa como proteína limitante en dicha interacción para las cantidades mencionadas de Tip60-V5 sobreexpresada.

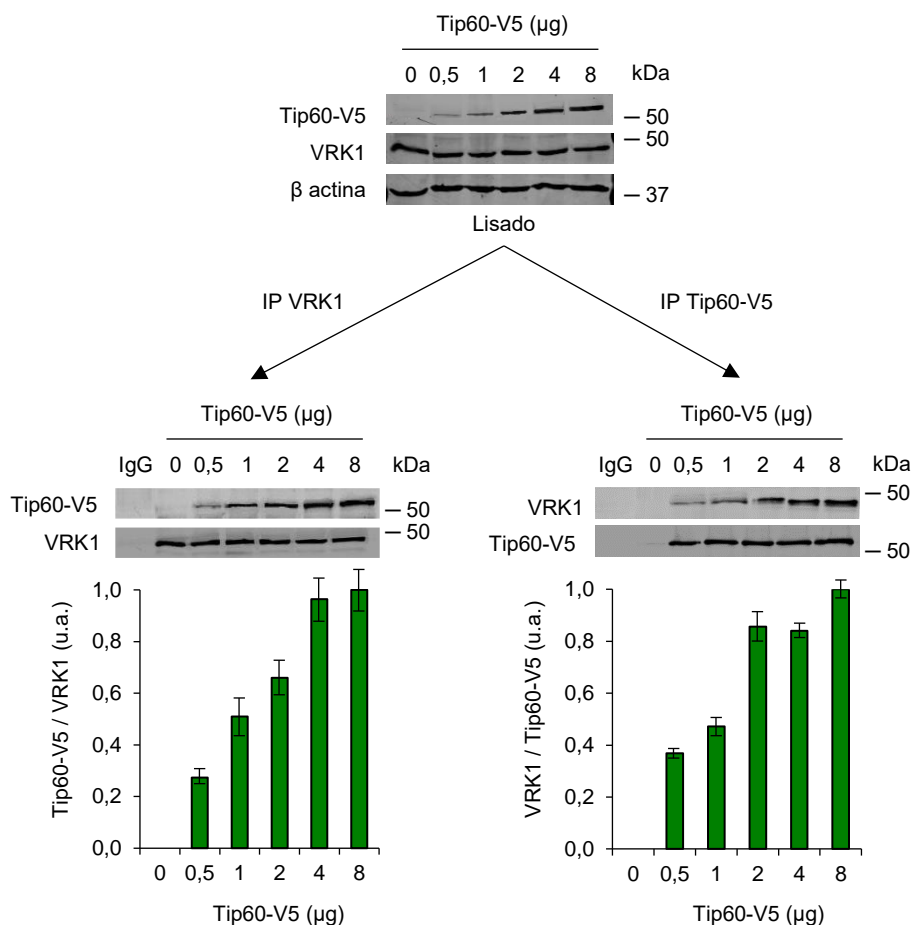


Figura 18. Interacción in vivo de Tip60-V5 y VRK1 endógeno. Análisis de la presencia de Tip60-V5 en inmunoprecipitados de VRK1 (parte inferior izquierda) y de la presencia de VRK1 en inmunoprecipitados de dosis crecientes de Tip60-V5 (parte inferior derecha). Los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir de un único extracto de células A549. Los valores cuantificados equivalen al cociente resultante de dividir la intensidad de la proteína co-inmunoprecipitada entre la intensidad de banda de la proteína control (objeto directo de la inmunoprecipitación).

Con el fin de asegurar que VRK1 y Tip60 interactúan sin necesidad de sobreexpresar la acetiltransferasa, se analizó dicha interacción a partir de las poblaciones endógenas de ambas proteínas. Para ello, a partir del mismo extracto celular, se inmunoprecipitaron tanto Tip60 como VRK1 endógenos. Posteriormente, se analizó a partir de los respectivos inmunoprecipitados la presencia de la proteína que no es sometida al proceso de inmunoprecipitación (figura 19). Los resultados muestran que, cuando Tip60 se inmunoprecipita con un anticuerpo específico, VRK1 co-inmunoprecipita con ella, confirmando la existencia de un complejo basal entre ambas proteínas sin necesidad de sobreexpresar la acetiltransferasa. Por el contrario, con la inmunoprecipitación de VRK1 endógeno no fue posible detectar la presencia de Tip60 en dicho inmunoprecipitado. Esto podría deberse a que la cantidad de VRK1 que interactúa con Tip60 en la célula es reducida con respecto a los niveles celulares totales de la quinasa. Como consecuencia, la proporción de Tip60 co-inmunoprecipitada en relación con la cantidad total de quinasa inmunoprecipitada es también muy reducida, dificultándose la detección de la acetiltransferasa mediante *western blot*.

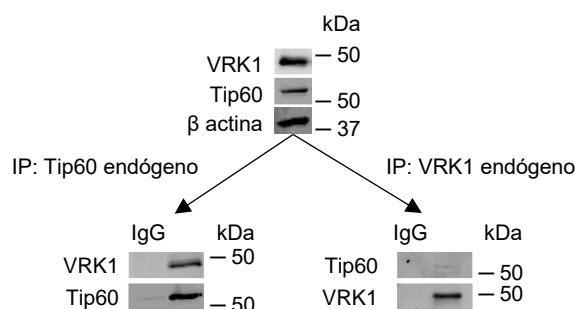


Figura 19. Interacción *in vivo* de Tip60 y VRK1 endógenos. Análisis de la presencia de VRK1 en un inmunoprecipitado de Tip60 (parte inferior izquierda) y la presencia de Tip60 endógeno en un inmunoprecipitado de VRK1 (parte inferior derecha). Los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir de un mismo cultivo de células A549.

Sabiendo que VRK1 y Tip60 interactúan *in vivo*, el siguiente paso fue tratar de averiguar la región de VRK1 que interactúa con Tip60. Para ello, se utilizaron 3 plásmidos diferentes capaces de codificar para diferentes secciones de VRK1: 2 plásmidos codifican para el extremo N-terminal de la proteína, con la diferencia de que uno alcanza sólo hasta el residuo 267 (extremo N-terminal corto) mientras que el otro codifica un extremo N-terminal largo (hasta el residuo 332). El tercer plásmido codifica para el extremo C-terminal de VRK1, correspondiente con la fracción de la proteína que abarca desde el residuo 267 hasta el residuo 396. La inmunoprecipitación de cada una de las 3 regiones de VRK1 por separado demostró que Tip60 era capaz de interactuar con todas ellas, independientemente de la cantidad de VRK1 transfectado (figura 20). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que Tip60 no interactúa con una región única de la estructura primaria de VRK1. Esto podría suponer que dicha interacción, más allá de la estructura primaria de VRK1, dependiera de un plegamiento terciario más complejo de la quinasa gracias al cual Tip60 establece contacto con una región tridimensional que acoge tanto la parte N-terminal como la parte C-terminal. De esta forma, a pesar de la ausencia de una de estas regiones en los constructos utilizados, Tip60 mantendría una interacción con la región de VRK1 sobreexpresada en estos experimentos, justificando de esta manera los resultados obtenidos. Otra posibilidad es que la interacción entre Tip60 y VRK1 esté mediada a través del complejo cuaternario del que Tip60 se encuentra formando parte (NuA4). En este caso, las diferentes regiones de VRK1 analizadas podrían estar interactuando con diferentes subunidades proteicas de dicho complejo, contribuyendo de forma independiente a la co-inmunoprecipitación del mismo y, por lo tanto, de Tip60.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de analizar la interacción entre Tip60 y VRK1 es la actividad quinasa de esta última, pues su autofosforilación implica un cambio conformacional de la proteína que puede estar afectando directamente a su capacidad para establecer complejos proteicos (Shin et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, se quiso analizar si la interacción de VRK1 con Tip60 dependía de la actividad quinasa de la proteína y, por lo tanto, del cambio estructural sujeto a dicha actividad. Para ello, se utilizó una construcción de VRK1 catalíticamente inactiva debido a una mutación en la lisina 179, la cual aparece sustituida por glutámico (VRK1-K179E). De nuevo, la inmunoprecipitación de VRK1-K179E posibilitaba una coimmunoprecipitación de Tip60 (figura 21), indicando que la interacción VRK1-Tip60 es independiente de la actividad enzimática de la primera. Por lo tanto, esta interacción puede ocurrir incluso cuando la quinasa se encuentra en la conformación asociada a su estado no fosforilado. Además, teniendo en cuenta que en condiciones celulares basales (ausencia de daño génico) VRK1 no está autofosforilada, este último resultado justifica la existencia de un complejo basal VRK1-Tip60 en la célula, tal y como se observaba en los resultados anteriores.

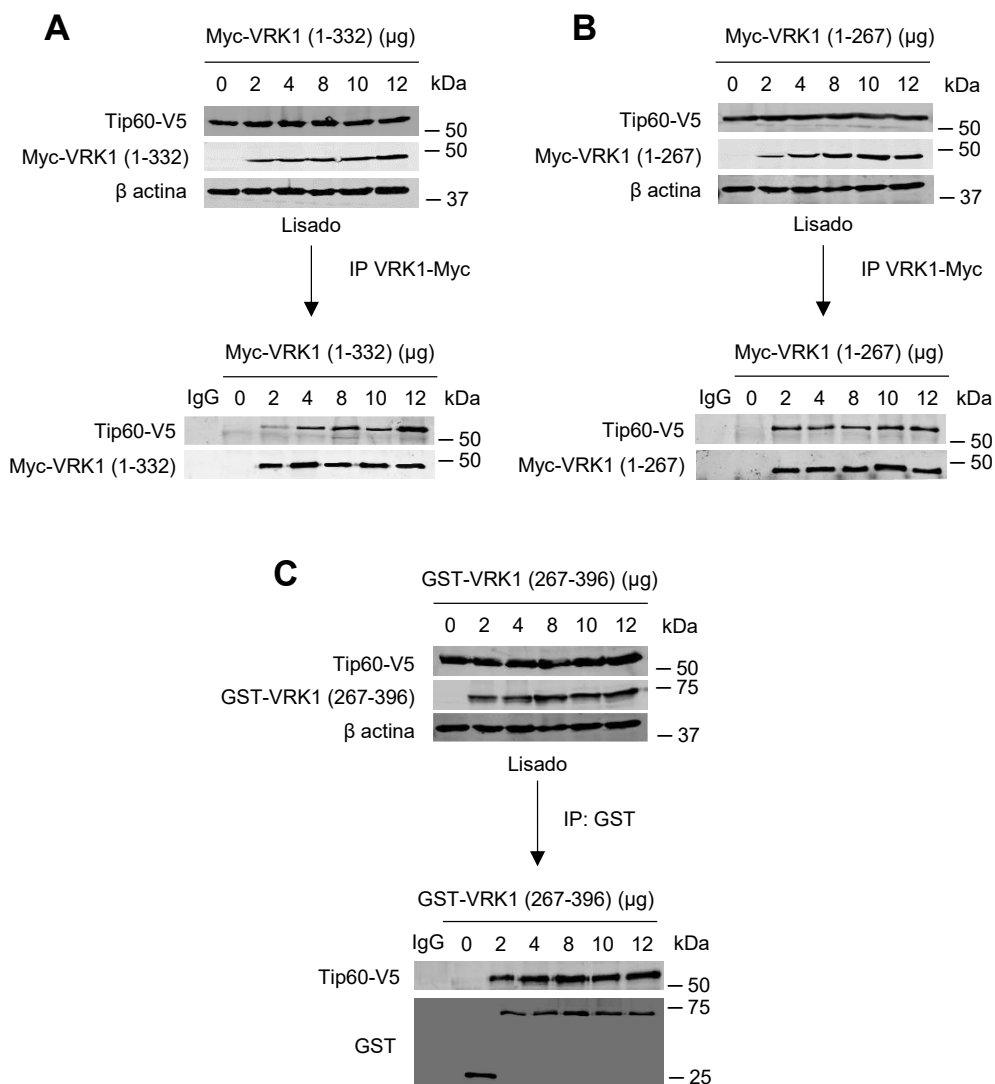


Figura 20. Análisis de la región de interacción de VRK1 con Tip60. Interacción *in vivo* de Tip60 con cantidades crecientes de tres constructos diferentes de VRK1 transfectados en células A549: región N-terminal larga, que engloba la región comprendida entre los aminoácidos 1 y 332 (A), región N-terminal corta, correspondiente a la fracción de VRK1 comprendida entre los aminoácidos 1 y 267 (B) y región C-terminal, constituida por la región comprendido entre los aminoácidos 267 y 396. (C).

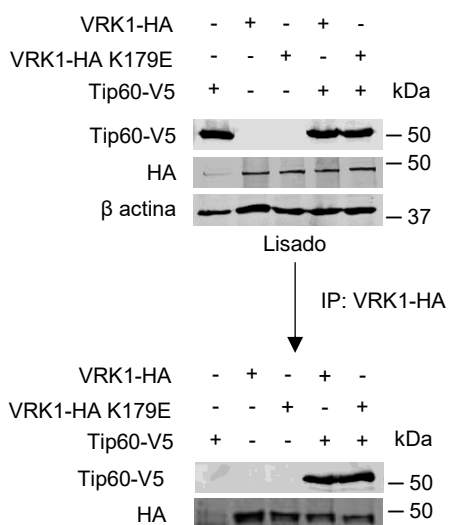


Figura 21. Interacción de Tip60-V5 con VRK1 catalíticamente inactiva. Células A549 se transfectaron con Tip60-V5 y bien con una construcción de VRK1 wild type o, alternativamente, con una construcción de VRK1 catalíticamente inactivo (K179E). Posteriormente, las células se lisaron y mediante la inmunoprecipitación de cada una de las variantes de VRK1 se analizó la presencia de Tip60 en dichos inmunoprecipitados (carril 4 para VRK1 wt y carril 5 para VRK1 K179E) mediante western blot.

2.1.3. El complejo Tip60-VRK1 se estabiliza en los primeros minutos de la respuesta a daño génico

Hasta ahora se ha demostrado que Tip60 y VRK1 interactúan entre sí en condiciones normales de crecimiento celular. Dado que pretendíamos analizar el papel que VRK1 desempeña sobre la actividad de Tip60 en el contexto del daño, el siguiente paso fue estudiar la estabilidad del complejo VRK1-Tip60 tras la inducción de daño génico. Para ello, células A549 fueron tratadas con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos. Posteriormente, se inmunoprecipitó Tip60 para determinar así la cantidad de VRK1 que interactuaba con la acetiltransferasa para cada uno de los tiempos de tratamiento. Un primer experimento con tiempos de tratamiento con doxorrubicina relativamente largos (hasta las 6 horas) (figura 22, A) reveló que la interacción Tip60-VRK1 aumentaba en la primera media hora de tratamiento para posteriormente verse rápidamente reducida hasta niveles de interacción inferiores a los basales. Teniendo en cuenta esto, se realizó el mismo experimento, pero utilizando tiempos más cortos de tratamiento (figura 22, B). Los resultados confirmaron un rápido incremento en la interacción Tip60-VRK1 tras los primeros minutos de daño, alcanzándose un máximo de interacción a los 30 minutos a partir de los cuales, tal y como se observaba en el experimento anterior, la interacción disminuye rápidamente. Esto parece indicar que, tras los primeros minutos de daño génico, el complejo basal Tip60-VRK1 adquiere una mayor estabilidad para, posteriormente, recuperar los niveles basales.

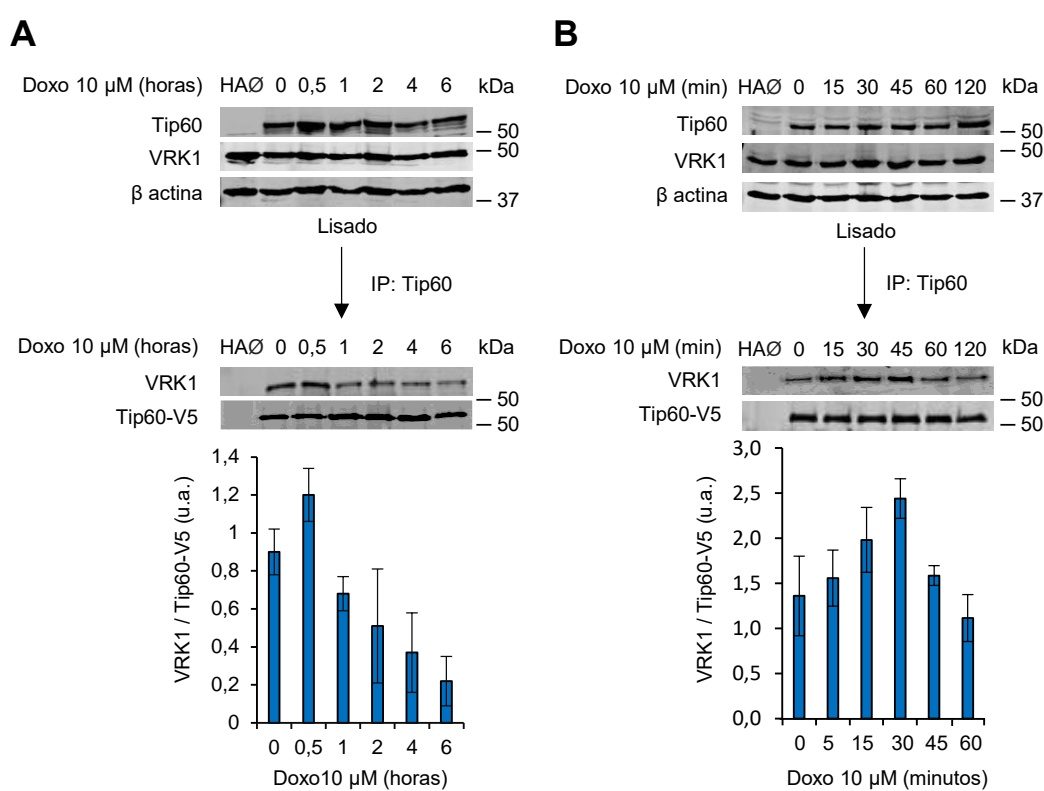


Figura 22. Dinámica de interacción de Tip60 y VRK1 en respuesta a daño génico. Análisis de la interacción entre Tip60 y VRK1 en células A549 a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina. La figura de la izquierda (A) muestra tiempos de tratamiento elevados, mientras que la figura de la derecha (B) muestra tiempos de tratamiento cortos. Los diagramas de barras muestran la interacción relativa de VRK1 respecto a la cantidad de Tip60 transfectada mediante el cociente resultante de dividir la intensidad de banda de Tip60 y la intensidad de banda correspondiente de VRK1.

2.2. FOSFORILACIÓN DE TIP60 MEDIADA POR VRK1 EN EL CONTEXTO DEL DAÑO GÉNICO

El hecho de que VRK1 y Tip60 interactúen entre sí parece indicar que ambas proteínas podrían estar relacionadas desde el punto de vista de su actividad enzimática. Además, dado que el silenciamiento de VRK1 causa, tal y como se ha explicado anteriormente, una disminución en los niveles de acetilación de la H4K16, diana directa de Tip60, se plantea la posibilidad de que VRK1 sea capaz de fosforilar a Tip60 con el fin de regular su actividad acetiltransferasa en respuesta a daño génico. Para confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de fosforilación: fosforilación *in vitro* y fosforilación *in vivo*.

2.2.1. VRK1 fosforila a Tip60 *in vitro*

Nuestro primer objetivo fue tratar de averiguar si VRK1 es capaz de fosforilar directamente a Tip60, independientemente del contexto celular y de la posible interferencia de otras proteínas y rutas de señalización. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro*. En primer lugar, se purificaron a partir de bacterias y por separado tanto Tip60 como dos variantes diferentes de VRK1, una *wild type* y otra portadora de la mutación K179E, lo que le hace catalíticamente inactiva. Tras ello, la acetiltransferasa, como sustrato, se incubó con una de las dos variantes de la quinasa bajo condiciones promotoras de la fosforilación, que implican la adición de ATP a la muestra. Tras el periodo de incubación correspondiente, se procesó cada una de las muestras y se analizó mediante *western blot* el nivel de fosforilación de Tip60. Los resultados demostraron cómo Tip60 era únicamente fosforilada por VRK1 *wild type* y no por el mutante catalíticamente inactivo de la quinasa. De esta manera, se pudo confirmar que la actividad catalítica de VRK1 es suficiente para inducir la fosforilación de Tip60 sin intervención de otras proteínas mediadoras.

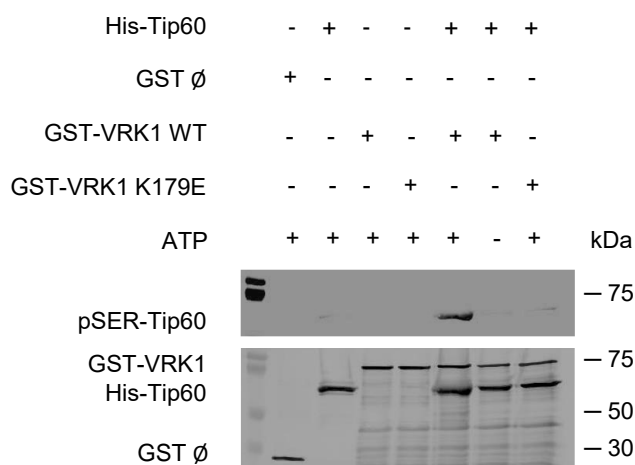


Figura 23. Fosforilación *in vitro* de Tip60 por VRK1. Tip60 purificada se incubó bien con VRK1-WT o bien con VRK1-K179E, ambas también purificadas, bajo condiciones favorables de la fosforilación (adición de ATP a una concentración de 2 mM y agitación a 37°C durante una hora) Seguidamente, se analizó la fosforilación de la acetiltransferasa mediante *western blot*.

2.2.2. VRK1 fosforila a Tip60 *in vivo* en respuesta a daño génico

Conociendo la capacidad de VRK1 de fosforilar a Tip60 *in vitro*, nuestro siguiente objetivo fue analizar el estado de fosforilación de la acetiltransferasa en el contexto celular cuando se induce daño génico. Así, cultivos celulares de A549 privados de suero, de forma que las rutas de señalización asociadas a señales mitogénicas no están activadas, se trataron con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos. Posteriormente, se inmunoprecipitó Tip60 y mediante *western blot* se estudió su estado de fosforilación. Tal y como se puede observar en la parte A de la figura 24, los niveles de fosforilación de Tip60 aumentan progresivamente a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con doxorrubicina. Además, estudios posteriores incrementando los tiempos de tratamiento demostraron que el máximo nivel de fosforilación de Tip60 se alcanza alrededor de las 2 horas, a partir de las cuales la fosforilación empieza a disminuir significativamente (figura 24, B).

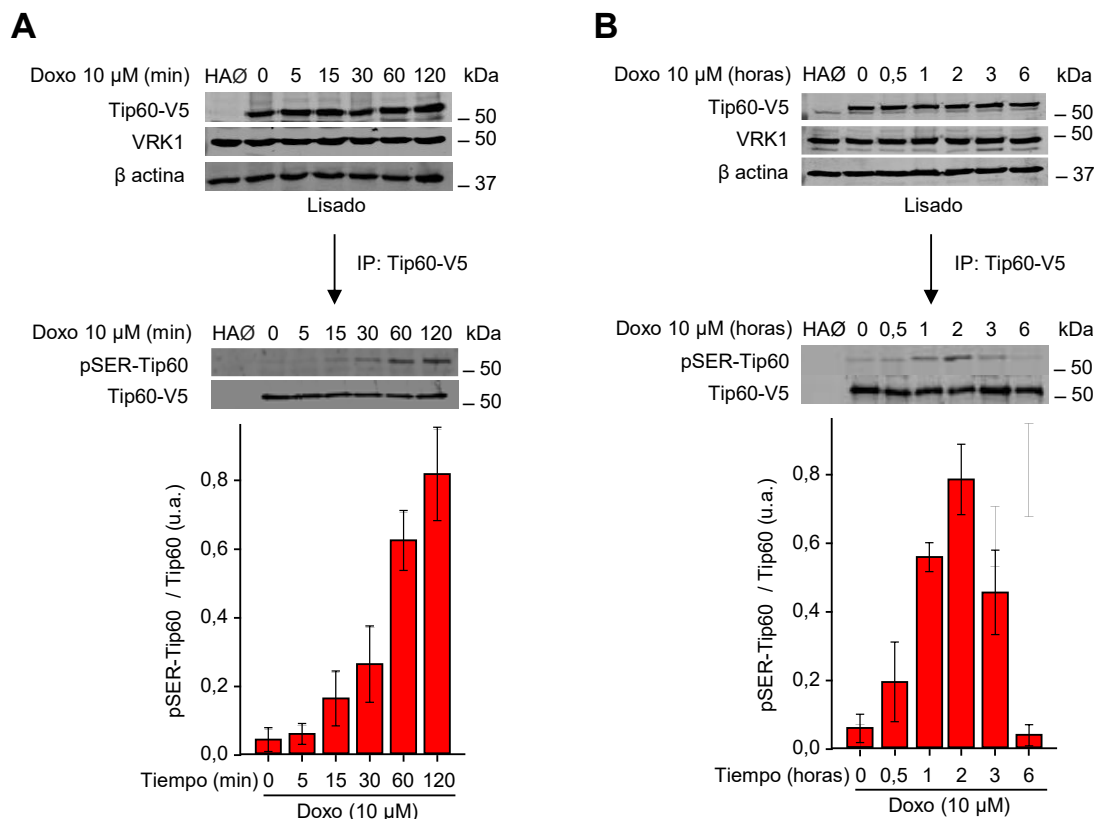


Figura 24. Fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico. Células A549 fueron tratadas con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos (A, tiempos cortos de tratamiento y B, tiempos largos de tratamiento). Tras la incubación con doxorrubicina, las células se lisaron y la acetiltransferasa Tip60-V5, que había sido previamente transfectada, se inmunoprecipitó para analizar su estado de fosforilación mediante *western blot*. Los diagramas de barras muestran el grado relativo de fosforilación de Tip60-V5 en los diferentes tiempos, cuantificado mediante el cociente resultante de dividir la intensidad de banda de Tip60 fosforilado respecto a la intensidad de banda de Tip60 total.

Una vez demostrado que Tip60 se fosforila en respuesta a daño y siendo VRK1 la quinasa candidata a llevar a cabo esta modificación post-traducciona, se analizó el grado de fosforilación de Tip60 en células A549 en las que la expresión de VRK1 se había bloqueado mediante diferentes ARNs de interferencia. Los resultados mostrados en la figura 25 confirman que, en efecto, el silenciamiento de VRK1 impide la fosforilación de Tip60 en respuesta al tratamiento con doxorrubicina. Por lo tanto, VRK1 fosforila a Tip60 en este contexto de daño génico.

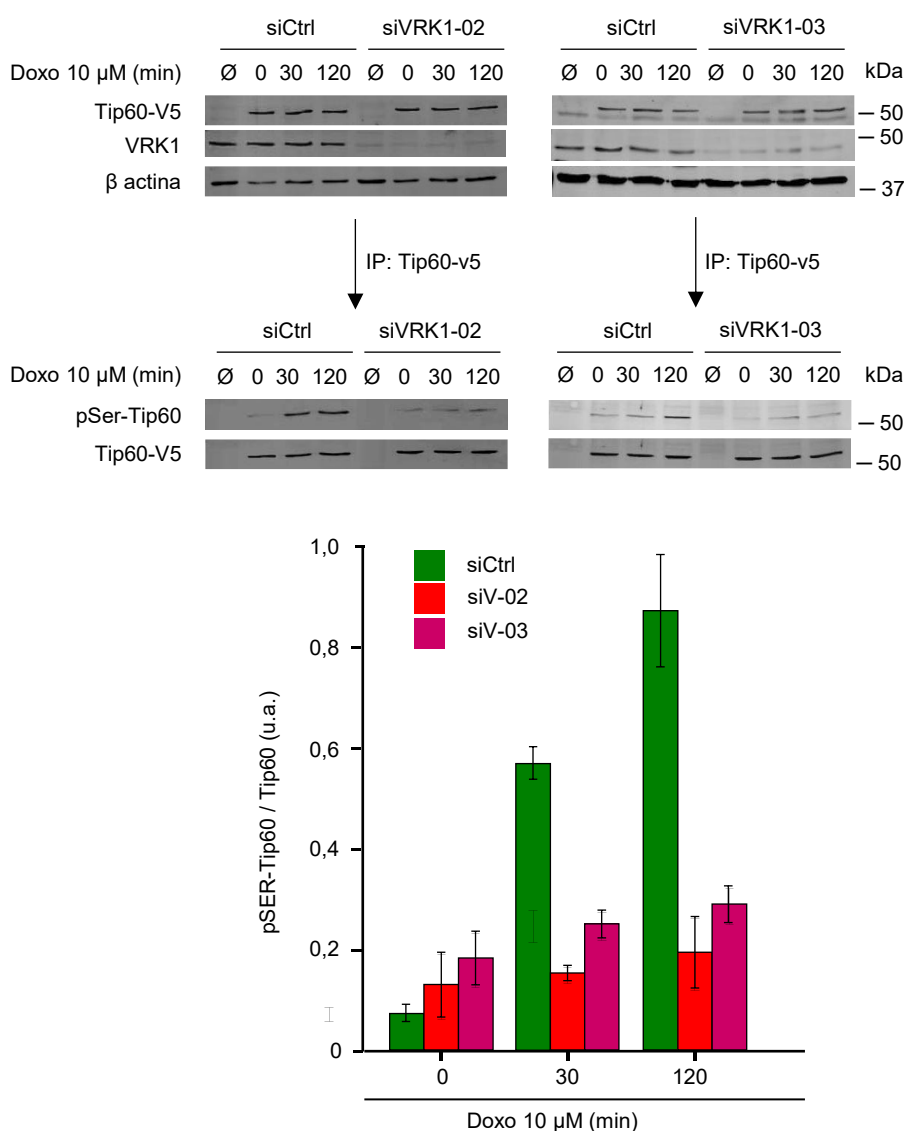


Figura 25. VRK1 es responsable de la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño. Células A549 transfectadas con Tip60-V5 y tratadas, alternativamente, con siCtrl, siVRK1-02 o siVRK1-03 se incubaron con doxorubicina (10 μM) durante 0, 30 o 120 minutos, tal y como se muestra en la figura. Tras los tratamientos, las células se lisaron y Tip60-V5 se inmunoprecipitó. El estado de fosforilación de Tip60 se analizó a partir del inmunoprecipitado de la proteína mediante western blot. Los diagramas de barras muestran el grado relativo de fosforilación de Tip60-V5 en los diferentes tiempos en función de la presencia o ausencia de VRK1 en la célula. El grado de fosforilación corresponde al cociente resultante de dividir la intensidad de banda de Tip60 fosforilado respecto a la intensidad de banda de Tip60 total.

Posteriormente, para confirmar el papel de VRK1 en la fosforilación de Tip60 en respuesta al tratamiento con doxorubicina, se llevó a cabo un experimento de rescate de fenotipo. Para ello, se utilizaron las líneas estables de A549 previamente descritas, capaces de expresar bien un VRK1 *wild type* murino (mVRK1-WT) o bien el mutante VRK1-K179E murino (mVRK1-K179E), catalíticamente inactivo. Sobre estas líneas, se silenció la expresión de la proteína VRK1 humana endógena mediante dos ARNs de interferencia que no interferían en la expresión de las variantes murinas. De nuevo, inmunoprecipitando Tip60, se analizó mediante *western blot* el grado de fosforilación de la acetiltransferasa en respuesta a daño, observándose que únicamente la variante mVRK1-WT, y no la variante mVRK1-K179E, es capaz de rescatar el fenotipo (figura 26). Dicho de otra manera, la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño ocurre únicamente cuando VRK1 es catalíticamente activa, confirmando que la actividad quinasa de VRK1 es esencial para esta modificación post-traducciona sobre la acetiltransferasa.

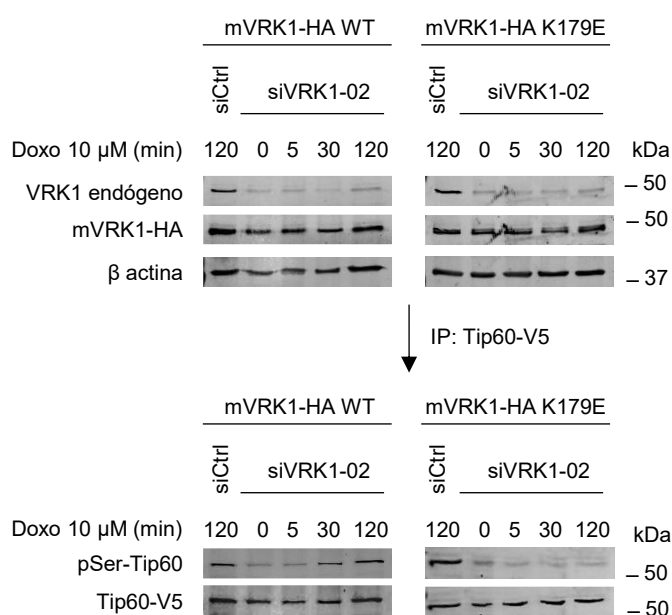


Figura 26. La actividad quinasa de VRK1 es imprescindible para la fosforilación de Tip60 en el contexto del daño génico. Células A549 estables en las que se estimula la expresión constitutiva mediante transducción viral de una variante murina wild type de VRK1 o de una variante catalíticamente inactiva fueron tratadas con ARNs de interferencia para bloquear la expresión del VRK1 endógeno. Posteriormente, estas células eran transfectadas para sobreexpresar Tip60-V5 y tratadas con doxorubicina a lo largo de diferentes tiempos. Mediante lisado celular e inmunoprecipitación de la acetiltransferasa transfectada, se analizó su fosforilación en cada una de las dos líneas celulares para cada uno de los tiempos de tratamiento.

2.2.3. La fosforilación de Tip60 durante la DDR es independiente del agente causante del daño

Hasta ahora, el análisis de la fosforilación de Tip60 en el contexto de daño génico se ha llevado a cabo utilizando doxorubicina, un inhibidor de la ADN topoisomerasa capaz de provocar roturas de doble cadena en el ADN. Con el fin de confirmar que dicha fosforilación mediada por VRK1 es independiente de la fuente de daño, se utilizó radiación ionizante como agente inductor. Tal y como se puede observar en la figura 27, Tip60 también se fosforila en respuesta a una radiación ionizante de 3 Gy, si bien, en comparación con el tratamiento con doxorubicina, dicha fosforilación ocurre a tiempos notablemente más cortos y se mantiene a lo largo de más tiempo tras la inducción del daño. Esto puede ser debido a que el daño generado por radiación ionizante, a diferencia del generado por doxorubicina, es instantáneo y, posiblemente, más severo, de forma que la respuesta al daño génico se desencadena mucho más rápido y durante un mayor periodo de tiempo.

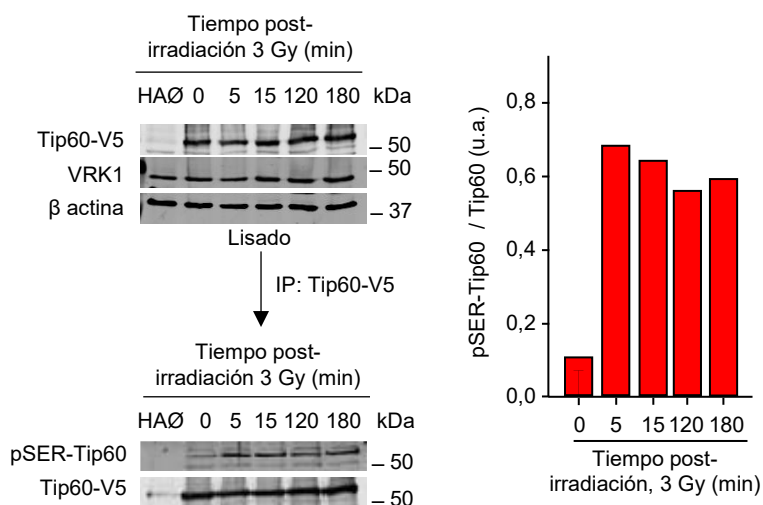


Figura 27. Tip60 se fosforila tras el tratamiento con radiación ionizante. Células A549 fueron sometidas a una radiación ionizante de 3 Gy y lisadas a diferentes tiempos post-irradiación. Posteriormente, se analizó el grado de fosforilación de Tip60 a partir de inmunoprecipitados de la proteína para cada una de las condiciones analizadas.

2.2.4. La fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 y su actividad acetiltransferasa de histonas son independientes de ATM y previas a su activación

Tal y como se ha explicado en la introducción, ATM es una quinasa que juega un papel fundamental a la hora de detectar el daño génico e iniciar la cascada de señalización para reparar la lesión (Bekker-Jensen y Mailand, 2010). Además, esta quinasa está estrechamente asociada a Tip60, pues se ha descrito que la acetilación de ATM en la lisina 3016 vía Tip60 es fundamental para su activación (Sun et al., 2005). Teniendo en cuenta esto, quisimos confirmar que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 es un proceso independiente y anterior a la activación de ATM durante la DDR. Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos diferentes.

En primer lugar, se decidió analizar la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico en la línea celular HT144, *ATM*^{-/-}. Al igual que en experimentos previos realizados en A549, se detectó mediante *western blot* que Tip60 se fosforila de forma muy similar en la línea celular que no expresa ATM tras el tratamiento con doxorrubicina (figura 28).

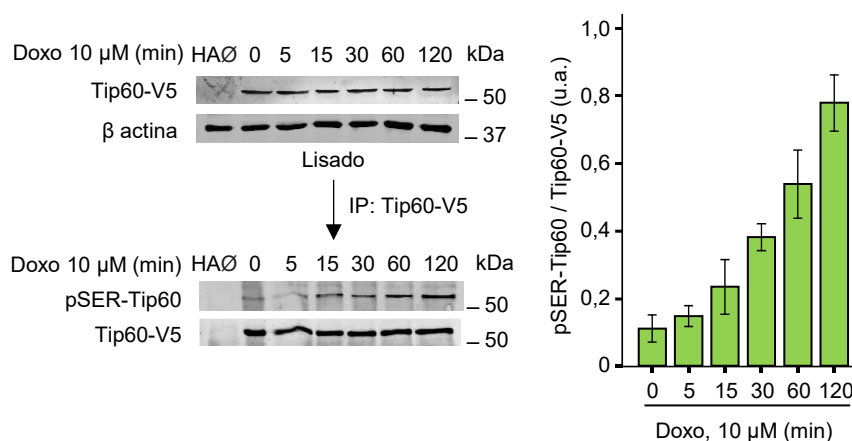


Figura 28. La fosforilación de Tip60 es independiente de ATM. Células HT144 (*ATM*^{-/-}) privadas de suero y transfectadas con pCDNA 3.1/Tip60-V5 fueron tratadas con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos. Posteriormente, se inmunoprecipitó la acetiltransferasa y se estudió su grado de fosforilación mediante *western blot*. Además, este grado de fosforilación se cuantificó mediante el cociente entre la intensidad de banda de Tip60 fosforilada y la intensidad de banda de Tip60 total inmunoprecipitado, representándose los resultados en el diagrama de barras que se muestra.

Para confirmar que la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño también es dependiente de VRK1 en HT144, se silenció *VRK1* en esta línea celular, observándose una pérdida de la fosforilación de Tip60 asociada al tratamiento con doxorrubicina (figura 29).

Por otro lado, también se analizó la fosforilación de Tip60 en A549 previo tratamiento de las células con cafeína, un inhibidor genérico de la familia de las PIKK quinastas a la que pertenece ATM, o con KU55933, un inhibidor específico de ATM. Los resultados mostrados en la figura 30 confirman que, a pesar de que la autofosforilación activadora de ATM queda inhibida a causa de los tratamientos con KU55933 o cafeína, Tip60 sigue fosforilándose en respuesta a daño génico. De nuevo, estos resultados permitían concluir que la fosforilación de Tip60 es previa e independiente a la activación de ATM, situando a VRK1 como una quinasa con una función anterior a lo largo de la cascada de señalización de la DDR.

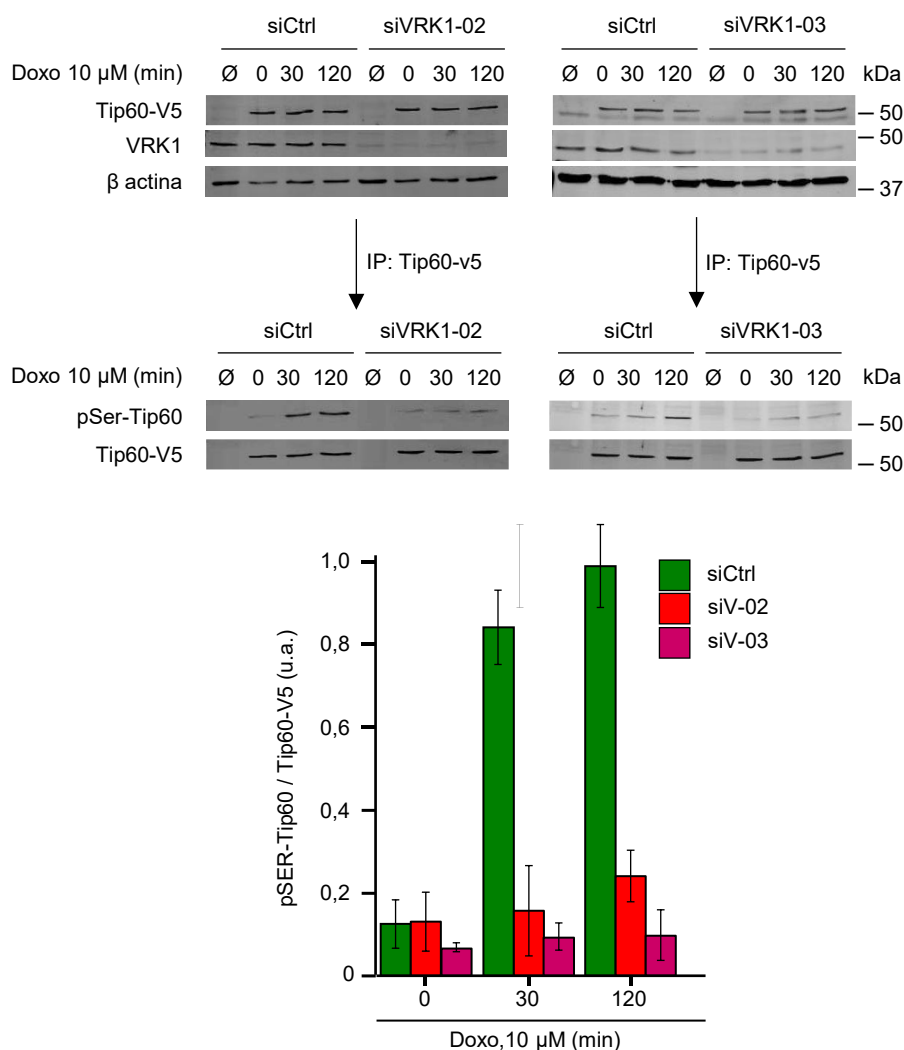


Figura 29. La fosforilación de Tip60 en respuesta a daño depende VRK1 en células ATM^{-/-}. Células HT144 (ATM^{-/-}) transfectadas alternativamente con siControl, siVRK1-02 o siVRK1-03 y, posteriormente, con Tip60-V5, fueron tratadas con doxorubicina (10 μ M) durante 0, 30 o 120 minutos. Tras los tratamientos, se inmunoprecipitó Tip60-V5 y se analizó su estado de fosforilación mediante western blot. Los diagramas de barras muestran el nivel de fosforilación de Tip60-V5 para los diferentes tiempos de tratamiento en función de la presencia o ausencia de VRK1 en la célula. Su cuantificación equivale al resultado de dividir la intensidad de banda de Tip60 fosforilado respecto a la intensidad de banda de Tip60 total.

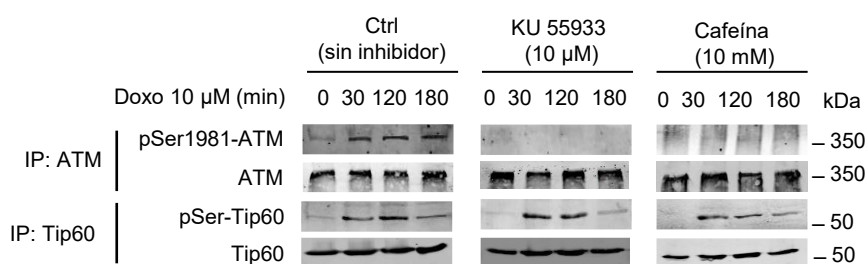


Figura 30. La inhibición de ATM no interfiere con la fosforilación de Tip60 respuesta a daño génico. Réplicas de células A549 privadas de suero se trataron en primer lugar con dos inhibidores de ATM diferentes: KU55933 (inhibidor específico) y cafeína (inhibidor genérico de PIKKs). Posteriormente, ambas réplicas también fueron tratadas con doxorubicina 10 μ M a lo largo de diferentes tiempos. El inmunoprecipitado de Tip60 obtenido a partir del lisado de las células se utilizó para analizar el grado de fosforilación de la acetiltransferasa mediante western blot.

Llegados a este punto, quisimos confirmar que, no sólo la fosforilación, sino también la actividad acetiltransferasa de Tip60 es independiente de ATM. Para ello, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células A549 sobre las que se analizaban los niveles de H4K16ac en respuesta a daño previa inhibición de la actividad quinasa de ATM mediante el tratamiento con KU55933 (figura 31, A y B). Este ensayo demuestra como el tratamiento con el inhibidor de ATM impedía la fosforilación de la quinasa, confirmando su eficacia, pero no reducía los niveles elevados de H4K16ac que aparecen como consecuencia del tratamiento con doxorrubicina. Por lo tanto, tal y como se preveía, la actividad acetiltransferasa de Tip60 en respuesta a daño es independiente y previa a la activación de ATM.

