



CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER  
(CSIC-USAL)

# **MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PATOGENESIS DE LAS VARIANTES DE LA QUINASA HUMANA VRK1 EN SÍNDROMES NEUROMOTORES**

TESIS DOCTORAL  
**Patricia Morejón García**

**Salamanca, España  
2022**





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

CERTIFICA:

Que la memoria de tesis doctoral titulada “**Mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de las variantes de la quinasa humana VRK1 en síndromes neuromotores**”, presentada por la graduada en biología **Patricia Morejón García**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para 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 25 de febrero de 2022.

Fdo.: Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena



Esta memoria ha sido realizada por **PATRICIA MOREJÓN GARCÍA**, siendo beneficiaria de una beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para la realización de la tesis doctoral (2016-2021).

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**



***A la asociación Red Solidaria Ribera de Roa***





# TABLA DE CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| TABLA DE CONTENIDO .....   | i         |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | vii       |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | xi        |
| ÍNDICE ANEXOS .....  | xiii      |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....   | xv        |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1         |
| <b>1. LAS PROTEÍNAS QUINASAS.....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1. La familia VRK.....   | 3         |
| 1.2. Estructura de las quinasas VRK .....                                      | 4         |
| 1.3. Regulación de las quinasas VRK .....                                      | 7         |
| 1.4. La quinasa humana VRK1.....   | 8         |
| 1.4.1. Implicación de VRK1 en proliferación y progresión del ciclo celular.... | 8         |
| 1.4.2. Regulación de factores de transcripción mediada por VRK1 .....          | 9         |
| 1.4.3. Implicación de VRK1 en la remodelación de la cromatina.....             | 10        |
| 1.4.4. VRK1 en la fragmentación del aparato de Golgi .....                     | 11        |
| 1.4.5. Implicación de VRK1 durante el ensamblaje de la envoltura nuclear       | 11        |
| 1.4.6. La respuesta a daño en el ADN y la implicación de VRK1.....             | 11        |
| 1.4.6. Patrón epigenético de la histona H3 y la implicación de VRK1 .....      | 15        |
| 1.5. La quinasa humana VRK2.....   | 18        |
| 1.6. La quinasa humana VRK3.....   | 18        |
| 1.7. Ratones <i>knock-out</i> de VRK1 y VRK2 .....                             | 19        |
| 1.8. Las quinasas VRK en síndromes neuromotores .....                          | 19        |
| <b>2. Coilina y cuerpos de Cajal.....</b>                                      | <b>27</b> |
| 2.1. Cuerpos de Cajal .....  | 27        |
| 2.2. p80-coilina .....   | 28        |
| 2.2.1. Estructura de coilina.....  | 28        |
| 2.2.2. Modificaciones postraduccionales de la coilina.....                     | 29        |
| <b>3. SMN (<i>Survival motor neuron</i>).....</b>                              | <b>31</b> |
| 3.1. Estructura de SMN .....   | 32        |
| 3.2. Funciones de SMN .....  | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.1. Implicación del complejo SMN en la biogénesis de las ribonucleoproteínas y en el proceso de <i>splicing</i> ..... | 34        |
| 3.2.2. Papel de SMN en la reparación del ADN.....  | 35        |
| 3.2.3. Papel de SMN en las neuronas: SMN como causante de la SMA.....  | 36        |
| <b>4. La ATPasa VCP/p97 (<i>Valosin contained protein</i>).....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1. Estructura de VCP.....  | 38        |
| 4.2. Funciones de VCP.....   | 39        |
| 4.2.1. Papel de VCP en la degradación de proteínas.....  | 39        |
| 4.2.2. Papel de VCP en la reparación del daño en el ADN.....   | 40        |
| 4.2.3. Regulación del ciclo celular por VCP.....   | 41        |
| 4.2.4. Papel de VCP en las neuronas.....   | 41        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL ADN.....</b>  | <b>49</b> |
| 1.1. Obtención y purificación del ADN plasmídico.....  | 49        |
| 1.2. Cuantificación de ADN plasmídico.....   | 49        |
| 1.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.....   | 50        |
| 1.4. Generación de vectores de ADN recombinante.....   | 50        |
| 1.5. Transformación de plásmidos en <i>E. coli</i> .....   | 51        |
| 1.6. Mutagénesis dirigida.....   | 51        |
| <b>2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN.....</b>   | <b>52</b> |
| 2.1. Purificación del ARN.....   | 52        |
| 2.2. Cuantificación del ARN.....   | 52        |
| 2.3. RT-PCR cuantitativa.....  | 52        |
| <b>3. TÉCNICAS DE MANIPULACION DE PROTEÍNAS.....</b>   | <b>53</b> |
| 3.1. Purificación de proteínas de fusión con GST.....  | 53        |
| 3.2. Purificación de la proteína de fusión BAF-HIS.....  | 54        |
| 3.3. Electroforesis en geles SDS-PAGE.....   | 55        |
| 3.4. Tinción con azul de <i>Coomassie</i> .....  | 56        |