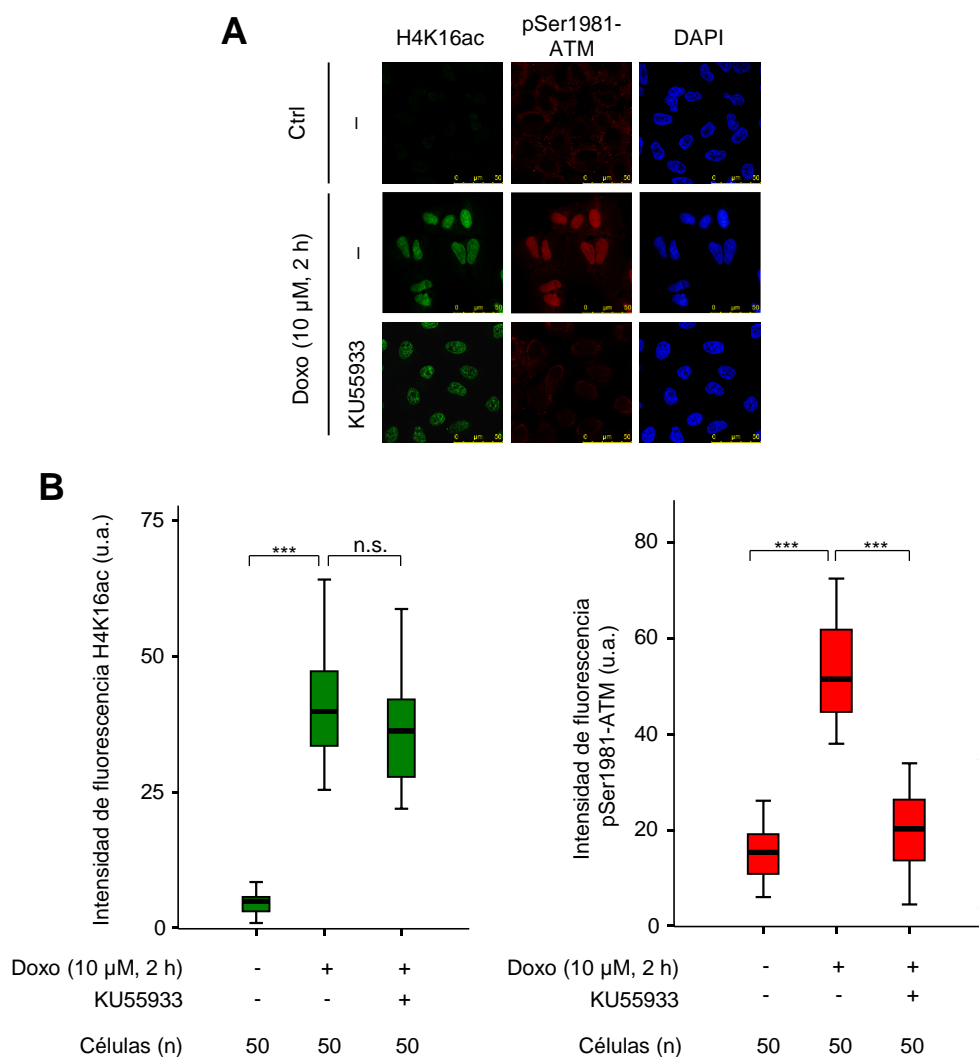


Figura 31. La acetilación de la H4K16 en respuesta a daño no depende de ATM. **A.** Células A549 tratadas con el inhibidor de ATM KU55933 (12 horas, 10 µM) fueron sometidas a daño génico con doxorrubicina 10 µM durante las dos últimas horas del tratamiento con el inhibidor. Posteriormente, por inmunofluorescencia, se observaron los niveles tanto de la acetilación de H4K16 como de ATM fosforilado en cada una de las poblaciones celulares. **B.** Cuantificación de las fluorescencias asociadas a la acetilación de la H4K16 (izquierda) y a la fosforilación de ATM (derecha) para las diferentes condiciones estudiadas. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001; p-valor ≥ 0,05.

3. IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA FOSFORILACIÓN DE TIP60 MEDIADA POR VRK1 EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

Una vez demostrado que VRK1 fosforila a Tip60 en respuesta a daño génico, nuestro propósito se centró en determinar cuáles son las consecuencias de dicha fosforilación a nivel celular. Para ello, se estudiaron diferentes propiedades de Tip60 que podrían estar afectadas por esta fosforilación, tales como su actividad acetiltransferasa de histonas, su localización celular, su estabilidad o su actividad enzimática en sustratos no cromatínicos como ATM o p53.

3.1. LA FOSFORILACIÓN DE TIP60 MEDIADA POR VRK1 MODULA LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE TIP60 A NIVEL DE LAS HISTONAS

Basándonos en los resultados obtenidos hasta ahora, la hipótesis inicialmente planteada, según la cual VRK1 está modulando la actividad acetiltransferasa de Tip60 a lo largo de la respuesta al daño génico, parece confirmarse. Así, con el propósito de complementar estos resultados y aportar nuevas perspectivas que permitan corroborar dicha hipótesis, se llevó a cabo un experimento adicional en el cual se comparaban las cinéticas de fosforilación de Tip60 y de acetilación de la H4K16 en células A549 tras la inducción de daño génico con doxorubicina. Tal y como se puede observar en la figura 32, la cinética de ambas modificaciones post-traduccionales son muy similares, de forma que a medida que se produce un incremento en la fosforilación de Tip60 tras tiempos cortos de exposición al agente quimioterapéutico, también incrementan los niveles de acetilación de la H4K16. Esto apoya el hecho de que la acetilación en la histona es dependiente de la fosforilación de Tip60 llevada a cabo por VRK1.

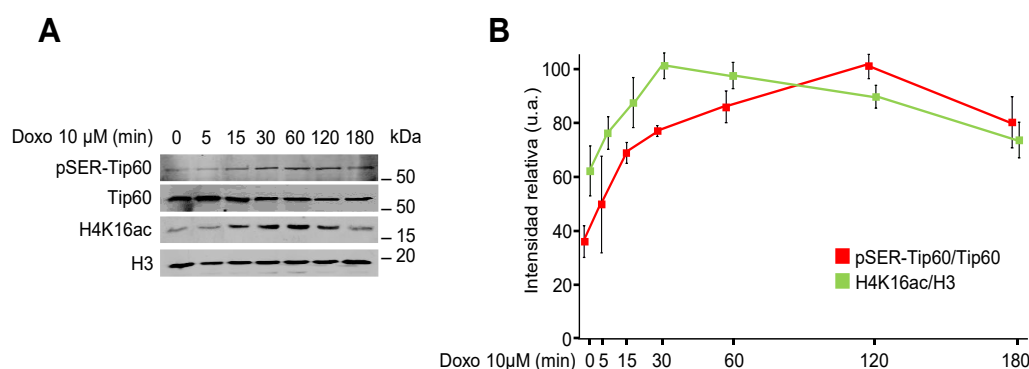


Figura 32. La fosforilación de Tip60 y la acetilación de la H4K16 en respuesta a daño siguen cinéticas similares. Células A549 privadas de suero fueron tratadas con doxorubicina 10 μM a lo largo de diferentes tiempos. Posteriormente, estas células se lisaron, analizando a partir de un inmunoprecipitado de Tip60, la fosforilación de la acetiltransferasa a lo largo de estos tiempos y, de forma paralela y a partir de un extracto enriquecido de histonas, la acetilación de la lisina 16 de la histona H4.

Todos estos resultados llevaban a pensar que el papel de dicha fosforilación era regular de forma directa la actividad acetiltransferasa de Tip60, de forma que ésta, una vez fosforilada, pasara de un estado catalíticamente inactivo a uno catalíticamente activo. Con el fin de demostrar esta hipótesis, en primer lugar se realizó un ensayo de la actividad de Tip60 a partir de proteína purificada bajo diferentes condiciones celulares: (1) presencia de VRK1 y ausencia de daño; (2) presencia de VRK1 e inducción de daño; (3) ausencia de VRK1 y ausencia de daño; y (4) ausencia de VRK1 e inducción de daño. Así, una vez purificada, Tip60 se incubó con los reactivos proporcionados por el kit de ensayo de la actividad acetiltransferasa (apartado 8 de materiales y métodos). De esta manera, se pudo analizar la capacidad catalítica de Tip60 bajo cada una de las condiciones descritas en base a los niveles de absorbancia producidos por las muestras (figura 33). Los resultados muestran como la actividad acetiltransferasa de Tip60 aumenta significativamente en respuesta a daño génico siempre y cuando ésta haya sido purificada a partir de células capaces de expresar VRK1. Sin embargo, la ausencia de la quinasa en las células impide que Tip60 ejerza su actividad acetiltransferasa *in vitro*. Este hecho confirma que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 en respuesta a daño génico es necesaria para la actividad catalítica de la acetiltransferasa y, consecuentemente, para el desencadenamiento de la DDR.

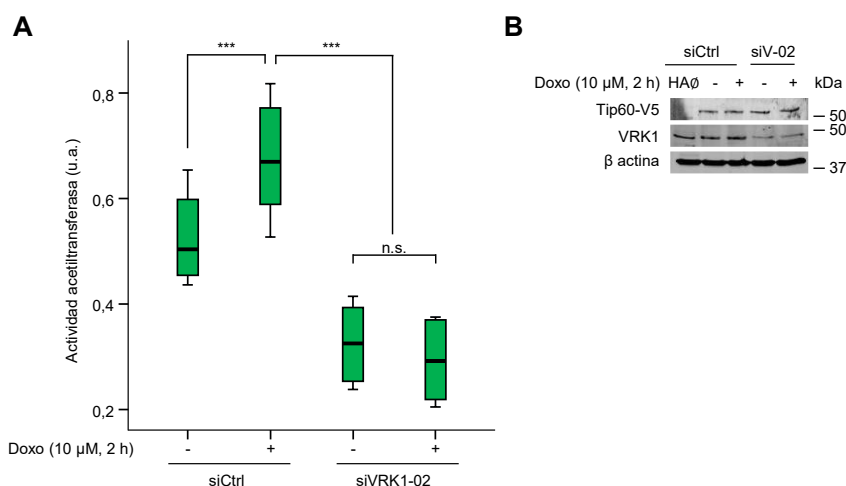


Figura 33. El silenciamiento de VRK1 previene la actividad de Tip60 in vitro. **A.** Réplicas de cultivos de A549 transfectados, en primer lugar, con siControl o siVRK1 y, posteriormente, con Tip60-V5, fueron privadas de suero y tratadas con doxorubicina (10 µM, 2 horas). Posteriormente, la proteína Tip60 sobreexpresada se inmunoprecipitó y eluyó, obteniendo así un purificado de la misma para cada una de las condiciones establecidas sobre el cual se realizó un ensayo de actividad acetiltransferasa in vitro. **B.** Control de transfección y silenciamiento de Tip60-V5 y VRK1, respectivamente.

Para confirmar los resultados y conclusiones obtenidos del experimento anterior, decidimos analizar *in vivo* la autoacetilación de Tip60 en respuesta a daño génico en función de los niveles de expresión de VRK1. Dado que esta modificación es indicadora de que la proteína se encuentra en un estado catalíticamente activo y que, tal y como se muestra en la figura 34, sólo ocurre en respuesta a daño génico cuando VRK1 se expresa normalmente y fosforila a Tip60, pudimos confirmar que, en efecto, la fosforilación de VRK1 posibilita la transición de Tip60 de un estado catalíticamente inactivo a uno catalíticamente activo durante la respuesta al daño génico.

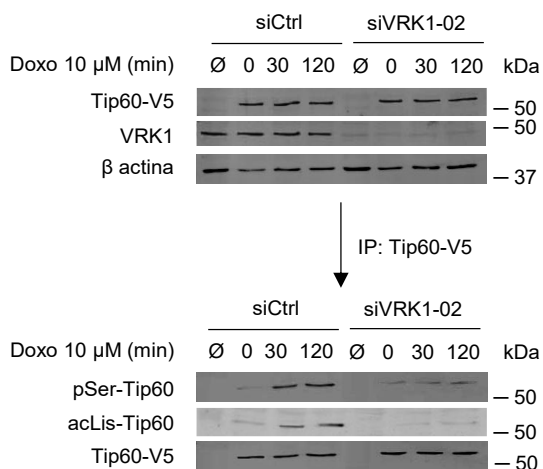


Figura 34. El silenciamiento de VRK1 imposibilita la autoacetilación de Tip60. Células A549 transfectadas con siControl o siVRK1-02 fueron sometidas a diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina 10 µM. A partir de dos inmunoprecipitados paralelos de Tip60-V5, se analizó tanto la fosforilación como la autoacetilación de Tip60 para cada una de las condiciones.

3.2. LA FOSFORILACIÓN DE TIP60 ASOCIADA A VRK1 PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE LA ACETILTRANSFERASA EN LA CROMATINA TRAS LA INDUCCIÓN DE DAÑO GÉNICO

Estudios anteriores han demostrado que la actividad quinasa de VRK1 ejerce un papel fundamental en la localización y acumulación de diferentes proteínas mediadoras del daño génico, como pueden ser 53BP1 (Sanz-García et al., 2012), γ H2AX (Salzano et al., 2015) o NBS1 (Monsalve et al., 2016). Teniendo en cuenta esto, se planteó la posibilidad de que, junto con la actividad acetiltransferasa, la localización subcelular de Tip60 también pudiera ser modulada por la fosforilación que VRK1 cataliza sobre la misma durante la respuesta al daño génico. Así, decidimos analizar la localización de Tip60 en células A549 privadas de suero en función de la presencia o ausencia de daño génico (figura 35). Los resultados muestran como Tip60 se acumula de forma significativa en el núcleo celular a medida que el tiempo de tratamiento con doxorubicina aumenta. Sin embargo, el silenciamiento de VRK1 a través de un ARNi específico imposibilitaba esta acumulación nuclear de Tip60 en respuesta a daño génico.

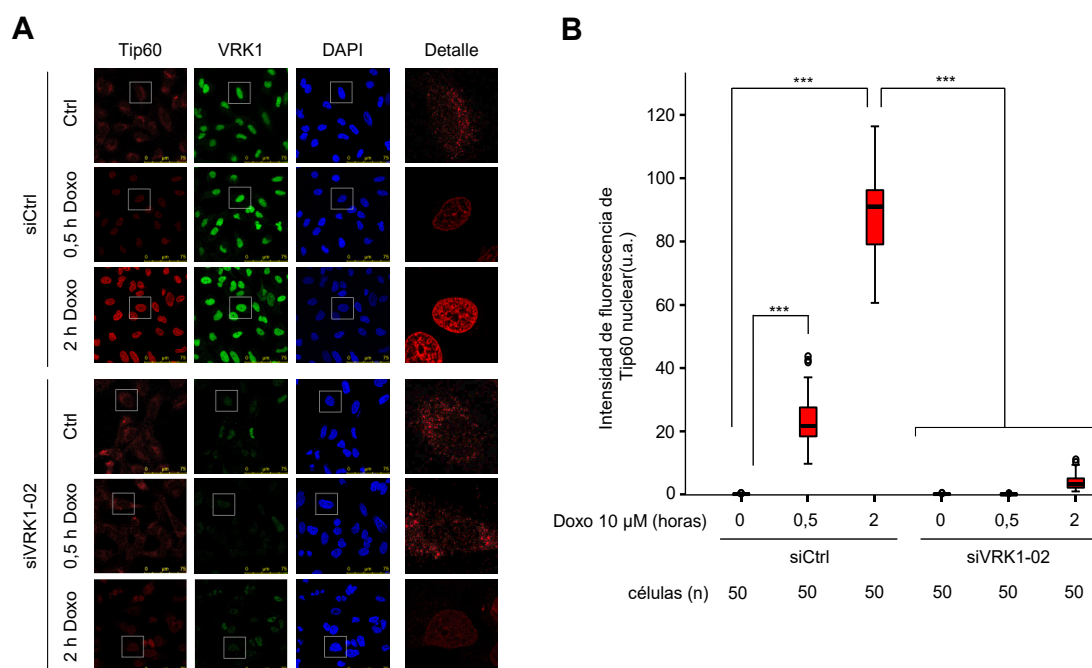


Figura 35. VRK1 promueve la acumulación nuclear de Tip60 en respuesta a daño génico. **A.** Células A549 privadas de suero se transfectaron con siControl o siVRK1-02 y, posteriormente, se trataron con doxorubicina 3 μM durante 30 minutos o dos horas. Mediante inmunofluorescencia, se analizó la localización de Tip60 endógeno en las células bajo las distintas condiciones. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear asociada a Tip60. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001.

Teniendo en cuenta este resultado, quisimos analizar el comportamiento de Tip60 a nivel subnuclear en lo que a su localización respecta. Para ello, se aislaron las fracciones nucleoplasmática y cromatínica del núcleo y se analizaron mediante *western blot* los niveles tanto de Tip60 fosforilado como de Tip60 total en cada una de estas fracciones (figura 36). Los resultados indican la existencia de una subpoblación de Tip60 constante y no fosforilada en el nucleoplasma, independientemente de la presencia o ausencia de VRK1 en la célula. Por el contrario, Tip60 no está presente en la cromatina en condiciones basales (ausencia de daño) pero se acumula en esta fracción nuclear a medida que aumenta el daño génico. Además, esta acumulación progresiva en la cromatina es VRK1-dependiente, ya que en ausencia de la quinasa no se detectó Tip60. Por otro lado, cabe destacar que la acumulación cromatínica de Tip60 aumenta progresivamente a medida que su fosforilación también incrementa. La similitud entre ambas cinéticas, junto con el hecho de que VRK1 es imprescindible para la unión de Tip60 en la cromatina, demuestran que la fosforilación de la acetiltransferasa es necesaria para su acumulación en esta fracción nuclear.

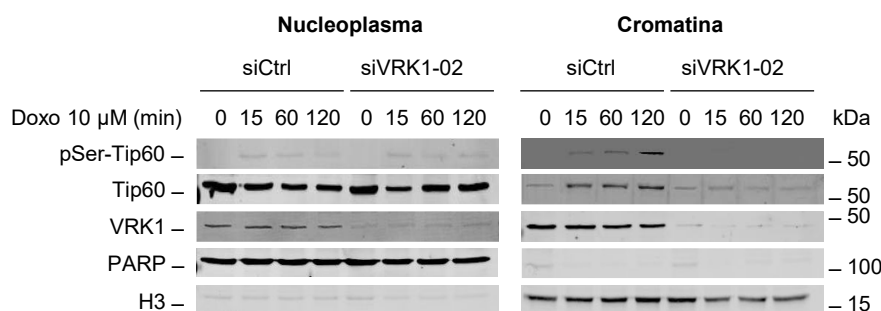


Figura 36. VRK1 posibilita la acumulación de Tip60 en la cromatina en respuesta a daño génico. Células A549 en presencia o ausencia de VRK1 se trataron con doxorubicina 10 μM a lo largo de diferentes tiempos. Posteriormente, siguiendo un protocolo de fraccionamiento nuclear, se purificó tanto el nucleoplasma como la cromatina de las células y, mediante *western blot*, se analizó los niveles de Tip60 fosforilado y de Tip60 total en cada una de dichas fracciones para cada uno de los tiempos de tratamiento utilizados.

Por último, quisimos analizar la capacidad de Tip60 de interactuar con VRK1 tanto en el nucleoplasma como en la cromatina. Para ello, siguiendo el procedimiento anterior, aislamos ambas fracciones nucleares e inmunoprecipitamos VRK1 en cada una de estas fracciones. Posteriormente, mediante *western blot* analizamos la presencia de Tip60-V5, previamente sobreexpresado (como se ha demostrado en la figura 19, la inmunoprecipitación de VRK1 imposibilita la detección de Tip60 endógeno) en cada uno de los precipitados (figura 37). La subpoblación de Tip60 presente en el nucleoplasma interactúa permanentemente con VRK1 a pesar de que dicha interacción no posibilite la fosforilación de la acetiltransferasa en esta fracción. Este fenómeno apoya los resultados anteriores en los que se demostraba la existencia de un complejo basal Tip60-VRK1 independiente de daño. Por su parte, en la fracción cromatínica se puede observar que la población de Tip60 que se acumula en ella en respuesta a daño aparece unida a una población de VRK1 asociada de forma permanente a la cromatina. Dado que Tip60 sólo aparece fosforilada en la cromatina, nunca en el nucleoplasma, cabe pensar que es la población de VRK1 cromatínica la responsable de fosforilar a Tip60 y asegurar su anclaje a la cromatina. Sin embargo, deben existir otros mecanismos alternativos que permitan una primera aproximación de la acetiltransferasa a la cromatina para posibilitar su posterior fosforilación y anclaje. En este sentido, la trimetilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) puede jugar un papel fundamental, pues ya se ha descrito que Tip60 se une a esta marca epigenética a través de su cromodominio (Li y Wang, 2017).

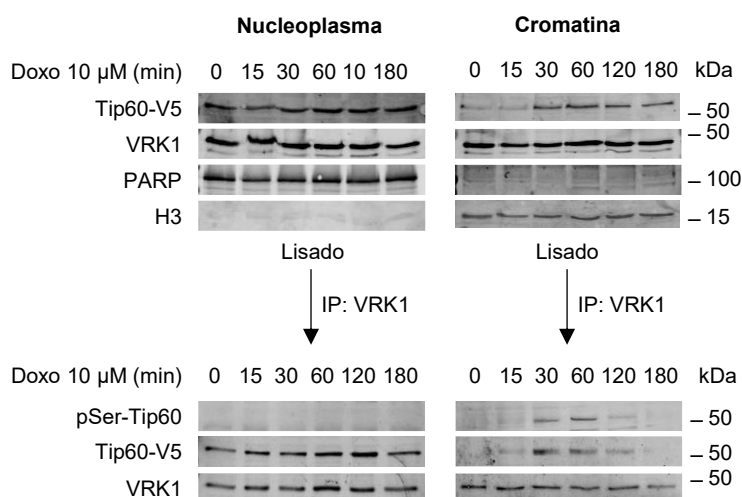


Figura 37. Tip60 interactúa con las subpoblaciones nucleoplasmática y cromatínica de VRK1. Células A549 se transfectaron con pCDNA3.1/Tip60-V5. Posteriormente, previa retirada del suero del medio de cultivo, se trataron con doxorubicina 10 μM a lo largo de diferentes tiempos. Las células se lisaron de forma que las fracciones nucleoplasmática y cromatínica quedaran aisladas y a partir de cada una de ellas se inmunoprecipitó VRK1. Mediante *western blot* se analizó la presencia de Tip60-V5 y su grado de fosforilación en cada uno de los inmunoprecipitados de VRK1.

3.3. VRK1 PROTEGE A TIP60 DE SU DEGRADACIÓN VÍA PROTEASOMA

Anteriormente se ha descrito el papel que la fosforilación por parte VRK1 tiene a la hora de estabilizar diferentes sustratos, como por ejemplo NBS1 (Monsalve et al., 2016), aurora quinasa B (Moura et al., 2018) o coilina (Cantarero et al., 2015). Por ello, decidimos estudiar si VRK1 también estaba involucrado en regular la estabilidad de Tip60.

3.3.1. El silenciamiento de VRK1 disminuye la vida media de Tip60 en la célula

Una primera aproximación para determinar el papel que VRK1 pudiera ejercer sobre la estabilidad de Tip60 consistió en comparar la vida media de la acetiltransferasa tanto en células A549 capaces de expresar VRK1 como en células en las que la expresión de VRK1 se ha bloqueado mediante un ARNi. Para ello, se inhibió la síntesis *de novo* de proteínas en ambos modelos celulares mediante el tratamiento con cicloheximida, de forma que se pudieran analizar mediante *western blot* los niveles proteicos de Tip60 a lo largo de diferentes tiempos sin que la síntesis de nueva proteína interfiriera en el análisis. De este modo, tal y como se puede observar en la figura 38, se determinó que, en presencia de VRK1, Tip60 presenta una vida media elevada, puesto que sus niveles proteicos no se ven alterados tras 24 horas de tratamiento con cicloheximida. Sin embargo, el silenciamiento de VRK1 provoca una disminución significativa en la estabilidad de la acetiltransferasa, la cual empieza a ver reducidos sus niveles proteicos a partir de las cuatro horas de tratamiento con cicloheximida. Esta disminución en la vida media como consecuencia del

silenciamiento de *VRK1* sugiere que Tip60 se degrada más rápidamente bajo esta condición en la célula. Uno de los principales mecanismos de degradación proteica a nivel celular tiene lugar vía proteasoma. Así, decidimos estudiar si los niveles proteicos de Tip60 podían ser rescatados en células que no expresan *VRK1* y en las que, además, se bloquea la degradación vía proteasoma mediante el tratamiento de MG132, un inhibidor específico de este último. Confirmamos, de acuerdo con el panel derecho de la figura 38, que en ausencia de *VRK1*, Tip60 estaba siendo degradada rápidamente mediante este mecanismo preteolítico, pues el tratamiento con MG132 permitió recuperar los niveles proteicos de la acetiltransferasa.

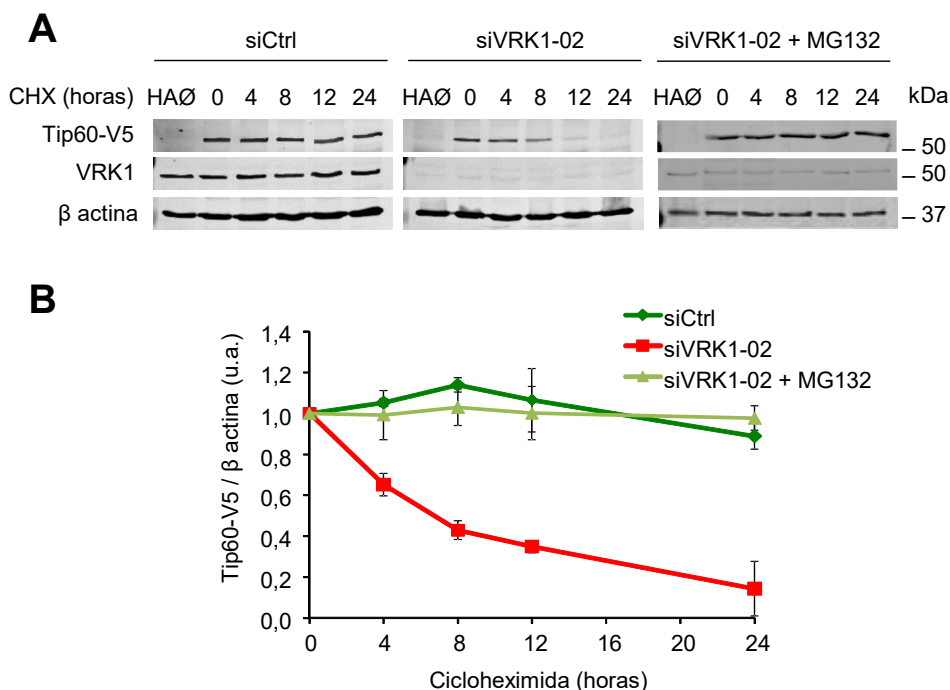


Figura 38. El silenciamiento de *VRK1* favorece la degradación de Tip60 vía proteasoma. **A.** Células A549 transfectadas con siControl o siVRK1-02 se trataron con cicloheximida a lo largo de diferentes tiempos. A lo largo de la incubación con cicloheximida, una de las réplicas que no expresaba *VRK1* fue tratada con MG132 (inhibidor del proteasoma) a una concentración de 15 μ M durante estas 24 horas. Transcurridos los tiempos correspondientes, se analizaron los niveles de Tip60 para cada una de las condiciones. **B.** Cuantificación de los niveles proteicos de Tip60 a lo largo de los diferentes tiempos de tratamiento con cicloheximida bajo las 3 condiciones analizadas. Esta cuantificación es el resultado de dividir la intensidad de banda de Tip60 entre la intensidad de banda de β actina (estable a lo largo del tiempo) para cada una de las condiciones estudiadas.

3.3.2. Las ubiquitin-ligasas Mdm2 y RNF8 promueven la degradación de Tip60

La degradación vía proteasoma implica una poliubiquitinación previa de las proteínas que tienen que ser degradadas con el fin de poder ser reconocidas así por la maquinaria proteolítica. Las ubiquitin-ligasas son las enzimas encargadas de llevar a cabo esta modificación post-traducciona que marca el destino de la proteína. Trabajos anteriores han demostrado que Mdm2 (la variante murina de Hdm2, una de las ubiquitin-ligasas más estudiadas) es capaz de ubiquitinar a Tip60 y promover su degradación (Legube et al., 2002). Sin embargo, Hdm2 constituye una ubiquitin-ligasa con una localización principalmente citosólica, mientras que Tip60 es una proteína mayoritariamente nuclear. Teniendo en cuenta esto, parece razonable pensar que la regulación de los niveles proteicos de Tip60 mediante proteólisis pueda ocurrir también a nivel nuclear, donde se ha demostrado la existencia de complejos de proteasoma. Así decidimos estudiar si existía alguna ubiquitin-ligasa nuclear capaz de marcar el destino de la acetiltransferasa vía poliubiquitinación. Para ello promovimos, mediante transfección, la expresión y actividad tanto de Mdm2 como de RNF8, una ubiquitin ligasa con una distribución subcelular muy similar a Tip60. Seguidamente, se analizaron por *western blot* los niveles proteicos de Tip60 tanto cuando la vía de degradación proteasomal estaba activa como cuando se bloqueaba mediante MG132. Tal y como se muestra en la figura 39, no sólo Mdm2, sino que también RNF8, promueven una reducción significativa de los niveles proteicos de Tip60, favoreciendo su degradación a través del proteasoma.

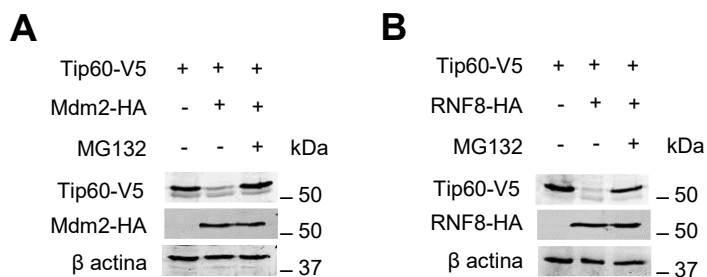


Figura 39. Diferentes ubiquitin-ligasas promueven la degradación vía proteasoma de Tip60. La sobreexpresión de Tip60 y Mdm2 (A) o Tip60 y RNF8 (B) en células A549 promueve la rápida degradación de la acetiltransferasa (carriles centrales). El bloqueo del proteasoma mediante el tratamiento con MG132 (25 μ M durante 12 horas) previene dicha degradación en ambos casos.

Posteriormente, con el fin de confirmar que RNF8, al igual que lo descrito en estudios anteriores para Mdm2 (Legube et al., 2002), promueve esta degradación al favorecer la poliubiquitinación de Tip60, se analizaron por *western blot* los niveles de Tip60 ubiquitinada en células A549 sometidas a diferentes condiciones que promueven en menor o mayor medida el proceso de ubiquitinación y degradación proteasomal (figura 40). Se observó que los niveles de Tip60 ubiquitinada aumentaban si se promovía la expresión de los genes de la ubiquitina y de RNF8, mientras que los niveles de Tip60 no ubiquitinada disminuían al transfectar conjuntamente ambos genes. Además, Tip60 en su forma ubiquitinada se acumulaba de manera mucho más significativa cuando, a mayores, se bloqueaba la degradación vía proteasoma con MG132. Estos resultados confirman que RNF8 es capaz de ubiquitinar a Tip60 y promover de esta manera su degradación proteasomal.

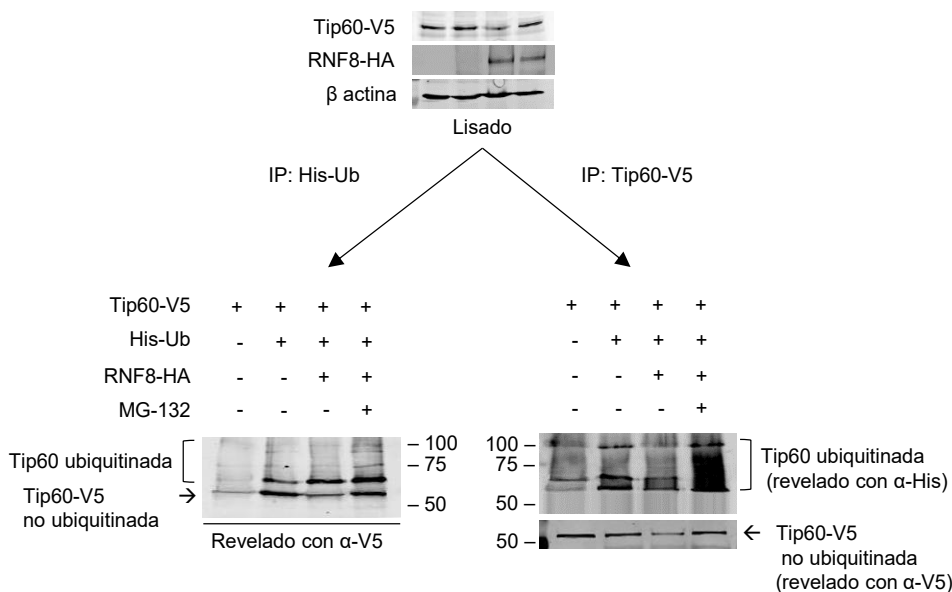


Figura 40. RNF8 ubiquitina a Tip60 para promover su degradación proteasomal. Réplicas de células A549 se transfectaron con diferentes combinaciones de constructos plasmídicos y posteriormente se trataron con MG132 (25 μ M) durante 12 horas, tal y como se indica en la figura. A partir de los lisados celulares se realizaron dos inmunoprecipitaciones paralelas, una de His-ubiquitina y otra de Tip60-V5 y sobre estos inmunoprecipitados se analizaron mediante *western blot* los niveles tanto de Tip60-V5 no ubiquitinada como de Tip60-V5 ubiquitinada.

3.3.3. Tip60 se poli-ubiquitina mediante cadenas formadas por la unión de monómeros de la proteína a través de su lisina 48

La poliubiquitinación de una proteína puede implicar diferentes destinos de la misma en función de los residuos a través de los cuales se unen las diferentes ubiquitinas que forman la cadena. Así, cadenas de poliubiquitina formadas a partir de la unión de monómeros a través de la lisina 48 marcan a las proteínas para ser degradadas vía proteasoma. Por el contrario, aquellas cadenas formadas a través de la unión de ubiquitinas por su lisina 63 normalmente implican un cambio de localización subcelular de la proteína o una señal de reclutamiento de otras proteínas. Teniendo en cuenta esto, quisimos analizar el tipo de cadenas que se estaban formando en la ubiquitinación de Tip60 previamente detectada. Para ello, se transfectaron

células A549 con plásmidos que contienen genes de ubiquitina capaces de expresar 5 variantes de la proteína: pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, que expresa una ubiquitina *wild type* o silvestre; pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K48R, que presenta la lisina 48 mutada a arginina; pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K63R, en el que la lisina 63 está sustituida por arginina; pCMV-His-Ubiquitina-K48, que expresa una ubiquitina en el que todas las lisinas menos la lisina 48 están mutadas; y pCMV-His-Ubiquitina-K63, para el cual la ubiquitina tiene todas las lisinas excepto la 63 mutadas. A partir de los respectivos cultivos celulares, previo bloqueo de la degradación proteasomal mediante MG132, se inmunoprecipitó Tip60 y mediante *western blot* se analizaron los niveles de proteína ubiquitinada (figura 41). Los resultados muestran altos niveles de Tip60 poliubiquitinada a través de la ubiquitina silvestre y los mutantes K63R (lisina 63 mutada a arginina) y K48 (todas las lisinas, a excepción de la 48, mutadas). Por el contrario, Tip60 incorpora en mucha menor medida cadenas de poliubiquitina formadas por los mutantes K48R (lisina 48 mutada a arginina) y K63 (todas las lisinas menos la 63 mutadas). Estos resultados son complementarios entre sí e indican que las cadenas de poliubiquitina que se unen a Tip60 están formadas por uniones de monómeros a través de la lisina 48, responsables, por lo tanto, de promover la degradación vía proteasoma.

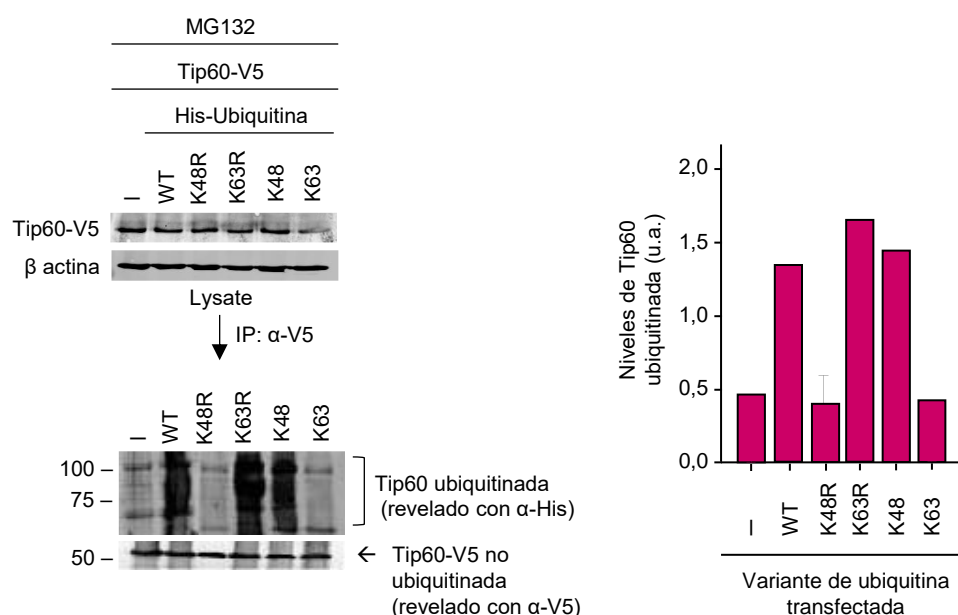


Figura 41. Cadenas de poli-ubiquitina formadas por uniones de monómeros a través de sus lisinas 48 marcan a Tip60 para su degradación. Células A549 transfectadas, además de con pcDNA3.1/Tip60-V5, con los plásmidos pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K48R, pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K63R, pCMV-His-Ubiquitina-K48 o pCMV-His-Ubiquitina-K63 se trataron con MG132 (25 μ M) durante 12 horas. Posteriormente, a partir del inmunoprecipitado del Tip60 transfectado, se analizó el grado de ubiquitinación de la proteína asociada a las diferentes variantes de ubiquitina. El diagrama de barras de la derecha muestra la cuantificación de los niveles relativos de Tip60 ubiquitinada.

3.3.4. VRK1 reduce los niveles de Tip60 ubiquitinada en respuesta a daño génico.

Hasta ahora se ha demostrado, por un lado, que VRK1 aumenta la estabilidad de Tip60 y, por otro, que la acetiltransferasa se poliubiquitina para ser degradada vía proteasoma. Por lo tanto, parece razonable pensar que ambos fenómenos están relacionados entre sí. Así, con el fin de estudiar si existe relación entre la actividad de VRK1 y la ubiquitinación de Tip60 en el contexto de daño génico, se analizaron mediante *western blot* los niveles de Tip60 ubiquitinada tras el tratamiento con doxorubicina en función de la capacidad de las células para expresar VRK1. Para ello, el plásmido pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, que expresa una ubiquitina silvestre, se transfectó previamente en células A549 tratadas con MG132 y sometidas a 4 condiciones diferentes: (1) presencia de VRK1 y ausencia de daño; (2) presencia de VRK1 e inducción de daño con doxorubicina durante 2 horas; (3) ausencia de VRK1 y ausencia de daño; y (4) ausencia de VRK1 e inducción de daño con doxorubicina durante 2 horas. Posteriormente, las células se lisaron y se inmunoprecipitó de forma paralela la ubiquitina transfectada o Tip60-V5. Finalmente, se analizaron los niveles de Tip60 ubiquitinada en cada uno de estos inmunoprecipitados. Tal y como muestra la figura 42, los niveles de Tip60 ubiquitinada se reducen considerablemente cuando se induce daño génico y VRK1 se expresa normalmente en la célula. Sin embargo, bajo la misma condición de daño y en ausencia de VRK1, los niveles de Tip60 ubiquitinada son elevados, similares a los que se pueden observar en células que no han sido tratadas con doxorubicina. Por lo tanto, frente a los niveles de ubiquitinación normales de Tip60

en las células, en respuesta a daño génico, dichos niveles se ven significativamente reducidos de forma VRK1-dependiente, previniendo con ello su degradación y aumentando la estabilidad de la acetiltransferasa.

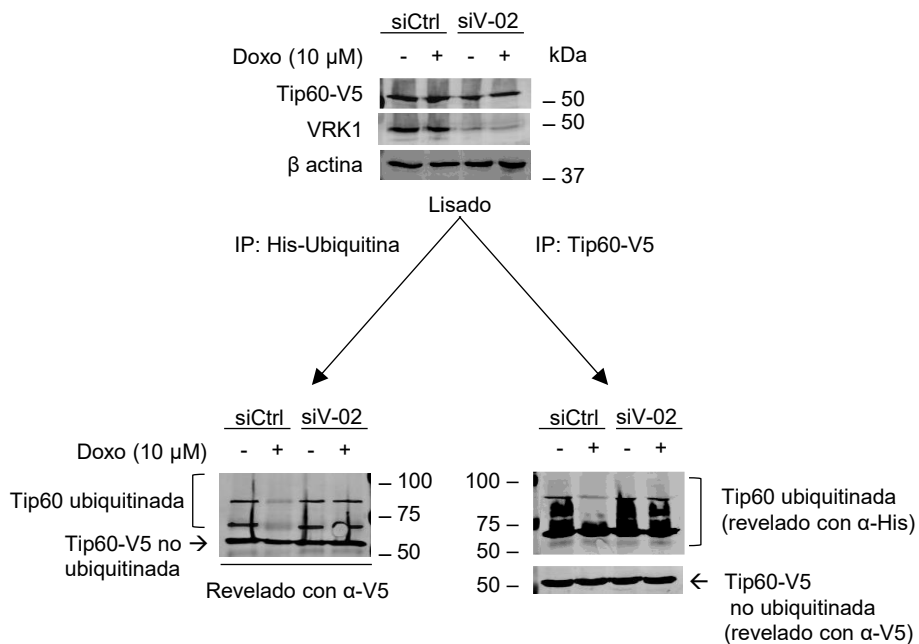


Figura 42. VRK1 protege a Tip60 de la ubiquitinación en respuesta a daño génico. Evaluación del grado de ubiquitinación de Tip60 dependiente de VRK1 en respuesta a doxorubicina (10 μM, 2 horas) en células A549 con sobreexpresión de Tip60-V5 y ubiquitina y tratadas con MG132 (25 μM, 12 horas).

3.4. IMPLICACIÓN DE VRK1 EN LA ACTIVIDAD ACETILTRANSFERASA DE TIP60 SOBRE SUSTRATOS NO CROMATÍNICOS QUE PARTICIPAN EN LA DDR

Hasta ahora se ha descrito que VRK1 juega un papel fundamental a la hora de posibilitar que Tip60 acetile la lisina 16 de la histona H4 en respuesta a daño génico. Sin embargo, la actividad acetiltransferasa de Tip60 no recae únicamente sobre residuos de histonas, sino que además se han descrito múltiples sustratos no cromatínicos de Tip60, algunos de ellos también implicados en la DDR. Teniendo en cuenta esto, quisimos determinar si el papel regulador de VRK1 sobre la actividad acetiltransferasa de Tip60 también tiene efecto sobre alguno de estos sustratos no cromatínicos como son ATM o p53.

3.4.1. VRK1 es fundamental para la acetilación de ATM mediada por Tip60 y su posterior activación en respuesta a daño génico

Los resultados descritos en el apartado 2.2.4. de esta tesis doctoral demostraban que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 no depende de ATM, siendo un paso previo en la DDR. Por otro lado, se sabe que ATM necesita ser acetilado por Tip60 en su lisina 3016 con el fin de posibilitar su posterior autofosforilación y activación (Sun et al., 2007). Teniendo en cuenta esto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 también es fundamental para la activación de ATM cuando se induce daño génico. Para ello, en primer lugar quisimos confirmar que ATM requiere de la acetilación de Tip60 para su posterior autofosforilación en la serina 1981. Así, se analizaron mediante inmunofluorescencia los niveles de ATM fosforilado en respuesta a daño tras la inhibición previa de Tip60 con MG149 (figura 43). Este experimento demuestra que la actividad acetiltransferasa de Tip60 era necesaria para la posterior autofosforilación de ATM. Sin embargo, la imposibilidad técnica de analizar los niveles de ATM acetilado mediante inmunofluorescencia impedía confirmar que esta pérdida de su capacidad autocatalítica estuviera directamente ligada a una reducción en sus niveles de acetilación. Por lo tanto, analizamos por *western blot* los niveles tanto de ATM acetilado como de ATM fosforilado sujetos al tratamiento con MG149 (figura 44). Tal y como se puede observar, la actividad de Tip60 en células no tratadas con MG149 condujo a una acetilación de ATM tras los primeros minutos de daño génico, a lo cual le seguía una posterior autofosforilación en el residuo 1981. Sin embargo, la inhibición de la acetiltransferasa con MG149 impedía tanto la fosforilación (confirmando los resultados observados por inmunofluorescencia) como la acetilación de ATM. Además, las cinéticas de acetilación y autofosforilación representadas en la parte B de la figura 44 confirmaban que la acetilación, disparada tras los primeros 15 minutos de daño, es previa a la autofosforilación, que muestra un incremento posterior en sus niveles.

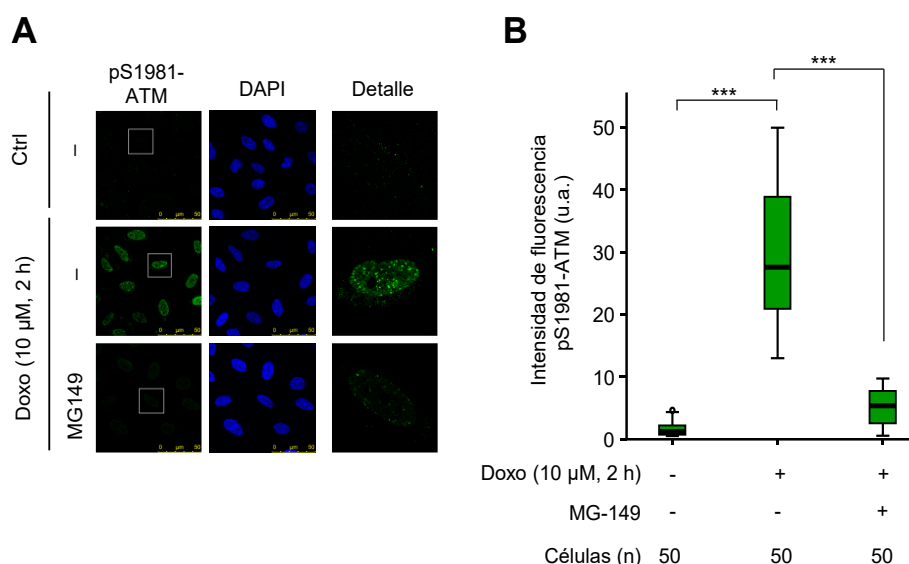


Figura 43. La inhibición de la actividad catalítica de Tip60 impide la autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico. **A.** Réplicas de A549 no tratadas o tratadas con el inhibidor de Tip60 MG149 (2 μM, 12 horas) se sometieron a un tratamiento con doxorubicina (10 μM) durante dos horas. Mediante inmunofluorescencia se analizó el grado de autofosforilación de ATM para dichas condiciones. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a la fosforilación de ATM en su serina 1981 para cada una de las condiciones estudiadas. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001.

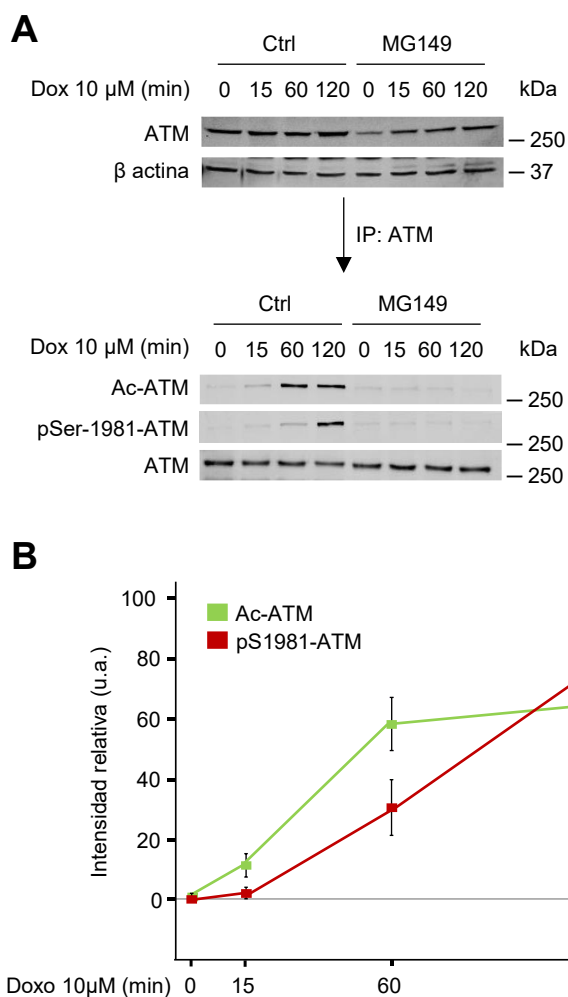


Figura 44. La acetilación de ATM es necesaria para su posterior autofosforilación en respuesta a daño génico. **A.** Réplicas de cultivos celulares de A549 a los que, alternativamente, se les trato con MG149 (2 μ M) durante 12 horas, se expusieron a diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina. Tras esto se analizó el grado de acetilación y autofosforilación de la quinasa a partir de inmunoprecipitados de ATM. **B.** Cinéticas de acetilación y autofosforilación de ATM obtenidas a partir de la cuantificación relativa de las intensidades de banda asociadas a cada una de estas modificaciones post-traduccionales con respecto a la proteína total.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el siguiente objetivo fue averiguar si, al igual que ocurría con la acetilación de la H4K16 (apartado 1.2. de resultados), VRK1 mimetiza el efecto de MG149 sobre la acetilación y fosforilación de ATM. Para ello, analizamos por inmunofluorescencia los niveles de fosforilación de ATM tras la inducción de daño génico en células A549 según fueran capaces o no de expresar VRK1. Este estudio muestra como el silenciamiento de VRK1 impedía el incremento en los niveles de pS1981-ATM en respuesta a doxorubicina que si se observa bajo las mismas condiciones de daño en aquellas células que expresaban la quinasa (figura 45).

Seguidamente, analizamos nuevamente por *western blot* la cinética de acetilación y fosforilación de ATM a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina, previo silenciamiento de VRK1 con dos ARNi diferentes (figura 46). Al igual que ocurría en células tratadas con MG149, el silenciamiento de VRK1 impedía no sólo la fosforilación, sino también la acetilación de ATM. De esta manera se concluyó que VRK1 es necesario para inducir ambas modificaciones post-traduccionales en ATM.

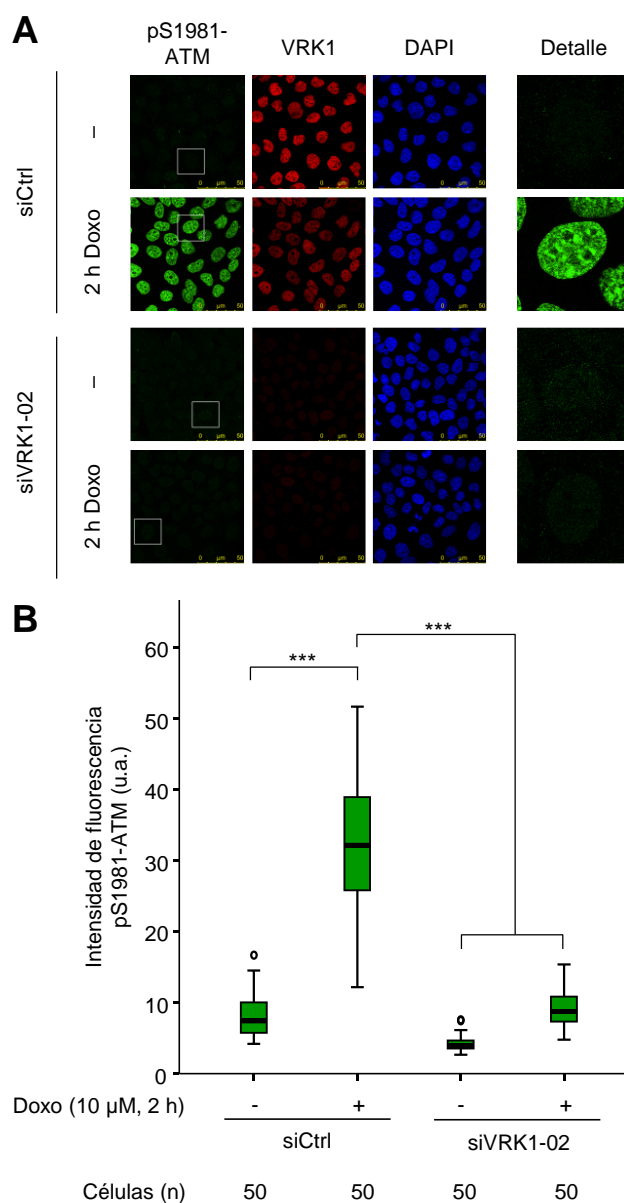


Figura 45. VRK1 es necesario para la fosforilación de ATM en respuesta a daño génico. **A.** Evaluación del grado de fosforilación de ATM en respuesta a doxorubicina (3 μM, 2 horas) en función del silenciamiento de VRK1 en células A549. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a la fosforilación de ATM para cada una de las condiciones estudiadas. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001.

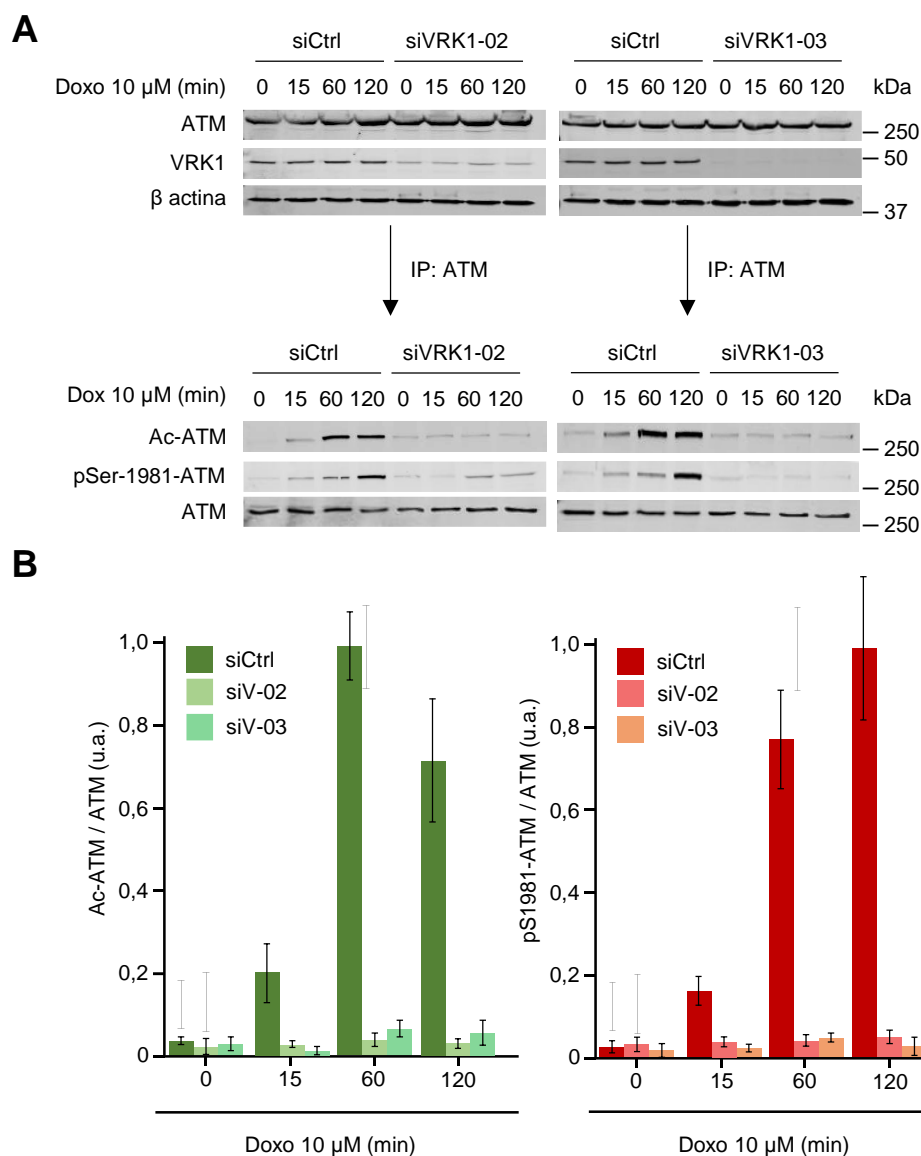


Figura 46. El silenciamiento de VRK1 impide la acetilación y posterior autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico. A. Evaluación del grado de acetilación y fosforilación de ATM en respuesta a doxorubicina (10 μM, 2 horas) en función del silenciamiento de VRK1 en células A549. **B.** Cuantificación de la intensidad relativa de acetilación (panel de la izquierda) e intensidad relativa de fosforilación (panel de la derecha) a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina en función del silenciamiento de VRK1.

Además, con el objetivo de asegurar que la acetilación de ATM mediada por Tip60 vía VRK1 es un paso previo e independiente a la propia autofosforilación de la quinasa, se estudiaron por *western blot* ambas modificaciones post-traduccionales en respuesta a daño génico, pero inhibiendo la actividad de ATM mediante el tratamiento de las células con el inhibidor específico KU55933 (figura 47). Tal y como era de esperar, este inhibidor imposibilitaba la autofosforilación de ATM en su residuo S1981, independientemente del silenciamiento de VRK1 en la célula. Por el contrario, ATM sí que se acetilaba en respuesta a daño génico cuando las células eran tratadas con KU55933. Ahora bien, al igual que lo observado en los experimentos previos, esta acetilación ocurría única y exclusivamente cuando VRK1 se expresaba normalmente y no cuando la expresión de esta quinasa era bloqueada mediante un ARNi. Por lo tanto, se confirmaba de nuevo que la acetilación de ATM en respuesta a daño génico, previa a su autofosforilación y activación, depende indirectamente de VRK1. Esto, junto con el hecho de que la fosforilación y posterior autoacetilación de Tip60 también dependen de esta quinasa, constituye un sustento de la hipótesis planteada por la cual VRK1 está modulando la actividad de Tip60 no sólo a nivel epigenético, sino también sobre sustratos no cromatínicos de la DDR.

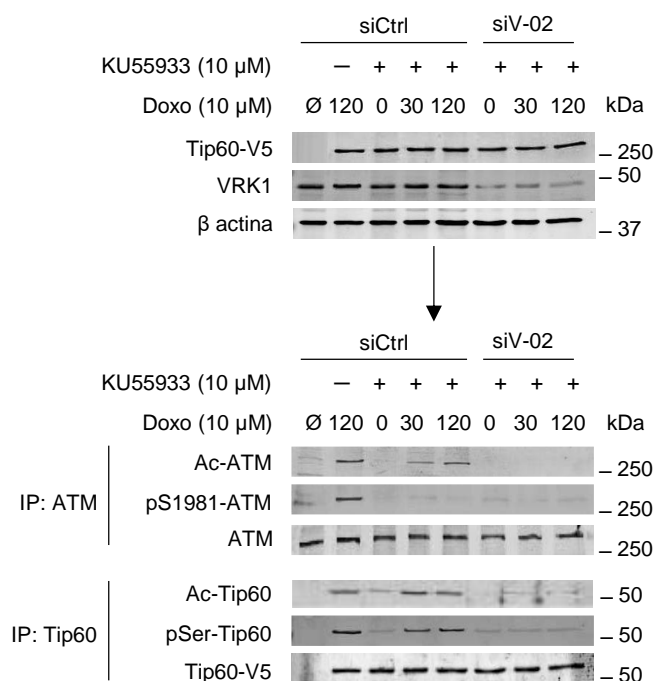
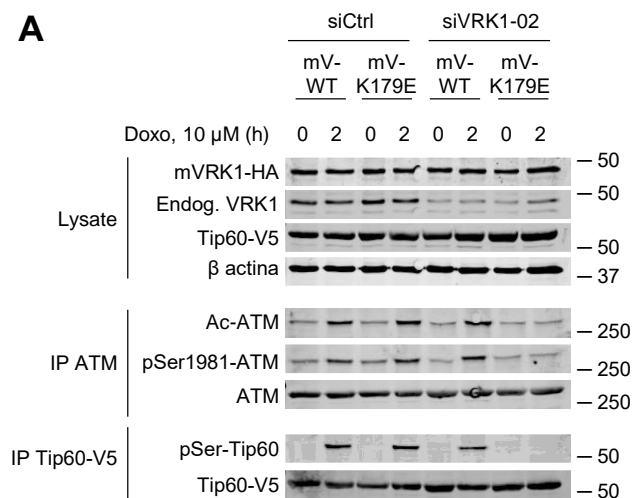


Figura 47. La acetilación de ATM mediada por Tip60 es previa e independiente a la autofosforilación de la quinasa. Análisis de la acetilación de ATM tras la inducción de daño génico (doxorubicina, 10 μ M) en células A549 transfectadas con siVRK1-02 y tratadas con el inhibidor KU55933 (10 μ M, 3 horas).

Tras los resultados obtenidos, quisimos asegurar que la acetilación y autofosforilación de ATM eran debidas a la propia actividad quinasa de VRK1 y no a otros aspectos de VRK1 independientes a dicha actividad catalítica. Para ello, se llevó a cabo un experimento de rescate de fenotipo mediante la utilización de las dos líneas estables de A549 que expresan bien mVRK1-WT o bien mVRK1-K179E. En primer lugar, se bloqueó la expresión del VRK1 humano endógeno en estas líneas celulares, de forma que la actividad enzimática asociada a esta quinasa dependiera únicamente de las variantes murinas. Posteriormente, ambas líneas celulares se trataron con doxorubicina y tanto mediante *western blot* (figura 48, A) como por inmunofluorescencia (figura 48, B y C) se analizaron los niveles de ATM acetilado y ATM fosforilado. De esta manera se determinó que la actividad catalítica de VRK1 es esencial para inducir el incremento en los niveles de acetilación y fosforilación de ATM tras la inducción de daño génico, pues la línea celular que expresa la variante mVRK1-K179E era incapaz de llevar a cabo estas modificaciones post-traduccionales sobre ATM al silenciar el VRK1 endógeno.



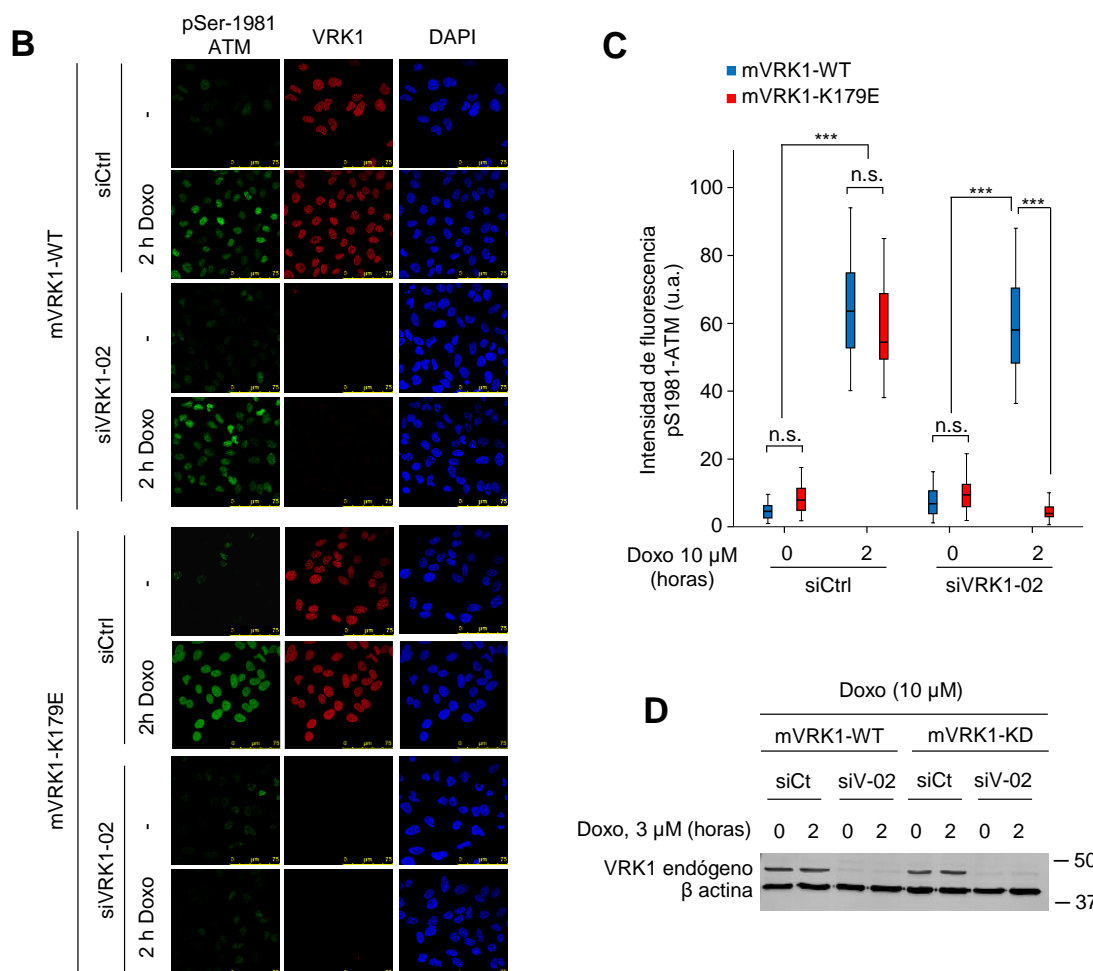


Figura 48. La acetilación y autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico dependen de la actividad quinasa de VRK1. A. Estudio de la acetilación y autofosforilación de ATM en respuesta a daño génico por doxorubicina (10 μM, 2 horas) en las líneas celulares A549-mVRK1 WT y A549-mVRK1 K179E. Como control de la actividad quinasa de VRK1 para cada una de las variantes, se inmunoprecipitó Tip60 de forma paralela a ATM y se analizó su grado de fosforilación en respuesta al daño génico. **B.** Análisis de inmunofluorescencia de la capacidad de autofosforilación de ATM en respuesta a doxorubicina 3 μM en las líneas celulares A549-mVRK1 WT y A549-mVRK1 K179E. **C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a la fosforilación de ATM para cada una de las condiciones estudiadas. La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001; n.s., p-valor > 0,05. **D.** Control de silenciamiento del VRK1 endógeno como consecuencia de la transfección de siVRK1-02 en las líneas celulares utilizadas.

En base a los resultados anteriores, quisimos confirmar que la acetilación y posterior autofosforilación de ATM dependientes de Tip60 y VRK1 son esenciales para que la PIKK ejerza su función quinasa durante la DDR. Uno de los sustratos directos de ATM es Chk2, quinasa a la que fosforila en su treonina 68 para posibilitar su posterior activación. Una vez fosforilada, Chk2 amplifica la respuesta al daño génico al fosforilar numerosos sustratos como las fosfatasa Cdc25 o el factor de transcripción p53. Teniendo en cuenta esto, células A549 se transfectaron con un siControl o con siVRK1-02. Posteriormente, previa inducción de daño génico con doxorubicina, se analizaron mediante *western blot* los niveles de fosforilación de Chk2 en su treonina 68 (figura 49, parte A). De esta manera observamos que Chk2 únicamente es fosforilado por ATM en respuesta a daño cuando VRK1 está presente en la célula. Además, de igual manera que lo ocurrido con el silenciamiento de VRK1, el tratamiento de las células con el inhibidor de Tip60 MG149, también bloqueaba la fosforilación de Chk2 mediada por ATM (figura 49, parte B). Esto demuestra que las modificaciones post-traduccionales de ATM mediadas por VRK1 y Tip60 (acetilación y autofosforilación) son imprescindibles para la activación de la quinasa y el desempeño de sus funciones durante la DDR.

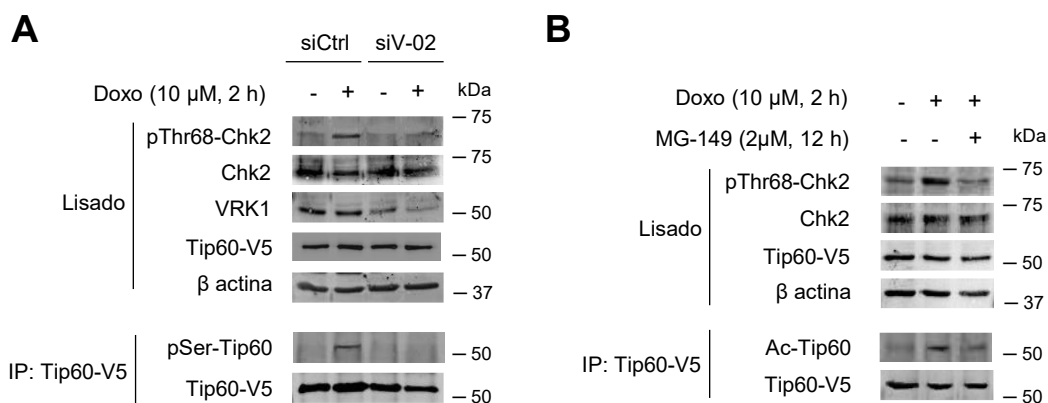


Figura 49. La fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 es necesaria para la fosforilación de sustratos de ATM durante la DDR. **A.** Estudio de la fosforilación de Chk2 en respuesta a doxorubicina (10 μ M, 2 horas) en función de la expresión génica de VRK1 en células A549 transfectadas con siCtrl o siVRK1-02. De forma paralela, se analizó la fosforilación de Tip60 a partir de un inmunoprecipitado de la proteína como control de la actividad catalítica de VRK1. **B.** Análisis de la fosforilación de Chk2 en respuesta a daño génico en células A549 con Tip60 inactivada como consecuencia del tratamiento con el inhibidor MG149 (2 μ M, 12 horas). En este caso, se analizó de forma paralela la autoacetilación de Tip60 como control de la eficacia del inhibidor MG149.

Por último, con el fin de asegurar que la actividad catalítica de VRK1 es necesaria para la actividad de ATM durante la DDR, se llevó a cabo un estudio de rescate de fenotipo de la fosforilación de Chk2 en su treonina 68. Así, utilizando las líneas A549 estables descritas en otros experimentos de rescate de fenotipo de esta tesis (mVRK1-WT y mVRK1-K179E), observamos que, al silenciar el VRK1 endógeno, la línea que expresa la variante *wild type* murina de VRK1 era capaz de rescatar la fosforilación de Chk2 mediada por ATM, mientras que la variante catalíticamente inactiva no posibilitaba dicha fosforilación en respuesta a daño génico (figura 50). De esta manera confirmamos que el proceso de activación de ATM y fosforilación de sus sustratos a lo largo de la DDR requiere de la actividad quinasa de VRK1.

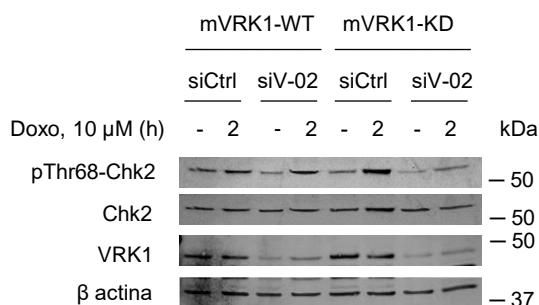


Figura 50. La actividad quinasa de VRK1 es necesaria para la función de ATM durante la DDR. Estudio de la fosforilación de Chk2, sustrato de ATM, en respuesta a daño en función de la actividad quinasa de VRK1. Para ello, se utilizaron dos líneas celulares de A549 diferentes: A549-mVRK1 WT y A549-mVRK1 K179E, previamente transfectadas con siVRK1-02 para bloquear la expresión del VRK1 endógeno y analizar exclusivamente el efecto de cada una de las variantes murinas de la quinasa.

3.4.2. La quinasa VRK1 no es necesaria para la acetilación de p53 mediada por Tip60 durante la respuesta al daño génico

Junto con ATM, el factor de transcripción p53 es otro de los sustratos de Tip60 durante la DDR, al cual acetila en su lisina 120 (Sykes et al., 2006). Teniendo en cuenta esto, quisimos determinar si VRK1 también está implicado en regular la acetilación de p53 mediada por Tip60.

En primer lugar, realizamos un experimento confirmatorio de que Tip60 es responsable de la acetilación de p53 en la lisina 120 tras la inducción de daño génico. Para ello, células A549 privadas de suero fueron tratadas con MG149, el inhibidor de Tip60, durante 12 horas. Además, transcurridas 10 horas de tratamiento con MG149, tanto las células sujetas a este tratamiento como las células control no tratadas, se incubaron con doxorubicina a lo largo de las 2 horas restantes. Posteriormente, se analizó mediante *western blot* los niveles de acetilación de p53 en la lisina 120 para ambas condiciones (figura 51, parte A). Tal y como se puede observar, el hecho de que el tratamiento con MG149 imposibilite la acetilación de p53 confirman la necesidad de Tip60 para llevar a cabo dicha modificación post-traducciona. A continuación, centramos el objetivo en determinar el papel de VRK1 en esta acetilación de p53 dependiente de Tip60. Así, silenciamos VRK1 en A549 y comparamos mediante *western blot* los niveles de acetilación de p53 en estas células respecto a aquellas en las que VRK1 no había sido silenciado. Se observó que p53 es acetilado por Tip60 en respuesta a daño independientemente de si la expresión de VRK1 ha sido bloqueada (figura 51, B). Por lo tanto, a diferencia de lo ocurrido sobre otros sustratos de Tip60 tales como la H4K16 o ATM, VRK1 no es necesario para la acetilación de p53 en su lisina 120.

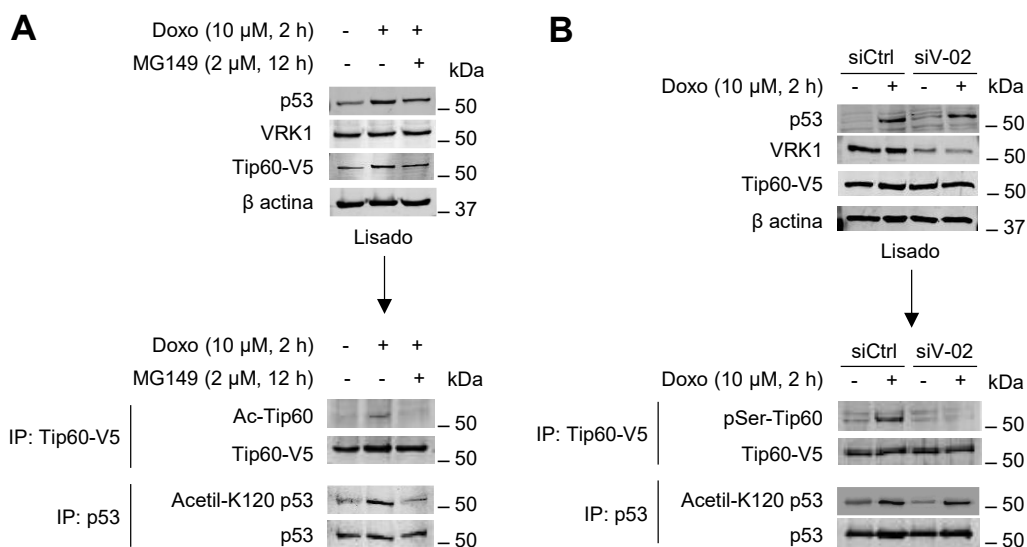


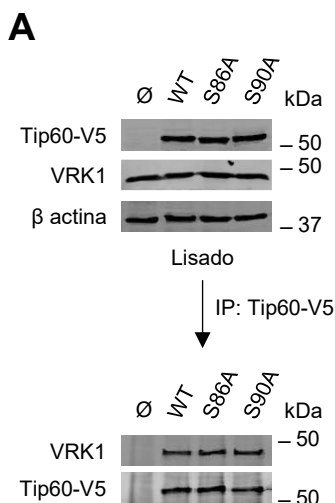
Figura 51. VRK1 no interfiere en la acetilación de p53 mediada por Tip60 durante la respuesta al daño génico. A. Tip60 es responsable de acetilar la lisina 120 de p53 en respuesta a daño génico. Se indujo daño génico con doxorubicina (10 μ M, 2 horas) en células A549 previamente tratadas con el inhibidor MG149 (2 μ M, 12 horas). A partir del inmunoprecipitado de p53, se analizó el grado de acetilación de la proteína tanto en células con Tip60 activo como en células tratadas con MG149. La acetilación de Tip60 analizada a partir de un inmunoprecipitado independiente de la proteína se utilizó como control de eficacia del inhibidor MG149. **B.** Análisis de la acetilación de p53 en respuesta a doxorubicina (10 μ M, 2 horas) en función de la expresión génica de VRK1 en células A549 transfectadas con siCtrl o siVRK1-02. De forma paralela, se analizó la fosforilación de Tip60 a partir de un inmunoprecipitado de la proteína como control de la actividad catalítica de VRK1.

4. IDENTIFICACIÓN DEL RESIDUO DE TIP60 FOSFORILADO POR VRK1 EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

En el apartado 2 de resultados de esta tesis doctoral se ha demostrado que VRK1 fosforila a Tip60 tras los primeros minutos de la aparición de daño génico en la célula. Sin embargo, la detección, mediante *western blot*, de esta modificación post-traducciona en Tip60 se realizó a partir del inmunoprecipitado de la acetiltransferasa utilizando un anticuerpo genérico capaz de detectar cualquier serina o treonina fosforilada. Por lo tanto, el residuo (o residuos) diana específico de Tip60 que es fosforilado por VRK1 en respuesta a daño no pudo ser determinado en los experimentos anteriores. Teniendo en cuenta esto, nuestro siguiente objetivo fue identificar el residuo de fosforilación de Tip60 dependiente de VRK1.

4.1. VRK1 NO FOSFORILA A LA SERINA 86 NI A LA SERINA 90 DE TIP60 EN EL CONTEXTO DEL DAÑO GÉNICO BAJO LAS CONDICIONES ESTABLECIDAS

Dos de los sitios de fosforilación de Tip60 mejor caracterizados son la serina 86 y la serina 90. A pesar de que se han descrito quinasas específicas capaces de fosforilar ambos residuos, nos planteamos la posibilidad de que VRK1 también pudiera llevar a cabo esta modificación post-traducciona sobre alguno de estos dos residuos en el contexto del daño génico. Para verificar esto utilizamos, además de la versión *wild type* de Tip60, dos mutantes diferentes, expresados en las células mediante la transfección del plásmido correspondiente: pcDNA3.1/V5-His Tip60-S86A, que expresa un mutante de Tip60 en el que la serina 86 está sustituida por alanina (no fosforilable) y pcDNA3.1/V5-His Tip60-S90A, en el que la serina 90 está sustituida por alanina. Teniendo en cuenta esto, en primer lugar quisimos averiguar si el complejo basal formado por VRK1 y Tip60 se veía alterado cuando alguna de estas serinas estaba mutada. Así, se inmunoprecipitó el mutante de Tip60 correspondiente y se analizó mediante *western blot* la presencia de VRK1 en el inmunoprecipitado. Los resultados mostrados en la parte A de la figura 52 indican que la interacción de VRK1 con Tip60 no se ve afectada en ausencia de daño cuando la serina 86 o la serina 90 de la acetiltransferasa están sustituidas por alaninas. Seguidamente, analizamos de la misma manera dicha interacción en el contexto de daño génico. Para ello, previo a la inmunoprecipitación de los mutantes de Tip60, las células se trataron con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos. Tal y como ocurría con Tip60-WT, la interacción entre VRK1 y Tip60-S86A o Tip60-S90A aumentaba ligeramente tras los primeros minutos de daño para posteriormente volver a disminuir hasta niveles basales (figura 52, parte B).



B

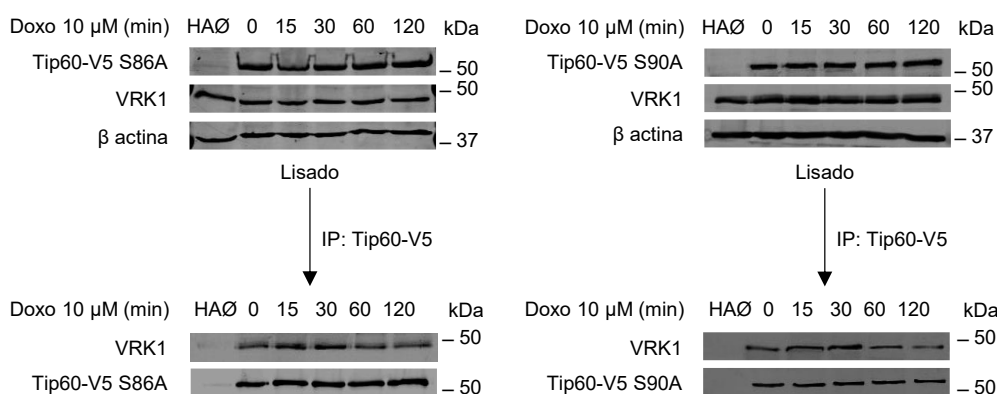


Figura 52. Mutantes de Tip60 no fosforilables en la S86 o S90 mantienen la interacción con VRK1 de forma idéntica a Tip60 wild type. A. VRK1 forma complejos basales con los mutantes de Tip60 S86A y S90A transfectados en células A549, al igual que con Tip60 wild type. B. Células A549 transfectadas con los mutantes de Tip60 S86A (izquierda) o S90A (derecha) fueron tratadas con doxorubicina 10 µM a lo largo de diferentes tiempos para analizar mediante western blot la interacción de los mismos con VRK1 a lo largo de la respuesta a daño génico.

Una vez concluido que la formación y las dinámicas del complejo VRK1-Tip60 no dependen de las serinas 86 y 90 de la acetiltransferasa, quisimos averiguar si VRK1 era capaz de fosforilar a los mutantes no fosforilables para estos residuos. Para ello, en primer lugar se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* utilizando proteínas purificadas. El análisis de la fosforilación, a través de un anticuerpo dirigido a residuos de serina fosforilados, muestra que los mutantes de Tip60 S86A, S90A y S86/90A son fosforilados *in vitro* por VRK1 en proporciones similares a Tip60 wild type (figura 53). A continuación, quisimos estudiar si esta fosforilación también tenía lugar *in vivo* como respuesta a daño génico por parte de las células. Así, los diferentes mutantes de Tip60 se transfectaron en células A549 que posteriormente eran tratadas con doxorubicina. Las variantes de Tip60 se inmunoprecipitaron y se analizó el grado de fosforilación de cada una de ellas mediante western blot. Los resultados representados en la figura 54 (parte A) muestran que cada uno de los mutantes no fosforilables de Tip60 para la S86 o S90 son igualmente fosforilados en respuesta a daño. Esto indica que la acetiltransferasa está siendo fosforilada en otro residuo diferente. Finalmente, para confirmar que la fosforilación detectada en estos mutantes depende de VRK1, se realizó un nuevo estudio de fosforilación *in vivo* en respuesta a doxorubicina previo silenciamiento de la quinasa mediante un ARNi específico (figura 54, parte B). Tal y como ocurre con Tip60-WT, la fosforilación de los mutantes de Tip60 estudiados se perdía cuando VRK1 era silenciado. Teniendo en cuenta todo esto, concluimos que VRK1 no fosforila a la serina 86 ni a la serina 90 de Tip60 durante la respuesta al daño génico.

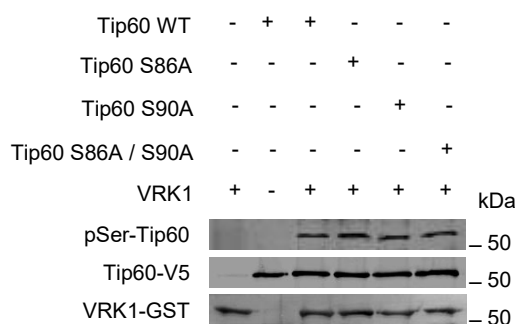


Figura 53. Fosforilación *in vitro* de mutantes S86A y S90A de Tip60 por VRK1. Diferentes variantes de Tip60, previamente purificadas, fueron incubadas con VRK1-GST bajo condiciones promotoras de la fosforilación (presencia de ATP a 37°C durante 1 hora). Tras la incubación, se analizó el grado de fosforilación de cada una de las variantes por western blot.

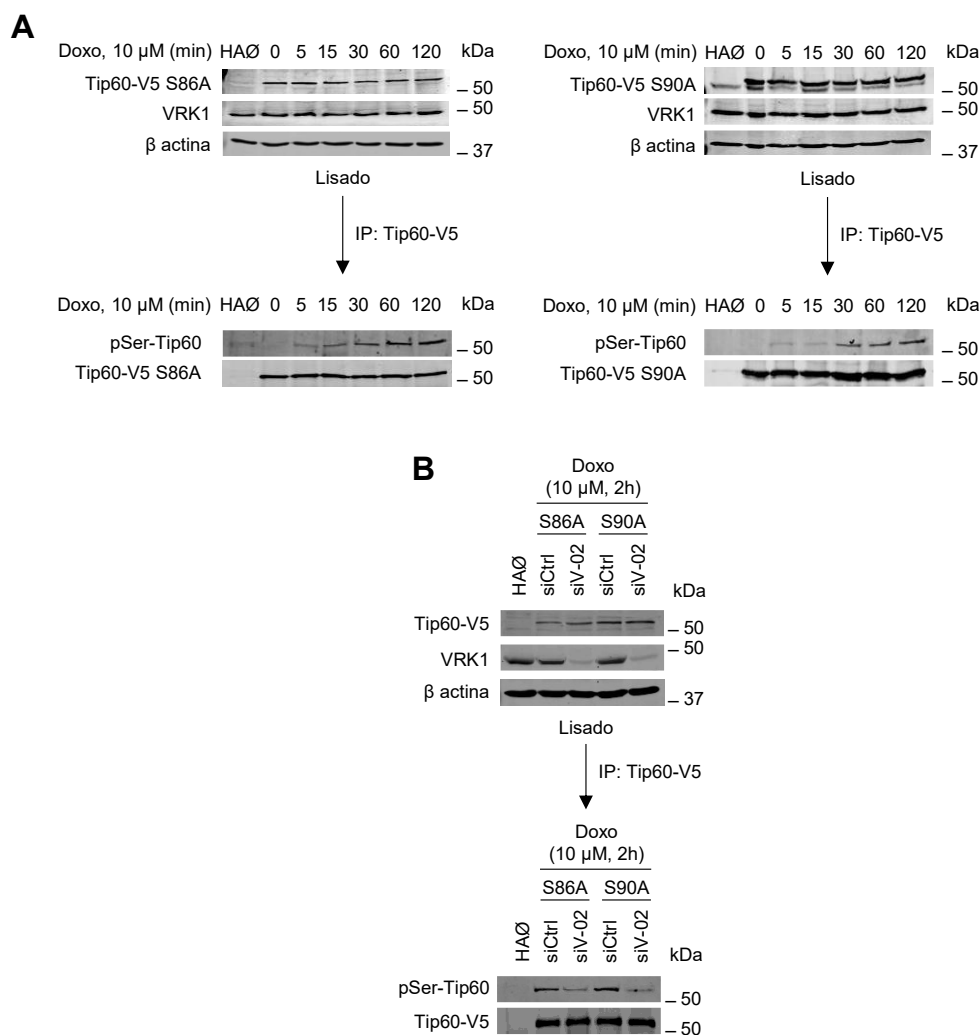


Figura 54. Fosforilación *in vivo* de mutantes S86A y S90A de Tip60 por VRK1. A. Células A549 transfectadas con Tip60-V5 S86A o Tip60-V5 S90A y cultivadas en ausencia de suero fueron tratadas con doxorubicina 10 μ M a lo largo de diferentes tiempos para, posteriormente, analizar mediante western blot la capacidad celular para fosforilar cada uno de los mutantes durante la DDR. **B.** Estudio del efecto del silenciamiento de VRK1 en células A549 sobre la fosforilación de los mutantes de Tip60 S86A y S90A en respuesta a daño génico.

4.2. LAS SERINAS 155, 190 Y 199 Y LA TREONINA 158 DE TIP60 SON RESIDUOS CANDIDATOS A SER FOSFORILADOS POR VRK1

Una vez descartadas las serinas 86 y 90 de Tip60 como dianas de fosforilación de VRK1, nuestro siguiente objetivo fue identificar otros residuos de la acetiltransferasa que son candidatos a ser fosforilados por una caseína quinasa en general y por VRK1 en particular. Para ello, en primer lugar realizamos una aproximación *in silico* que nos permitiera acotar los posibles candidatos utilizando la herramienta bioinformática *NetPhos 3.1*. En la tabla 12 se muestran, de entre todos los residuos de Tip60, aquellos con mayor susceptibilidad a ser fosforilados por miembros de la familia de las caseína quinasa I de acuerdo con el algoritmo del programa. Entre ellos, la S86 fue descartada, gracias a los experimentos del apartado anterior, como residuo diana de VRK1. Para el resto de candidatos se realizó una segunda criba utilizando la herramienta bioinformática *Phosphosite plus*, que, a diferencia del programa anterior, muestra una puntuación para residuos fosforilables en base a experimentos de espectrometría de masas (HTP) y otras técnicas de identificación de péptidos fosforilados menos eficientes (LTP), centrando el interés, por lo tanto, en fosforilaciones que realmente ocurren en la naturaleza. De esta manera, tal y como se muestra en la tabla 13, de entre todos los residuos identificados anteriormente, únicamente los residuos S155, T158, S190 y S199 obtuvieron una valoración adecuada como candidatos a ser fosforilados.

Tabla 12. Puntuaciones (scores) asignadas por la herramienta bioinformática NetPhos 3.1. a los diferentes residuos de Tip60 candidatos a ser fosforilados en base a un algoritmo propio por algún miembro de la familia de las caseína quinasa 1, dentro de la cual se incluyen los miembros de la subfamilia VRK.

Residuos de Tip60 candidatos a ser fosforilados por CKI según el programa Netphos 3.1.	
Residuo	Score
Serina 86	0,491
Serina 155	0,375
Treonina 158	0,369
Serina 168	0,367
Serina 190	0,360
Treonina 195	0,369
Serina 199	0,545
Serina 202	0,596
Serina 218	0,445
Serina 221	0,490
Treonina 342	0,471
Serina 393	0,524
Serina 445	0,592

Tabla 13. Puntuaciones HTP y LTP asignadas por la herramienta bioinformática Phosphosite plus a diferentes residuos de Tip60 cuya fosforilación *in vivo* ha sido identificada a partir de diferentes técnicas. En base a esto, la valoración HTP asigna un punto por cada estudio que ha identificado fosforilación en el residuo correspondiente a través de espectrometría de masas, mientras que la valoración LTP establece se basa en la identificación de la fosforilación del residuo por técnicas menos precisas como western blot.

Residuos de Tip60 candidatos a ser fosforilados por VRK1 según el programa Phosphosite plus		
Residuo	HTP Score	LTP Score
Serina 155	10	0
Treonina 158	6	2
Serina 190	14	0
Serina 199	26	0

En base a estos resultados, los 4 residuos mencionados se seleccionaron como posibles candidatos a constituir el/los sitio/s de Tip60 fosforilado/s por VRK1. Así, se decidió generar mediante mutagénesis dirigida mutantes no fosforilables (el residuo específico sustituido por alanina) para cada uno de los residuos S155, T158, S190 y S199. Una vez realizada la mutagénesis y corroborado el éxito de la misma mediante secuenciación, se procedió a analizar la eficiencia de expresión de cada uno de estos mutantes transfecando células A549 (figura 55). Tal y como se puede observar, la expresión de los mutantes es eficiente para dosis de transfección bajas (1-2 µg). Cabe destacar, a modo de excepción, el mutante T158A, cuya expresión bajo esas cantidades no es eficiente, siendo necesario transfectar hasta 8 µg del plásmido correspondiente para lograr obtener niveles proteicos adecuados en el *western blot*.

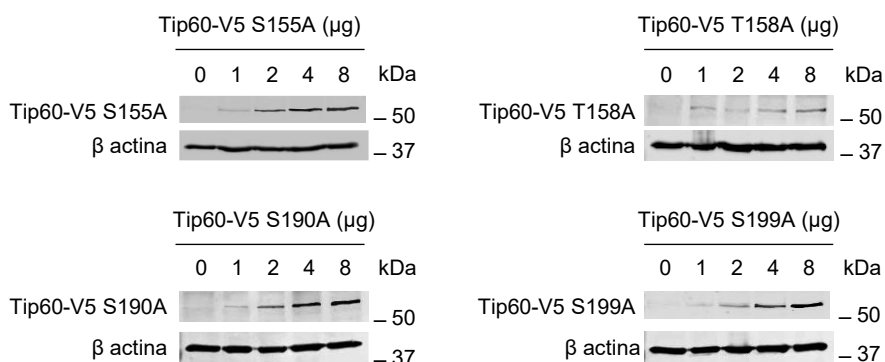


Figura 55. Análisis de expresión de los mutantes de Tip60 S155A, T158A, S190A y S199A generados por mutagénesis dirigida y transfectados en células A549 a diferentes dosis crecientes (0, 1, 2, 4 y 8 µg).

4.3. LOS MUTANTES DE TIP60 T158A Y S199A NO SE FOSFORILAN TRAS DOS HORAS DE INDUCCIÓN DE DAÑO GÉNICO CON DOXORRUBICINA

Una vez generados los mutantes no fosforilables de Tip60 para los 4 residuos candidatos, decidimos analizar el nivel de fosforilación de cada uno de ellos en respuesta a daño génico. Así, en primer lugar se privó de suero a células A549. Posteriormente, se transfectaron los plásmidos correspondientes y las células se trataron con doxorubicina a lo largo de dos horas. En la figura 56 se muestra como los mutantes Tip60-S155A y Tip60-S190A, además de los mutantes Tip60-S86A y Tip60-S90A estudiados anteriormente y el Tip60-WT (a modo de control), se fosforilan en respuesta al daño génico inducido por la doxorubicina. Por lo tanto, dado que la fosforilación en estos mutantes sigue teniendo lugar, los residuos modificados en cada uno de éstos (S86, S90, S155 y S190, respectivamente) no constituyen la diana de fosforilación. Por el contrario, los mutantes de Tip60 T158A y S199A no se fosforilaban tras la inducción de daño. La interpretación de este resultado sugiere que los residuos no mutados correspondientes (treonina 158 y serina 199) se fosforilan en respuesta a daño génico y que dichas fosforilaciones son, de alguna manera, dependientes la una de la otra, pues en caso contrario deberíamos ser capaces de detectar la fosforilación asociada al residuo no modificado en los respectivos mutantes (la fosforilación de la S199 en el mutante T158A y la fosforilación de la T158 en el caso del mutante S199A).