| 3.5. Transferencia húmeda y <i>Western blot</i> de extractos proteicos.....  | 56        |
| <b>4. LÍNEAS CELULARES.....</b>  | <b>57</b> |
| 4.1. Cultivo de líneas celulares.....  | 57        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2. Generación de líneas celulares estables .....  | 57        |
| 4.3. Clonación de célula única de líneas celulares estables .....   | 58        |
| <b>5. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO MONOCAPA .....</b>  | <b>58</b> |
| 5.1. Transfección con JetPEI™ .....   | 58        |
| 5.2. Transfección con <i>Lipotransfectin</i> .....  | 59        |
| <b>6. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>7. EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES.....</b>  | <b>60</b> |
| 7.1. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo .....   | 60        |
| 7.2. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo con <i>buffer</i> RIPA ..   | 61        |
| 7.3. Fraccionamiento citosol-núcleo de extractos proteicos .....  | 61        |
| <b>8. ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS .....</b>  | <b>62</b> |
| 8.1. Ensayos de coimmunoprecipitación .....   | 62        |
| 8.2. Ensayos de <i>Pull-Down</i> .....  | 62        |
| <b>9. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.....</b>   | <b>63</b> |
| 9.1. Ensayos de cierre de herida .....  | 63        |
| <b>10. INMUNOFUORESCENCIA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>11. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA .....</b>   | <b>65</b> |
| 11.1. Ensayos quinasa <i>in vitro</i> con ATP radiomarcado .....  | 65        |
| 11.2. Ensayos quinasa <i>in vitro</i> con ATP frío .....  | 65        |
| <b>12. REACTIVOS Y ESTIMULACIONES.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>13. SIMULACIÓN DE LA DINÁMICA MOLECULAR DE LAS VARIANTES DE VRK1 ..</b>  | <b>66</b> |
| <b>14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>1. Frecuencias alélicas de las variantes patogénicas de VRK1 .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica..</b>   | <b>79</b> |
| 2.1. Modelos estructurales de las variantes patogénicas de VRK1 muestra alteraciones en la estabilidad estructural y actividad catalítica ..... | 79        |
| 2.2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica <i>in vivo</i> .....   | 85        |
| <b>3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>87</b> |
| 3.1. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i> sobre la histona H3 .....                           | 87        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i> sobre la proteína BAF .....  | 88         |
| 3.3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i> sobre proteínas implicadas en respuesta al daño en el ADN .....                    | 90         |
| 3.4. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i> sobre coilina .....  | 92         |
| <b>4. Generación de líneas estables <i>HeLa</i> y <i>A549</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino .....</b>   | <b>93</b>  |
| 4.1. Caracterización fenotípica de las líneas estables <i>HeLa</i> y <i>A549</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino .....                                  | 97         |
| 4.2. Estudio de la migración de las líneas estables <i>HeLa</i> y <i>A549</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino .....                                     | 102        |
| <b>5. Las células de las líneas <i>A549</i> portadoras de las variantes de VRK1 tienen alterada la ruta de reparación del daño en el ADN .....</b>                             | <b>109</b> |
| 5.1. Las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 acumulan más daño oxidativo en su ADN.....  | 109        |
| 5.2. Los niveles de la acetilación del residuo Lys16 de la histona H4 no se recuperan en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN ..... | 111        |
| 5.3. La formación de focos de $\gamma$ H2A.X y 53BP1 se ve alterada en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN.....                    | 114        |
| 5.4. La fosforilación TIP-60 se ve disminuida en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN.....  | 121        |
| <b>6. El patrón epigenético de la histona H3 en las líneas estables <i>A549</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 se ve alterado .....</b>                       | <b>125</b> |
| 6.1. El patrón de acetilación y trimetilación de la H3K9 se encuentra alterado en las líneas estables .....  | 125        |
| 6.2. El patrón de acetilación y trimetilación de la H3K27 se encuentra alterado en las líneas estables .....   | 129        |
| <b>7. La formación de los cuerpos de Cajal se ve alterada en las células que expresan la mayoría de las variantes patogénicas de VRK1.....</b>                                 | <b>133</b> |
| 7.1. Se rescata la formación de los cuerpos de Cajal en la línea mR219I .....  | 133        |
| 7.2. Durante la fase celular G2/M, el residuo serina 184 de la coilina se fosforila en las células que portan las variantes patogénicas mL195V y mR219I.....                   | 139        |
| 7.3. Se rescata la formación de los CBs en células que expresan la variante patogénica mR89Q, encontrándose la Ser184 de la coilina fosforilada .....                          | 141        |