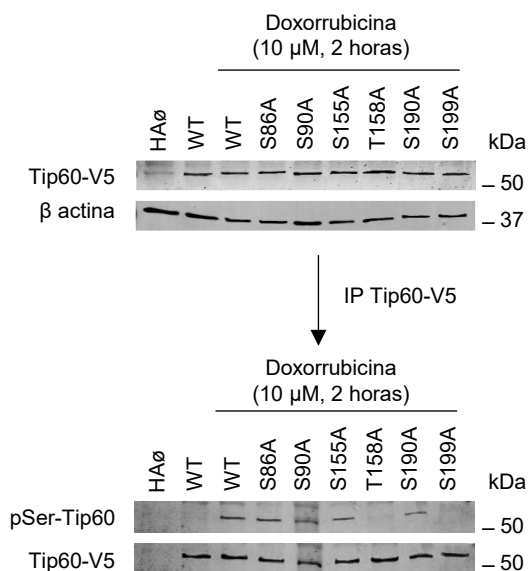


Figura 56. Análisis de la fosforilación de diferentes mutantes de Tip60 en respuesta a daño génico. Mutantes no fosforilables de Tip60 se transfectaron en células A549 privadas de suero que, 48 horas post-transfección, se trataron con doxorubicina (10 µM, 2 horas). Posteriormente, se analizó el grado de fosforilación de cada mutante a partir del inmunoprecipitado correspondiente.

4.4. LA TREONINA 158 Y LA SERINA 199 SON LOS ÚNICOS RESIDUOS DE TIP60 FOSFORILADOS EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

Llegados a este punto, confirmamos que Tip60 no se fosforila en un único residuo tras la inducción de daño génico. A pesar de que la T158 y la S199 se fosforilan bajo estas condiciones de daño y que ambas fosforilaciones parecen ser dependientes, los resultados anteriores no esclarecen si existe algún residuo más que pueda ser fosforilado, también de manera dependiente, durante la respuesta al daño génico. Por ello, decidimos generar, mediante mutagénesis dirigida, mutantes fosfomiméticos para ambos residuos, en los cuales el residuo en cuestión es sustituido por ácido aspártico, mimetizando la carga negativa propia de la fosforilación (T158D y S199D). Del mismo modo, generamos las 4 combinaciones posibles de mutantes dobles para estos residuos (T158A/S199D, T158D/S199A, T158D/S199D y T158A/S199A). Una vez confirmadas las dosis óptimas de expresión de cada uno de estos mutantes (figura 57), se estudió la capacidad de cada uno de ellos para ser fosforilado *in vivo* tras el tratamiento de células A549 con doxorubicina. Tal y como se puede observar en la figura 58, cada uno de los mutantes simples fosfomiméticos (T158D y S199D) recuperan la fosforilación de Tip60 que se perdía en los respectivos mutantes no fosforilables (T158A y S199A). Esto apoya la hipótesis de que ambos residuos, la T158 y la S199, se fosforilan en respuesta a daño, aunque no descarta la existencia de otros residuos de Tip60 también fosforilados bajo estas circunstancias. Sin embargo, el estudio de fosforilación de los dobles mutantes (figura 59) reveló una pérdida total de fosforilación en cada uno de ellos en respuesta a daño génico. De esta manera queda confirmado que la T158 y la S199 son los únicos residuos fosforilables por Tip60 en respuesta a daño génico bajo las condiciones establecidas, pues en caso contrario, debería detectarse la fosforilación del/los residuo/s no mutados en cada uno de estos dobles mutantes.

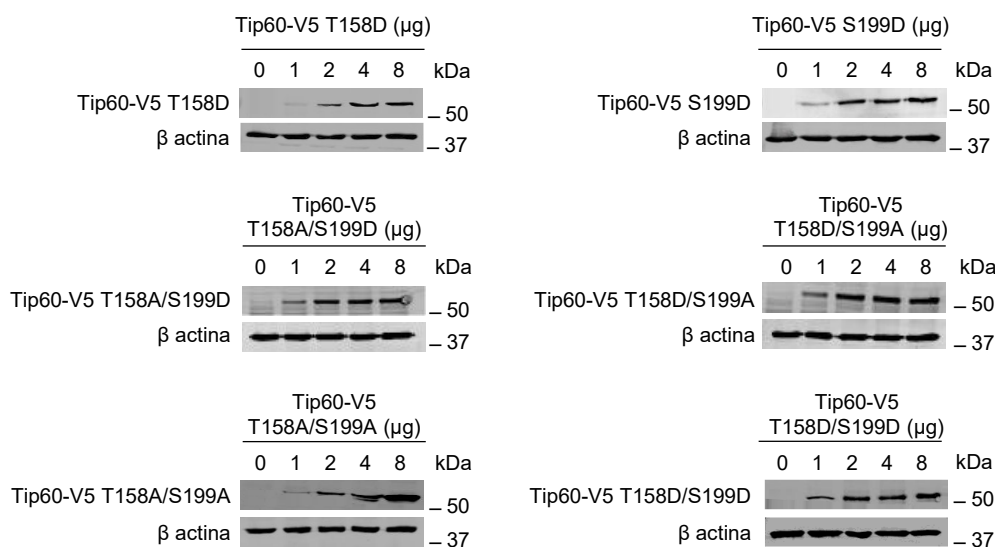


Figura 57. Análisis de expresión de los mutantes simples de Tip60 T158D y S199D y los dobles mutantes T158A/S199D, T158D/S199A, T158A/S199A y T158D/S199D generados por mutagénesis dirigida y transfectados en células A549 a diferentes dosis (0, 1, 2, 4 y 8 µg).

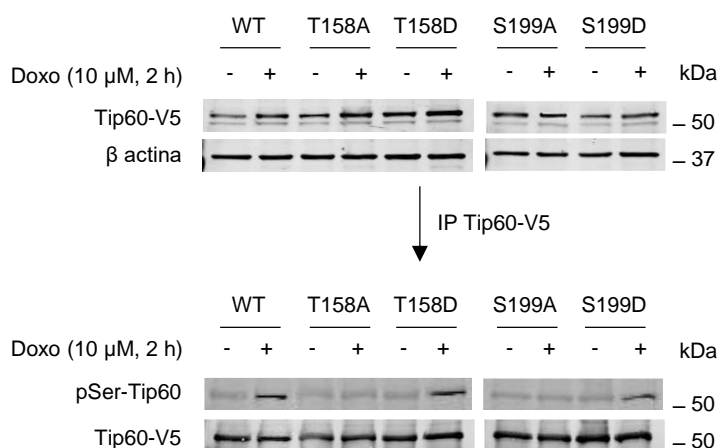


Figura 58. Análisis de la fosforilación de mutantes de Tip60 para los residuos T158 y S199. Mutantes no fosforilables (alanina) y mutantes fosfomiméticos (aspártico) de Tip60 fueron transfectados en células A549 y tratadas con doxorubicina (10 µM, 2 horas). Posteriormente, a partir del inmunoprecipitado de los mutantes, se analizó mediante western blot su grado de fosforilación.

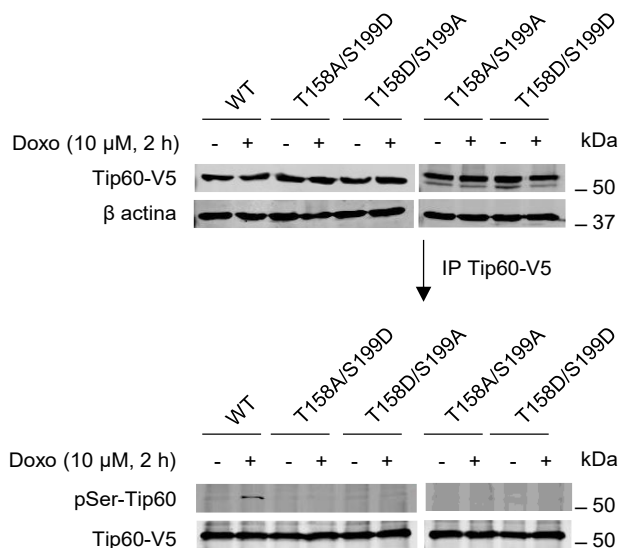


Figura 59. Estudio de la fosforilación en dobles mutantes de Tip60. Los cuatro mutantes dobles para los residuos T158 y S199 de Tip60 se transfectoron en células A549 que, 48 horas de post-transfección, fueron tratadas con doxorubicina (10 μ M, 2 horas). Después, las células se lisaron y los diferentes mutantes se inmunoprecipitaron a partir de los extractos correspondientes. Finalmente, se analizó el grado de fosforilación de cada uno de los mutantes bajo las condiciones establecidas.

4.5. LA FOSFORILACIÓN EN LA T158 DE TIP60 ES PREVIA A LA FOSFORILACIÓN DE LA S199 DURANTE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO

Dado que las dos fosforilaciones identificadas parecían ser mutuamente dependientes, nuestro siguiente objetivo fue caracterizar las cinéticas de fosforilación de Tip60 para los residuos correspondientes (T158 y S199) y tratar de aportar así una primera aproximación al mecanismo que permitiera explicar este fenómeno. Para ello, utilizamos los mutantes fosfomiméticos correspondientes (T158D y S199D). De esta forma, una de las dos fosforilaciones de Tip60 queda mimetizada por el residuo de aspártico y la señal de fosforilación detectada por *western blot* en respuesta a daño correspondería únicamente a la del residuo no modificado. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 60. Como se puede observar, para el mutante T158D, la señal de fosforilación, que corresponde por lo tanto a aquella ocurrida en la S199, aumenta progresivamente a medida que el tiempo de tratamiento con doxorubicina también aumenta. Por el contrario, la fosforilación en el mutante S199D, asociada al residuo T158, no aumenta de forma proporcional al tiempo de tratamiento; en este caso, la fosforilación aumenta significativamente tras los primeros minutos de tratamiento (5-15 minutos) para posteriormente ir disminuyendo progresivamente hasta que la señal desaparece en la tercera hora de daño con doxorubicina. Con estos resultados concluimos que la T158 es el primer residuo de Tip60 en ser fosforilado, seguido de una posterior fosforilación de la S199.

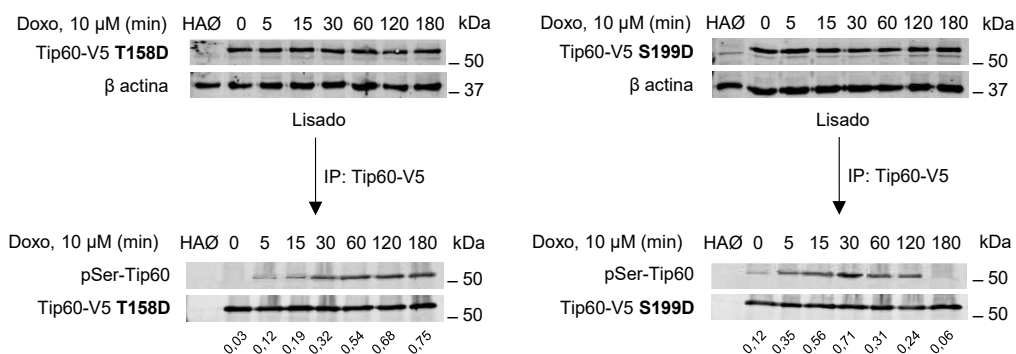


Figura 60. Análisis de la fosforilación de los residuos T158 y S199 de Tip60 a lo largo del tiempo durante la DDR. Cinéticas de fosforilación de los mutantes T158D y S199D en respuesta al tratamiento con doxorubicina en células A549. La cuantificación relativa de los niveles de fosforilación para cada uno de los tiempos establecidos aparece indicada debajo de los western blots.

4.6. LA FOSFORILACIÓN DE TIP60 EN SU RESIDUO S199 ES DEPENDIENTE DE LA FOSFORILACIÓN PREVIA EN LA T158 PERO NO VICEVERSA

En base a lo descrito anteriormente, los mutantes no fosforilables en los que la T158 o la S199 son sustituidas por alanina parecen imposibilitar la fosforilación del residuo alternativo no modificado. Estos estudios de fosforilación se realizaron a tiempos fijos de dos horas de tratamiento con doxorrubicina. Sin embargo, en el apartado anterior (figura 60), hemos observado que en el caso del mutante Tip60-S199D, la fosforilación en la T158, que tiene lugar tras los primeros minutos de inducción del daño, prácticamente desaparece para estos tiempos más largos de tratamiento. Debido a esto, decidimos estudiar las cinéticas de fosforilación para los mutantes T158A y S199A a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento ante la posibilidad de que dicha fosforilación no sea detectable tras dos horas de tratamiento, pero si lo sea anterior o posteriormente. Tal y como se puede observar en la figura 61, el mutante T158A, en contraposición a su mutante antagonista T158D, no experimenta ninguna fosforilación a lo largo de los tiempos estudiados. Por el contrario, el mutante S199A, para el cual no se detectó fosforilación en los experimentos previos con 2 horas de tratamiento, sí se fosforila tras los primeros minutos de daño génico. Por lo tanto, la hipótesis inicial de que ambas fosforilaciones son mutuamente dependientes quedaba descartada y se concluía que la fosforilación en la T158 ocurre en primer lugar y de forma independiente a cualquier otra fosforilación, mientras que aquella ocurrida en la S199 constituye una modificación posterior y dependiente de la fosforilación previa en la T158. Ahora bien, cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurría con el mutante S199D en el que la fosforilación en la T158 era detectable tras dos horas de tratamiento, dicha fosforilación se mantiene mucho menos en el tiempo a lo largo de la DDR para el mutante S199A.

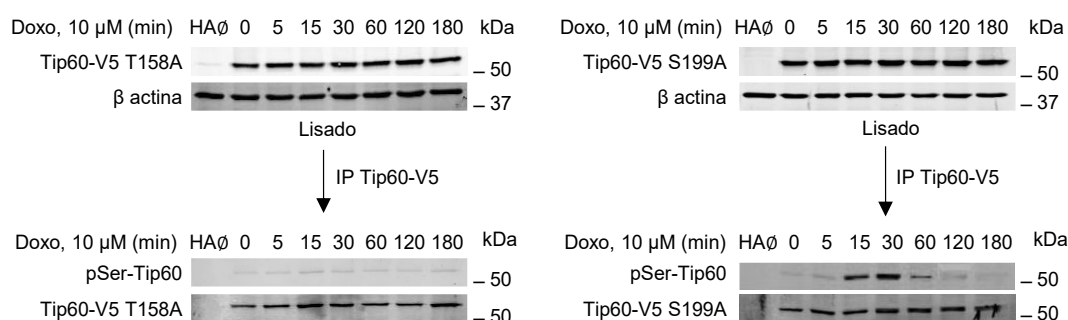


Figura 61. Estudio de la interdependencia existente entre las fosforilaciones de los residuos T158 y S199 de Tip60 durante la DDR. Células A549 transfectadas con el mutante T158A (izquierda) o S199A (derecha) de Tip60 fueron sometidas a diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina (10 μ M). Después, a partir del inmunoprecipitado de cada uno de los mutantes, se estudió si existe fosforilación en el residuo no mutado cuando la fosforilación en el residuo sobre el que recae la mutación está imposibilitada.

4.7. VRK1 FOSFORILA A TIP60 EN LA T158 PERO NO EN LA S199 DURANTE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO

Una vez identificados los residuos de fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico y habiendo determinado previamente que VRK1 es fundamental para la fosforilación de Tip60 en este contexto, decidimos estudiar cual/es de los residuos identificados constituye realmente una diana de VRK1. Para ello, analizamos la fosforilación de los diferentes mutantes fosfomiméticos y no fosforilables generados para los residuos T158 y S199 en células A549 en las que, previamente a la inducción de daño, se ha silenciado VRK1 mediante ARNi específicos (figura 62). Cabe destacar que el tiempo de tratamiento con doxorrubicina (10 μ M) empleado en este experimento fue de 30 minutos, ya que, de acuerdo con las cinéticas de fosforilación de los diferentes mutantes previamente analizadas (figuras 60 y 61), es el tiempo en el que la fosforilación en ambos residuos (T158 y S199) confluye y es detectable mediante *western blot*. Los resultados muestran, tal y como era de esperar, como el mutante de Tip60 T158A, que no se fosforilaba en ningún caso en presencia de VRK1, tampoco se fosforila en ausencia de la quinasa. Por su parte, el mutante fosfomimético para la T158 (Tip60-T158D), el cual sí era fosforilado en respuesta a daño, mantiene sus niveles de fosforilación tras el silenciamiento de la quinasa. Esto indica que la fosforilación en la S199, residuo al cual está asociada la señal de fosforilación en este mutante, no es llevada a cabo por VRK1. Por otro lado, los mutantes de Tip60 S199A y S199D, ambos fosforilados tras 30 minutos de inducción de daño en presencia de VRK1, pierden dicha fosforilación cuando VRK1 no está presente en la célula. Por lo tanto, la T158 constituye el residuo diana de VRK1 en la acetiltransferasa, siendo dicha fosforilación necesaria, tal y como se ha demostrado en el apartado anterior, para la posterior fosforilación de la S199 en un proceso que no es catalizado por VRK1.

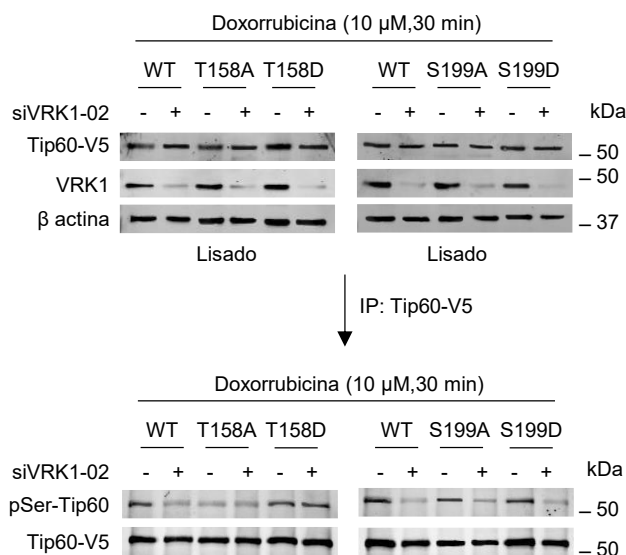


Figura 62. VRK1 es responsable de la fosforilación de la T158 y no de la S199 de Tip60 en respuesta a daño génico. Diferentes réplicas de A549 fueron transfectadas con siControl o siVRK1-02. Posteriormente, cada una de ellas fue transfectada bien con Tip60-V5 wild type o bien con uno de los cuatro mutantes simples para los residuos estudiados (T158A, T158D, S199A o S199D). Finalmente, todas las muestras se sometieron a un tratamiento con doxorubicina (10 μ M) durante 30 minutos y a partir del inmunoprecipitado de cada uno de los mutantes, se analizó su grado de fosforilación.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores y determinar, al mismo tiempo, si VRK1 está afectando a las cinéticas de fosforilación de los mutantes T158D y S199D, células transfectadas con dichos mutantes y en las que la expresión de VRK1 se bloqueó mediante ARNi, fueron tratadas con doxorubicina a lo largo de diferentes tiempos. Tras esto, se analizó mediante *western blot* la fosforilación de los mutantes para dichos tiempos (figura 63). Los resultados muestran como en el caso del mutante T158D, la fosforilación aumenta progresivamente a medida que el tiempo de tratamiento aumenta, siguiendo una cinética similar a la llevada a cabo en presencia de VRK1. De esta manera, se demuestra nuevamente que la fosforilación en la S199 asociada al mutante T158D no es llevada a cabo por VRK1. Por su parte, el mutante S199D, que en presencia de VRK1 experimentaba una rápida fosforilación tras los primeros minutos de tratamiento, perdía la señal de fosforilación cuando la expresión de VRK1 estaba bloqueada a nivel celular. Además, esta fosforilación no se recuperaba para ninguno de los tiempos analizados. Esto confirma que la fosforilación de la T158 es llevada a cabo por VRK1 y que no existe ninguna otra quinasa con actividad redundante capaz de rescatar dicha modificación post-traduccional a lo largo de la DDR cuando VRK1 no está presente en la célula.

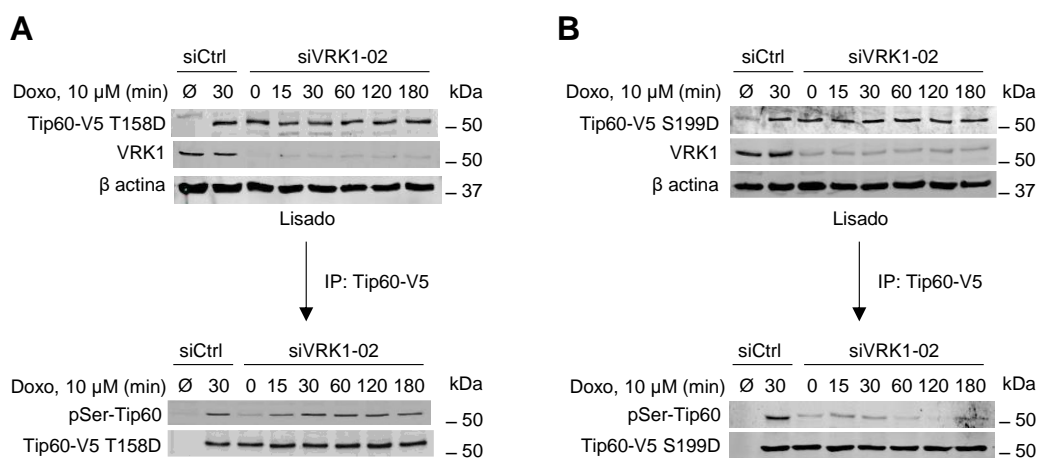


Figura 63. VRK1 no es necesario para la cinética de fosforilación de la S199 en Tip60-T158D pero es fundamental para la fosforilación del mutante S199D a lo largo de la DDR. Células A549 con la expresión de VRK1 silenciada a través de siVRK1-02 y, tras 24 horas, transfectadas con el mutante de Tip60 T158D (A) o S199D (B) fueron tratadas con doxorubicina (10 μ M) a lo largo de los tiempos indicados. Mediante *western blot*, a partir de la inmunoprecipitación del mutante correspondiente, se analizaron las cinéticas de fosforilación.

4.8. LA FOSFORILACIÓN DE LA S199 DE TIP60 DURANTE LA RESPUESTA AL DAÑO NO ES LLEVADA A CABO POR ATM NI POR MIEMBROS DE LA FAMILIA DE QUINASAS JNK

Llegados a este punto, quisimos tratar de averiguar la quinasa que pudiera llevar a cabo la fosforilación de la S199 que, como se ha visto anteriormente, depende de la fosforilación previa en la T158 pero no es catalizada por VRK1.

Nuestro primer candidato fue ATM, ya que se trata de una quinasa que actúa en etapas más tardías durante la DDR, siendo esto compatible con el hecho de que la fosforilación en la S199 es posterior a la que ocurre en la T158. Así, analizamos mediante *western blot* los niveles de fosforilación del mutante T158D en respuesta a daño génico en células A549 en las que ATM había sido previamente bloqueado mediante el tratamiento con el inhibidor específico KU55933. Este estudio se realizó, además, tanto en presencia como en ausencia de VRK1 (figura 64, parte A). Tal y como se puede observar, en ausencia del tratamiento con KU55933, ATM aparece autofosforilado y, por lo tanto, activado, independientemente del silenciamiento de VRK1. Esto podría indicar que el efecto mimético de este mutante de Tip60 sobre la T158 fuera suficiente para activar a ATM que, posteriormente y de acuerdo con nuestra hipótesis, fosforilaría a la S199, tal y como se observa en el inmunoprecipitado de la acetiltransferasa. Sin embargo, el tratamiento con KU55933, el cual fue eficaz en la inhibición de la autofosforilación y posterior activación de ATM, no afectó a la fosforilación de la S199 en el mutante Tip60-T158D en respuesta a daño, independientemente del silenciamiento de VRK1. Por lo tanto, queda descartada la hipótesis anterior, demostrándose que la fosforilación en la S199 es previa e independiente a la activación de ATM.

Con el fin de confirmar el resultado anterior, decidimos analizar la fosforilación del mutante de Tip60 T158D en células HT144 (*ATM*^{-/-}). Para ello, estas células, bien con VRK1 silenciado o bien sin alterar la expresión de VRK1, se transfectaron con el mutante y, posteriormente, se trataron con doxorrubicina. A partir del inmunoprecipitado de la acetiltransferasa, se analizó mediante *western blot* su estado de fosforilación, el cual se veía incrementado en respuesta a daño génico tanto en presencia como en ausencia de VRK1. De esta forma confirmamos que la fosforilación en la S199 que tiene lugar en este mutante no es llevada a cabo por ATM (figura 64, parte B).

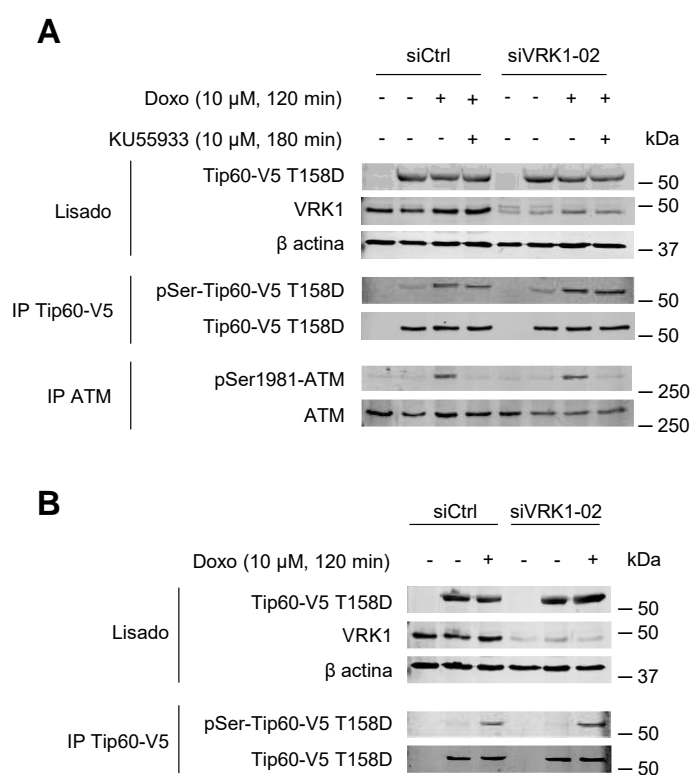


Figura 64. ATM no fosforila a la S199 de Tip60 en respuesta a daño génico. A. Estudio del efecto de la inhibición de ATM sobre la fosforilación del mutante de Tip60 T158D en respuesta a daño génico en células A549 transfectadas con siControl o con siVRK1-02. **B.** Fosforilación del mutante T158D de Tip60 en respuesta a daño génico en células HT144 (*ATM*^{-/-}) en función del silenciamiento de VRK1.

Llegados a este punto, planteamos la posibilidad de que la fosforilación en la S199 de Tip60 fuera llevada a cabo por JNK, ya que es un miembro de la familia de las MAP quinasas que está implicado en la respuesta al daño génico favoreciendo, principalmente, el desencadenamiento de la apoptosis celular (Roos y Kaina, 2006). Para comprobar esta hipótesis, siguiendo la misma perspectiva que en el experimento anterior, analizamos mediante *western blot* la fosforilación de Tip60-V5 T158D en respuesta a daño génico en células A549 en las que la actividad de JNK había sido bloqueada mediante el tratamiento con el inhibidor específico e irreversible JNK-IN-8, impidiendo la fosforilación tanto de JNK-3 como c-Jun (figura 65). El tratamiento con este inhibidor no supuso una pérdida de la fosforilación del mutante de Tip60 T158D en respuesta a daño génico, independientemente del silenciamiento de *VRK1*. Por lo tanto, JNK tampoco es la quinasa implicada en la fosforilación de la S199 de Tip60 durante la DDR.

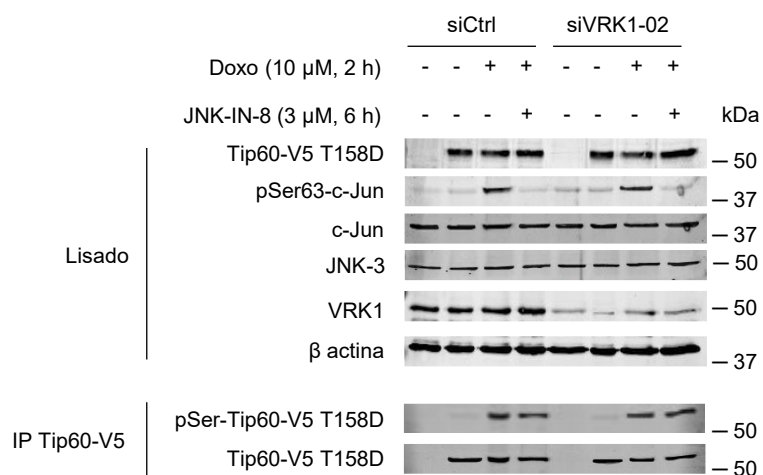


Figura 65. JNK no fosforila a la S199 de Tip60 durante la DDR. Células A549 transfectadas con siControl o siVRK1-02 y, posteriormente, con el mutante T158D de Tip60, fueron tratadas con doxorubicina (10 μ M, 2 horas) o con la combinación del inhibidor de JNK JNK-IN-8 (3 μ M, 6 horas) y doxorubicina (10 μ M, 2 últimas horas de tratamiento con JNK-IN-8). Posteriormente, se inmunoprecipitó el mutante de Tip60 para analizar mediante *western blot* su estado de fosforilación en respuesta a cada uno de los tratamientos.

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FOSFORILACIONES DE TIP60 IDENTIFICADAS EN RESPUESTA A DAÑO GÉNICO

Tras identificar a los residuos T158 y S199 como nuevas dianas de fosforilación de Tip60 durante la DDR, nuestro siguiente objetivo fue tratar de esclarecer cuáles son las implicaciones biológicas de cada una de estas fosforilaciones sobre Tip60. Para ello, siguiendo el modelo de experimentos realizados en el apartado 3 de resultados de esta tesis doctoral, quisimos identificar el efecto que los diferentes mutantes de Tip60 generados para dichos residuos tienen sobre la actividad, localización y estabilidad de la acetiltransferasa.

5.1. EFECTO DE LAS FOSFORILACIONES EN LA TREONINA 158 Y LA SERINA 199 SOBRE LA ESTABILIDAD DE TIP60

Tal y como se ha visto anteriormente, VRK1 protege a Tip60 *wild type* de su ubiquitinación y degradación vía proteasoma. Teniendo en cuenta esto, planteamos la posibilidad de que alguna de las fosforilaciones identificadas y asociadas directa e indirectamente a la quinasa, estuviera implicada en esta estabilización de Tip60 y protección frente a su degradación. Así, en primer lugar, tal y como hicimos con el Tip60 *wild type*, decidimos analizar la estabilidad de los diferentes mutantes de Tip60 en células A549 tratadas con cicloheximida a lo largo de diferentes tiempos en función de la presencia o ausencia de VRK1 en las células (figura 66). Resultó que los mutantes no fosforilables Tip60-T158A y Tip60-S199A mostraban una gran inestabilidad no sólo cuando VRK1 era silenciado a través de un ARNi específico, sino también cuando VRK1 se expresa normalmente. Esto parece indicar que ambas fosforilaciones en la T158 y la S199 son importantes para la estabilidad de Tip60. Para corroborar esto, se analizó la estabilidad de los mutantes fosfomiméticos Tip60-T158D y Tip60-S199D. Los resultados presentados en la parte B de la figura 66 indicaban que, en efecto, el mutante Tip60-T158D es altamente estable incluso tras el silenciamiento de VRK1. Dos interpretaciones son compatibles en base a este resultado. Por un lado, el aumento de estabilidad de este mutante podría deberse a la sustitución de la treonina 158 por aspártico, de forma que el efecto mimético de la fosforilación en este residuo aporte la estabilidad a la proteína. Por otro lado, se podría deducir que dado que la fosforilación en la S199 es dependiente de una fosforilación previa en la T158 (mimetizada en este mutante) y que, además, dicha fosforilación en la S199 no es llevada a cabo directamente por VRK1, la quinasa implicada sea capaz de fosforilar a Tip60 en la S199 y sea esta fosforilación la que confiera la estabilidad a Tip60. Los resultados obtenidos para el mutante Tip60-S199D (panel de la derecha de la figura 66, parte B) permiten esclarecer esta situación. Este mutante muestra un comportamiento idéntico al Tip60 *wild type*, siendo altamente estable en presencia de VRK1 pero inestable en ausencia de la quinasa. Por lo tanto, dado que la inestabilidad en dicho mutante se debe a la ausencia de VRK1, se confirma que es la fosforilación en la T158, la cual se ve imposibilitada en esta situación, la responsable de conferir mayor estabilidad a Tip60.

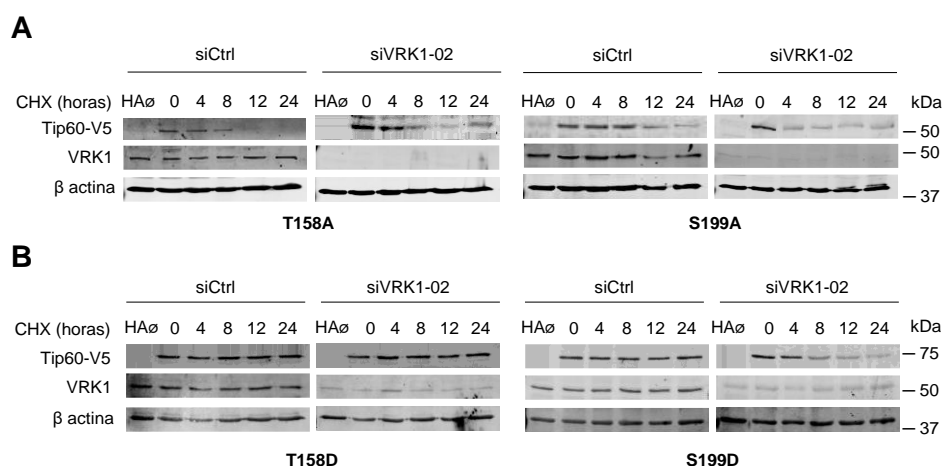


Figura 66. Efecto de VRK1 sobre la estabilidad de mutantes de Tip60. Células A549 transfectadas con siControl o siVRK1-02 y, posteriormente, con los mutantes de Tip60-V5 no fosforilables (A) o fosfomiméticos (B) se trataron con cicloheximida (50 µg/ml) a lo largo de diferentes tiempos. Transcurridos los tiempos correspondientes, se analizó mediante western blot los niveles proteicos de los mutantes de Tip60 para cada una de las condiciones.

Tras estos resultados, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la estabilidad de diferentes mutantes de la acetiltransferasa tras la inducción de daño génico. Así, se estableció un nuevo planteamiento experimental en base a los mutantes no fosforilables Tip60-T158A y Tip60-S199A. Tal y como se ha mostrado en el apartado anterior, ambos mutantes mostraban gran inestabilidad cuando las células eran tratadas con cicloheximida, independientemente del silenciamiento de *VRK1* en la célula. Teniendo en cuenta esto, quisimos analizar la capacidad que estos mutantes tienen para reestablecer sus niveles proteicos tras un tratamiento con cicloheximida de 24 horas (tiempo para el que ambos mutantes pierden sus niveles proteicos) en función de dos variables: el nivel de expresión de *VRK1* y el nivel de daño génico al que las células son sometidas (figura 67). Para el mutante Tip60-V5 T158A observamos un comportamiento idéntico para cada una de las condiciones estudiadas, recuperando sus niveles proteicos a partir de las 2-4 horas de retirada de la cicloheximida, independientemente de la presencia o ausencia de *VRK1* en la célula, así como de la inducción o no de daño génico. Además, tal y como era de esperar, en ninguno de los casos el mutante era fosforilado. En el caso del mutante S199A de Tip60, su comportamiento en ausencia de daño fue similar al del mutante anterior, recuperando los niveles proteicos tras las 2 horas post-cicloheximida, independientemente del nivel de expresión de *VRK1*. Sin embargo, en respuesta a daño génico, dicho mutante sí que mostro diferencias en las cinéticas asociadas al restablecimiento de sus niveles proteicos. En este caso y cuando las células eran capaces de expresar *VRK1*, los niveles de proteína se vieron incrementados incluso tras los primeros 30 minutos desde la retirada de la cicloheximida, tiempo que coincide con la duración del tratamiento con doxorubicina. Además, este incremento en los niveles de proteína estaba acompañado de una fosforilación en el mutante, asociada a su T158. Por el contrario, cuando las células no eran capaces de expresar *VRK1* y el mutante no se fosforilaba, de nuevo, los niveles de proteína no se reestablecían hasta las 2-4 horas post-cicloheximida. Estos resultados demuestran que, en efecto, la fosforilación de Tip60 en su T158 en respuesta a daño génico contribuye a reestablecer más rápidamente los niveles proteicos, lo cual podría estar directamente asociado a un incremento de la estabilidad de la proteína.

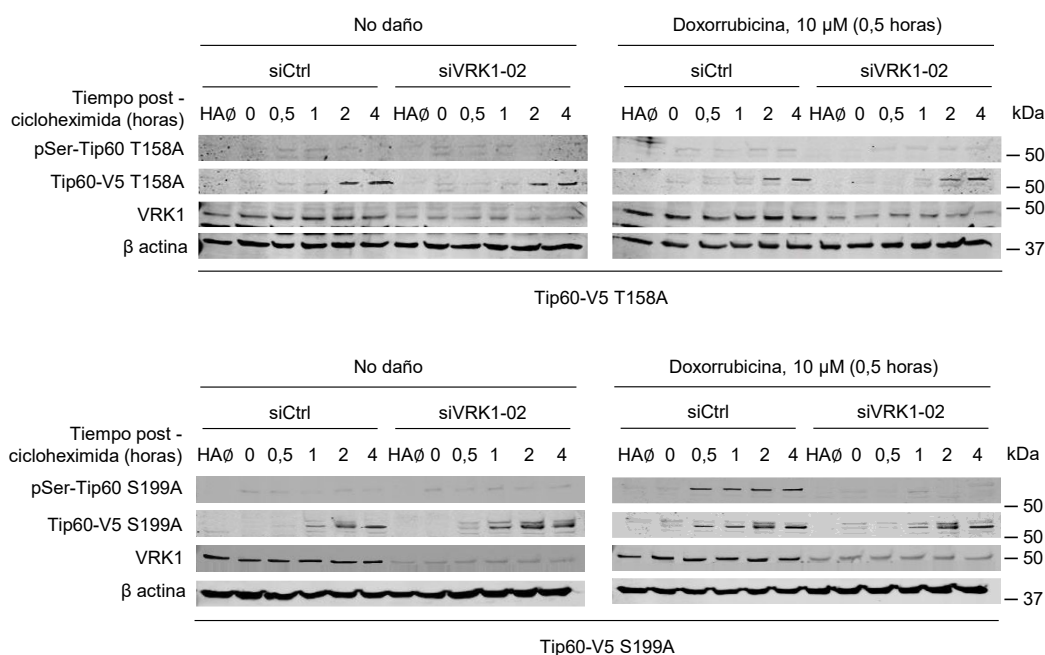


Figura 67. La fosforilación de la T158 de Tip60 interviene en la estabilidad de la acetiltransferasa. Cultivos celulares de A549 con diferente capacidad para expresar *VRK1* así como distintos mutantes no fosforilables de Tip60 (T158A o S199A) fueron tratados con cicloheximida (50 μg/ml) durante 24 horas, lo cual condujo a una pérdida total de los niveles proteicos del respectivo mutante de Tip60 que expresan. Transcurridas estas 24 horas de tratamiento, la cicloheximida fue retirada y, al mismo tiempo, las células fueron, alternativamente, no tratadas o tratadas con doxorubicina (10 μM) durante media hora. Finalmente, se extrajeron réplicas de cada uno de los cultivos a lo largo de diferentes tiempos post-cicloheximida y se analizó para cada una de las condiciones, los niveles proteicos de cada uno de los mutantes.

Los resultados obtenidos hasta ahora establecen que la fosforilación en la T158 de Tip60 conduce a un aumento de la estabilidad proteica. Con el propósito de demostrar que el aumento en la estabilidad asociado a esta fosforilación es la consecuencia directa de la disminución del grado de ubiquitinación de Tip60 observado en el apartado 3.3. de esta tesis doctoral, se llevaron a cabo dos nuevos experimentos. Para el primero, tomamos como referencia el experimento correspondiente a la figura 39 del apartado 3.3.2. de resultados, en el cual se observa como una sobreexpresión de la ubiquitina ligasa RNF8 disminuye considerablemente los niveles proteicos de Tip60. Así, el experimento consistió en analizar los niveles proteicos de diferentes mutantes de Tip60 en células A549 en las que la degradación proteica estaba potenciada a través de la sobreexpresión de dicha ubiquitina ligasa. Tal y como se puede observar (figura 68, parte A), en ausencia de daño, el mutante de Tip60 T158A, así como el mutante S199A, reducen considerablemente sus niveles proteicos tras la sobreexpresión de RNF8. Esto indica que ambos mutantes son susceptibles de ser degradados bajo estas circunstancias. Además, el hecho de que el tratamiento con MG132 posibilite recuperar los niveles basales de los dos mutantes confirma que éstos estaban siendo degradados vía proteasoma. Por el contrario, el tratamiento con doxorubicina en células transfectadas con estos mutantes no fosforilables (T158A y S199A) demostró como el primero de ellos seguía siendo inestable al sobreexpresar RNF8, mientras que Tip60-S199A mantenía elevados sus niveles proteicos bajo estas condiciones de daño génico incluso en ausencia del tratamiento con MG132. Esto podía ser debido a que la fosforilación en la T158 mediada por VRK1 en Tip60-S199A está posibilitada tras la inducción de daño, lo que apoya la hipótesis de que dicha fosforilación previene la ubiquitinación y degradación de Tip60. De forma paralela, se realizó el mismo estudio sobre los mutantes fosfomiméticos de Tip60 T158D y S199D (figura 68, parte B). En este caso, el mutante Tip60-T158D fue capaz de mantener sus niveles proteicos basales a pesar de la sobreexpresión de RNF8 independientemente de la inducción o no de daño génico con doxorubicina. Por su parte, el mutante S199D mostró un comportamiento idéntico al de su antagonista S199A, siendo inestable en ausencia de daño génico cuando la maquinaria de ubiquitinación estaba sobreexpresada y recuperando esta estabilidad cuando las células eran sometidas a daño génico. De nuevo, todos estos resultados son compatibles con la hipótesis establecida. En el caso del mutante Tip60-T158D, el efecto mimético que la mutación hace de la fosforilación en este residuo posibilita que la proteína quede protegida de la degradación vía proteasoma incluso en ausencia de daño. Por el contrario, el efecto mimético del mutante Tip60-S199D no protege a Tip60 de su degradación vía proteasoma en ausencia de daño, confirmando que la fosforilación sobre la S199 no es necesaria para este fenómeno. En cambio, en respuesta a daño, es la fosforilación de la T158 llevada a cabo por VRK1 la que, de nuevo, posibilitaría proteger a este mutante de la degradación vía proteasoma.

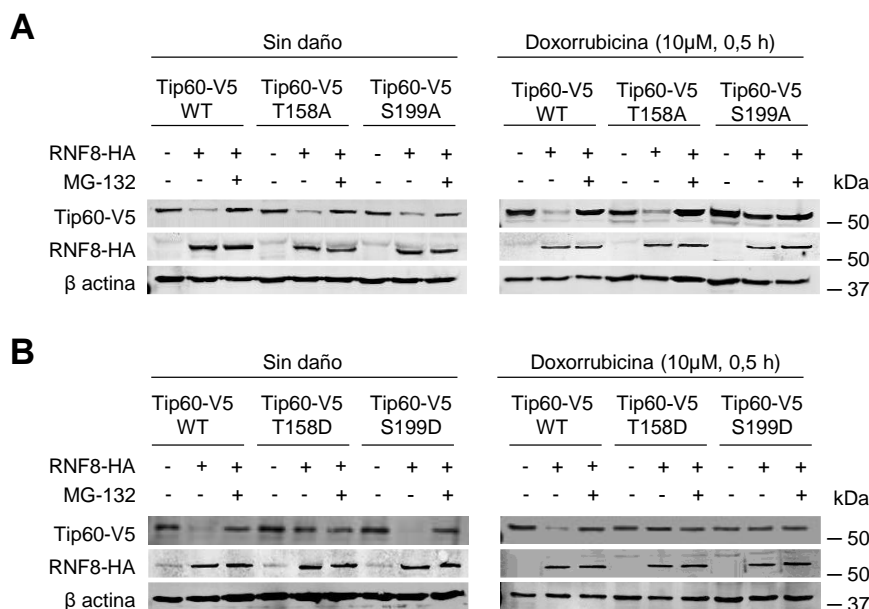


Figura 68. La fosforilación de la T158 previene la degradación de Tip60 vía proteasoma. Células A549 cotransfectadas con RNF8-HA y variantes no fosforilables (**parte A**) o variantes fosfomiméticas (**parte B**) de Tip60 fueron sometidas a diferentes combinaciones de tratamientos con MG132 (25 µM, 12 horas) y doxorubicina (10 µM, 30 min), tal y como se indica en la figura. Después, mediante western blot se analizaron los niveles proteicos de cada una de estas variantes bajo las diferentes combinaciones de tratamientos.

El segundo experimento orientado a caracterizar la implicación de las fosforilaciones en la T158 y la S199 en la degradación de Tip60 consistió en analizar el grado de ubiquitinación de los diferentes mutantes de Tip60 en respuesta a daño génico. Para ello, el plásmido pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, que expresa una ubiquitina *wild type*, se cotransfectó con los diferentes mutantes de Tip60 previamente estudiados en cultivos celulares de A549 tratados con MG132 y sometidos a 4 condiciones diferentes: (1) presencia de VRK1 y ausencia de daño; (2) presencia de VRK1 e inducción de daño con doxorubicina durante 2 horas; (3) ausencia de VRK1 y ausencia de daño; y (4) ausencia de VRK1 e inducción de daño con doxorubicina durante 2 horas. Posteriormente, las células se lisaron y las diferentes variantes de Tip60 sobreexpresadas se inmunoprecipitaron. Por último, se analizaron los niveles de Tip60 ubiquitinada en cada uno de estos inmunoprecipitados (figura 69). Tal y como se puede observar, la ubiquitinación en el mutante no fosforilable T158A (panel izquierdo, carriles 1-4) es considerable independientemente del grado de expresión de *VRK1* y de la inducción o no de daño génico con doxorubicina. Por su parte, el mutante S199A (panel izquierdo, carriles 5-8) también muestra altos niveles de ubiquitinación en ausencia de daño y/o ausencia de *VRK1*. Sin embargo, en respuesta a daño y presencia de *VRK1* (carril 6) el grado de ubiquitinación del mutante se reduce significativamente. Esto indicaría que *VRK1* está protegiendo a la proteína de su degradación vía proteasoma. Por otro lado, el mutante Tip60-T158D (panel derecho, carriles 1-4) muestra un comportamiento completamente opuesto a su antagonista al no ser ubiquitinado de forma considerable bajo ninguna de las condiciones estudiadas. Por lo tanto, el efecto fosfomimético sobre este mutante y, en consecuencia, la fosforilación que Tip60 *wild type* puede experimentar en la treonina 158 a través de *VRK1*, previenen de forma significativa de la ubiquitinación de la acetiltransferasa. Esto explicaría el aumento de estabilidad asociada a dicha fosforilación observada en experimentos anteriores. En el caso del mutante de Tip60 S199D (panel derecho, carriles 5-8), su grado de ubiquitinación era similar al de su antagonista para todas las condiciones estudiadas. Entre ellas, destaca nuevamente el punto en el que las células con capacidad de expresar *VRK1* eran tratadas con doxorubicina (carril 6), pues los niveles de ubiquitinación se veían reducidos de forma significativa. Así, dado que en ausencia de *VRK1*, este mutante mostraba elevados niveles de ubiquitinación, se confirma que la protección para la degradación de la proteína es debida a la fosforilación que este mutante experimenta en su T158 y no al efecto fosfomimético sobre su S199.

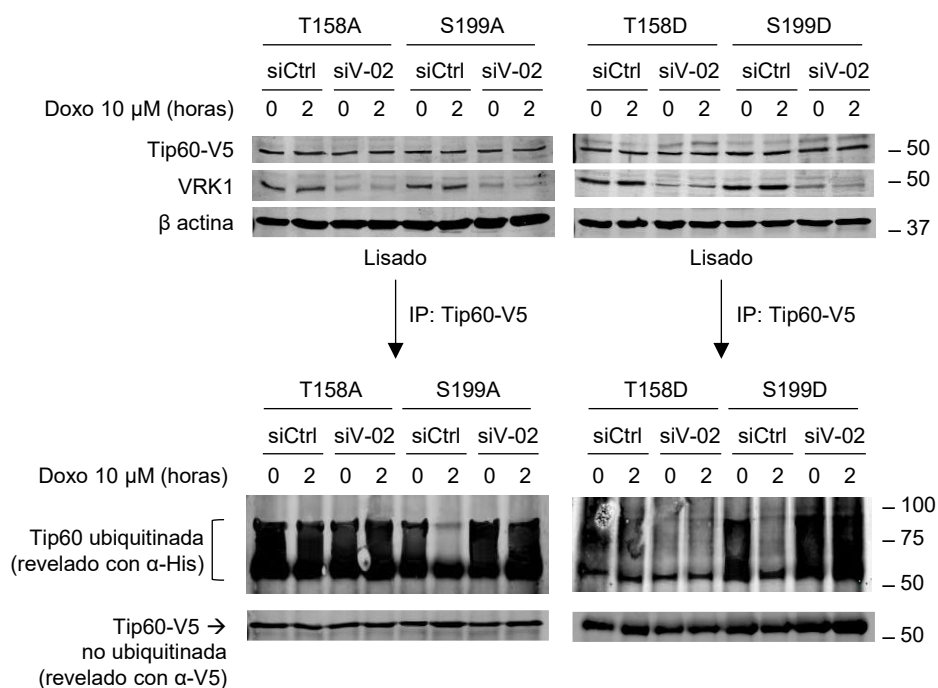


Figura 69. La fosforilación de la T158 protege a Tip60 de su ubiquitinación. Evaluación del grado de ubiquitinación de Tip60 dependiente de *VRK1* en respuesta a doxorubicina (10 μM, 30 min) en células A549 que sobreexpresan ubiquitina junto con diferentes mutantes de Tip60 y que han sido tratadas con MG-132 (25 μM, 12 horas).

5.2. IMPLICACIÓN DE LAS FOSFORILACIONES EN LA T158 Y S199 EN LA UNIÓN DE TIP60 A LA CROMATINA

De acuerdo con resultados anteriores, se sabe que una de las funciones que VRK1 ejerce sobre Tip60 durante la DDR es promover su unión y acumulación a nivel de la cromatina para que así pueda ejercer su actividad en la zona de daño. Teniendo en cuenta que dicha acumulación es paralela a un aumento de los niveles de fosforilación de la acetiltransferasa, parece evidente que alguna de las fosforilaciones mediadas directa o indirectamente por VRK1 es la responsable de posibilitar la translocación a la cromatina. Así, nuestro propósito se centró en identificar cuál de estas fosforilaciones, ya sea en la T158, en la S199, o en ambas, está implicada en el proceso. Para ello, al igual que en el apartado anterior, decidimos trabajar con los diferentes mutantes generados para estos residuos y analizar su capacidad de acumularse en la cromatina en respuesta a daño génico. Así, células A549 se transfectaron con cada uno de los mutantes de forma individual y, en condiciones de privación de suero, se trataron con doxorrubicina a lo largo de diferentes tiempos. En la parte A de la figura 70 se muestran los resultados para los mutantes no fosforilables T158A y S199A. El primero de ellos, Tip60-T158A, resultó ser incapaz de acumularse en la cromatina a lo largo de los tratamientos con doxorrubicina establecidos. Dada la incapacidad de este mutante para ser fosforilado en los residuos objeto de estudio, se confirma que al menos una de estas fosforilaciones es necesaria para la acumulación de Tip60 en la cromatina. Por su parte, el mutante S199A fue capaz de translocarse a la cromatina en respuesta a daño génico. Además, dicha acumulación en la cromatina iba acompañada de una fosforilación en la T158. Esto parece indicar que dicha fosforilación es necesaria para la acumulación de Tip60 en la cromatina. Para confirmar esta hipótesis, se analizó de la misma manera la localización nuclear de los mutantes fosfomiméticos T158D y S199D (figura 70, parte B). El mutante S199D, al igual que su antagonista, era capaz de acumularse en la cromatina en respuesta a daño en base a una fosforilación en la T158. Sin embargo, cabe destacar el comportamiento del mutante T158D, que aparecía unido a la fracción cromatínica incluso en ausencia de daño y, consecuentemente, en ausencia de una fosforilación en la S199, detectable únicamente tras el tratamiento con doxorrubicina. Dado el efecto fosfomimético que el aspártico ejerce sobre el residuo T158, se confirma que es la fosforilación en el mismo la única responsable de posibilitar la acumulación de Tip60 en la cromatina.

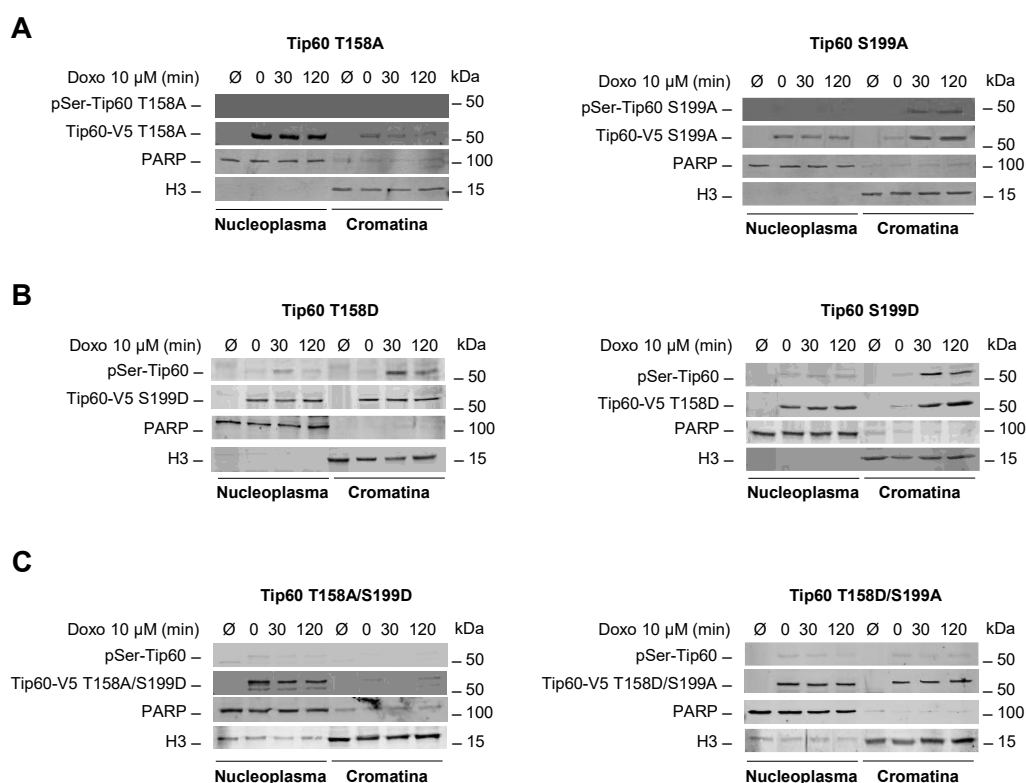


Figura 70. La fosforilación en la T158 es responsable de la acumulación de Tip60 en la cromatina durante la DDR. Localización nucleoplasmática y cromatínica de mutantes no fosforilables (A), mutantes fosfomiméticos (B) y dobles mutantes (C) transfectados en células A549 a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina (10 μ M).

Por último, se analizó la localización de los dobles mutantes de Tip60 T158D/S199A y T158A/S199D (figura 70, parte C). De nuevo, el mutante en el que la fosforilación en la T158 estaba impedida, independientemente del efecto mimético que el aspártico ejerce sobre el residuo S199, imposibilita una acumulación de la proteína en la cromatina. Por su parte, el mutante T158D/S199A, con una subpoblación constante de proteína en la cromatina, confirma que basta la fosforilación en la T158 para que Tip60 se acumule en esta región nuclear.

5.3. EFECTO DE LAS FOSFORILACIONES EN T158 Y S199 SOBRE LA ACTIVIDAD ACETILTRANSFERASA DE TIP60

Para finalizar con la caracterización de las fosforilaciones identificadas en este trabajo, quisimos determinar el efecto de cada una de ellas sobre la actividad acetiltransferasa de Tip60 que, al igual que la estabilidad y localización de la proteína, también dependía de VRK1. Para ello, en primer lugar, realizamos ensayos de actividad acetiltransferasa a partir de inmunoprecipitados de los diferentes mutantes generados para la T158 y S199 de Tip60 (T158A, S199A, T158D y S199D). Así, células A549 transfectadas con cada uno de estos mutantes fueron sometidas a las cuatro condiciones diferentes descritas en experimentos anteriores: (1) presencia de VRK1 y ausencia de daño; (2) presencia de VRK1 e inducción de daño; (3) ausencia de VRK1 y ausencia de daño; y (4) ausencia de VRK1 e inducción de daño. Tras la exposición a los diferentes tratamientos, las células se lisaron y cada uno de los mutantes se inmunoprecipitó y eluyó para obtener así proteína purificada sobre la cual se realizó el ensayo acetiltransferasa. A diferencia de Tip60 *wild type*, ninguno de los mutantes no fosforilables de Tip60 (figura 71, parte A) mostraba actividad acetiltransferasa en respuesta a daño, independientemente del nivel de expresión de VRK1. Por el contrario, los dos mutantes fosfomiméticos (figura 71, parte B) fueron capaces de mostrar una actividad acetiltransferasa incrementada en respuesta a daño génico incluso cuando la expresión de VRK1 estaba bloqueada. Además, el mutante S199D, a diferencia del resto de variantes, mantenía la actividad acetiltransferasa incrementada incluso en ausencia de daño y, de nuevo, de forma independiente a la expresión de VRK1. Esto permitía concluir que la fosforilación mimetizada por el mutante S199D bastaba para activar Tip60 e inducir su capacidad acetiltransferasa *in vitro*. En base a esto, en el caso del mutante T158D, su aumento de actividad en respuesta a daño génico era debido a la posterior fosforilación de la S199 que tenía lugar a nivel celular que, tal y como se ha demostrado anteriormente, no está catalizada por VRK1 pero requiere de la fosforilación previa en la T158.

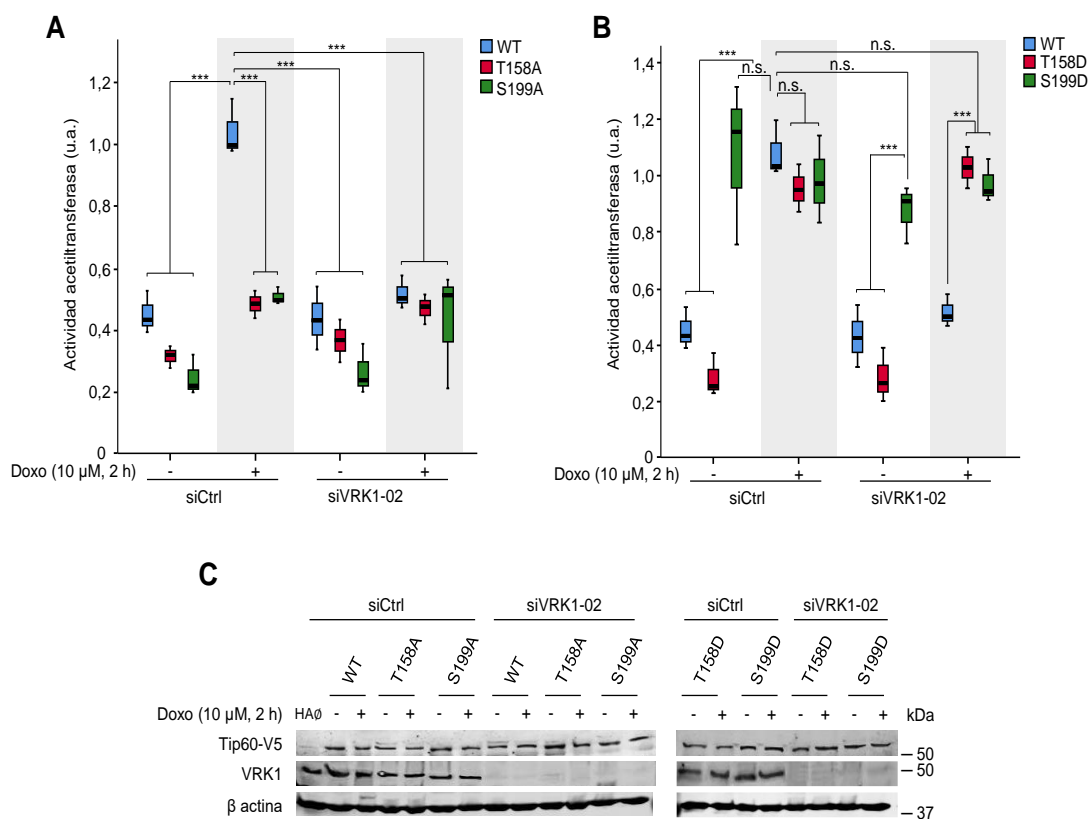


Figura 71. La fosforilación en la S199 es suficiente para inducir la actividad acetiltransferasa de Tip60 in vitro. Réplicas de células A549 transfectadas, en primer lugar, con siControl o siVRK1 y, posteriormente, con Tip60-V5 *wild type*, mutantes no fosforilables (Tip60-V5 T158A, Tip60-V5 S199A) (A) o mutantes fosfomiméticos (Tip60-V5 T158D o Tip60-V5 S199D) (B), fueron privadas de suero y tratadas con doxorubicina (10 μ M, 2 horas). Posteriormente, se inmunoprecipitó y eluyó la variante de Tip60 correspondiente, obteniendo un purificado de la proteína para cada una de las condiciones establecidas. A partir de 20 μ g de proteína purificada se realizó un ensayo de actividad acetiltransferasa in vitro. C. Para cada una de las condiciones establecidas, se realizó mediante western blot un control de transfección de los diferentes mutantes de Tip60 y control de silenciamiento de VRK1.

Para confirmar estos resultados, quisimos analizar la actividad de los diferentes mutantes de Tip60 *in vivo*, analizando mediante *western blot* la acetilación de diferentes sustratos celulares de Tip60. En base a los estudios realizados anteriormente en esta tesis doctoral, los sustratos elegidos fueron la propia acetiltransferasa, dada su capacidad de autoacetilarse, la lisina 16 de la histona H4 y ATM.

5.3.1. Efecto de las fosforilaciones en la T158 y S199 sobre la autoacetilación de Tip60

Con el objetivo de analizar la implicación que las fosforilaciones identificadas en Tip60 tienen sobre su autoacetilación y consecuente activación, analizamos el grado de autoacetilación de cada uno de los mutantes generados para la T158 y S199 en función de la presencia o ausencia de Tip60 y VRK1 endógenos en las células así como de la inducción o no de daño génico (figura 72). En ausencia de daño, ni Tip60 *wild type* ni ninguno de los mutantes para la T158 (T158A, apartado A, carriles 3, 6, 9 y 12; y T158D; apartado A, carriles 4, 7, 10 y 13) eran fosforilados ni autoacetilados. Esto también ocurría para el mutante S199A (apartado A, carriles 16, 19, 22 y 25). En cambio, cabe destacar los resultados observados para Tip60-S199D (apartado A, carriles 17, 20, 23 y 26), que mostraba autoacetilación en todos los casos incluso sin producirse una fosforilación previa en la T158. Este resultado parece indicar que el efecto mimético de la fosforilación en la S199 ejercido por el aspártico en este mutante es suficiente para promover la autoacetilación y activación de la acetiltransferasa.

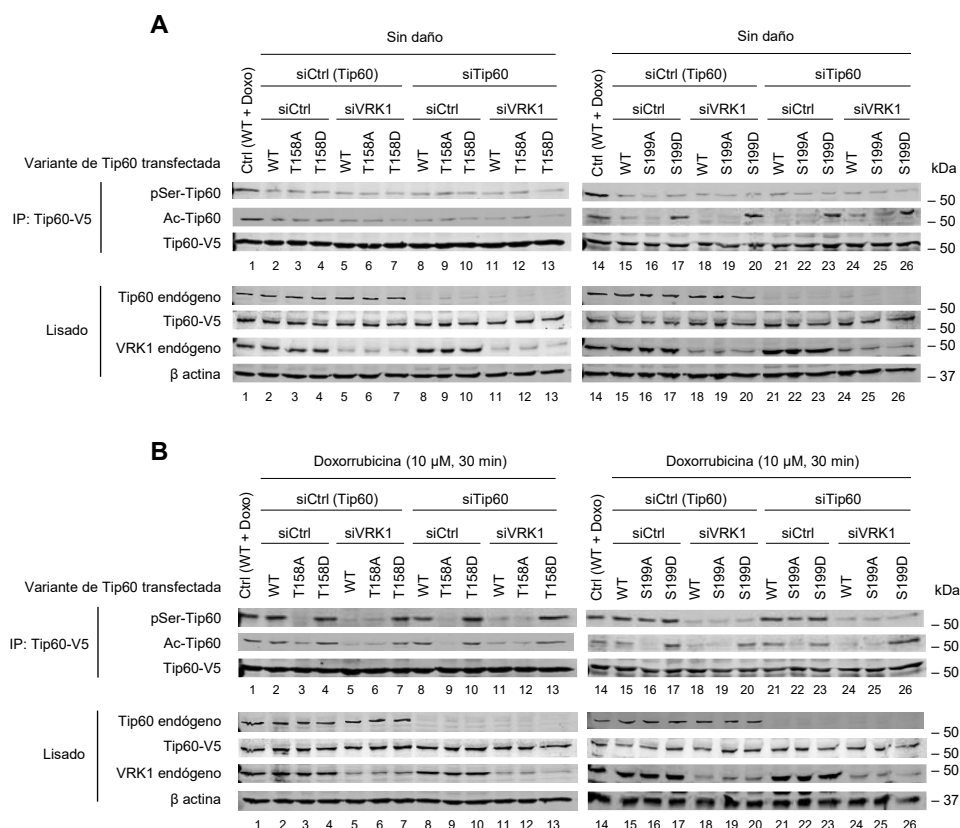


Figura 72. La fosforilación en la S199 posibilita la autoacetilación de Tip60 en respuesta a daño. Estudio de la fosforilación y autoacetilación de diferentes mutantes de Tip60 transfectados en células A549 en función de la ausencia de daño (apartado A) o la inducción de daño con doxorubicina (10 μ M, 30 minutos) (apartado B). Previamente, la expresión de KAT5 y VRK1 endógenos fue bloqueada mediante ARNi específicos para evitar el efecto que las proteínas correspondientes puedan tener sobre las modificaciones post-traduccionales de los mutantes.

En respuesta a daño, el grado de autoacetilación cambia significativamente de unos mutantes a otros. En primer lugar, la ausencia de fosforilación en el mutante T158A (apartado B, carriles 3, 6, 9 y 12) siempre va acompañado de una falta de autoacetilación, independientemente de la presencia o ausencia de Tip60 y VRK1 endógenos en la célula. Esto parece indicar que al menos una de las dos fosforilaciones identificadas en este trabajo es necesaria para la autoacetilación y activación de la proteína. Además, asumiendo que, en los casos en los que *KAT5* no ha sido silenciado, la proteína endógena sí es fosforilada y activada por VRK1, la falta de acetilación en el mutante confirma que dicha modificación siempre ocurre en *cis* y nunca en *trans*. En caso contrario, Tip60 endógeno sería capaz de acetilar al mutante. Por su parte, el mutante T158D (apartado B, carriles 4, 7, 10 y 13) experimenta una fosforilación y autoacetilación para cada una de las condiciones estudiadas. Esto confirma, tal y como se había indicado anteriormente, que, por un lado, la fosforilación en la S199 no es catalizada por VRK1 (dicha fosforilación ocurre en células en las que *VRK1* se ha silenciado) y, por otro, que alguna de estas dos fosforilaciones es necesaria para la posterior autoacetilación de la proteína. Sin embargo, dado que para todas las condiciones estudiadas existe un efecto mimético de la fosforilación en la T158 y una fosforilación propiamente dicha en la S199, resulta imposible esclarecer cuál de estas dos fosforilaciones es responsable de la autoacetilación. Teniendo en cuenta esto, centramos el interés en los mutantes para la S199 (apartado B, panel derecho). En este caso, cabe destacar en primer lugar el comportamiento del mutante S199A (carriles 16, 19, 22 y 25), el cual nunca experimenta una autoacetilación, independientemente de que exista una fosforilación previa en la T158 cuando VRK1 está presente en la célula (carriles 16 y 22). Por lo tanto, la fosforilación en la T158 parece no ser suficiente para posibilitar la autoacetilación de Tip60. Por el contrario, el mutante S199D (carriles 17, 20, 23 y 26) muestra siempre una autoacetilación en respuesta a daño. Además, dicha autoacetilación resulta ser independiente de la fosforilación previa en la T158, que no sería necesaria para el proceso autocatalítico (carriles 20 y 26). Todos estos resultados parecen indicar que la autoacetilación de Tip60 en respuesta a daño génica depende exclusivamente de la fosforilación en la S199.

5.3.2. Efecto de las fosforilaciones en la T158 y S199 de Tip60 sobre la acetilación de la H4K16 durante la DDR

La autoacetilación de Tip60 implica una activación de la proteína que, en consecuencia, será capaz de acetilar otros sustratos. Tal y como se ha descrito a lo largo de esta tesis doctoral, uno de los sustratos más importantes de Tip60 durante la DDR es la lisina 16 de la histona H4, al posibilitar el desencadenamiento de la cascada de señalización que posibilita la reparación del daño. Así, decidimos estudiar la capacidad que los diferentes mutantes de Tip60 tienen para acetilar dicha diana en base a dos condiciones: ausencia de daño, como condición control, y daño con doxorrubicina (figura 73). En ausencia de daño, ni Tip60 *wild type* ni ninguno de los diferentes mutantes estudiados son capaces de acetilar la lisina 16 de la histona H4 (apartado A). En este aspecto, existe una clara diferencia en el comportamiento del mutante S199D en comparación con su autoacetilación. Si bien dicho mutante es capaz de autoacetilarse en ausencia de daño, su incapacidad para modificar el residuo de la histona H4 revela que la fosforilación en la S199 no es suficiente para que Tip60 ejerza su actividad catalítica sobre otros sustratos. Por otro lado, en respuesta a daño, cabe destacar aquellas condiciones en las que *KAT5* endógeno se ha silenciado, de forma que la posible acetilación de la H4K16 sólo dependa del mutante correspondiente y no de la proteína endógena. Teniendo en cuenta esto, en primer lugar se observó que ni el mutante T158A (apartado B, carriles 9 y 12) ni el mutante S199A (apartado B, carriles 22 y 25) son capaces de acetilar la H4K16. En ambos casos, esta observación queda justificada por la falta de autoacetilación (y activación) que dichos mutantes mostraban en respuesta a daño en el apartado anterior. Por su parte, el mutante T158D (apartado B, panel izquierdo), que, en respuesta a daño, era fosforilado en la S199 y autoacetilado, era capaz de acetilar la H4K16 tanto en presencia (carril 10) como en ausencia de VRK1 (carril 13). Por el contrario, Tip60-S199D, a pesar de estar constitutivamente acetilado, sólo era capaz de acetilar la H4K16 cuando la fosforilación en la T158 está posibilitada en presencia de VRK1 (apartado B, carril 23), pero no en ausencia de la quinasa (apartado B, carril 26).

Teniendo en cuenta estos resultados, se concluye que, aunque la capacidad autocatalítica de Tip60 sólo depende de la fosforilación en la S199, su actividad *in vivo* sobre sustratos cromatínicos requiere una doble fosforilación en la T158 y la S199.

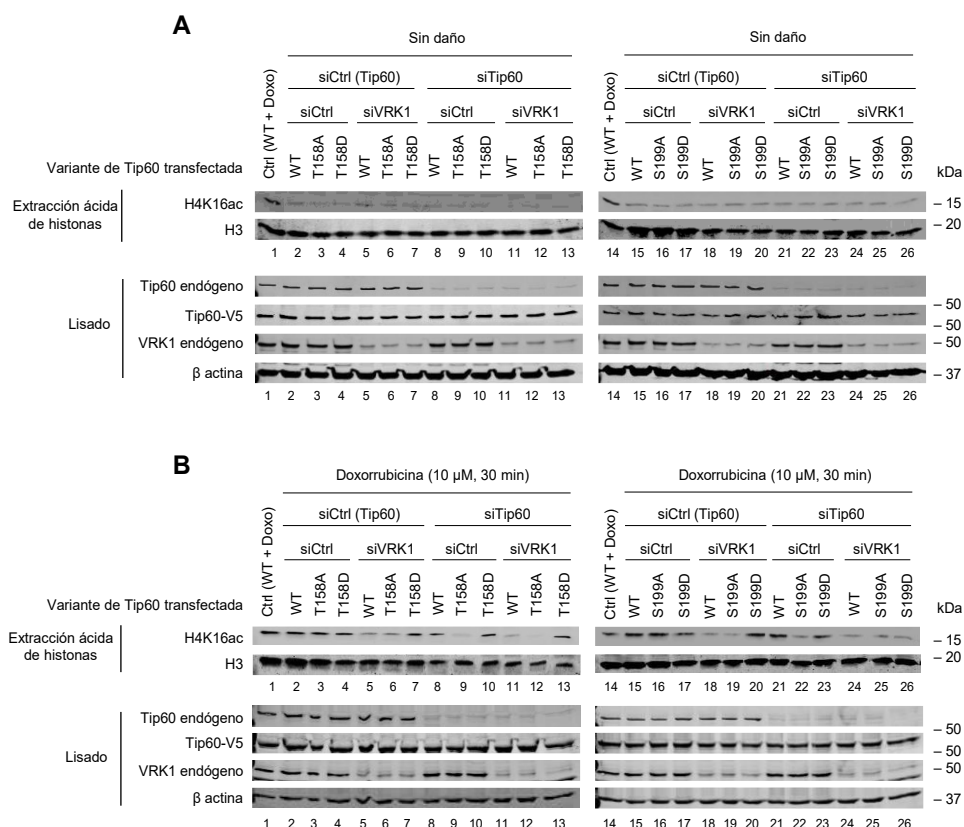


Figura 73. Las fosforilaciones en la T158 y S199 son necesarias para la acetilación de la H4K16 por Tip60 en respuesta a daño génico. Células A549 con expresión de KAT5 y VRK1 endógeno controlada por diferentes ARNi se transfectaron con diferentes variantes de Tip60 para posteriormente analizar la acetilación de la H4K16 en función de la ausencia (**apartado A**) o presencia de daño génico con doxorubicina (10 μM, 30 minutos; **apartado B**).

5.3.3. Implicación de la fosforilación de Tip60 sobre sus residuos T158 y S199 en la acetilación de ATM

Junto con el papel epigenético que Tip60 desempeña durante la DDR, esta acetiltransferasa también está involucrada en la acetilación de otras proteínas mediadoras del daño génico que no forman parte de la cromatina. Entre estos sustratos no cromatínicos de Tip60, en el desarrollo de este trabajo hemos destacado a ATM. Por ello, nuestro siguiente propósito fue averiguar si el efecto que las fosforilaciones en la T158 y S199 tienen sobre la actividad de Tip60 difiere en función de si el sustrato de la acetiltransferasa forma parte o no de la cromatina. En base a esto, decidimos estudiar nuevamente la capacidad que los diferentes mutantes de Tip60 tienen para acetilar ATM en base a las condiciones de daño anteriormente establecidas: ausencia de daño y tratamiento con doxorubicina durante 30 minutos.

En ausencia de daño (figura 74, apartado A), tal y como era de esperar, ninguno de los mutantes estudiados, al igual que Tip60 *wild type*, acetilaba a ATM, cuya activación depende directamente de la presencia de daño génico. Ahora bien, teniendo en cuenta la existencia de una autoacetilación y, por lo tanto, de capacidad acetiltransferasa en el mutante S199D en ausencia de daño, se confirma que la fosforilación en la S199 no es suficiente para la actividad catalítica de Tip60 no sólo sobre sustratos cromatínicos (H4K16), sino también sobre proteínas mediadoras del daño que no forman parte de la cromatina.

Tras la inducción de daño génico, cabe destacar que se obtuvieron los mismos resultados que los mostrados para la acetilación de la H4K16. Por lo tanto, centrando de nuevo el interés en los puntos en los que Tip60 endógeno no está presente en la célula, resultó que ninguno de los mutantes no fosforilables (T158A en el apartado B, carriles 9 y 12; y S199A en el apartado B, carriles 22 y 25) acetilaban a ATM al no ser capaces de autoacetilarse y activarse durante la DDR. El mutante T158D, portador de las dos fosforilaciones tras la inducción de daño génico (la primera sobre la T158 mimetizada por la sustitución a aspártico y la segunda en la S199 catalizada por la quinasa correspondiente), acetilaba a ATM independientemente de la presencia (apartado B, carril 10) o ausencia de VRK1 (apartado B, carril 13). Por último, la acetilación de ATM por el mutante S199D dependía directamente de la presencia de VRK1 en la célula y, con ello, de una fosforilación en la T158 (apartado B, carril 23), pues el silenciamiento de *VRK1* (carril 26) imposibilitaba establecer la modificación post-traduccional sobre la quinasa. Por lo tanto, se concluyó que la actividad catalítica *in vivo* de Tip60 durante la DDR depende de dos fosforilaciones en la T158 y S199 independientemente de la naturaleza del sustrato (cromatínico o no cromatínico) sobre el que ejerce su acción.

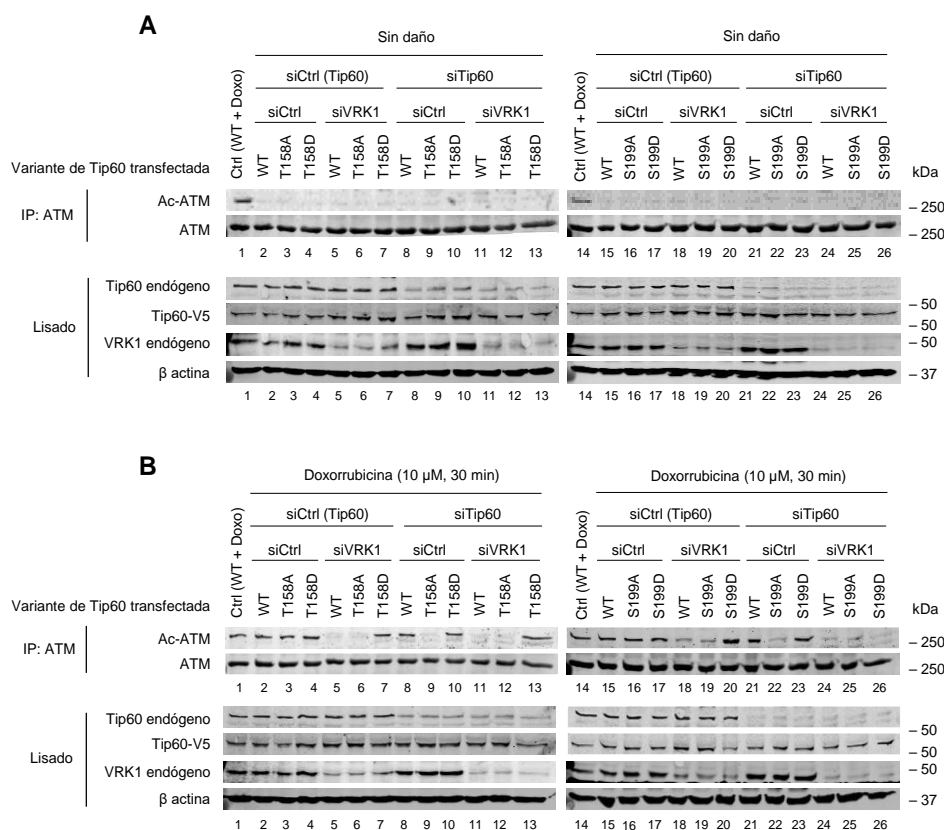
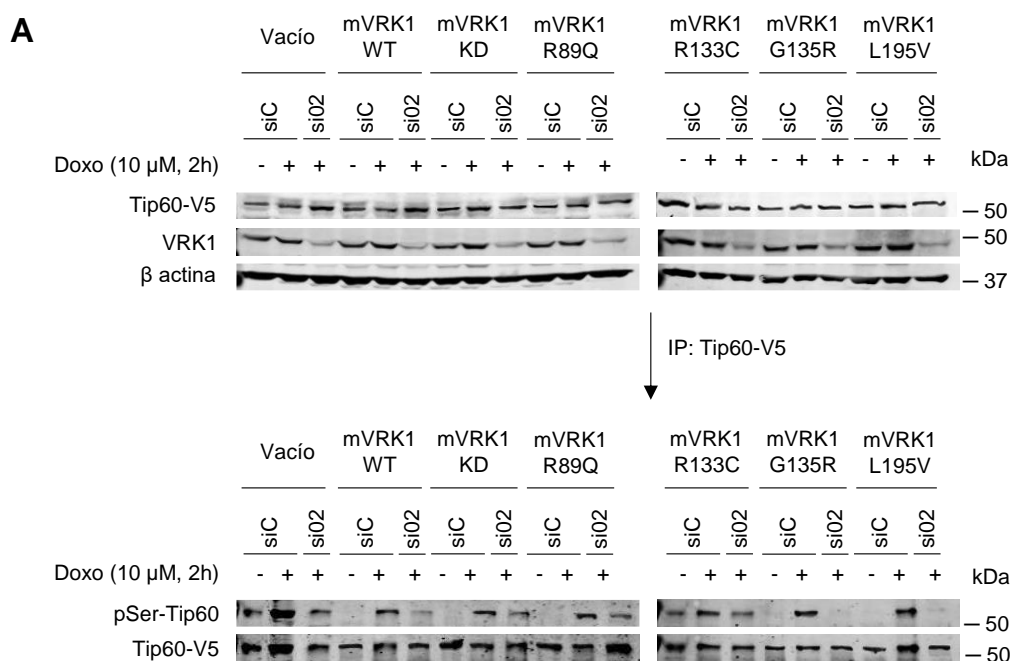


Figura 74. La acetilación de ATM durante la DDR depende de una doble fosforilación de Tip60 en sus residuos T158 y S199. Análisis del grado de acetilación de ATM en función del daño génico (**apartado A**, ausencia de daño; **apartado B**, tratamiento con doxorrubicina 10 μ M durante media hora) asociado a diferentes mutantes de Tip60 que fueron transfectados en células A549. La expresión de *KAT5* y *VRK1* endógenos fue bloqueada mediante ARNi específicos para comparar las variaciones que dicha acetilación pudiera tener en función de las proteínas endógenas correspondientes.

6. EFECTO DE MUTANTES PATOGENICOS DE VRK1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE TIP60/KAT5 A LO LARGO DE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO

Actualmente se sabe que mutaciones de la quinasa VRK1 conducen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas con cuadros clínicos variables, entre los cuales es frecuente el desarrollo de atrofia muscular espinal, microcefalia, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia espinocerebelosa, paraplejia espástica hereditaria o deficiencia mental. Con el propósito de aportar una primera perspectiva acerca del conocimiento de estas enfermedades, un estudio realizado recientemente trató de caracterizar el efecto de las diferentes mutaciones de VRK1 asociadas a las mismas sobre la propia actividad y comportamiento de la quinasa (Martín-Doncel et al., 2019). De esta manera, se pudo determinar que muchas de estas mutaciones conferían a VRK1 de una gran inestabilidad proteica y/o de una reducción en su actividad enzimática. A pesar de estos resultados, la patogénesis de dichas enfermedades neurodegenerativas aún no se conoce y necesita ser estudiada. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio (aún no publicados) han demostrado la incapacidad de la gran mayoría de variantes patogénicas de VRK1 identificadas para establecer focos de γ H2AX o acetilar la H4K16 en respuesta a daño génico. Esto sugiere que las mutaciones de VRK1 descritas en pacientes pueden conducir a una reparación defectiva del daño génico y, con ello, a la acumulación del mismo que esté afectando a la funcionalidad celular. En base a esto, quisimos averiguar si las variantes patogénicas de VRK1 estaban limitando la reparación del daño génico a partir de etapas más tempranas de la DDR y, más concretamente, a partir de la activación de Tip60 que, como se ha demostrado, depende de la fosforilación previa mediada por VRK1. Para ello, utilizamos diferentes líneas celulares con capacidad de expresar de forma constitutiva las variantes patogénicas murinas de VRK1 R89Q, R133C, G135R o L195V, además de la VRK1 *wild type* como control positivo y VRK1 K179E como control negativo. De entre estas variantes cabe destacar que, *in vitro*, R89Q y L195V son catalíticamente activas, mientras que R133C y G135R son inactivas (Martín-Doncel et al, 2019). Estas líneas celulares, previo silenciamiento del VRK1 endógeno para evitar su interferencia en los resultados, fueron tratadas con doxorrubicina para inducir daño génico. Tras esto, se analizó el grado de fosforilación de Tip60, el cual estaría directamente asociado a la actividad de la variante de VRK1 correspondiente. Tal y como se puede observar en la figura 75, a excepción de la variante murina *wild type* de VRK1, que mostraba un comportamiento idéntico a su ortólogo humano y es capaz de fosforilar a Tip60 en respuesta a daño, ninguna de las variantes patogénicas de VRK1 era capaz de rescatar el fenotipo de Tip60 fosforilado cuando el VRK1 endógeno es silenciado en las células. Estos resultados justifican las deficiencias que todos estos mutantes mostraban en la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 y formación de focos de γ H2AX durante la DDR, confirmando defectos en la iniciación y desarrollo de la respuesta al daño génico cuando VRK1 muestra mutaciones asociadas a enfermedades neurodegenerativas.



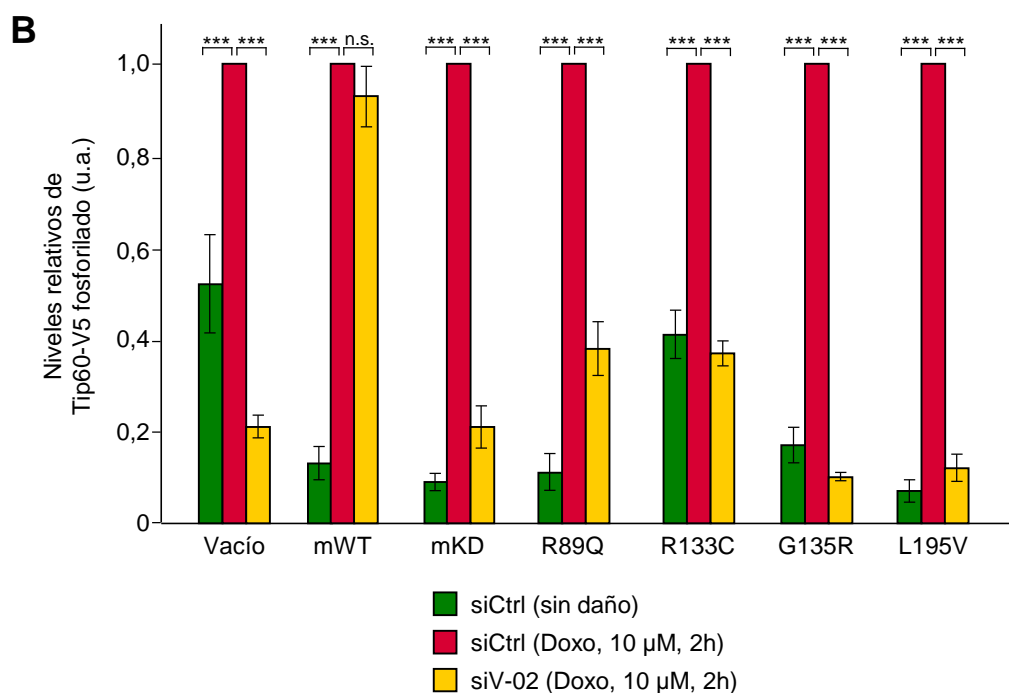


Figura 75. Variantes neuropatogénicas de VRK1 no fosforilan a Tip60 en respuesta a daño génico. **A.** Líneas celulares A549 con capacidad de expresar constitutivamente diferentes variantes patogénicas de VRK1 gracias a la técnica de transducción viral se sometieron, previo silenciamiento del VRK1 humano no mutado y posterior transfección de Tip60-V5, a un tratamiento con doxorubicina (10 µM, 2 horas) con el propósito de inducir daño génico. Tras ello, las células se lisaron y, a partir de la inmunoprecipitación de Tip60-V5, se analizó su grado de fosforilación, directamente asociado a la actividad de cada una de las variantes de la quinasa. **B.** Cuantificación relativa de los niveles de fosforilación de Tip60-V5 asociado a cada uno de los mutantes en respuesta a daño (barras amarillas) respecto a sus controles positivos resultantes de tratar las células con doxorubicina en presencia del VRK1 humano endógeno (barras rojas). Además, también se representa el nivel de fosforilación de Tip60-V5 en ausencia de daño como control negativo (barras verdes). La significación estadística se calculó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. ***, p-valor < 0,001; n.s., p-valor > 0,05.

DISCUSIÓN

El empaquetamiento del ADN en la estructura ribonucleoproteica altamente organizada y compacta que constituye la cromatina es un aspecto fundamental a la hora de garantizar la incorporación de la macromolécula portadora de la información génica en el interior del núcleo celular. Sin embargo, la compactación a la que dicha estructura está sometida puede limitar el desarrollo de diferentes procesos celulares, como la replicación, la transcripción génica o la reparación de las lesiones que se producen de forma constante en el ADN. Todo ello podría comprometer enormemente la homeostasis y viabilidad celular. Para evitar esto, la cromatina está sujeta a un proceso dinámico de remodelación y empaquetamiento que posibilita regular el grado de compactación/descompactación, tanto a nivel local como a nivel global, en función de las necesidades celulares. Como consecuencia, aquellas regiones cromatínicas expuestas a una estructura más laxa quedan accesibles para las proteínas y maquinarias celulares implicadas en dichos procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN (Wagner et al., 2018).

Teniendo en cuenta la importancia que la remodelación de la cromatina juega en los procesos y viabilidad celulares, se hace evidente que éste constituye un proceso altamente organizado y controlado. En este sentido, la epigenética es responsable de regular las dinámicas de la cromatina según los requerimientos de la célula. Para ello, incorpora diferentes modificaciones químicas y estructurales en la cromatina que son las responsables de modular, en última instancia, dicha conformación. Entre estas modificaciones destacan la metilación del ADN, el posicionamiento y composición de los nucleosomas, los cambios estructurales asociados a ARNs no codificantes o las modificaciones covalentes de histonas, ya sean metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, etc. Centrando el interés en las modificaciones de histonas, la regulación epigenética está fundamentalmente sujeta a un control preciso de la actividad de los diferentes *writers*, *readers* y *erasers* responsables de incorporar, reconocer o liberar cada una de estas marcas epigenéticas, respectivamente. Este sistema de control de *writers*, *readers* y *erasers* puede llevarse a cabo a diferentes niveles. Uno de ellos ocurre a nivel transcripcional, lo cual implica regular los niveles de síntesis proteica de cada uno de los modificadores epigenéticos en función de los requerimientos celulares y las modificaciones que deban establecerse en cada momento (Seto y Yoshida, 2014). Sin embargo, este mecanismo no es suficiente para garantizar el mantenimiento de un epigenoma acorde a las necesidades celulares, especialmente en aquellos procesos, como la respuesta al daño génico, en los que las modificaciones epigenéticas cambian constantemente y a una velocidad a la que el control de la transcripción de las enzimas no puede hacer frente. Por ello, es necesario un control epigenético a nivel enzimático, en cual sea la propia actividad catalítica de los *writers*, *readers* y *erasers* la que esté sujeta a una regulación estricta a lo largo de la vida celular. En este aspecto, la fosforilación de estos moduladores epigenéticos a través de quinasas específicas puede constituir un mecanismo candidato para orquestar esta regulación. De hecho, dicha modificación post-traducciona es responsable de regular la actividad de numerosas proteínas en diferentes rutas de señalización. Así, por ejemplo, la acetiltransferasa Tip60 (también llamada KAT5) es fosforilada por diferentes quinasas en función de las condiciones y requerimientos celulares. En apoptosis, son las quinasas GSK3 y p38 α las que, al fosforilar a Tip60 en su serina 86 y treonina 158, respectivamente, posibilitan la acetilación de p53 y posterior activación de genes pro-apoptóticos como *PUMA* o *BAX* (Charvet et al., 2011). De igual manera, CDK1 fosforila a Tip60 en la serina 90 durante la fase G2/M, lo cual es fundamental para la parada del ciclo celular (Lemerrier et al., 2003) mientras que el complejo p-TEFb (CDK9-ciclina T1) fosforila también dicho residuo de Tip60, desencadenando el proceso de elongación transcripcional (Brauns-Schubert et al., 2018).

A pesar de todos los datos preexistentes, la regulación de Tip60 en el contexto del daño génico, esencial para generar una región cromatínica localmente acetilada y descompactada en la zona del daño, es desconocida y necesita ser estudiada. En esta tesis doctoral, en primer lugar planteamos la hipótesis de que la quinasa VRK1 pudiera estar fosforilando y regulando a Tip60 en respuesta a daño génico, pues datos preexistentes realizados en nuestro laboratorio demuestran una reducción de los niveles de acetilación de la lisina 16 de la histona H4 (sustrato de Tip60 durante la DDR) al silenciar la expresión de *VRK1* en las células (Salzano et al., 2015). Una vez planteada esta hipótesis, hemos podido concluir que, en efecto, un proceso de fosforilación de Tip60 mediado por VRK1 en respuesta a daño es fundamental a la hora de regular la actividad enzimática de la acetiltransferasa y posibilitar el desencadenamiento de la cascada de señalización reparadora del daño.

1. PAPEL DE VRK1 EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO A TRAVÉS DE LA FOSFORILACIÓN DE TIP60

Una vez corroborado que la acetilación de la H4K16 en respuesta a daño depende directamente de la expresión de VRK1, nuestro propósito fue tratar de establecer una relación directa entre la quinasa y Tip60, la acetiltransferasa responsable de catalizar dicha modificación epigenética. En primer lugar, demostramos que ambas proteínas interactuaban entre sí, formando un complejo basal en la célula independientemente de la inducción o no de daño génico. Estos resultados constituyeron una base fundamental a la hora de investigar si realmente existe una regulación de Tip60 en el contexto del daño génico mediada por nuestra quinasa candidata.