|  |            |
|--|------------|
| 7.4. Los niveles de coilina se mantienen estables en presencia de mL195V, mR219I, mT228M, mR89Q y mR387H a los 5 días de silenciamiento del gen <i>VRK1 humano</i> , encontrándose la Ser184 de dicha proteína fosforilada ..... | 144        |
| 7.5. La mayoría de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i> pierden la interacción con la coilina .....  | 148        |
| <b>8. Efecto de <i>VRK1</i> en SMN y VCP .....</b>   | <b>152</b> |
| 8.1. <i>VRK1</i> , SMN, VCP y coilina interactúan entre sí .....   | 152        |
| 8.2. VCP interactúa con SMN tanto en el núcleo como en el citosol .....  | 154        |
| 8.3. Efecto del silenciamiento de <i>VRK1</i> sobre VCP y SMN .....  | 155        |
| 8.3.1. El silenciamiento de la quinasa humana <i>VRK1</i> no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN .....  | 155        |
| 8.3.2. Al silenciar el gen <i>VRK1</i> , los niveles de ARN mensajero de VCP no se ven alterados, pero los de SMN aumentan .....   | 157        |
| 8.3.3. Al silenciar el gen <i>VRK1</i> , los niveles de VCP aumentan en el núcleo y los de SMN en el citosol .....   | 159        |
| 8.3.4. El aumento de VCP en el núcleo podría estar relacionado con el daño génico que acumulan las células al deplecionar <i>VRK1</i> .....  | 161        |
| 8.3.5. La interacción VCP-SMN aumenta al deplecionar <i>VRK1</i> , sobre todo en el citosol .....  | 165        |
| 8.4. Efecto de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i> en SMN y VCP .....   | 167        |
| 8.4.1. Interacción de las variantes patogénicas de <i>VRK1</i> humanas y murinas con SMN y VCP .....   | 167        |
| 8.4.2. Los niveles de SMN citosólicos y VCP nucleares aumentan en la mayoría de las células que portan las variantes de <i>VRK1</i> .....  | 169        |
| 8.4.3. La mayoría de las líneas celulares que portan las variantes de la quinasa <i>VRK1</i> , acumulan más daño en el ADN .....   | 177        |
| 8.4.4. Los niveles de ARNm de SMN no se alteran en las células que portan las variantes de la quinasa <i>VRK1</i> .....  | 179        |
| 8.5. Estudio de las interacciones entre las proteínas VCP, <i>VRK1</i> , SMN y coilina durante el ciclo celular .....  | 181        |
| 8.5.1. VCP interactúa con <i>VRK1</i> y SMN, mayoritariamente durante la fase G2/M .....   | 181        |
| 8.5.2. Al silenciar <i>VRK1</i> , la interacción VCP-SMN aumenta en células asincrónicas y G0, pero no durante la fase G2/M .....  | 183        |
| 8.5.3. La interacción VCP-SMN se ve alterada en las distintas líneas celulares que portan las variantes de la quinasa .....  | 184        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>185</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 1. Frecuencias alélicas de las variantes patogénicas de VRK1.....  | 187        |
| 2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica...  | 188        |
| 3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa <i>in vitro</i><br>.....   | 189        |
| 4. Generación de líneas estables <i>HeLa</i> y <i>A549</i> portadoras de las variantes<br>patogénicas de VRK1 murino.....                            | 192        |
| 5. Estudio de la reparación del daño en el ADN en las líneas estables <i>A549</i><br>portadoras de las variantes patogénicas de VRK1.....            | 194        |
| 6. El patrón epigenético de la histona H3 se ve alterado en las líneas estables<br><i>A549</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ..... | 197        |
| 7. La formación de los cuerpos de Cajal se ve alterada en las células que expresan<br>la mayoría de las variantes patogénicas de VRK1.....           | 199        |