Llegados a este punto, centramos el interés en el comportamiento de dicho complejo en el contexto del daño génico. Para ello, utilizamos el agente quimioterapéutico doxorubicina como agente genotóxico. La selección de este inductor de daño se debió a varios factores. En primer lugar, desde un punto de vista técnico, este fármaco ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, estando bien caracterizadas las dosis eficientes de daño. Por otro lado, es un fármaco ampliamente utilizado en quimioterapia, por lo que los efectos asociados al mismo que se detectan en la investigación básica pueden tener importantes implicaciones a nivel clínico. Además, este tipo de agentes químicos permiten monitorizar de manera más sencilla experimentos de *time lapse* en comparación con otras fuentes de daño también utilizadas comúnmente en la investigación, como la radiación ionizante. Por último, la doxorubicina es capaz de generar roturas de doble cadena en el ADN, una de las formas más deletéreas de daño que conducen a una cascada de señalización muy bien caracterizada a lo largo de diferentes etapas. Así, tras observar que la interacción entre Tip60 y VRK1 aumentaba ligeramente tras los primeros minutos de tratamiento con doxorubicina para posteriormente recuperar los niveles basales, analizamos el grado de fosforilación de la acetiltransferasa a lo largo de diferentes tiempos de daño. Para ello, previo a la inducción del daño, siempre se retiraba el suero de los cultivos celulares. De esta manera evitábamos interferencias de posibles fosforilaciones de la acetiltransferasa derivadas de las cascadas de señalización activadas por mitógenos. Observamos que, en efecto, Tip60 se fosforilaba en respuesta a daño génico tras los primeros minutos de tratamiento con doxorubicina, alcanzando un máximo de fosforilación a las dos horas de tratamiento a partir de las cuales dicha fosforilación empieza a disminuir. En este sentido, cabe destacar que la rápida fosforilación de Tip60 es acorde con los tiempos en los que la actividad de la acetiltransferasa es mayor durante la DDR, pues es uno de los primeros modificadores epigenéticos que actúa en la etapa de sensibilización al daño. Este fenómeno constituía un primer apoyo a la posibilidad de que la actividad acetiltransferasa de Tip60 durante la respuesta al daño génico estuviera regulada positivamente por una fosforilación. Además, para confirmar que la fosforilación observada en Tip60 era independiente de la fuente de daño, también se analizó el grado de fosforilación de la proteína en respuesta a radiación ionizante. De nuevo, Tip60 se fosforilaba tras someter las células a este agente exógeno de daño, si bien en esta ocasión la fosforilación alcanzaba los niveles más elevados mucho antes que en el tratamiento con doxorubicina. Esto es entendible dado que la radiación ionizante, a diferencia de la doxorubicina, que es un compuesto que requiere de cierto tiempo para penetrar en la célula y generar la lesión, es una fuente inmediata de daño. Esto hace que la sensibilización celular y el desencadenamiento de la respuesta al daño sean mucho más rápidos en el caso de la radiación. Además, el hecho de que Tip60 se fosforile rápidamente en respuesta a radiación (a los 5 minutos post-irradiación ya se observaba un incremento significativo en la fosforilación) confirman que esta modificación post-traducciona es una etapa muy temprana de la DDR.

Nuestro siguiente paso fue confirmar, de acuerdo con nuestra hipótesis, que la fosforilación observada en Tip60 durante la DDR es llevada a cabo por VRK1. Para ello, silenciábamos la expresión de *VRK1* en los cultivos celulares y analizamos nuevamente el grado de fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico. La pérdida de fosforilación de Tip60 cuando *VRK1* no estaba presente en la célula demostraba que la fosforilación previamente observada dependía de esta quinasa. Además, un ensayo de rescate de fenotipo en líneas celulares en las que el *VRK1* no era expresado pero que, expresaban alternativamente, una variante murina *wild type* o una variante catalíticamente inactiva de la quinasa, confirmó que la actividad enzimática de VRK1 era necesaria para esta fosforilación. Sin embargo, con estos resultados aún no era posible concluir que VRK1 fosforilase directamente a Tip60, existiendo también la posibilidad de que su actividad quinasa estuviera modulando a cualquier otra quinasa y que fuera ésta la responsable, en última instancia, de modificar post-traduccionalmente a Tip60. En este aspecto, cobraba especial importancia la

realización de un ensayo de fosforilación *in vitro* bajo el cual una posible fosforilación de Tip60 dependiera única y exclusivamente de VRK1, al ser la única quinasa con la que está en contacto. Al detectar fosforilación de Tip60 en este ensayo *in vitro*, quedaba demostrado que VRK1 era capaz de fosforilar a la acetiltransferasa por sí misma. Tras esto, también decidimos realizar experimentos *in vivo* en células en las que ATM, una de las quinasas más importantes de la DDR, bien había sido bloqueada con KU55933 (inhibidor específico de ATM) o cafeína (inhibidor genérico de PIKKs) o bien no era expresada, al ser células *ATM*^{-/-} (HT144). En ambos casos, se observó que no sólo la fosforilación de Tip60, sino también su actividad acetiltransferasa de histonas, eran completamente independientes de ATM, aunque seguían dependiendo de la expresión y actividad de VRK1. De esta forma concluíamos que la activación de Tip60 depende de VRK1 en un proceso previo e independiente a la activación de ATM. Esto permite situar a VRK1 como una proteína sensora de daño que actúa de forma muy temprana en la respuesta al daño génico, siendo responsable incluso de la descompactación local de la cromatina en la zona del daño, uno de los primeros cambios epigenéticos en la cromatina que permite desencadenar toda la cascada de señalización posterior.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se deduce que la inhibición de VRK1 con inhibidores específicos bloquearía, presumiblemente, la cascada de señalización de la DDR en etapas muy tempranas de la misma. Esto situaría a la quinasa como una posible diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, especialmente en terapias combinadas con diferentes agentes inductores de daño, como la propia doxorrubicina. En base a esto, estos tratamientos combinados conducirían a la acumulación de lesiones en las células tumorales y promovería la posterior activación de programas de muerte celular o, alternativamente, las haría más susceptibles a inmunoterapia (Germano et al., 2017; Chae et al., 2018). Además, esta perspectiva terapéutica también sería adecuada para el tratamiento de tumores que han desarrollado resistencia (ya sea primaria o adquirida) a un tratamiento radioterapéutico o quimioterapéutico a raíz de su capacidad para reparar el daño generado. De nuevo, el bloqueo de VRK1 podría incapacitar a las células tumorales para reparar dicho daño, que se acumularía de forma significativa y conduciría a la muerte celular (figura 76). Por otro lado, otro aspecto a tener en cuenta en la candidatura de VRK1 como diana terapéutica es la función que esta quinasa ejerce no sólo durante la DDR, sino también en la progresión del ciclo celular. Así, estos posibles tratamientos combinados podrían favorecer más fácilmente la reducción del tamaño del tumor. De hecho, a nivel clínico, se ha descrito la existencia de altos niveles de VRK1 en tumores asociados a un mal pronóstico al favorecer estos fenómenos de proliferación celular (Valbuena et al., 2008; Valbuena et al., 2011, Molitor y Traktman, 2013) y resistencia al daño génico (Campillo-Marcos y Lazo, 2018; Ren et al., 2020). Por lo tanto, estos resultados clínicos apoyan en mayor medida la posibilidad de que VRK1 pueda utilizarse como diana terapéutica en el tratamiento combinado de diferentes tipos de cáncer. Por último, cabe destacar que estas estrategias, además, permitirían reducir la dosis de los tratamientos actuales con agentes quimio o radioterapéuticos y, en consecuencia, la toxicidad y efectos secundarios asociados a ellos (Campillo-Marcos y Lazo, 2019).

Actualmente, la principal limitación para el desarrollo de estos inhibidores específicos de VRK1 reside en las características estructurales de su dominio catalítico, las cuales lo vuelven insensible a inhibidores ya desarrollados tanto de serina/treonina quinasas (Fedorov et al., 2007a; Fedorov et al., 2007b) como de auto- y transfosforilación (Vázquez-Cedeira et al., 2011). A pesar de esto, hasta la fecha, ha sido posible identificar dos inhibidores efectivos para esta quinasa, la luteolina y el ácido ursólico. El primero de ellos, un flavonoide natural, es capaz de inhibir tanto la autofosforilación de VRK1 como la fosforilación de BAF mediada por esta quinasa. Como consecuencia, se ha observado que es capaz de inducir la parada del ciclo celular y aumentar la susceptibilidad celular, favoreciendo la apoptosis (Kim et al., 2014). De igual manera, el ácido ursólico también inhibe la actividad quinasa de VRK1, favoreciendo la acumulación de daño y promoviendo autofagia. De hecho, se ha demostrado que este último inhibidor muestra un efecto sinérgico con diferentes agentes quimioterapéuticos (Kim et al., 2015). Sin embargo, la principal limitación de estos dos compuestos para su implantación a nivel clínico es que requieren de dosis efectivas muy elevadas (en rangos de escala micromolar) a la hora de posibilitar la inhibición de VRK1, lo que supone un riesgo de inhibición cruzada con otras quinasas y del desarrollo de efectos secundarios en los pacientes (Campillo-Marcos y Lazo, 2018). Teniendo en cuenta esto, la investigación y el desarrollo de nuevos inhibidores de VRK1, ya no sólo naturales, sino también sintéticos, sigue siendo un aspecto fundamental con prometedores resultados clínicos.

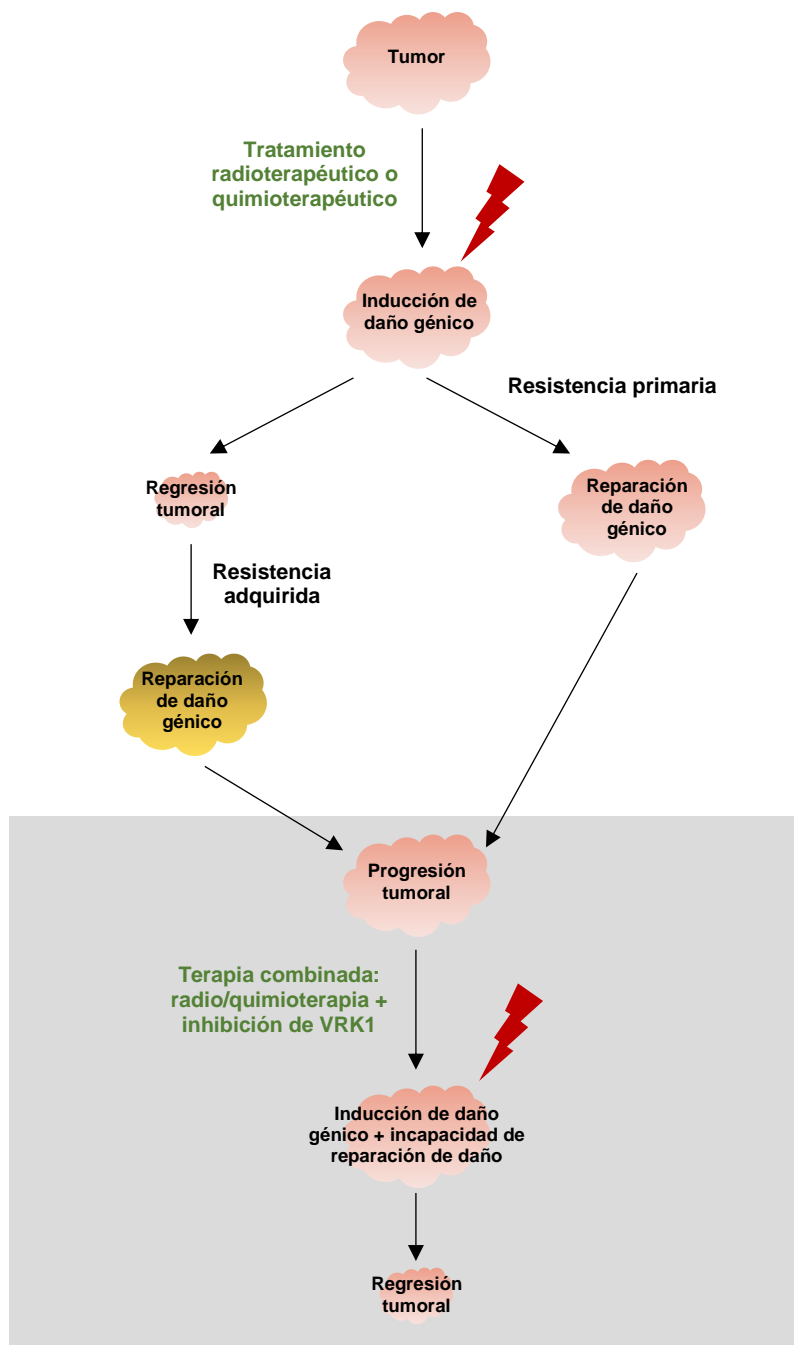


Figura 76. Representación esquemática que muestra el papel que podría tener la inhibición de VRK1 en terapias combinadas para el tratamiento de tumores que hayan desarrollado resistencia primaria o adquirida al tratamiento con quimio o radioterapia.

2. IMPLICACIONES DE LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR VRK1 SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE TIP60 A LO LARGO DE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO

Las conclusiones obtenidas del apartado anterior indican que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 es necesaria para su actividad acetiltransferasa de histonas, posibilitando la descompactación de la cromatina en la zona del daño que conduce al desencadenamiento de toda la DDR. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, era imposible determinar si dicha fosforilación realmente se encontraba modulando la actividad catalítica de Tip60 o si, por el contrario, estaba afectando otras propiedades de la proteína estrechamente relacionadas con su capacidad acetiltransferasa, como su localización subcelular o su estabilidad. Por ello, en primer lugar, decidimos determinar el efecto que la ausencia de VRK1 y, consecuentemente, la pérdida de fosforilación de Tip60 durante la respuesta al daño, tenían sobre su capacidad para acetilar diferentes sustratos. Así, se purificó Tip60 a partir de células con o sin capacidad de expresar, respectivamente, *VRK1* y sometidas de igual manera a daño génico con doxorrubicina. Seguidamente, se analizó la actividad acetiltransferasa *in vitro* de la proteína purificada bajo cada una de las condiciones establecidas. Los resultados demostraron como dicha actividad catalítica de Tip60, que se veía significativamente incrementada en respuesta a daño génico cuando procedía de células que expresaban *VRK1*, se perdía prácticamente en su totalidad al silenciar la quinasa en las células. Esto parecía indicar que, en efecto, el papel que la fosforilación pudiera ejercer sobre Tip60 recaía sobre su actividad acetiltransferasa.

Una propiedad importante a tener en cuenta de Tip60 es que su actividad catalítica depende significativamente de un proceso de autoacetilación a través del cual la proteína adquiere una conformación mucho más activa (Yang et al., 2012). En base a los resultados anteriores, se podía plantear la hipótesis de que dicha autoacetilación dependiera de la fosforilación previa llevada a cabo por VRK1. Para verificar esto, se analizaron *in vivo* los niveles de fosforilación y autoacetilación de Tip60 en función del grado de expresión génica de *VRK1*. Una pérdida de fosforilación, acompañada de una pérdida de autoacetilación cuando *VRK1* era silenciado, confirmaban la hipótesis establecida. Por lo tanto, se concluía que una función fundamental de la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 en respuesta a daño génico es conferir un mayor grado de actividad catalítica a la acetiltransferasa. Hasta el momento, no se ha demostrado una actividad catalítica de VRK1 sobre Tip60 en otras funciones en las que la acetiltransferasa juega un papel importante, como la regulación de la transcripción o la inducción de apoptosis. Ahora bien, en todas estas funciones sí se han identificado otras quinasas capaces de fosforilar a Tip60 con el propósito de que sea catalíticamente activa (Lemerrier et al., 2002; Charvet et al., 2011; Brauns-Schubert et al., 2018). A pesar de esto, el hecho de que el silenciamiento de *VRK1* suponga una pérdida total de la fosforilación y autoacetilación de Tip60 tras la inducción de daño, indica que no existe actividad redundante entre quinasas en este contexto y demuestra el papel central de VRK1 en la regulación de la actividad de Tip60 durante la DDR. Por lo tanto, mutaciones con pérdida de función de VRK1 presumiblemente pueden comprometer significativamente la capacidad celular de reparar el daño. Esto constituye un nuevo apoyo para el desarrollo de inhibidores de VRK1 que puedan ser utilizados en clínica de la manera que se ha descrito anteriormente, pues se aseguraría un bloqueo de la DDR desde etapas tempranas de la misma.

Cuando se analizaban las dinámicas de fosforilación de Tip60 y acetilación de H4K16, se observaba que, a pesar de que ambas dinámicas eran similares tras los primeros minutos de daño, diferían en su comportamiento entre los 30 y 120 minutos (la fosforilación de Tip60 sigue aumentando mientras que la acetilación de la H4K16 disminuye). Basándonos en la conclusión obtenida de que la fosforilación de Tip60 provoca una activación de la acetiltransferasa, este resultado sería algo contradictorio. Sin embargo, se podría explicar teniendo en cuenta que la actividad acetiltransferasa de Tip60 durante la DDR no sólo recae a nivel de la cromatina, sino que se han descrito otros muchos sustratos no cromatínicos. Entre ellos destacan ATM y p53, que juegan un papel fundamental en etapas más tardías de la respuesta al daño génico. Por lo tanto, es de esperar que, en este intervalo de tiempo entre los 30 y 120 minutos de daño, la fosforilación en Tip60 siga aumentando con el fin de posibilitar la acetilación y activación de dichos sustratos. Para verificar esta hipótesis, que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 no sólo afecta a la actividad acetiltransferasa de histonas de Tip60, sino también a su actividad sobre otros sustratos, se analizaron las acetilaciones de ATM y p53 llevadas a cabo por Tip60 en función de la expresión de *VRK1*.

Por un lado, ATM constituye una quinasa con un papel central a lo largo de la DDR al ser capaz de fosforilar numerosos sustratos que actúan como proteínas mediadoras y efectoras de la reparación del daño génico. Esta actividad catalítica de ATM depende directamente de la acetilación previa de la quinasa por parte de Tip60, lo que posibilita su autofosforilación y posterior activación. En base a esto, se observó que VRK1 era necesaria para la acetilación y consecuente activación de la quinasa. Además, la inhibición de ATM impide su autofosforilación, pero no altera su acetilación por Tip60. Esto sitúa a VRK1 como una proteína sensora muy temprana en la DDR, permitiendo tanto la relajación local de la cromatina en la zona del daño como la posterior activación de ATM gracias a la fosforilación y activación de Tip60. Por lo tanto, en este trabajo se demuestra que VRK1 tiene un papel central y fundamental durante la DDR.

Respecto a p53, se sabe que su acetilación mediada por Tip60 es fundamental a la hora de inducir un cambio de especificidad del factor de transcripción, lo que favorecería una activación de genes proapoptóticos en detrimento de genes que favorezcan la parada transitoria del ciclo celular. En este caso, se vio que el silenciamiento de *VRK1* no afectaba a la acetilación del factor de transcripción y, por lo tanto, no impedía la inducción de apoptosis en células con un exceso de daño acumulado. Así, queda demostrado que, durante la DDR, *VRK1* actúa como oncogén al ejercer una función orientada a la reparación del daño y supervivencia celular, en detrimento de la inducción de apoptosis. De hecho, estudios realizados con anterioridad han demostrado que *VRK1*, lejos de promover la apoptosis, protege a las células de la muerte celular programada (Navarro-Carrasco y Lazo, 2021). Además, cabe destacar que, si bien *VRK1* no es responsable indirecto de la acetilación de p53, esta quinasa sí es capaz de establecer otras modificaciones post-traduccionales en el factor de transcripción. Concretamente, se ha descrito que *VRK1* fosforila a p53 en su treonina 18 (Lopez-Sanchez et al., 2014). Como consecuencia, p53 se libera de la ubiquitina ligasa mdm2 (Kussie et al., 1996), lo que estabiliza la proteína y facilita fosforilaciones adicionales, como pueden ser la serina 15 (catalizada por ATR) o la serina 20 (catalizada por ATM) (Toledo y Wahl, 2006). Estas fosforilaciones contribuyen a la especificidad de p53 por cofactores específicos que favorecerán la parada del ciclo celular en detrimento de la apoptosis (Navarro-Carrasco y Lazo, 2021). En este sentido, cabe destacar que los roles consecutivos que *VRK1* y ATM ejercen sobre la fosforilación de p53 en respuesta a daño génico son consistentes con el orden de activación de estas quinasas descrito en este trabajo. Esto refuerza la idea de que *VRK1* es un componente primario y anterior a ATM durante la DDR.

La regulación positiva que *VRK1* muestra sobre Tip60 y la consecuente acetilación tanto de la H4K16 como de ATM son dos factores claves en la correcta progresión de la DDR, pues posibilita la accesibilidad y reclutamiento a la zona de daño de multitud de proteínas mediadoras. En este aspecto, experimentos anteriores han demostrado que *VRK1* también es responsable del desarrollo de etapas de la DDR tan importantes como la formación de focos de γ H2AX (Salzano et al., 2015), NBS1 (componente del complejo MRN) (Monsalve et al., 2016) o 53BP1 (Sanz-García et al., 2012), todas ellas posteriores a la acetilación de la H4K16. Por lo tanto, todos estos pasos de la DDR pueden ser ordenados a lo largo de la cascada de señalización de una forma en la que *VRK1* actúa como proteína desencadenante del proceso, tal y como se representa en la figura 77. Tras la aparición de daño génico, *VRK1* fosforila y activa rápidamente a Tip60. Una vez activa, Tip60, por un lado, va a ser capaz de acetilar residuos de lisina 16 de la histona H4 en la zona del daño, ocasionando una descompactación de la cromatina. Por otro lado, también acetila a ATM que, como consecuencia, se autofosforila y adquiere conformación de monómeros activos. Es entonces cuando ATM será capaz de fosforilar H2AX, generando uno de los principales puntos de anclaje de proteínas involucradas en la DDR. De esta manera, NBS1 y, posteriormente, 53BP1 también serán reclutadas a la zona del daño, permitiendo la entrada en la fase de resolución, en la cual el daño es finalmente reparado.

A lo largo de esta cascada de señalización, la acumulación de 53BP1 depende del establecimiento de marcas de H4K20me2. El hecho de que H4K20me2 y H4K16ac sean marcas epigenéticas mutuamente excluyentes parece contradecir el fenómeno descrito por el cual *VRK1* favorece tanto la H4K16ac como la acumulación de 53BP1. Sin embargo, cabe destacar que dicha acumulación de 53BP1 constituye una etapa mucho más tardía de la respuesta al daño génico en comparación con la acetilación de la H4K16. Así, teniendo en cuenta la pérdida de fosforilación (y, por lo tanto, de actividad) que Tip60 experimenta a partir

de las dos horas de tratamiento con doxorrubicina, es asumible pensar que transcurrido este tiempo las marcas epigenéticas de H4K16ac vayan siendo sustituidas por marcas de H4K20me2. A medida que esta sustitución acontece, 53BP1, que sí se fosforila por VRK1 en etapas más tardías de la DDR, va a poder anclarse a la región cromatínica, dando lugar a los focos característicos que forma la proteína. De esta manera, el efecto aparentemente contradictorio ejercido por VRK1 a lo largo de la DDR queda resuelto.

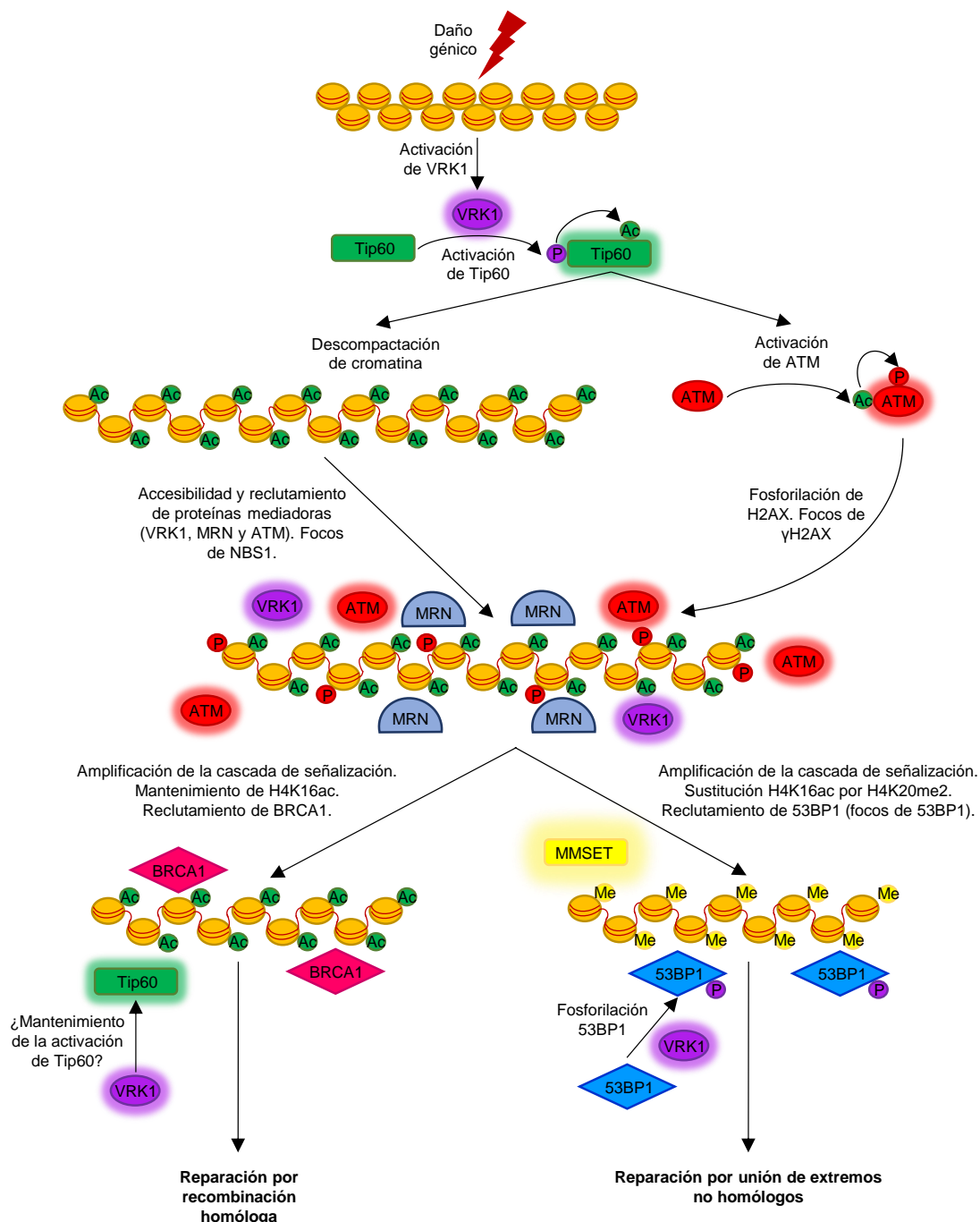


Figura 77. Representación esquemática de las principales funciones que VRK1 y Tip60 desempeñan durante la respuesta al daño génico. Los fosforilaciones establecidas tanto a nivel de la cromatina como en diferentes proteínas mediadoras se representan con una "P" sobre un fondo de color equivalente al de la quinasa post-traduccional. De igual manera, las acetilaciones se representan con la etiqueta "Ac" y la dimetilación de la lisina 20 de la histona H4 con la etiqueta "Me".

A efectos mecanísticos, la acumulación de 53BP1 descrita es responsable de inducir una reparación del daño por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (figura 77, parte inferior derecha). Por el contrario, una acumulación de BRCA1 sería responsable de una reparación por recombinación homóloga (HR) (figura 77, parte inferior izquierda). En base a esto, el balance entre H4K16ac y H4K20me2 también va a ser importante a la hora de determinar el tipo de reparación que se lleva a cabo. Un reciente estudio ha determinado que la fosforilación de Tip60 en sus residuos 86 y 90 juega un papel fundamental en esta “toma de decisión”. Concretamente, este estudio determina que durante las fases S y G2 del ciclo, Tip60 puede ser fosforilado en estos residuos, lo que conduce a un incremento de su actividad acetiltransferasa, con la consiguiente acumulación de BRCA1 en las regiones del daño y la inducción de HR (Li et al., 2019). A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, parece asumible pensar que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 también va a ejercer un papel importante en la toma de decisión entre HR y NHEJ. Así, un mantenimiento a lo largo del tiempo de dicha fosforilación podría conducir a una acumulación de H4K16ac que favorecería la HR. Por el contrario, la pérdida de dicha fosforilación favorecería el establecimiento de marcas de H4K20me2 que inducen la NHEJ. En este sentido, sería interesante analizar si mutantes de Tip60 no fosforilables por VRK1 dificultan la acumulación de BRCA1 tras la inducción de daño y favorecen en su lugar la acumulación de 53BP1. Por el contrario, de acuerdo con la hipótesis establecida, mutantes fosfomiméticos de Tip60 promoverían la acumulación de BRCA1 y HR en detrimento de la NHEJ estimulada por 53BP1.

Llegados a este punto, se ha demostrado que la fosforilación de Tip60 ejercida por VRK1 es imprescindible para su actividad acetiltransferasa. Un aspecto fundamental a tener en cuenta es que, durante la DDR, la activación y consecuente actividad quinasa de VRK1 es regulada por la interacción de su extremo C-terminal con las histonas (Kang et al., 2007; Wiebe y Jamin, 2016). Esto hace pensar que la fosforilación y activación de Tip60 ocurre directamente en las regiones nucleares asociadas a la cromatina. Teniendo en cuenta esto, quisimos analizar la localización celular de Tip60 por inmunofluorescencia con el propósito de determinar si existe una migración subcelular de la proteína en respuesta a daño génico. El resultado obtenido mostró una acumulación significativa de Tip60 en la región nuclear en respuesta a daño génico. Además, esta acumulación nuclear dependía directamente de VRK1, pues el bloqueo de expresión de la quinasa conducía a una dispersión de Tip60 incluso en presencia de daño génico, que reducía de manera significativa sus niveles nucleares. Posteriormente, se realizó un estudio de la localización subnuclear de Tip60, comparando sus niveles en las fracciones nucleoplasmática y cromatínica a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina. Se observó que, independientemente del daño, existe una subpoblación constante de Tip60 en el nucleoplasma que no es fosforilada tras la inducción del daño génico. Además, a pesar de no ser fosforilada por VRK1, se comprobó que ambas proteínas, Tip60 y VRK1, interaccionaban y formaban un complejo basal en esta región nucleoplasmática. Esto demuestra que la activación de VRK1 requiere de una interacción con la cromatina en la región del daño. Por el contrario, en ausencia de daño, Tip60 no se asociaba a la cromatina. Sin embargo, a medida que se inducía daño génico, aparecía una subpoblación progresivamente mayor de la acetiltransferasa en esta región subnuclear. Dicha subpoblación resultaba estar fosforilada por VRK1. Además, cuando la quinasa no se expresaba en las células, la acumulación cromatínica de Tip60 se perdía completamente, indicando que dicha fosforilación es necesaria para la unión de Tip60 a la cromatina. En conclusión, se demostró que la fosforilación de Tip60 mediada por VRK1 tiene lugar en la región cromatínica, donde VRK1 es activada, y que contribuye a la retención de la acetiltransferasa en la misma.

Hasta la fecha, se ha descrito que la unión de Tip60 a la cromatina está mediada por modificaciones epigenéticas y, más concretamente, por la trimetilación de la H3K36, a la que Tip60 se une por medio de su cromodominio. Sin embargo, para que esta unión sea posible, las proteínas que puedan estar unidas a las marcas de H3K36me3 deben de ser liberadas. Entre estas proteínas se encuentra HP1 (heteroproteína 1). Un estudio realizado en 2009 demostró que la caseína quinasa 2 fosforilaba a HP1, posibilitando su liberación de la H3K36me3 y el posterior acceso y unión de Tip60 a dicha marca epigenética (Sun et al., 2009). Más recientemente, un nuevo estudio ha demostrado que la unión de Tip60 a la H3K36me3 puede tener lugar no sólo a través de su cromodominio, sino también de forma indirecta por medio de la proteína LEDGF (del inglés, *lens epithelium-derived growth factor p75*) (Li y Wang, 2017). Según este estudio, tras la inducción del daño génico, una trimetilación en la H3K36 posibilita la unión de LEDGF, que se encuentra interaccionando con Tip60. Como resultado, Tip60 es reclutada a la cromatina a través de esta proteína puente, posibilitándose de esta manera la acetilación de la lisina 16 de la histona H4.

A la vista de las diferentes posibilidades descritas para la unión de Tip60 a la cromatina, sería interesante profundizar en el principio mecanístico por el cual VRK1 posibilita el reclutamiento y retención cromatínica de Tip60. Así, convendría analizar en primer lugar si la fosforilación de Tip60 por VRK1 en respuesta a daño está posibilitando un anclaje directo de la acetiltransferasa a la H3K36me3 o si, por el contrario, esta acumulación de Tip60 en la cromatina mediada por VRK1 depende de otras proteínas intermedias que actúan como puente. Por otro lado, tal y como se discutirá de forma más detallada en el apartado 1.6., convendría estudiar si VRK1 está regulando de forma indirecta el establecimiento de marcas de H3K36me3 que permitan la posterior unión de Tip60. Por último, también sería interesante tratar de averiguar si VRK1, además de fosforilar a Tip60, está implicado en la fosforilación y liberación de proteínas como HP1 ancladas a la H3K36me3, siguiendo un proceso similar al llevado a cabo por la caseína quinasa 2.

Estudios anteriores han demostrado que muchas de las dianas de VRK1, como 53BP1 (Sanz-García et al., 2012), coilina (Cantarero et al, 2015) o ataxina (datos no publicados), aumentan su estabilidad al ser fosforiladas por la quinasa. Por ello, junto con la actividad catalítica y la localización subcelular de Tip60, también se analizó el posible papel que VRK1 podía estar ejerciendo sobre la vida media de la acetiltransferasa. Para ello, en primer lugar analizamos la estabilidad de Tip60 tanto en presencia como en ausencia de VRK1. Observamos que los niveles celulares de Tip60 se veían notablemente disminuidos cuando la expresión de *VRK1* se bloqueaba. Esto proporcionaba un primer apoyo a la hipótesis de que VRK1 estabiliza a Tip60. Estudios posteriores demostraron que el efecto que VRK1 ejerce sobre la estabilidad de la acetiltransferasa está directamente relacionado con los niveles de ubiquitinación de esta última. Concretamente, células que están sometidas a daño génico muestran niveles reducidos de Tip60 ubiquitinado, lo que implica reducir su marcaje para la degradación vía proteasomal. Sin embargo, cuando estas células son incapaces de expresar *VRK1*, los niveles de ubiquitinación de Tip60 incrementaban significativamente en respuesta a daño génico. Por lo tanto, se concluyó que VRK1 está protegiendo a Tip60 del marcaje necesario para su degradación tras la inducción de daño génico. Desde un punto de vista mecanístico, esto podría ser debido a una mayor demanda de Tip60 bajo estas condiciones de daño con el fin de posibilitar el correcto desarrollo de la DDR. Así, al aumentar la estabilidad de Tip60, también aumenta sus niveles y su actividad acetiltransferasa en la célula, posibilitando que ejerza las funciones anteriormente descritas sobre la cromatina y ATM.

Como conclusión a este apartado, podemos decir que la función de Tip60 a lo largo de las diferentes etapas de la DDR está estrechamente ligada a VRK1. Tras la aparición de daño génico, VRK1 se activa y fosforila a Tip60. Como consecuencia, Tip60 no sólo ve posibilitada su autoacetilación e incremento de su actividad catalítica sobre distintos sustratos, sino que también experimenta un incremento de su estabilidad y una redistribución subcelular que permite su anclaje a la cromatina. Todo ello, en conjunto, aumenta considerablemente las capacidades de Tip60 durante la DDR que, en ausencia de VRK1, se verían seriamente comprometidas. Sin embargo, con los resultados hasta ahora expuestos, no queda resuelto si los tres efectos que VRK1 ejerce sobre Tip60 (aumento de actividad catalítica, localización cromatínica y protección frente a la degradación vía proteasoma) están interconectados y el desarrollo de unos depende, necesariamente, del desarrollo de otros o viceversa.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS DE FOSFORILACIÓN DE TIP60 DURANTE LA RESPUESTA AL DAÑO GÉNICO

Una vez identificada VRK1 como quinasa responsable de la fosforilación de Tip60 durante la respuesta a daño génico, uno de nuestros principales objetivos fue averiguar cuál era el residuo diana de dicha fosforilación. La bibliografía existente hasta ahora describe dos principales residuos de fosforilación de Tip60: la serina 86 y la serina 90. En el caso del primer residuo, su fosforilación ha sido ampliamente caracterizada en el contexto de la muerte celular programada. En este sentido, la quinasa GSK-3 cataliza la modificación post-traducciona, lo que incrementa la especificidad de Tip60 por p53, que será acetilado y activará una serie de genes proapoptóticos (Charvet et al., 2011). Por otro lado, se han identificado al menos dos quinasas responsables de fosforilar a la serina 90 de Tip60. La primera de ellas es CDK1 (también llamada Cdc2), una quinasa dependiente de ciclo que es activa durante la fase G2/M del ciclo tras su unión a la ciclina B. Por lo tanto, en este caso la fosforilación en la serina 90 representa una modificación post-traducciona dependiente de ciclo, la cual es importante a la hora de controlar la progresión del ciclo celular (Lemerrier et al., 2003). La otra quinasa descrita que tiene como sustrato la serina 90 de Tip60 es CDK9, a través del complejo P-TEFb del que forma parte. En este caso, dicha fosforilación, tal y como se ha descrito anteriormente, posibilita el correcto desarrollo del proceso transcripcional. Por lo tanto, de acuerdo con los datos preexistentes, se sabe que la fosforilación en un mismo residuo de Tip60 (como es el caso de la serina 90) puede desencadenar funciones biológicas diferentes en función de la quinasa que catalice la modificación y del propio contexto celular. Por ello, planteamos la posibilidad de que, en el contexto del daño génico y reparación del mismo, fuera alguna de estas dos serinas ya caracterizadas para otras funciones celulares las que constituyeran el sustrato de VRK1. Sin embargo, tanto ensayos de fosforilación *in vitro* como ensayos de fosforilación *in vivo* en respuesta a daño génico para Tip60 S86A y Tip60 S90A mostraban que ambos mutantes mantenían el estado de fosforilación inducido como consecuencia de las lesiones en el ADN. Llegados a esto punto, nos servimos de diferentes herramientas bioinformáticas que nos proporcionaron nuevos residuos de Tip60 candidatos a ser fosforilados por VRK1. Así, se desarrollaron diferentes mutantes de Tip60 para cada uno estos residuos, en los cuales la serina o treonina correspondiente era sustituida por alanina. De esta manera, se esperaba que aquel mutante que no fuera fosforilado en la célula tras la inducción de daño génico revelara a su residuo mutado como el sustrato de VRK1 en Tip60. Sorprendentemente, se encontraron, no uno, sino dos mutantes que no eran fosforilados tras dos horas de tratamiento con doxorrubicina: Tip60-T158A y Tip60-S199A. Con estos resultados, una primera interpretación fue que ambas fosforilaciones en la T158 y en la S199 debían ser necesariamente dependientes la una de la otra, pues en caso contrario la fosforilación asociada al residuo no mutado en cada uno de los mutantes hubiera debido ser detectable en el experimento realizado. De hecho, el posterior estudio de fosforilación con los mutantes fosfomiméticos T158D y S199D revelaba una fosforilación que, presumiblemente, era debida a la fosforilación del residuo no mutado. Además, dobles mutantes de Tip60 para ambos residuos perdían completamente la fosforilación en respuesta a daño, confirmando que no existían otros residuos fosforilados en este contexto. Sin embargo, la hipótesis de que las fosforilaciones en ambos residuos fueran interdependientes la una de la otra finalmente fue descartada al estudiar las cinéticas de fosforilación para cada uno de los mutantes T158A, S199A, T158D y S199D (figura 78, fondos claros). Resultó que el mutante S199A, para el que anteriormente no se había detectado fosforilación, realmente sí era fosforilado en respuesta a daño génico, pero dicha fosforilación ocurría a tiempos más cortos tras la inducción del daño. Por tanto, se concluyó que la fosforilación en la T158 (aquella detectada en los mutantes para la S199) era independiente de la fosforilación en la S199. Por el contrario, dado que únicamente el mutante T158D, y no el mutante T158A, se fosforilaba a lo largo del tiempo de tratamiento, se concluía que la fosforilación en la S199 sí era dependiente de una fosforilación previa en la T158. Ahora bien, analizando más detalladamente los resultados obtenidos para los mutantes S199A y S199D, se observó una clara diferencia en cuanto a la cinética de fosforilación de la T158 entre uno y otro. En el caso de Tip60-S199A, la fosforilación en la T158 se perdía rápidamente, tras la primera hora de tratamiento con doxorrubicina. Por el contrario, para el mutante Tip60-S199D dicha fosforilación se mantenía a lo largo de más tiempo, siendo aún detectable tras dos horas de tratamiento. Dado el efecto fosfomimético de este último mutante sobre la S199, estos resultados sugieren que la posterior fosforilación que acontece en Tip60 *wild-type* sobre la S199 permite mantener y estabilizar la fosforilación previa en la T158, evitando que ésta se pierda tras los primeros minutos de aparición de daño génico.

De acuerdo con los resultados anteriores y dado que el silenciamiento de *VRK1* imposibilitaba la fosforilación de Tip60 en respuesta a daño génico, se abrían dos posibilidades. La primera de ellas era que *VRK1* fuera responsable de fosforilar a Tip60 tanto en la T158 como en la S199. La segunda posibilidad era que *VRK1* únicamente fosforilara a la T158, mientras que la fosforilación en la S199, dependiente de la primera, fuera realmente llevada a cabo por otra quinasa. Para resolver esta incógnita, se llevaron a cabo estudios de fosforilación de mutantes de Tip60 en células en las que *VRK1* no era capaz de expresarse. Las dinámicas de fosforilación de cada uno de estos mutantes (T158A, S199A, T158D y S199D) en respuesta a daño y en ausencia de *VRK1* aparecen esquematizados en la figura 78 (fondos oscuros). Los resultados obtenidos permitieron concluir que *VRK1* únicamente era responsable de catalizar la fosforilación en la T158, mientras que la S199 era fosforilada por otra quinasa diferente.

De las dos fosforilaciones identificadas, aquella que tiene lugar sobre la S199 es completamente nueva, no habiendo sido descrita con anterioridad en la bibliografía desde un punto de vista biológico, aunque sí haya sido descrita *in vitro* (Mertins et al., 2013; Zhou et al., 2013). Sin embargo, la fosforilación sobre la T158 sí ha sido identificada recientemente en el contexto de muerte celular programada (Xu et al., 2014). En este caso, ante una acumulación significativa de daño, es la quinasa p38 α la que fosforila dicho residuo, favoreciendo la acetilación de p53 por Tip60 y la posterior activación de genes proapoptóticos. Sin embargo, en este trabajo se ha demostrado que la fosforilación promovida por *VRK1* sobre dicho residuo no es necesaria para la acetilación de p53 y posterior activación de genes proapoptóticos. De hecho, tal y como se ha mencionado anteriormente, se sabe que *VRK1* actúa como proteína antiapoptótica, protegiendo a las células de esta muerte celular programada (Navarro-Carrasco y Lazo, 2021). Esto demuestra nuevamente, al igual que ocurría con la serina 90, que una misma fosforilación sobre Tip60 puede desencadenar respuestas celulares completamente diferentes en función de la quinasa y el contexto celular en los que dicha modificación tenga lugar. Sin embargo, las bases moleculares por las que una misma modificación post-traducciona es capaz de desencadenar estas respuestas celulares distintas aún es poco conocida, siendo evidente la existencia de *crossstalks* entre rutas moleculares totalmente diferentes con Tip60 como elemento común. Por ello, sería conveniente profundizar en las cascadas de señalización de cada una de estas rutas moleculares, así como en la capacidad de Tip60 de favorecer el desarrollo de una u otra. En este sentido, el fenómeno de la doble fosforilación descrito en este trabajo, primero en la T158 y después en la S199, y que parece no ocurrir cuando la T158 es fosforilada por p38 α , podría jugar un papel fundamental a la hora de orientar la funcionalidad celular hacia la reparación del daño y no hacia la inducción de apoptosis. De hecho, un fenómeno similar también ha sido descrito en Tip60 para los residuos S86 y S90. Por un lado, una única fosforilación en la S90 de Tip60 por CDK9 induce una parada de ciclo celular (Lemercier et al., 2003). Sin embargo, si a dicha fosforilación en la S90 le sigue una segunda fosforilación en la S86 por GSK-3, el resultado es la inducción de una muerte celular programada (Charvet et al., 2011). Además, si en este proceso de doble fosforilación es la CDK1, en lugar de la CDK9, la que cataliza la primera fosforilación, el resultado es un aumento su capacidad catalítica y especificidad por regiones promotoras concretas que favorece en gran medida la activación y progresión transcripcional sin inducir apoptosis celular (Brauns-Schubert et al., 2018). Teniendo en cuenta esto, un estudio más exhaustivo de la especificidad de sustrato de Tip60 como consecuencia de la fosforilación de su S199, así como la identificación de la quinasa responsable de catalizar dicha modificación, podrían aportar nuevas conclusiones acerca de los roles alternativos que ejerce esta acetiltransferasa.

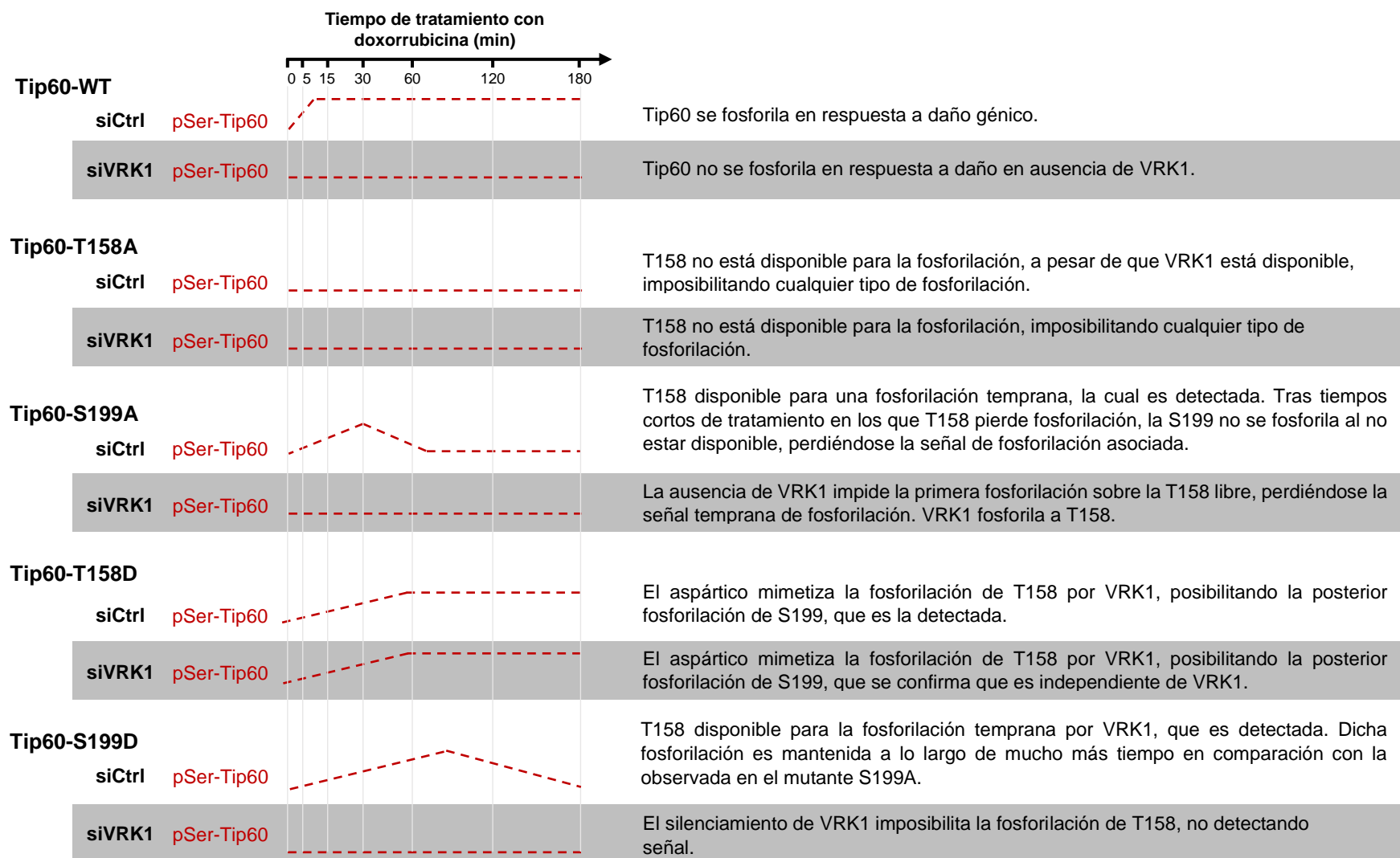


Figura 78. Representación esquemática de las dinámicas de fosforilación de Tip60 wild type y diferentes mutantes de Tip60 en respuesta a daño génico tanto en presencia (fondo claro) como en ausencia (fondo oscuro) de VRK1. A la derecha se describen las principales conclusiones obtenidas de cada uno de los resultados.

4. EFECTO DE LAS FOSFORILACIONES DE TIP60 IDENTIFICADAS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LA ACETILTRANSFERASA A LO LARGO DE LA DDR

Anteriormente se ha demostrado que VRK1 modula tres aspectos diferentes de Tip60 en respuesta a daño génico: estabilidad, localización subcelular y actividad acetiltransferasa. Sin embargo, no se había podido determinar cómo la fosforilación descrita en ese apartado podía estar regulando de forma conjunta esas tres propiedades a lo largo de la respuesta al daño génico. La identificación de dos fosforilaciones diferentes de Tip60, directa e indirectamente dependientes de VRK1, abre una posibilidad a la hora de aclarar esta situación. En otras palabras, ambas fosforilaciones, que ocurren secuencialmente, podrían estar coordinando los tres efectos descritos de forma lógica y ordenada. Para afrontar esta perspectiva, decidimos utilizar diferentes mutantes no fosforilables (T158A y S199A) y fosfomiméticos (T158D y S199D) de Tip60 y realizar una serie de experimentos que permitieran determinar su comportamiento tanto a nivel de actividad acetiltransferasa, como de estabilidad y localización subcelular. Así, variaciones en el comportamiento de dichos mutantes respecto a Tip60 *wild type* permitirían asociar cada una de las fosforilaciones identificadas en la T158 y S199 con la regulación de una determinada propiedad de Tip60.

En primer lugar, decidimos analizar la estabilidad de los mutantes de Tip60. En ausencia de daño génico, estudios de estabilidad con cicloheximida revelaron una gran inestabilidad de los mutantes no fosforilables T158A y S199A, no sólo en ausencia de VRK1 (como ocurría con Tip60 *wild type*) sino también en presencia de la quinasa. Por su parte, el mutante S199D mostraba un comportamiento similar al de Tip60 *wild type*, mientras que el mutante T158D era estable tanto en presencia como en ausencia de VRK1. Este último resultado, en el que la sustitución de la treonina en la posición 158 por aspártico está mimetizando el efecto de la fosforilación, parecía indicar que era la fosforilación en este residuo el que confiere estabilidad a Tip60. Para confirmar esto, decidimos analizar la capacidad que los mutantes T158A y S199A, que mostraban gran inestabilidad, tienen para reestablecer sus niveles proteicos. Observamos que el mutante T158A, que tal y como se ha descrito anteriormente tiene incapacitada su fosforilación en la S199 al ser dependiente de una fosforilación previa en la T158, recuperaba sus niveles proteicos a partir de las 2 horas de retirar la cicloheximida. Este comportamiento era idéntico independientemente de la ausencia o presencia de daño génico. Sin embargo, el mutante S199A, que sí puede ser fosforilado en la T158 en respuesta a daño, recuperaba sus niveles proteicos de forma mucho más precoz (a partir de la media hora de retirada de cicloheximida) cuando dicha fosforilación en la T158 se inducía mediante un tratamiento con doxorrubicina. Además, el silenciamiento génico de *VRK1* y la consecuente pérdida de la fosforilación en la T158 en respuesta a daño génico suponía nuevamente una recuperación mucho más lenta de los niveles proteicos de la proteína. De esta manera se concluía que la fosforilación en la T158, pero no la fosforilación en la S199, era responsable de conferir la estabilidad a Tip60. Además, posteriores experimentos en los que se analizaba el grado de ubiquitinación de los diferentes mutantes en respuesta a daño génico confirmaban que este aumento de estabilidad de Tip60 era debido a una protección que la fosforilación en la T158 ejercía en su marcaje para la degradación vía proteasoma por las ubiquitina ligasas RNF8 o Mdm2.

En relación con los resultados obtenidos, cabe destacar un estudio previo que ya demostraba un aumento de la vida media de Tip60 cuando las células eran sometidas a daño génico (Legube et al., 2002). De acuerdo con este estudio, Tip60 se encuentra interaccionando con Mdm2 en condiciones basales. Esta interacción posibilita la ubiquitinación de Tip60, que mantiene unos niveles proteicos relativamente bajos en la célula. Tras la inducción de daño génico, los niveles de Tip60 aumentan de manera significativa, lo cual está directamente asociado a una disrupción de su interacción con Mdm2. Las conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral complementan esta información y sitúan a la quinasa VRK1 como un elemento clave en este proceso (figura 79). Aparentemente, la fosforilación de la T158 de Tip60 durante la respuesta a daño génico podría estar detrás de esta pérdida de especificidad de Tip60 por Mdm2, lo cual justificaría el descenso de ubiquitinación observado tanto en Tip60 *wild type* tras la inducción de daño génico como en el mutante T158D, independientemente de la inducción de daño. Así, sería conveniente realizar nuevos experimentos que confirmaran esta hipótesis. Entre ellos, uno muy interesante podría ser el análisis de la interacción Tip60-Mdm2 en células incapaces de expresar *VRK1*. También sería muy interesante estudiar dicha interacción de Mdm2 con los mutantes de Tip60 T158A, para el cual se espera una interacción estable incluso en respuesta a daño génico, y T158D, para el cual se espera una pérdida de interacción incluso en

ausencia de daño génico. En base a esto, existen trabajos previos que demuestran un mecanismo mediado por VRK1, idéntico al descrito para Tip60, que aumenta la estabilidad del factor de transcripción p53 (Campillo-Marcos y Lazo, 2018). De nuevo, VRK1 sería responsable de fosforilar a p53 en respuesta a daño génico, lo cual evitaría su interacción con Mdm2. Como resultado, el factor de transcripción se acumularía en la célula y conduciría a una activación transcripcional de los genes implicados en la parada de ciclo celular. Estos resultados constituyen un apoyo fundamental para el mecanismo de regulación de Tip60 planteado. Por último, cabe destacar que, junto con Mdm2, se ha identificado a RNF8 como otra ubiquitina-ligasa que también participa en el marcaje de Tip60 para su degradación, por lo que sería interesante estudiar si el mecanismo planteado es válido para ambas ubiquitina-ligasas.

De acuerdo con el modelo planteado, la estabilidad de Tip60 mediada por VRK1 juega un papel fundamental en el contexto del daño génico, donde la fosforilación de la T158 tiene lugar. Sin embargo, algunos de los experimentos realizados en los que también se demuestra que VRK1 estabiliza a la proteína se realizaron en ausencia de daño. Por lo tanto, estos resultados aparentemente son incompatibles con el modelo. Esta incompatibilidad podría explicarse a partir del hecho de que las células en estos experimentos estén siendo tratadas con cicloheximida. El bloqueo de la síntesis *de novo* de proteínas provoca que la cantidad de Tip60 en la célula no se pueda renovar y esté, por lo tanto, limitada. Ante esta situación y teniendo en cuenta las funciones esenciales que Tip60 desempeña no sólo en el contexto de daño génico, sino también en procesos como el control de la transcripción, VRK1 podría estar igualmente fosforilando a Tip60 para evitar así su degradación vía proteasoma. En base a esto, hubiera sido conveniente analizar el grado de fosforilación de las diferentes variantes de Tip60 en los experimentos mencionados. Por otro lado, el tratamiento de cicloheximida y la consecuente incapacidad de las células para llevar a cabo la síntesis proteica también podría estar induciendo un estrés celular significativo por sí mismo bajo el cual, la fosforilación de Tip60 por VRK1 esté estimulada como mecanismo de respuesta. En cualquier caso, resulta evidente el papel central que VRK1 ejerce sobre la estabilidad de la acetiltransferasa.

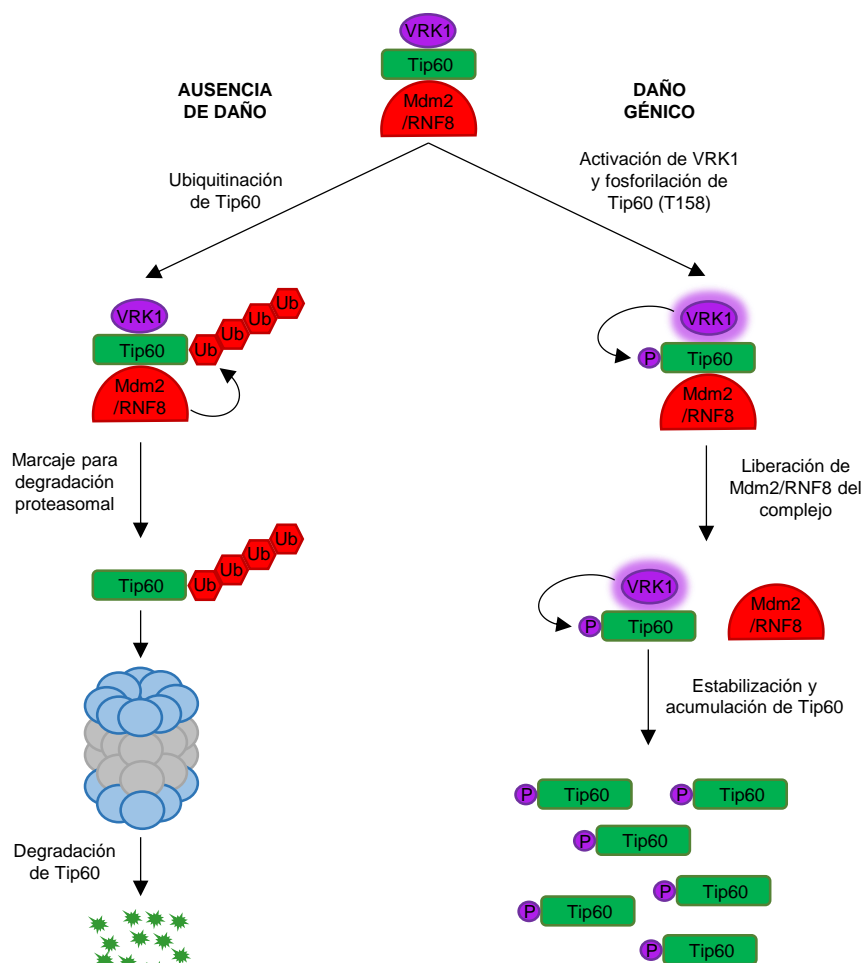


Figura 79. Esquema del modelo planteado acerca de la estabilización de Tip60 en respuesta a daño mediada por la fosforilación de la T158 a través de VRK1.

Tras estudiar la estabilidad de los diferentes mutantes en el contexto de daño génico, el siguiente objetivo planteado fue determinar el efecto de cada una de las fosforilaciones identificadas en la localización subnuclear de Tip60. Para ello, utilizando de nuevo los diferentes mutantes no fosforilables (T158A y S199A) y fosfomiméticos (T158D y S199D) de Tip60, realizamos un fraccionamiento nuclear a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con doxorrubicina y analizamos los niveles de cada uno de los mutantes en las fracciones nucleoplasmática y cromatínica. Resultó que el mutante no fosforilable T158A no se acumulaba en ningún momento en la cromatina, mientras que Tip60-S199A sí experimentaba una acumulación en la cromatina, previa fosforilación de la T158, a lo largo del tiempo de tratamiento. Esto, junto con el hecho de que el mutante T158D aparecía unido a la cromatina incluso en ausencia de daño mientras que el mutante S199D, al igual que su antagonista S199A, se acumulaba de forma progresiva en la cromatina a medida que la fosforilación en la T158 tenía lugar, permitió concluir que la fosforilación en la T158 era la única necesaria para posibilitar la translocación de Tip60 a la región cromatínica dañada. Este fenómeno es compatible con el hecho de que VRK1 sea responsable de fosforilar directamente dicho residuo. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la activación de VRK1 en respuesta a daño génico requiere de una interacción con diferentes histonas que posibilitan su cambio conformacional (Kang et al., 2007; Wiebe y Jamin, 2016). En este sentido, se esperaba que la fosforilación de Tip60 tuviera lugar en la región cromatínica una vez que VRK1 fuera activado en la misma. De esta manera, la rápida respuesta de Tip60 tras la aparición del daño génico, siendo capaz de acetilar diferentes sustratos tras los primeros minutos de daño, estaría posibilitada por el efecto de dicha fosforilación temprana en la T158 que promueve su acumulación en la región cromatínica.

Llegados a este punto, se sabía que la fosforilación en la T158 era responsable de dos efectos fundamentales sobre Tip60: por un lado, aumentaba su estabilidad y, por otro, posibilitaba su unión a la cromatina. Sin embargo, el orden cronológico en el que ambos fenómenos tiene lugar no ha podido ser demostrado. En base a esto, una primera posibilidad es que la fosforilación en la T158 aumente en primer lugar la estabilidad de Tip60 y, como consecuencia, se produzca una acumulación de la proteína a nivel nuclear que facilite su translocación a la cromatina. Ahora bien, esta hipótesis parece poco probable, dado que el fenómeno de translocación de Tip60 se observa rápidamente tras los primeros minutos de inducción de daño génico. En este lapso de tiempo es difícil, por lo tanto, asumir que el cambio en la estabilidad y niveles proteicos de Tip60 sean tan significativos como para que se posibilite dicha acumulación cromatínica. Por el contrario, una segunda posibilidad es que la fosforilación en la T158 esté directamente asociada a la unión de Tip60 en la cromatina. Junto con esta rápida translocación y de forma independiente, Tip60, tal y como se ha explicado en el modelo de la figura 79, se liberaría de Mdm2 y, al no ser degradada, experimentaría una acumulación significativa de sus niveles proteicos en la cromatina. Teniendo en cuenta esto, sería interesante realizar más estudios que permitieran esclarecer la interconexión entre los dos efectos observados, sujetos a una misma fosforilación en la T158. Además, convendría estudiar si el propio anclaje de Tip60 a la cromatina promovido por VRK1 favorece la estabilización de la HAT o si, por el contrario, basta con la fosforilación en la T158, independientemente de si Tip60 está unida a la cromatina, para impedir su degradación.

Por último, quisimos analizar la manera en la que cada una de las fosforilaciones en la T158 y S199 está afectando a la actividad acetiltransferasa de Tip60. Para ello, en primer lugar, se analizó *in vitro*, a partir de mutantes de Tip60 purificados de células sometidas a diferentes condiciones, la actividad acetiltransferasa de cada uno de ellos. De esta manera, evitábamos que otros factores que pudieran estar condicionando la actividad acetiltransferasa, como el anclaje a la cromatina previamente descrito, pudieran interferir con los resultados. Observamos una incapacidad de los mutantes no fosforilables T158A y S199A para ejercer su actividad catalítica en respuesta a daño, así como una significativa actividad catalítica de los mutantes T158D y S199D en este contexto. Una diferencia fundamental entre los mutantes fosfomiméticos era el hecho de que el mutante S199D mantenía una actividad catalítica muy elevada incluso cuando había sido purificado a partir de células no sometidas a daño génico. Dado que bajo estas condiciones la fosforilación en la T158 de este mutante no se producía, este resultado parecía indicar que la fosforilación en la S199 era suficiente para la actividad acetiltransferasa de Tip60. Para confirmar esto, se analizó *in vivo* tanto la actividad autocatalítica como la actividad acetiltransferasa de sustrato de cada uno de los mutantes. Los resultados obtenidos del estudio autocatalítico confirmaban que basta una fosforilación en la S199 para que Tip60 sea catalíticamente activa, ya que el mutante S199D era capaz de autoacetilarse por sí mismo incluso cuando la fosforilación previa en la T158 estaba impedida. Sin embargo,

sorprendentemente, al analizar la actividad de los diferentes mutantes sobre la H4K16 y ATM en respuesta a daño génico, se observó que el mutante S199D únicamente era capaz de fosforilar los sustratos en presencia de VRK1, cuando la fosforilación en la T158 tenía lugar. Por lo tanto, mientras que para la actividad autocatalítica de Tip60 basta la fosforilación en la S199, la actividad de sustrato requiere de ambas fosforilaciones en la T158 y la S199. La interpretación de estos resultados sugiere que para que Tip60 ejerza sus funciones a lo largo de la DDR, es necesaria una estabilización y acumulación previa de la proteína a nivel de la cromatina. Por último, conviene matizar la conclusión obtenida del estudio de autoacetilación realizado sobre mutantes de Tip60, según la cual la autoacetilación y activación de la proteína dependen únicamente de la fosforilación en la S199. *In vivo*, para que Tip60 *wild type* se fosforile en la S199, es necesaria una fosforilación previa en la T158, tal y como se ha demostrado en este trabajo. Por lo tanto, realmente ambas fosforilaciones, la primera en la T158 de forma indirecta y la segunda en la S199 de forma directa, son necesarias para la autoactivación de Tip60. Dicho en otras palabras, la fosforilación en la T158 durante la DDR posibilita la fosforilación en la S199, siendo esta última la que confiere la capacidad autocatalítica a Tip60.

Como resumen de los resultados discutidos en este apartado, se establece un modelo cronológico de fosforilaciones de Tip60 y consecuencias funcionales derivadas de las mismas a lo largo de la respuesta al daño génico. Este modelo aparece representado esquemáticamente en la figura 80. En primer lugar, tras la aparición de daño génico, uno de los primeros eventos que tiene lugar es la activación de VRK1. Como consecuencia, entre otras muchas funciones, VRK1 va a fosforilar a Tip60 en su T158, lo que permite el reclutamiento de la HAT a la cromatina. Al mismo tiempo, esta fosforilación va a posibilitar que Tip60 aumente su estabilidad proteica, probablemente debido a la liberación de las ubiquitina ligasas Mdm2 y/o RNF8, que se encontraban unidas a Tip60 para marcar su degradación vía proteasoma (ver figura 79). Todo esto se traduce en una retención y acumulación significativa de Tip60 en la cromatina. De esta manera, quedaría asegurada una rápida respuesta de la acetiltransferasa a lo largo de la DDR. Además, la fosforilación en la T158 conduce a una segunda fosforilación, a través de una quinasa desconocida, en la S199. Esta fosforilación, por su parte, activa parcialmente a Tip60, lo que posibilita un fenómeno de autoacetilación y activación completa. Al estar acumulada en la cromatina, Tip60 va a tener acceso a los diferentes sustratos a los que acetila a lo largo de la DDR, entre los cuales se encuentran la H4K16 y ATM, también localizados en la cromatina o estrechamente asociados a ella. Finalmente, tal y como se ha descrito anteriormente, la acetilación de ambos sustratos desencadena la cascada de señalización que posibilitará la reparación del daño.

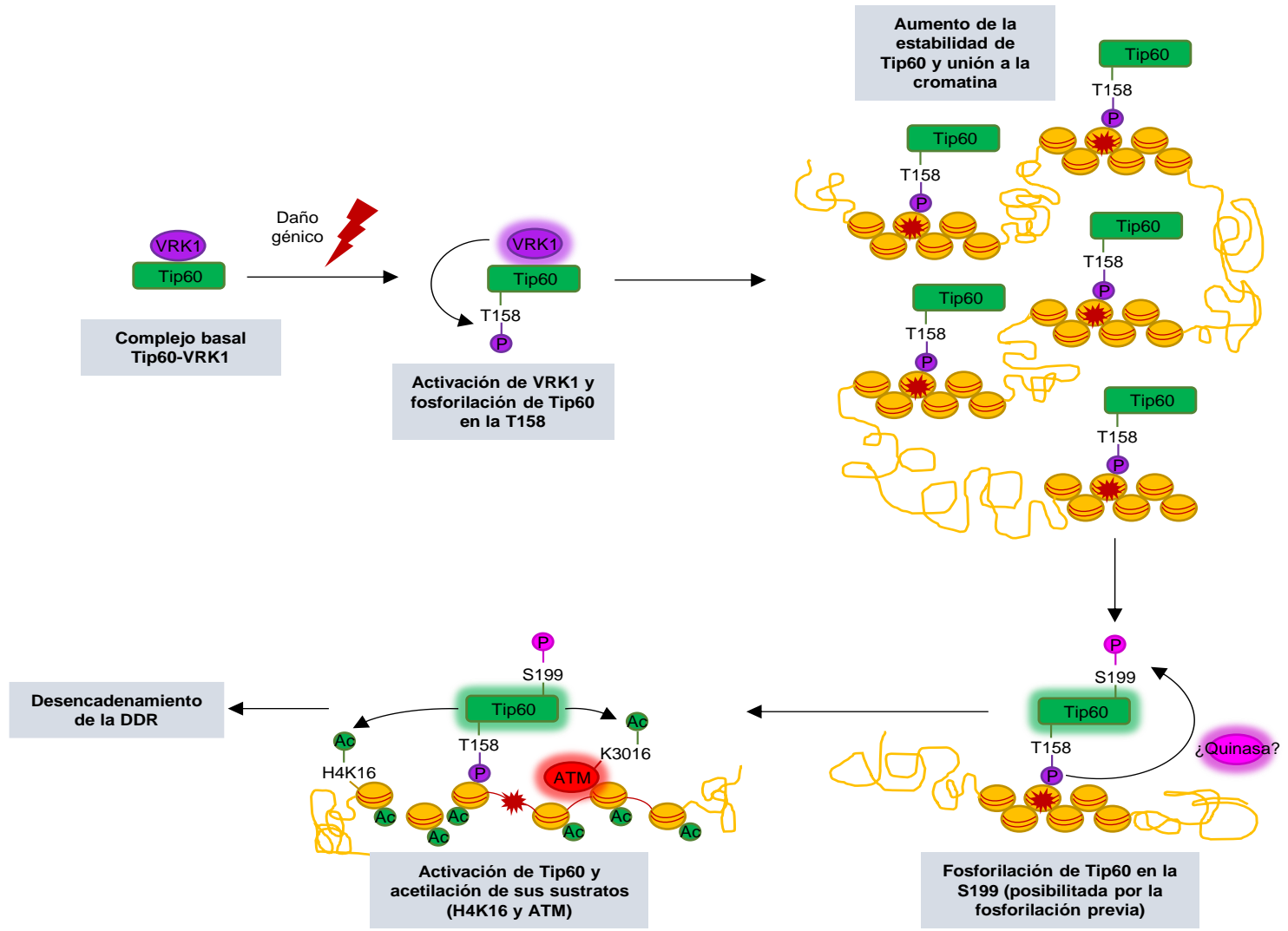


Figura 80. Esquema del modelo planteado en este trabajo acerca de la regulación que VRK1 ejerce sobre Tip60 a lo largo de la DDR.

5. DEFECTOS DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO GÉNICO EN LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS ASOCIADAS A VRK1

Más allá de los altos niveles de expresión de VRK1 asociados al desarrollo de tumores de mal pronóstico (Campillo-Marcos y Lazo, 2018; Ren et al., 2020), hasta la fecha no se han identificado mutaciones de esta quinasa que sean responsables del desarrollo de enfermedades oncológicas. Por el contrario, a lo largo de los últimos años sí que se ha podido asociar la aparición de diferentes enfermedades neurodegenerativas a la portabilidad de mutaciones de VRK1 (Martin-Doncel et al., 2019). Tal es así que, desde 2009, se han descrito un total de 22 mutaciones de VRK1 responsables del desarrollo de estos síndromes neurológicos, que se manifiestan cuando los dos alelos de *VRK1* son portadores, ya sea en homocigosis o heterocigosis, de una o dos de estas mutaciones, respectivamente.

La implicación de estas mutaciones en la patogénesis de dichas enfermedades ha hecho que el interés por VRK1 crezca en el ámbito neurológico, abriendo una nueva posibilidad para esclarecer las bases asociadas al desarrollo de las mismas. En base a esto, se ha realizado una primera caracterización bioquímica de cada uno de los mutantes de VRK1 identificados, concluyendo que estas variantes patogénicas muestran alteraciones en su estabilidad proteica y/o actividad quinasa (Martin-Doncel et al., 2019). Sin embargo, más allá de esta primera caracterización, el mecanismo patogénico específico por el cual estas variantes de VRK1 conducen al desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa sigue siendo desconocido. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, una hipótesis podría ser que las variantes patogénicas de VRK1 fueran incapaces de fosforilar a Tip60 y que, como consecuencia, el desarrollo de la respuesta al daño génico se viese afectado. Esta hipótesis se apoya en estudios preliminares en los que se observa que los mutantes de VRK1 eran incapaces de inducir la acetilación de la lisina 16 de la histona H4, así como la formación de focos de γ H2AX (datos no publicados). En base a esto, los experimentos realizados en esta tesis doctoral con líneas celulares que expresan algunos de los mutantes de VRK1 mejor caracterizados han demostrado que, en efecto, ninguna de las variantes estudiadas (R89Q, R133C, G135R y L195V) es capaz de fosforilar a Tip60. Este resultado justifica los resultados previos acerca de la acetilación de la H4K16 y la formación de focos de γ H2AX. Además, cabe destacar que, de entre estas variantes, R89Q y L195V mostraban actividad catalítica en ensayos de fosforilación *in vitro* realizados (Martin-Doncel et al., 2019). Esto parece indicar, por lo tanto, que las mutaciones de VRK1 encontradas en pacientes pueden estar afectando la actividad de la quinasa sobre Tip60 no sólo como consecuencia de una pérdida de actividad catalítica, sino también en función de otros aspectos, como pueden ser la interacción de ambas proteínas o su capacidad para ser reclutadas a la región cromatínica. Así, sería necesario realizar nuevos estudios que permitieran revelar las causas por las que los mutantes de VRK1 ven incapacitada su función a lo largo de la DDR. En conclusión, los defectos en la DDR que muestran las células que expresan mutantes patogénicos de VRK1 sugieren que el desarrollo del cuadro clínico y las enfermedades neurodegenerativas asociadas pueda ser debido a una incapacidad para reparar lesiones en el ADN y una consecuente acumulación de daño génico, de forma que las células afectadas pierden su funcionalidad. En este sentido, en la bibliografía está ampliamente descrito que alteraciones en la DDR conducen frecuentemente al desarrollo de diferentes enfermedades neurodegenerativas, lo cual apoya esta hipótesis (McKinnon y Caldecott, 2007; Bianchi et al., 2018).

A nivel clínico, se sabe que las células afectadas en estas enfermedades neurodegenerativas asociadas a mutaciones de VRK1 son, principalmente, neuronas motoras distales. Este fenómeno resulta interesante, especialmente teniendo en cuenta la importancia de VRK1 no sólo en el contexto de la reparación del daño génico, sino también en otros aspectos tan importantes como la proliferación celular (Valbuena et al., 2011), la regulación transcripcional (Vega et al., 2004) o la formación de cuerpos de Cajal (Canterero et al., 2015), lo que haría pensar que el abanico de células afectadas fuera mucho más amplio. Por lo tanto, cómo las mutaciones de VRK1 descritas afectan exclusivamente a la funcionalidad de neuronas motoras y no de otros tipos celulares necesita ser esclarecido. En este sentido, sería interesante estudiar si, junto con los defectos en la DDR, otras rutas de señalización celular y funciones celulares mediadas por VRK1 también se encuentran alteradas en células que expresan variantes patogénicas de la quinasa. Entre ellas, cobra especial importancia la función que VRK1 ejerce sobre la formación de los cuerpos de Cajal. Se ha descrito que la quinasa interacciona y fosforila a la coilina, componente principal de los mismos

(Canterero et al., 2015). Además, esta proteína también interacciona con otras proteínas implicadas en el desarrollo de fenotipos neuropatológicos, como SMN (del inglés, *Survival Motor Neuron*) o ataxina-1 (Hebert et al., 2001; Hong et al., 2003; Chaytow et al., 2018), por lo que una desregulación de la fosforilación de la coilina asociada a VRK1 podría estar contribuyendo al desarrollo de la patología.

Por otro lado, un estudio establece que las neuronas motoras afectadas también muestran una limitación en el proceso de migración a raíz de una reducción de los niveles proteicos de VRK1 y una consecuente inactivación de la proteína precursora beta-amiloidea (APP) (Vinograd-Byk et al., 2015). De forma paralela, otros estudios han sido capaces de establecer una conexión directa entre APP y Tip60. Concretamente se ha demostrado que ambas proteínas se encuentran interaccionando y formando un complejo basal fundamental para el control transcripcional y desarrollo del sistema nervioso. Para ello, el complejo es reclutado a los promotores de determinados genes diana donde Tip60 se encarga de acetilar las histonas y promover así la transcripción de dichos genes (Cao y Südhof, 2001; Slomnicki y Lesniak, 2008). En base a esto, también se ha descubierto que, ante determinadas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, existe una pérdida en la actividad de Tip60 y, en consecuencia, un defecto en la acetilación de dichos promotores, seguido de una expresión aberrante de los genes diana. Como resultado, la proteína APP del complejo es capaz de inducir apoptosis en células del sistema nervioso central, lo cual contribuye enormemente al desarrollo de la enfermedad (Pirooznia et al., 2012). Por lo tanto, estos últimos estudios (Pirooznia et al., 2012 y Vinograd-Byk et al., 2015) permiten establecer una nueva y prometedora interconexión entre Tip60 y VRK1 en el contexto neurodegenerativo asociado a una diana común como es APP. Teniendo en cuenta esto, es posible que el efecto que cada una de ellas ejerce sobre la actividad de APP sea consecuencia de un mismo proceso de regulación de Tip60 por VRK1, de acuerdo con el modelo descrito en este trabajo de tesis doctoral. En apoyo a esta idea destaca un estudio en el que se plantea la posibilidad de que una desregulación de los mecanismos de control epigenético (como puede ser el descrito entre Tip60 y VRK1) y el resultante establecimiento de un epigenoma aberrante pueden contribuir a disfunciones cognitivas (Penner et al., 2010). En este sentido, sería interesante estudiar si, por ejemplo, VRK1 está formando parte del complejo APP-Tip60 o si la inducción de apoptosis vía APP asociada a una pérdida de actividad de Tip60 en modelos de Alzheimer puede ser dependiente de una desregulación de la actividad y control de VRK1 sobre la acetiltransferasa. De igual manera, las enfermedades neurodegenerativas de pacientes con VRK1 mutado también podrían manifestarse en base a la hipótesis planteada, de forma que la pérdida de actividad de la quinasa conduzca a una inactividad de Tip60 que favorezca la apoptosis de las neuronas motoras distales afectadas vía APP.

Como conclusión de este apartado, se puede considerar el defecto en el desarrollo de la DDR asociado a los mutantes de VRK1 como una de las posibles causas que explican la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas asociadas. Sin embargo, existen indicios de que otras muchas funciones celulares pueden estar viéndose alteradas. Por ello, nuevos estudios que determinen el comportamiento de cada una de estas funciones celulares en función de las mutaciones en VRK1 podrían aportar nuevos datos fundamentales para el entendimiento de estos síndromes neurológicos severos. Además, la heterogeneidad en los cuadros clínicos de los pacientes afectados por mutaciones de VRK1 parece indicar la existencia de otras alteraciones genéticas que también puedan contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la mayoría de los casos clínicos ocurren bien en familias consanguíneas o bien dentro de un subgrupo étnico específico, aumentando así considerablemente la incidencia de diferentes variantes patogénicas.

6. VRK1 COMO REGULADOR DEL EPIGENOMA CELULAR. PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo, hemos podido identificar a VRK1 como una proteína clave para la acetilación de la H4K16 durante la DDR. El hecho de que se trate de una quinasa nos llevó a pensar que la regulación de esta modificación epigenética mediada por VRK1 se estaba realizando de forma indirecta, probablemente a través de la modulación de la actividad del *writer* epigenético responsable de catalizar dicha modificación, Tip60. Los resultados mostrados en esta tesis confirman esta hipótesis. Sin embargo, junto con Tip60, existen multitud de moduladores epigenéticos más, ya sean *writers* o *erasers*, implicados en el establecimiento de un epigenoma celular específico según las necesidades de la célula (Hyun et al., 2017). Por consiguiente, la acetilación de la H4K16 también es sólo una de las múltiples modificaciones epigenéticas que juegan un papel clave en funciones tan importantes como la DDR. El resultado de todo esto es una red compleja de modificadores post-traduccionales de histonas interconectados que establecen y modifican el epigenoma, de forma sincronizada, a lo largo de la vida celular. Además, la complejidad de esta red de interconexiones aumenta en base a dos aspectos fundamentales. Por un lado, la posibilidad de que un mismo residuo de las colas N-terminales de histonas pueda incorporar diferentes modificaciones epigenéticas (Latham y Dent, 2007). Este fenómeno, conocido como *crossstalk in situ*, va a requerir la coordinación de, al menos, cuatro modificadores epigenéticos: 2 *writers*, encargados de incorporar cada una de las modificaciones epigenéticas (en caso de que sólo sean dos las modificaciones que puede incorporar el residuo), y dos *erasers*, responsables de retirar la modificación establecida para liberar el residuo y poder incorporar así la otra modificación. El otro aspecto importante a tener en cuenta es la existencia de *crossstalks* en cis o en trans, tanto positivos como negativos, que provocan que el establecimiento de muchas marcas epigenéticas dependa directamente de la presencia o ausencia de otras en residuos diferentes tanto de la misma histona como de histonas diferentes.

En base a todo esto, se asume que debe existir un control preciso, coordinado y eficaz del conjunto de modificadores epigenéticos con el fin de garantizar el mantenimiento y/o modificación del epigenoma en función de los requerimientos celulares. Sin embargo, el conocimiento del mismo hasta la fecha es escaso. Ante los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, existe la posibilidad de que VRK1 constituya una pieza clave en este mecanismo responsable de regular el epigenoma celular en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. En primer lugar, la regulación de Tip60 y, por consiguiente, de la H4K16ac durante la DDR, permite plantear la hipótesis de que VRK1, con el propósito de integrar y controlar dicha modificación epigenética, esté regulando negativamente también la actividad de SIRT1, la deacetilasa responsable de liberar el grupo acetilo (figura 81). En base a esto, sería interesante realizar estudios similares a los planteados en esta tesis doctoral sobre esta deacetilasa y determinar así, si VRK1 tiene alguna implicación en el control de su actividad durante la DDR. De hecho, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio (no publicados) ya han demostrado la existencia de una interacción de VRK1 con SIRT1.

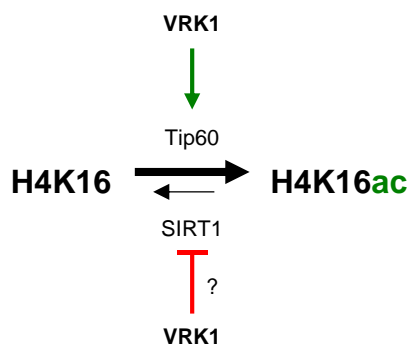


Figura 81. Modelo de regulación de la acetilación de la H4K16 mediada por VRK1. Hasta la fecha, se sabe la regulación positiva que VRK1 ejerce sobre Tip60, favoreciendo la acetilación del residuo. De forma hipotética se plantea que VRK1 también contribuya a esta acetilación mediante una fosforilación inactivadora de SIRT1, la deacetilasa antagonista de Tip60.

Por otro lado, se sabe que la acetilación es la única modificación epigenética que puede incorporar la lisina 16 de la histona H4. En este aspecto, la imposibilidad de un *crosstalk in situ* en este residuo supone que no son necesarios más *writers* y *erasers* para modular la epigenética del mismo. Sin embargo, se sabe que la H4K16ac es capaz de establecer un *crosstalk* en cis con la H4K20me2, de forma que el establecimiento de una de estas modificaciones imposibilita necesariamente el establecimiento de la otra, y viceversa. Además, ambas modificaciones, tal y como se ha discutido anteriormente, desempeñan funciones fundamentales durante la DDR, la H4K16ac en etapas tempranas a la hora de posibilitar la descompactación de la cromatina y activación de ATM, y la segunda en etapas más tardías, posibilitando el reclutamiento de 53BP1. Esto lleva a pensar que VRK1, junto con la regulación de la H4K16ac, también pueda estar involucrada en la regulación de la H4K20me2. Por ello, sería interesante estudiar si VRK1 está regulando de forma opuesta la actividad de Tip60 y de MMSET (*writer* de H4K20me2), de manera que en el momento de activar una, también sea capaz de inactivar la otra. Esto ocurriría en las etapas tempranas de la DDR, mientras que, en etapas más avanzadas, VRK1 perdería especificidad por estos moduladores epigenéticos, volviéndose Tip60 inactivo y MMSET activo. Alternativamente, también existe la posibilidad de que, en el momento de activar Tip60, VRK1 también ejerza un efecto activador sobre la demetilasa implicada en liberar las marcas de H4K20me2. Posteriormente, más avanzada la DDR, la pérdida de fosforilación observada en Tip60, también iría acompañada de una pérdida de fosforilación y actividad en dicha demetilasa, favoreciendo la dimetilación de la H4K20. En base a esto, se establece un modelo de regulación del *crosstalk* entre H4K16ac y H4K20me2 a lo largo de la DDR mediado por VRK1 (figura 82).

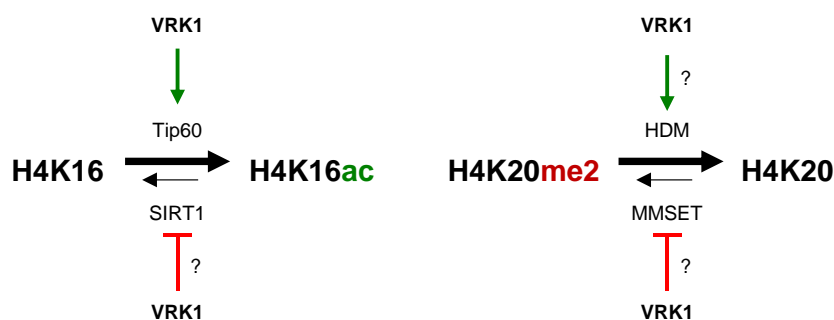


Figura 82. Modelo hipotético de la regulación ejercida por VRK1 sobre el *crosstalk* existente entre la acetilación de la H4K16 y la dimetilación de la H4K20. Junto con la activación de Tip60, una activación temprana de VRK1 durante la DDR podría conducir de forma simultánea a una activación de la demetilasa responsable de liberar la marca de la H4K20 y/o a una inactivación de la deacetilasa SIRT1 y la metiltransferasa MMSET. Así, la posterior inactivación de VRK1 en etapas más tardías de la DDR permitiría orientar el balance hacia la dimetilación de la H4K20 y el reclutamiento de 53BP1.

Recientemente se ha descrito un nuevo *crosstalk* en trans fundamental durante la DDR entre la acetilación de la H4K16 y la trimetilación de la H3K36 (Li y Wang, 2017). De acuerdo con el estudio publicado, se establece que la trimetilación en la H3K36 durante la DDR precede y es indispensable para una posterior acetilación de la H4K16. Esto es debido, tal y como se ha descrito anteriormente, a que dicha trimetilación posibilita la unión de Tip60 a la cromatina, bien directamente (a través de la interacción de la marca de trimetilación con su cromodominio), o bien indirectamente (a través de LEDGF, que actúa como proteína puente). La rápida respuesta celular durante la DDR, que posibilita una acetilación de la H4K16 instantes posteriores a la aparición del daño, pone de manifiesto la necesidad de un sistema de control e interconexión muy rápido y eficaz entre estas modificaciones. Habiendo demostrado en esta tesis doctoral que VRK1 es necesaria para la unión y acumulación de Tip60 en la cromatina, existe la posibilidad de que la quinasa también esté modulando el establecimiento de marcas de H3K36me3 (figura 83).

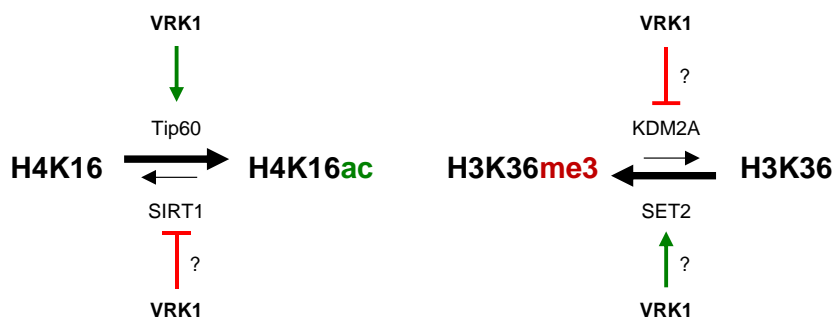


Figura 83. Modelo hipotético de la regulación ejercida por VRK1 sobre el *crosstalk* existente entre la acetilación de la H4K16 y la trimetilación de la H3K36 durante la DDR.

Para ello, al igual que en el caso anterior, se plantea un modelo según el cual VRK1 podría estar fosforilando y activando SET2, enzima responsable de catalizar la trimetilación de H3K36 en respuesta a daño génico. Alternativamente, VRK1 podría ejercer también una fosforilación inactivadora sobre KDM2A, favoreciendo de igual manera la acumulación de H3K36me3. Esto, junto con la activación de Tip60 demostrada en este trabajo, haría del *crosstalk* entre H3K36me3 y H4K16ac un mecanismo de regulación epigenética muy eficaz capaz de explicar la rápida acetilación de la H4K16 durante la DDR.

Los modelos hipotéticos anteriores sitúan a VRK1 como una proteína central en la regulación global del epigenoma durante la respuesta al daño génico. Todos ellos se apoyan en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Campillo-Marcos, 2019) en los que se demuestra que el silenciamiento de *VRK1* mimetiza el efecto de diferentes inhibidores de *writers* y *erasers* implicados en el establecimiento de diversas modificaciones epigenéticas. Por lo tanto, estos datos parecen indicar que, en efecto, VRK1 se encuentra regulando la actividad no sólo de Tip60, sino de otros reguladores epigenéticos, y hacen factible la posibilidad de que los modelos aquí planteados sean consistentes. En base a ello, evaluar de forma más exhaustiva el papel de VRK1 en la regulación de todos estos *writers* y *erasers* podría abrir una nueva perspectiva al entendimiento del epigenoma y de cómo este es modulado en función de los requerimientos celulares en diversas situaciones fisiológicas y patológicas.

CONCLUSIONES

En base a todo lo expuesto en este trabajo de tesis doctoral, se concluye que:

1. La quinasa VRK1 y la acetiltransferasa Tip60 forman un complejo basal y estable en la célula.
2. En respuesta a daño génico, el complejo VRK1-Tip60 experimenta una activación secuencial. En primer lugar, como parte de la sensibilización al daño, VRK1 se activa, induciendo una posterior fosforilación y activación de Tip60. Esto posibilita que la acetiltransferasa ejerza sus funciones catalíticas sobre diferentes sustratos implicados en la respuesta al daño génico, como son la lisina 16 de la histona H4 o ATM. Por el contrario, esta fosforilación no influye en la actividad enzimática de Tip60 sobre p53, que es acetilado de manera VRK1-independiente por Tip60.
3. La fosforilación y activación de Tip60 durante la respuesta al daño génico implica la modificación secuencial de dos residuos diferentes. En primer lugar, VRK1 fosforila de forma directa al residuo T158 en los primeros minutos tras la aparición del daño. Posteriormente, la fosforilación en la T158 es imprescindible y posibilita una segunda fosforilación en la S199 de Tip60 a través de otra quinasa diferente a VRK1, ATM o JNK, no identificada en este trabajo.
4. Las dos fosforilaciones identificadas tienen diferentes consecuencias sobre la funcionalidad de Tip60 en la respuesta al daño génico. Por un lado, la fosforilación en la S199 sería suficiente para la propia autoacetilación y activación de Tip60. Sin embargo, *in vivo*, la fosforilación previa en la T158, además de promover la modificación post-traducciona en la S199, estabiliza a la proteína y posibilita su translocación y acumulación en la cromatina. Estos efectos son fundamentales para la accesibilidad de Tip60 hacia sus sustratos H4K16 y ATM y su consecuente acetilación.
5. Pacientes con enfermedades neurodegenerativas asociadas a mutaciones en *VRK1* pueden mostrar alterada la respuesta celular al daño génico como consecuencia de una inactivación de Tip60. En consecuencia, el daño génico acumulado podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad.
6. VRK1 se sitúa como un modulador epigenético clave en la respuesta al daño génico al regular la actividad de Tip60. En este aspecto, es posible que VRK1 también esté regulando la actividad de otros *writers* y/o *erasers* epigenéticos, actuando como un eje central en la regulación y coordinación del conjunto de modificaciones epigenéticas que tienen lugar a lo largo de la respuesta al daño génico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams-Cioaba, M. A., & Min, J. (2009). Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 93-105.
- Aihara, H., Nakagawa, T., Yasui, K., Ohta, T., Hirose, S., Dhomae, N., ... & Ito, T. (2004). Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes & development*, 18(8), 877-888.
- Alabert, C., Jasencakova, Z., & Groth, A. (2017). Chromatin replication and histone dynamics. *DNA Replication*, 311-333.
- Amor, D. J., Kalitsis, P., Sumer, H., & Choo, K. A. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends in cell biology*, 14(7), 359-368.
- Arents, G., & Moudrianakis, E. N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11170-11174.
- Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K., & Schapira, M. (2012). Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 11(5), 384-400.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine*, 79(2), 137-158.
- Avvakumov, N., & Cote, J. (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, 26(37), 5395-5407.
- Bacon, C. W., & D'Orso, I. (2019). CDK9: a signaling hub for transcriptional control. *Transcription*, 10(2), 57-75.
- Ban ath, J. P., MacPhail, S. H., & Olive, P. L. (2004). Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer research*, 64(19), 7144-7149.
- Bantele, S. C., & Pfander, B. (2019). Quantitative mechanisms of DNA damage sensing and signaling. *Current genetics*, 66(1), 59-62.
- Bantele, S. C., Lisby, M., & Pfander, B. (2019). Quantitative sensing and signalling of single-stranded DNA during the DNA damage response. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Barcia, R., López-Borges, S., Vega, F. M., & Lazo, P. A. (2002). Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Archives of biochemistry and biophysics*, 399(1), 1-5.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., & Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Molecular cell*, 8(6), 1243-1254.
- Bar-Ziv, R., Voichek, Y., & Barkai, N. (2016). Chromatin dynamics during DNA replication. *Genome research*, 26(9), 1245-1256.
- Basu, A. K. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 970.
- Batty, P., & Gerlich, D. W. (2019). Mitotic chromosome mechanics: how cells segregate their genome. *Trends in cell biology*, 29(9), 717-726.
- Baxevanis, A. D., Arents, G., Moudrianakis, E. N., & Landsman, D. (1995). A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic acids research*, 23(14), 2685-2691.
- Bekker-Jensen, S., & Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA repair*, 9(12), 1219-1228.
- Ben, Z., Gong, L., & Qiu, Y. (2018). High expression of VRK1 is related to poor prognosis in glioma. *Pathology-Research and Practice*, 214(1), 112-118.
- Berndsen, C. E., & Denu, J. M. (2008). Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Current opinion in structural biology*, 18(6), 682-689.

- Besant, P. G., & Attwood, P. V. (2012). Histone H4 histidine phosphorylation: kinases, phosphatases, liver regeneration and cancer. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 290-293.
- Bestor, T. H., Edwards, J. R., & Boulard, M. (2015). Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6796-6799.
- Bhargava, R., Onyango, D. O., & Stark, J. M. (2016). Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends in Genetics*, 32(9), 566-575.
- Bianchi, M., Renzini, A., Adamo, S., & Moresi, V. (2017). Coordinated actions of microRNAs with other epigenetic factors regulate skeletal muscle development and adaptation. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 840.
- Bianchi, F. T., Berto, G. E., & Di Cunto, F. (2018). Impact of DNA repair and stability defects on cortical development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(21), 3963-3976.
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 837, 8-24.
- Biterge, B., & Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell and tissue research*, 356(3), 457-466.
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstone, J. R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular cell*, 48(4), 491-507.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633-1649.
- Bochtler, M., Kolano, A., & Xu, G. L. (2017). DNA demethylation pathways: additional players and regulators. *Bioessays*, 39(1), 1-13.
- Brauns-Schubert, P., Schubert, F., Wissler, M., Weiss, M., Schlicher, L., Bessler, S., ... & Maurer, U. (2018). CDK9-mediated phosphorylation controls the interaction of TIP60 with the transcriptional machinery. *EMBO reports*, 19(2), 244-256.
- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., & Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292(5525), 2333-2337.
- Bruner, S. D., Norman, D. P., & Verdine, G. L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403(6772), 859-866.
- Burden, D. A., & Osheroff, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1-3), 139-154.
- Buschbeck, M., & Hake, S. B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(5), 299-314.
- Campillo-Marcos, I., & Lazo, P. A. (2018). Implication of the VRK1 chromatin kinase in the signaling responses to DNA damage: a therapeutic target? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(13), 2375-2388.
- Campillo-Marcos, I., & Lazo, P. A. (2019). Olaparib and ionizing radiation trigger a cooperative DNA-damage repair response that is impaired by depletion of the VRK1 chromatin kinase. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-16.
- Campillo-Marcos, I. (2019). Nuevas funciones de la quinasa humana VRK1 en la respuesta al daño en el ADN y la estructura de la cromatina. [Tesis doctoral]. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. CSIC-Universidad de Salamanca.
- Campillo-Marcos, I., García-González, R., Navarro-Carrasco, E., & Lazo, P. A. (2021). The human VRK1 chromatin kinase in cancer biology. *Cancer Letters*, 503, 117-128.
- Cantarero, L., Sanz-García, M., Vinograd-Byk, H., Renbaum, P., Levy-Lahad, E., & Lazo, P. A. (2015). VRK1 regulates Cajal body dynamics and protects coilin from proteasomal degradation in cell cycle. *Scientific reports*, 5(1), 1-18.

- Cao, X., & Südhof, T. C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293(5527), 115-120.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends in cell biology*, 26(1), 52-64.
- Chae, Y. K., Anker, J. F., Oh, M. S., Bais, P., Namburi, S., Agte, S., ... & Chuang, J. H. (2018). Mutations in DNA repair genes are associated with increased neoantigen burden and a distinct immunophenotype in lung squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., & Bruick, R. K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 318(5849), 444-447.
- Chang, H. H., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(8), 495-506.
- Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J. B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., ... & Boulton, S. J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Molecular cell*, 49(5), 858-871.
- Charvet, C., Wissler, M., Brauns-Schubert, P., Wang, S. J., Tang, Y., Sigloch, F. C., ... & Maurer, U. (2011). Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53. *Molecular cell*, 42(5), 584-596.
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Chaytow, H., Huang, Y. T., Gillingwater, T. H., & Faller, K. M. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(21), 3877-3894.
- Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y. L., & Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1-CtIP-MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7713-7720.
- Chen, Q. Y., Costa, M., & Sun, H. (2015). Structure and function of histone acetyltransferase MOF. *AIMS biophysics*, 2(4), 555.
- Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular cell*, 5(6), 905-915.
- Choi, J. K., & Howe, L. J. (2009). Histone acetylation: truth of consequences? *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 139-150.
- Chuang, J. C., & Jones, P. A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research*, 61(7), 24-29.
- Ciccarone, F., Zampieri, M., & Caiafa, P. (2017, March). PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 63, pp. 123-134). Academic Press.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179-204.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends in biochemical sciences*, 25(12), 596-601.
- Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238), 591-596.
- Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S., & Khochbin, S. (1999). Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry*, 38(27), 8826-8830.
- Dalal, Y. (2009). Epigenetic specification of centromeres. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 273-282.
- Dargemont, C., & Babour, A. (2017). Novel functions for chromatin dynamics in mRNA biogenesis beyond transcription. *Nucleus*, 8(5), 482-488.

- Deem, A. K., Li, X., & Tyler, J. K. (2012). Epigenetic regulation of genomic integrity. *Chromosoma*, 121(2), 131-151.
- Dell'Aversana, C., Lepore, I., & Altucci, L. (2012). HDAC modulation and cell death in the clinic. *Experimental cell research*, 318(11), 1229-1244.
- del Puerto-Nevedo, L., Marin-Arango, J. P., Fernandez-Aceñero, M. J., Arroyo-Manzano, D., Martinez-Useros, J., Borrero-Palacios, A., ... & Garcia-Foncillas, J. (2016). Predictive value of vrk 1 and 2 for rectal adenocarcinoma response to neoadjuvant chemoradiation therapy: a retrospective observational cohort study. *BMC cancer*, 16(1), 1-9.
- DesJarlais, R., & Tummino, P. J. (2016). Role of histone-modifying enzymes and their complexes in regulation of chromatin biology. *Biochemistry*, 55(11), 1584-1599.
- Dhillon, N., & Hoekstra, M. F. (1994). Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *The EMBO journal*, 13(12), 2777-2788.
- Di Cerbo, V., & Schneider, R. (2013). Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Briefings in functional genomics*, 12(3), 231-243.
- Dianov, G. L., & Hübscher, U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic acids research*, 41(6), 3483-3490.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., ... & Lukas, C. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*, 136(3), 435-446.
- Downs, J. A., & Côté, J. (2005). Dynamics of chromatin during the repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 4(10), 1373-1376.
- Doyon, Y., & Côté, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development*, 14(2), 147-154.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., & Côté, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology*, 24(5), 1884-1896.
- Dulev, S., Tkach, J., Lin, S., & Batada, N. N. (2014). SET 8 methyltransferase activity during the DNA double-strand break response is required for recruitment of 53 BP 1. *EMBO reports*, 15(11), 1163-1174.
- Dumitrescu, R. G. (2018). Interplay between genetic and epigenetic changes in breast cancer subtypes. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*, 19-34.
- Elsässer, S. J., & D'Arcy, S. (2012). Towards a mechanism for histone chaperones. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3-4), 211-221.
- Ensminger, M., & Löbrich, M. (2020). One end to rule them all: non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *The British journal of radiology*, 93(1115), 20191054.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*, 12(12), 861-874.
- Fedorov, O., Marsden, B., Pogacic, V., Rellos, P., Müller, S., Bullock, A. N., ... & Knapp, S. (2007a). A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20523-20528.
- Fedorov, O., Sundström, M., Marsden, B., & Knapp, S. (2007b). Insights for the development of specific kinase inhibitors by targeted structural genomics. *Drug discovery today*, 12(9-10), 365-372.
- Fishel, R., & Lee, J. B. (2016). Mismatch repair. *DNA Replication, Recombination, and Repair*, 305-339.
- Fong, P. C., Boss, D. S., Yap, T. A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., ... & De Bono, J. S. (2009). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *New England Journal of Medicine*, 361(2), 123-134.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M. D., Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Leung, C. C., Huang, H., ... & Durocher, D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*, 499(7456), 50-54.

- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., ... & Flicek, P. (2019). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic acids research*, 47(D1), D766-D773.
- García-González, R., Morejón-García, P., Campillo-Marcos, I., Salzano, M., & Lazo, P. A. (2020). VRK1 Phosphorylates Tip60/KAT5 and Is Required for H4K16 Acetylation in Response to DNA Damage. *Cancers*, 12(10), 2986.
- Gates, L. A., Shi, J., Rohira, A. D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M. T., ... & O'Malley, B. W. (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14456-14472.
- Gavaravarapu, S., & Kamine, J. (2000). Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(3), 758-766.
- Germano, G., Lamba, S., Rospo, G., Barault, L., Magri, A., Maione, F., ... & Bardelli, A. (2017). Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*, 552(7683), 116-120.
- Ghobashi, A. H., & Kamel, M. A. (2018). Tip60: updates. *Journal of applied genetics*, 59(2), 161-168.
- Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S. J., Yao, M., ... & Ganesan, S. (2011). BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Molecular and cellular biology*, 31(10), 1972-1982.
- Ginsburg, D. S., Govind, C. K., & Hinnebusch, A. G. (2009). NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Molecular and cellular biology*, 29(24), 6473-6487.
- Graber, M. W., Schweinfest, C. W., Reed, C. E., Papas, T. S., & Baron, P. L. (1996). Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus. *Annals of surgical oncology*, 3(2), 192-197.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-638.
- Gomase, V. S., & Tagore, S. (2008). Kinomics. *Current drug metabolism*, 9(3), 255-258.
- Gorjánác, M., Klerkx, E. P., Galy, V., Santarella, R., López-Iglesias, C., Askjaer, P., & Mattaj, I. W. (2007). Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *The EMBO journal*, 26(1), 132-143.
- Greally, J. M. (2018). A user's guide to the ambiguous word 'epigenetics'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 207-208.
- Grozinger, C. M., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 4868-4873.
- Hake, S. B., & Allis, C. D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6428-6435.
- Happel, N., & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431(1-2), 1-12.
- Hassan, Y. I., & Zemleni, J. (2006). Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *The Journal of nutrition*, 136(7), 1763-1765.
- Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., & Dawid, I. B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic acids research*, 20(10), 2603.
- He, B., Dai, L., Zhang, X., Chen, D., Wu, J., Feng, X., ... & Zheng, S. (2018). The HDAC inhibitor quisinostat (JNJ-26481585) suppresses hepatocellular carcinoma alone and synergistically in combination with sorafenib by G0/G1 phase arrest and apoptosis induction. *International journal of biological sciences*, 14(13), 1845.
- Hebert, M. D., Szymczyk, P. W., Shpargel, K. B., & Matera, A. G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & development*, 15(20), 2720-2729.

- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., ... & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics*, 39(3), 311-318.
- Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., ... & Ren, B. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, 459(7243), 108-112.
- Henikoff, S., & Smith, M. M. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a019364.
- Henry, K. W., & Berger, S. L. (2002). Trans-tail histone modifications: wedge or bridge?. *Nature structural biology*, 9(8), 565-566.
- Hlubek, F., Löhberg, C., Meiler, J., Jung, A., Kirchner, T., & Brabletz, T. (2001). Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *The Journal of Biochemistry*, 129(4), 635-641.
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M., & Andrews, B. (1997). Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 581-586.
- Hong, S., Ka, S., Kim, S., Park, Y., & Kang, S. (2003). p80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1638(1), 35-42.
- Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., & Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*, 43(D1), D512-D520.
- Hortobagyi, G. N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs*, 54(4), 1-7.
- House, N. C., Yang, J. H., Walsh, S. C., Moy, J. M., & Freudenreich, C. H. (2014). NuA4 initiates dynamic histone H4 acetylation to promote high-fidelity sister chromatid recombination at postreplication gaps. *Molecular cell*, 55(6), 818-828.
- Hsiao, K. Y., & Mizzen, C. A. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *Journal of molecular cell biology*, 5(3), 157-165.
- Hua, S., Kallen, C. B., Dhar, R., Baquero, M. T., Mason, C. E., Russell, B. A., ... & White, K. P. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A. Z associated with breast cancer progression. *Molecular systems biology*, 4(1), 188.
- Huertas, P., & Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9558-9565.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & molecular medicine*, 49(4), e324-e324.
- Ikehata, H., & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of radiation research*, 52(2), 115-125.
- Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., ... & Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 102(4), 463-473.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., ... & Kamiya, K. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Molecular and cellular biology*, 27(20), 7028-7040.
- Isono, M., Niimi, A., Oike, T., Hagiwara, Y., Sato, H., Sekine, R., ... & Shibata, A. (2017). BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. *Cell reports*, 18(2), 520-532.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
- Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), a012740.

- Jeong, K. W., Kim, K., Situ, A. J., Ulmer, T. S., An, W., & Stallcup, M. R. (2011). Recognition of enhancer element-specific histone methylation by TIP60 in transcriptional activation. *Nature structural & molecular biology*, *18*(12), 1358.
- Jiang, X., Sun, Y., Chen, S., Roy, K., & Price, B. D. (2006). The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(23), 15741-15746.
- Johnson, C. A., White, D. A., Lavender, J. S., O'Neill, L. P., & Turner, B. M. (2002). Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(11), 9590-9597.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., & Chinnadurai, G. (1995). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, *216*(2), 357-366.
- Kang, T. H., Park, D. Y., Choi, Y. H., Kim, K. J., Yoon, H. S., & Kim, K. T. (2007). Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, *27*(24), 8533-8546.
- Kang, T. H., Park, D. Y., Kim, W., & Kim, K. T. (2008). VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *Journal of cell science*, *121*(18), 3035-3041.
- Kapoor, A., Goldberg, M. S., Cumberland, L. K., Ratnakumar, K., Segura, M. F., Emanuel, P. O., ... & Bernstein, E. (2010). The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*, *468*(7327), 1105-1109.
- Karakashev, S., Zhu, H., Wu, S., Yokoyama, Y., Bitler, B. G., Park, P. H., ... & Zhang, R. (2018). CARM1-expressing ovarian cancer depends on the histone methyltransferase EZH2 activity. *Nature communications*, *9*(1), 1-11.
- Klerkx, E. P., Lazo, P. A., & Askjaer, P. (2009). Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family.
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D. R., ... & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(28), 11667-11672.
- Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., ... & Bedford, M. T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO reports*, *7*(4), 397-403.
- Kim, W., Chakraborty, G., Kim, S., Shin, J., Park, C. H., Jeong, M. W., ... & Kim, K. T. (2011). Macro histone H2A1. 2 (macroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(8), 5278-5289.
- Kim, C. H., Kim, J. W., Jang, S. M., An, J. H., Song, K. H., & Choi, K. H. (2012). Transcriptional activity of paired homeobox Pax6 is enhanced by histone acetyltransferase Tip60 during mouse retina development. *Biochemical and biophysical research communications*, *424*(3), 427-432.
- Kim, I. J., Quigley, D., To, M. D., Pham, P., Lin, K., Jo, B., ... & Balmain, A. (2013). Rewiring of human lung cell lineage and mitotic networks in lung adenocarcinomas. *Nature communications*, *4*(1), 1-11.
- Kim, Y. S., Kim, S. H., Shin, J., Harikishore, A., Lim, J. K., Jung, Y., ... & Kim, K. T. (2014). Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1. *PloS one*, *9*(10), e109655.
- Kim, S. H., Ryu, H. G., Lee, J., Shin, J., Harikishore, A., Jung, H. Y., ... & Kim, K. T. (2015). Ursolic acid exerts anti-cancer activity by suppressing vaccinia-related kinase 1-mediated damage repair in lung cancer cells. *Scientific reports*, *5*(1), 1-13.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, *37*(5), 937-953.
- Kooistra, S. M., & Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(5), 297-311.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, *184*(4139), 868-871.

- Kötter, A., Cornils, K., Borgmann, K., Dahm-Daphi, J., Petersen, C., Dikomey, E., & Mansour, W. Y. (2014). Inhibition of PARP1-dependent end-joining contributes to Olaparib-mediated radiosensitization in tumor cells. *Molecular oncology*, 8(8), 1616-1625.
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Jakob, B., Tobias, F., Kijas, A. W., Tanuji, M., ... & Lavin, M. F. (2011). Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9107-9119.
- Kumar, S., Gonzalez, E. A., Rameshwar, P., & Etchegaray, J. P. (2020). Non-Coding RNAs as Mediators of Epigenetic Changes in Malignancies. *Cancers*, 12(12), 3657.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J., & Pavletich, N. P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274(5289), 948-953.
- Lamarache, B. J., Orazio, N. I., & Weitzman, M. D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters*, 584(17), 3682-3695.
- Lancaster, O. M., Cullen, C. F., & Ohkura, H. (2007). NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the Drosophila oocyte nucleus. *The Journal of cell biology*, 179(5), 817-824.
- Langelier, M. F., Planck, J. L., Roy, S., & Pascal, J. M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly (ADP-ribosyl) ation by human PARP-1. *Science*, 336(6082), 728-732.
- Latham, J. A., & Dent, S. Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nature structural & molecular biology*, 14(11), 1017-1024.
- Lavin, M. F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(10), 759-769.
- Lavin, M. F., Kozlov, S., Gatei, M., & Kijas, A. W. (2015). ATM-dependent phosphorylation of all three members of the MRN complex: from sensor to adaptor. *Biomolecules*, 5(4), 2877-2902.
- Lazo, P. A. (2017). Reverting p53 activation after recovery of cellular stress to resume with cell cycle progression. *Cellular signalling*, 33, 49-58.
- Lee, H., Kwak, H. J., Cho, I. T., Park, S. H., & Lee, C. H. (2009). S1219 residue of 53BP1 is phosphorylated by ATM kinase upon DNA damage and required for proper execution of DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(1), 32-36.
- Lee, N., Kwon, J. H., Kim, Y. B., Kim, S. H., Park, S. J., Xu, W., ... & Choi, K. Y. (2015). Vaccinia-related kinase 1 promotes hepatocellular carcinoma by controlling the levels of cell cycle regulators associated with G1/S transition. *Oncotarget*, 6(30), 30130.
- Legube, G., Linares, L. K., Lemerrier, C., Scheffner, M., Khochbin, S., & Trouche, D. (2002). Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *The EMBO journal*, 21(7), 1704-1712.
- Legube, G., & Trouche, D. (2003). Identification of a larger form of the histone acetyl transferase Tip60. *Gene*, 310, 161-168.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., ... & Peters, A. H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology*, 13(14), 1192-1200.
- Leidecker, O., Bonfiglio, J. J., Colby, T., Zhang, Q., Atanassov, I., Zaja, R., ... & Matic, I. (2016). Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones. *Nature chemical biology*, 12(12), 998-1000.
- Lemerrier, C., Legube, G., Caron, C., Louwagie, M., Garin, J., Trouche, D., & Khochbin, S. (2003). Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4713-4718.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., & Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69(6), 905-914.

- Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS letters*, *589*(20), 2893-2904.
- Li, L., & Wang, Y. (2017). Cross-talk between the H3K36me3 and H4K16ac histone epigenetic marks in DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(28), 11951-11959.
- Li, M. L., Jiang, Q., Bhanu, N. V., Wu, J., Li, W., Garcia, B. A., & Greenberg, R. A. (2019). Phosphorylation of TIP60 suppresses 53BP1 localization at DNA damage sites. *Molecular and cellular biology*, *39*(1).
- Lilley, D. M. (2016). Holliday junction-resolving enzymes—structures and mechanisms. *FEBS letters*, *591*(8), 1073-1082.
- Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 65, pp. 127-134). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Liu, J., Luo, S., Zhao, H., Liao, J., Li, J., Yang, C., ... & Ye, K. (2012). Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. *Nucleic acids research*, *40*(9), 3898-3912.
- Liu, X., McEachron, T. A., Schwartzentruber, J., & Wu, G. (2014). Histone H3 mutations in pediatric brain tumors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(4), a018689.
- Liu, J., Wang, Y., He, S., Xu, X., Huang, Y., Tang, J., ... & Cheng, C. (2016). Expression of vaccinia-related kinase 1 (VRK1) accelerates cell proliferation but overcomes cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in multiple myeloma. *Hematology*, *21*(10), 603-612.
- Liu, Z. C., Cao, K., Xiao, Z. H., Qiao, L., Wang, X. Q., Shang, B., ... & Wang, Z. (2017). VRK1 promotes cisplatin resistance by up-regulating c-MYC via c-Jun activation and serves as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *8*(39), 65642.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., ... & Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Molecular cell*, *5*(6), 917-926.
- López-Sánchez, I., Valbuena, A., Vázquez-Cedeira, M., Khadake, J., Sanz-García, M., Carrillo-Jiménez, A., & Lazo, P. A. (2014). VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage. *FEBS letters*, *588*(5), 692-700.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., ... & Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell*, *21*(2), 187-200.
- Lue, J. K., & Amengual, J. E. (2018). Emerging EZH2 inhibitors and their application in lymphoma. *Current hematological malignancy reports*, *13*(5), 369-382.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S. I., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., ... & Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*, *107*(2), 137-148.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., ... & Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell*, *16*(5), 701-713.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, *131*(5), 887-900.
- Makałowski, W. (2001). The human genome structure and organization. *Acta Biochimica Polonica*, *48*(3), 587-598.
- Mansouri, L., Wierzbinska, J. A., Plass, C., & Rosenquist, R. (2018, August). Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological impact. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 1-11). Academic Press.
- Martín-Doncel, E., Rojas, A. M., Cantarero, L., & Lazo, P. A. (2019). VRK1 functional insufficiency due to alterations in protein stability or kinase activity of human VRK1 pathogenic variants implicated in neuromotor syndromes. *Scientific reports*, *9*(1), 1-15.

- McCabe, M. T., Brandes, J. C., & Vertino, P. M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Cancer Research*, *15*(12), 3927-3937.
- McKinnon, P. J., & Caldecott, K. W. (2007). DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, *8*, 37-55.
- McNeely, T., Leone, M., Yanai, H., & Beerman, I. (2020). DNA damage in aging, the stem cell perspective. *Human genetics*, *139*(3), 309-331.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., ... & Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, *454*(7205), 766-770.
- Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature structural & molecular biology*, *20*(3), 300-307.
- Mertins, P., Qiao, J. W., Patel, J., Udeshi, N. D., Clauser, K. R., Mani, D. R., ... & Carr, S. A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature methods*, *10*(7), 634.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., ... & Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular cell*, *30*(6), 755-766.
- Molitor, T. P., & Traktman, P. (2013). Molecular genetic analysis of VRK1 in mammary epithelial cells: depletion slows proliferation in vitro and tumor growth and metastasis in vivo. *Oncogenesis*, *2*(6), e48-e48.
- Monk, M., Boubelik, M., & Lehnert, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, *99*(3), 371-382.
- Monsalve, D. M., Campillo-Marcos, I., Salzano, M., Sanz-García, M., Cantarero, L., & Lazo, P. A. (2016). VRK1 phosphorylates and protects NBS1 from ubiquitination and proteasomal degradation in response to DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1863*(4), 760-769.
- Moore-Morris, T., van Vliet, P. P., Andelfinger, G., & Puceat, M. (2018). Role of epigenetics in cardiac development and congenital diseases. *Physiological reviews*, *98*(4), 2453-2475.
- Moura, D. S., Fernández, I. F., Marín-Royo, G., López-Sánchez, I., Martín-Doncel, E., Vega, F. M., & Lazo, P. A. (2016). Oncogenic Sox2 regulates and cooperates with VRK1 in cell cycle progression and differentiation. *Scientific reports*, *6*(1), 1-15.
- Moura, D. S., Campillo-Marcos, I., Vázquez-Cedeira, M., & Lazo, P. A. (2018). VRK1 and AURKB form a complex that cross inhibit their kinase activity and the phosphorylation of histone H3 in the progression of mitosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(14), 2591-2611.
- Moynahan, M. E., & Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(3), 196-207.
- Murr, R., Loizou, J. I., Yang, Y. G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z. Q., & Herceg, Z. (2005). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*, *8*(1), 91-99.
- Murr, R. (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Advances in genetics*, *70*, 101-141.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R. M., Okamura, S., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., ... & Harris, C. C. (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene*, *22*(3), 343-350.
- Nakayama, J. I., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., & Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, *292*(5514), 110-113.
- Nan, X., Meehan, R. R., & Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic acids research*, *21*(21), 4886-4892.
- Narlikar, G. J., Sundaramoorthy, R., & Owen-Hughes, T. (2013). Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell*, *154*(3), 490-503.

- Navarro-Carrasco, E. & Lazo, P. A. (2021). VRK1 depletion facilitates the synthetic lethality of temozolomide and Olaparib in glioblastoma cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(68), 30-38.
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., & Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS genetics*, 14(6), e1007362.
- Nemtsova, M. V., Zaletaev, D. V., Bure, I. V., Mikhaylenko, D. S., Kuznetsova, E. B., Alekseeva, E. A., ... & Zamyatin Jr, A. A. (2019). Epigenetic changes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Frontiers in genetics*, 10, 570.
- Nezu, J. I., Oku, A., Jones, M. H., & Shimane, M. (1997). Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, 45(2), 327-331.
- Ng, H. H., & Adrian, B. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Current opinion in genetics & development*, 9(2), 158-163.
- Nichols, R. J., & Traktman, P. (2004). Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7934-7946.
- Orr, H. T. (2012). SCA1—Phosphorylation, a regulator of Ataxin-1 function and pathogenesis. *Progress in neurobiology*, 99(3), 179-185.
- Osley, M. A., Fleming, A. B., & Kao, C. F. (2006). Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Chromatin dynamics in cellular function*, 47-75.
- Park, J. H., & Roeder, R. G. (2006). GAS41 is required for repression of the p53 tumor suppressor pathway during normal cellular proliferation. *Molecular and cellular biology*, 26(11), 4006-4016.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., ... & Lou, Z. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, 470(7332), 124-128.
- Pendleton, M., Lindsey Jr, R. H., Felix, C. A., Grimwade, D., & Osheroff, N. (2014). Topoisomerase II and leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310(1), 98.
- Peng, L., Ling, H., Yuan, Z., Fang, B., Bloom, G., Fukasawa, K., ... & Seto, E. (2012). SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Molecular and cellular biology*, 32(14), 2823-2836.
- Penner, M. R., Roth, T. L., Barnes, C., & Sweatt, D. (2010). An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 9.
- Peterlin, B. M., & Price, D. H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell*, 23(3), 297-305.
- Pflum, M. K. H., Tong, J. K., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47733-47741.
- Piña, I. C., Gautschi, J. T., Wang, G. Y. S., Sanders, M. L., Schmitz, F. J., France, D., ... & Crews, P. (2003). Psammaplins from the Sponge *Pseudoceratina purpurea*: Inhibition of Both Histone Deacetylase and DNA Methyltransferase. *The Journal of organic chemistry*, 68(10), 3866-3873.
- Pirooznia, S. K., Sarthi, J., Johnson, A. A., Toth, M. S., Chiu, K., Koduri, S., & Elefant, F. (2012). Tip60 HAT activity mediates APP induced lethality and apoptotic cell death in the CNS of a *Drosophila* Alzheimer's disease model. *PLoS one*, 7(7), e41776.
- Poleskaya, A., Naguibneva, I., Duquet, A., Bengal, E., Robin, P., & Harel-Bellan, A. (2001). Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Molecular and cellular biology*, 21(16), 5312-5320.
- Price, B. D., & D'Andrea, A. D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*, 152(6), 1344-1354.
- Quenet, D. (2018). Histone variants and disease. *International review of cell and molecular biology*, 335, 1-39.
- Rai, R., Dai, H., Multani, A. S., Li, K., Chin, K., Gray, J., ... & Lin, S. Y. (2006). BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer cell*, 10(2), 145-157.

- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. (2002). Histone H2a variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development*, 12(2), 162-169.
- Reid, J. L., Moqtaderi, Z., & Struhl, K. (2004). Eaf3 regulates the global pattern of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 24(2), 757-764.
- Reiter, N. J., Chan, C. W., & Mondragón, A. (2011). Emerging structural themes in large RNA molecules. *Current opinion in structural biology*, 21(3), 319-326.
- Ren, Z., Geng, J., Xiong, C., Li, X., Li, Y., Li, J., & Liu, H. (2020). Downregulation of VRK1 reduces the expression of BANF1 and suppresses the proliferative and migratory activity of esophageal cancer cells. *Oncology Letters*, 20(2), 1163-1170.
- Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., ... & Levy-Lahad, E. (2009). Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 281-289.
- Riggi, N., Knoechel, B., Gillespie, S. M., Rheinbay, E., Boulay, G., Suvà, M. L., ... & Rivera, M. N. (2014). EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer cell*, 26(5), 668-681.
- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, 14(1), 9-25.
- Rojas, J. R., Trievel, R. C., Zhou, J., Mo, Y., Li, X., Berger, S. L., ... & Marmorstein, R. (1999). Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature*, 401(6748), 93-98.
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 12(9), 440-450.
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098-1108.
- Sallmyr, A., & Tomkinson, A. E. (2018). Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10536-10546.
- Salzano, M., Vázquez-Cedeira, M., Sanz-García, M., Valbuena, A., Blanco, S., Fernández, I. F., & Lazo, P. A. (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.
- Salzano, M., Sanz-García, M., Monsalve, D. M., Moura, D. S., & Lazo, P. A. (2015). VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics*, 10(5), 373-383.
- Sandoval, G. J., Pulice, J. L., Pakula, H., Schenone, M., Takeda, D. Y., Pop, M., ... & Kadoch, C. (2018). Binding of TMPRSS2-ERG to BAF chromatin remodeling complexes mediates prostate oncogenesis. *Molecular cell*, 71(4), 554-566.
- Sano, Y., & Ishii, S. (2001). Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3674-3682.
- Santivasi, W. L., & Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & redox signaling*, 21(2), 251-259.
- Santos, C. R., Rodríguez-Pinilla, M., Vega, F. M., Rodríguez-Peralto, J. L., Blanco, S., Sevilla, A., ... & Lazo, P. A. (2006). VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer research*, 4(3), 177-185.
- Sanz-García, M., López-Sánchez, I., & Lazo, P. A. (2008). Proteomics identification of nuclear Ran GTPase as an inhibitor of human VRK1 and VRK2 (vaccinia-related kinase) activities. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(11), 2199-2214.
- Sanz-García, M., Monsalve, D. M., Sevilla, A., & Lazo, P. A. (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. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23757-23768.
- Sapountzi, V., Logan, I. R., & Robson, C. N. (2006). Cellular functions of TIP60. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(9), 1496-1509.

- Scheeff, E. D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., & Manning, G. (2009). Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure*, *17*(1), 128-138.
- Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., & Postberg, J. (2011). H3. 5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma*, *120*(3), 275-285.
- Schwartz, B. E., & Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3. 3. *Genes & development*, *19*(7), 804-814.
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(4), a018713.
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., & Hake, S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols*, *2*(6), 1445.
- Shibata, A., Jeggo, P., & Löbrich, M. (2018). The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA repair*, *71*, 164-171.
- Shibata, A., & Jeggo, P. A. (2020). Canonical DNA non-homologous end-joining; capacity versus fidelity. *The British journal of radiology*, *93*(1115), 20190966.
- Shin, J., Chakraborty, G., Bharatham, N., Kang, C., Tochio, N., Koshiba, S., ... & Yoon, H. S. (2011). NMR solution structure of human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) reveals the C-terminal tail essential for its structural stability and autocatalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(25), 22131-22138.
- Slomnicki, L. P., & Lesniak, W. (2008). A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *68*(2), 219-228.
- Squatrito, M., Gorrini, C., & Amati, B. (2006). Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends in cell biology*, *16*(9), 433-442.
- Stoccoro, A., & Coppedè, F. (2018). Role of epigenetics in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurodegenerative disease management*, *8*(3), 181-193.
- Stokes, M. P., Rush, J., MacNeill, J., Ren, J. M., Sprott, K., Nardone, J., ... & Comb, M. J. (2007). Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), 19855-19860.
- Stolz, A., Ertych, N., & Bastians, H. (2011). Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clinical Cancer Research*, *17*(3), 401-405.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., & Price, B. D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(37), 13182-13187.
- Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., & Price, B. D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Molecular and cellular biology*, *27*(24), 8502-8509.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstone, J. R., & Price, B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nature cell biology*, *11*(11), 1376-1382.
- Sun, X. J., Man, N., Tan, Y., Nimer, S. D., & Wang, L. (2015). The role of histone acetyltransferases in normal and malignant hematopoiesis. *Frontiers in oncology*, *5*, 108.
- Surace, A. E. A., & Hedrich, C. M. (2019). The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease. *Frontiers in immunology*, *10*, 1525.
- Sykes, S. M., Mellert, H. S., Holbert, M. A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W. S., & McMahon, S. B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Molecular cell*, *24*(6), 841-851.
- Sylvestersen, K. B., Horn, H., Jungmichel, S., Jensen, L. J., & Nielsen, M. L. (2014). Proteomic analysis of arginine methylation sites in human cells reveals dynamic regulation during transcriptional arrest. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(8), 2072-2088.
- Tallis, M., Morra, R., Barkauskaite, E., & Ahel, I. (2014). Poly (ADP-ribosyl) ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response. *Chromosoma*, *123*(1-2), 79-90.

- Tang, J., Cho, N. W., Cui, G., Manion, E. M., Shanbhag, N. M., Botuyan, M. V., ... & Greenberg, R. A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*, *20*(3), 317.
- Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., & Patel, D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology*, *14*(11), 1025-1040.
- Thompson, P. R., & Fast, W. (2006). Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS chemical biology*, *1*(7), 433-441.
- Toledo, F., & Wahl, G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer*, *6*(12), 909-923.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Hardebeck, M. C., Ilcheva, M., Camacho, C. V., Harris, J. L., ... & Burma, S. (2014). Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nature communications*, *5*(1), 1-10.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350-4354.
- Tyagi, M., Imam, N., Verma, K., & Patel, A. K. (2016). Chromatin remodelers: We are the drivers!!. *Nucleus*, *7*(4), 388-404.
- Tyteca, S., Legube, G., & Trouche, D. (2006). To die or not to die: a HAT trick. *Molecular cell*, *24*(6), 807-808.
- Uckelmann, M., & Sixma, T. K. (2017). Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA repair*, *56*, 92-101.
- Utley, R. T., & Cote, J. (2003). The MYST family of histone acetyltransferases. *Protein Complexes That Modify Chromatin*, 203-236.
- Valbuena, A., López-Sánchez, I., & Lazo, P. A. (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., Sanz-García, M., López-Sánchez, I., Vega, F. M., & Lazo, P. A. (2011). Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cellular signalling*, *23*(8), 1267-1272.
- van Dijk, S. J., Tellam, R. L., Morrison, J. L., Muhlhausler, B. S., & Molloy, P. L. (2015). Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clinical epigenetics*, *7*(1), 1-13.
- Vazquez, B. N., Thackray, J. K., Simonet, N. G., Kane-Goldsmith, N., Martinez-Redondo, P., Nguyen, T., ... & Serrano, L. (2016). SIRT 7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *The EMBO journal*, *35*(14), 1488-1503.
- Vázquez-Cedeira, M., Barcia-Sanjurjo, I., Sanz-García, M., Barcia, R., & Lazo, P. A. (2011). Differential inhibitor sensitivity between human kinases VRK1 and VRK2. *PLoS one*, *6*(8), e23235.
- Vega, F. M., Sevilla, A., & Lazo, P. A. (2004). p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Molecular and cellular biology*, *24*(23), 10366-10380.
- Verdin, E., & Ott, M. (2015). 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, *16*(4), 258-264.
- Vinograd-Byk, H., Sapir, T., Cantarero, L., Lazo, P. A., Zeligson, S., Lev, D., ... & Levy-Lahad, E. (2015). The spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia gene VRK1 regulates neuronal migration through an amyloid- β precursor protein-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, *35*(3), 936-942.
- Vousden, K. H. (2002). Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer cell*, *2*(5), 351-352.
- Wagner, V. P., Martins, M. D., & Castilho, R. M. (2018). Histones acetylation and cancer stem cells (CSCs). In *Cancer Stem Cells* (pp. 179-193). Humana Press, New York, NY.

- Wakeman, T. P., Wang, Q., Feng, J., & Wang, X. F. (2012). Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases. *The EMBO journal*, 31(9), 2169-2181.
- Wallace, S. S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA repair*, 19, 14-26.
- Walport, L. J., Hopkinson, R. J., Chowdhury, R., Schiller, R., Ge, W., Kawamura, A., & Schofield, C. J. (2016). Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases. *Nature communications*, 7(1), 1-12.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., ... & Coonrod, S. A. (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science*, 306(5694), 279-283.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., ... & Zhao, K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics*, 40(7), 897-903.
- Wang, H. W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D. W., Ma, E., Felderer, K., ... & Nogales, E. (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature structural & molecular biology*, 16(11), 1148.
- Wang, J., & Chen, J. (2010). SIRT1 regulates autoacetylation and histone acetyltransferase activity of TIP60. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11458-11464.
- Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G., & Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19579-19582.
- Waters, K., Yang, A. Z., & Reinke, V. (2010). Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C. elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53. *Developmental biology*, 344(2), 1011-1025.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Wei, H., & Yu, X. (2016). Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 14(3), 131-139.
- Wesche, J., Kühn, S., Kessler, B. M., Salton, M., & Wolf, A. (2017). Protein arginine methylation: a prominent modification and its demethylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18), 3305-3315.
- Wiebe, M. S., & Jamin, A. (2016). The barrier to autointegration factor: interlocking antiviral defense with genome maintenance. *Journal of virology*, 90(8), 3806-3809.
- Williams, G. J., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2010). Mre11–Rad50–Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA repair*, 9(12), 1299-1306.
- Williamson, C. T., Muzik, H., Turhan, A. G., Zamò, A., O'Connor, M. J., Bebb, D. G., & Lees-Miller, S. P. (2010). ATM deficiency sensitizes mantle cell lymphoma cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*, 9(2), 347-357.
- Windheim, M., Peggie, M., & Cohen, P. (2008). Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochemical Journal*, 409(3), 723-729.
- Wolffe, A. P., & Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *science*, 286(5439), 481-486.
- Wu, R., Lu, Z., Cao, Z., & Zhang, Y. (2011). Zinc chelation with hydroxamate in histone deacetylases modulated by water access to the linker binding channel. *Journal of the American Chemical Society*, 133(16), 6110-6113.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., & Yang, Y. C. (2003). Tip60 is a co-repressor for STAT3. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11197-11204.
- Xu, Y., Liao, R., Li, N., Xiang, R., & Sun, P. (2014). Phosphorylation of Tip60 by p38 α regulates p53-mediated PUMA induction and apoptosis in response to DNA damage. *Oncotarget*, 5(24), 12555.

- Yan, Y., Barlev, N. A., Haley, R. H., Berger, S. L., & Marmorstein, R. (2000). Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Molecular cell*, 6(5), 1195-1205.
- Yan, Y., Harper, S., Speicher, D. W., & Marmorstein, R. (2002). The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nature structural biology*, 9(11), 862-869.
- Yang, X. J. (2004a). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*, 26(10), 1076-1087.
- Yang, X. J. (2004b). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic acids research*, 32(3), 959-976.
- Yang, C., Wu, J., & Zheng, Y. G. (2012). Function of the active site lysine autoacetylation in Tip60 catalysis. *PLoS one*, 7(3), e32886.
- Yi, J., Huang, X., Yang, Y., Zhu, W. G., Gu, W., & Luo, J. (2014). Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 33878-33886.
- Yu, T., MacPhail, S. H., Banath, J. P., Klovov, D., & Olive, P. L. (2006). Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA repair*, 5(8), 935-946.
- Yu, Y., Wang, P., Cui, Y., & Wang, Y. (2018). Chemical analysis of DNA damage. *Analytical chemistry*, 90(1), 556.
- Yüce, D. G., & Ersoy, O. E. (2016). Akciğer Kanseri ve Epigenetik Değişiklikler. *Tuberk Toraks*, 64(2), 163-170.
- Yue, X., Bai, C., Xie, D., Ma, T., & Zhou, P. K. (2020). DNA-PKcs: A Multi-Faceted Player in DNA Damage Response. *Frontiers in Genetics*, 11, 1692.
- Yuqing Yang, A., Kim, H., Li, W., & Tony Kong, A. N. (2016). Natural compound-derived epigenetic regulators targeting epigenetic readers, writers and erasers. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(7), 697-713.
- Zamani, M., Hosseini, S. V., & Mokarram, P. (2018). Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomarkers*, 23(2), 105-114.
- Zelko, I., Kobayashi, R., Honkakoski, P., & Negishi, M. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Archives of biochemistry and biophysics*, 352(1), 31-36.
- Zhang, S. M., Song, M., Yang, T. Y., Fan, R., Liu, X. D., & Zhou, P. K. (2012). HIV-1 Tat impairs cell cycle control by targeting the Tip60, Plk1 and cyclin B1 ternary complex. *Cell Cycle*, 11(6), 1217-1234.
- Zhang, Y., Wang, J., Ding, M., & Yu, Y. (2013). Site-specific characterization of the Asp-and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nature methods*, 10(10), 981-984.
- Zhang, M., Wang, L., & Zhong, D. (2017). Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair. *Archives of biochemistry and biophysics*, 632, 158-174.
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J., & Mohammed, S. (2013). Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *Journal of proteome research*, 12(1), 260-271.
- Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T. Y., Kohlbacher, O., ... & Meissner, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), 477-481.

Parte del trabajo mostrado en esta tesis doctoral ha sido publicado en el siguiente artículo científico:

García-González, R., Morejón-García, P., Campillo-Marcos, I., Salzano, M., & Lazo, P. A. (2020). VRK1 Phosphorylates Tip60/KAT5 and Is Required for H4K16 Acetylation in Response to DNA Damage. *Cancers*, 12(10), 2986.

El resto de resultados no presentes en el artículo mencionado están a la espera de ser publicados. Por otro lado, otros trabajos en los que se ha participado y que también han sido publicados son los siguientes:

Campillo-Marcos, I., **García-González, R.**, Navarro-Carrasco, E., & Lazo, P. A. (2021). The human VRK1 chromatin kinase in cancer biology. *Cancer Letters*, 503, 117-128.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de esta tesis doctoral se ha desarrollado a lo largo de los 6 últimos años bajo la dirección y supervisión de Pedro Lazo. Así que a ti, Pedro, te agradezco tu interés y confianza en mí desde el primer día en el que me ofreciste la posibilidad de realizar el doctorado en tu laboratorio pero, especialmente, tu apoyo. A lo largo de este tiempo, siempre has sabido comprender situaciones personales que me han demostrado que, además de un gran profesional, eres buena persona.

También agradezco a toda la gente del Centro de Investigación del Cáncer que, de la forma que sea, contribuye a que todo funcione correctamente. Personal de los servicios comunes (almacén, cocina, mantenimiento, conserjería, secretaría, informática, gerencia o trabajadores de la limpieza) y compañeros de cualquier laboratorio que en algún momento me hayan podido ayudar con cualquier cosa. Creo que es importante mencionar expresamente a los miembros de la unidad de microscopía María, Ángel y Ana por su cercanía y por hacer que el trabajo con ellos siempre sea tan fácil. Y por su puesto a Sara. Obviamente has sido más que una compañera de trabajo, gracias por estar siempre ahí, apoyándome y animándome en cualquier momento, y por demostrarme con tus actos que eres una muy buena amiga.

Doy especialmente las gracias a todos compañeros y compañeras de laboratorio con los que he coincidido a lo largo de este tiempo porque, al fin y al cabo, compartir el día a día con las mismas personas hace que éstas pasen a formar parte de tu vida. Me acuerdo de David, Lara, Adrivanio, Elena y Eugenia, con los que he compartido menos tiempo. También de Abel y de todos los momentos de diversión que hemos tenido. Eva, eres la alegría del laboratorio y haces que todo sea más fácil. Todo el mundo quisiera una amiga como tú. Patricia, parte de esta tesis también es gracias a ti. Valoro mucho tu trabajo con las líneas celulares y mutantes de *VRK1* y todo el esfuerzo que hay detrás, pero sobre todo valoro lo buena persona que eres. Helena, siempre voy a recordar todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Sólo tengo palabras de agradecimiento hacia ti. Me has ayudado a crecer. Espero que tú sólo te quedes con todo lo bueno. Te voy a echar de menos. Nacho, gracias por acogerme en Salamanca como tú lo hiciste, por enseñarme gran parte de las cosas que hoy en día se hacen en un laboratorio, por darme caña cuando era necesario y por estar cerca de mí cuando lo he necesitado. De aquí me llevo un amigo con el que siempre voy a poder contar y te deseo todo lo mejor en tu vida personal y profesional, porque nadie se lo merece más que tú. Y Aurora y Paula, ha sido un placer terminar estos últimos meses con vosotras. Ojalá hubierais llegado antes para haber podido compartir muchos más momentos juntos. Espero que todo os vaya genial en la vida.

Fuera del laboratorio, agradezco a todas las personas con la que haya compartido parte de mi vida a lo largo de mi estancia en Salamanca, pero me acuerdo especialmente de mi grupo de amigos de Valladolid. Desde que salí de la ciudad hace ya 10 años, hemos mantenido el contacto literalmente a diario, y aunque en los últimos años nos hayamos visto menos, nada me hace sentir mejor que saber que nada ha cambiado cuando tenemos la ocasión de juntarnos. Y de mis amigos del pueblo, mis amigos de toda la vida, sólo decir que espero poder seguir celebrando con vosotros lo bueno, lo malo y lo peor de la manera que sólo nosotros sabemos hacerlo. Nacho, Alfonso, Diego, César, Pablo y Sara. Gracias por todo especialmente a vosotros, por los momentos que hemos pasado juntos y que vamos a seguir compartiendo toda la vida, que quedarán para nosotros.

Por último, decir a mis padres y a mi hermana que son la base y el motivo de todo esto. No tengo tiempo ni espacio suficiente para agradeceros todo lo que hacéis y os preocupáis por mí. Siento todos los malos momentos que os haya hecho pasar, pero sé que siempre estaréis conmigo para apoyarme, confiar en mí y hacerme ser quien soy. Os quiero muchísimo. Y a vosotros abuelos, deciros que la auténtica felicidad es estar con vosotros y disfrutar cada momento de vuestra compañía. Sólo con vosotros soy completamente yo. Me enseñáis todo lo que necesito saber y estoy eternamente agradecido de poder compartir este momento con vosotros cuatro. Os quiero.