| 8. Efecto de VRK1 en SMN y VCP .....   | 203        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>215</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>219</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>241</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema modular de la estructura de las quinasas de la familia VRK.....  | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Representación tridimensional de VRK1 .....  | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema resumen de las principales proteínas y modificaciones epigenéticas implicadas en la respuesta al daño génico (DSBs) que permiten el reclutamiento de BRCA1 y 53BP1 ..... | 14 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema resumen de los sustratos más importantes de VRK1 con los residuos de fosforilación específicos.....  | 17 |
| <b>Figura 5.</b> Mutaciones de VRK1 identificadas hasta ahora .....   | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Representación de los cuerpos de Cajal .....   | 28 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema modular de la estructura primaria de coilina .....   | 29 |
| <b>Figura 8.</b> Modelo de la regulación del ensamblaje de los cuerpos de Cajal por VRK1. ....  | 30 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema de una motoneurona (MN) en crecimiento donde se indica la localización de SMN .....  | 31 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema en el que se presenta la diferencia entre <i>SMN1</i> y <i>SMN2</i> .....   | 32 |
| <b>Figura 11.</b> Esquema de la estructura de SMN completa .....  | 33 |
| <b>Figura 12.</b> Esquema del papel de SMN en el ensamblaje de las RNPsn y maduración de los pre-RNA mensajeros .....   | 35 |
| <b>Figura 13.</b> Esquema del papel de SMN en el transporte de ARNm a lo largo del axón neuronal.....   | 37 |
| <b>Figura 14.</b> Estructura de VCP .....   | 39 |
| <b>Figura 15.</b> Modelo de la función de VCP en el reclutamiento de 53BP1 a los sitios de daño en el ADN.....  | 41 |
| <b>Figura 16.</b> Localización en la estructura tridimensional de VRK1 de los aminoácidos afectados en los distintos pacientes.....   | 80 |
| <b>Figura 17.</b> Estructura de VRK1 con la mutación P79L .....   | 80 |
| <b>Figura 18.</b> Estructura de VRK1 con la mutación Y213H.....   | 81 |
| <b>Figura 19.</b> Estructura de VRK1 con la mutación R219I.....   | 81 |
| <b>Figura 20.</b> Estructura de VRK1 con la mutación T228M.....   | 82 |
| <b>Figura 21.</b> Estructura de VRK1 con la mutación R241C.....   | 82 |
| <b>Figura 22.</b> Estructura de VRK1 con la mutación W254L.....   | 83 |
| <b>Figura 23.</b> Estructura de VRK1 con la mutación D263G .....  | 84 |
| <b>Figura 24.</b> Estructura de VRK1 con la mutación D267G .....  | 84 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 25.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 presentan estabilidades distintas a nivel proteico .....   | <b>86</b>  |
| <b>Figura 26.</b> Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre la histona H3..   | <b>87</b>  |
| <b>Figura 27.</b> Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre BAF y su autofosforilación .....  | <b>89</b>  |
| <b>Figura 28.</b> Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre p53, H2A.X y 53BP1 .....  | <b>91</b>  |
| <b>Figura 29.</b> Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre coilina .....   | <b>92</b>  |
| <b>Figura 30.</b> Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murino en los clones elegidos de las líneas estables <i>HeLa</i> .....  | <b>94</b>  |
| <b>Figura 31.</b> Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murino en los clones elegidos de las líneas estables <i>A549</i> .....  | <b>95</b>  |
| <b>Figura 32.</b> La autofosforilación y fosforilación de H3 del VRK1 murino es mayor que la de VRK1 humano .....  | <b>96</b>  |
| <b>Figura 33.</b> Fenotipo de las células de las líneas estables <i>HeLa</i> generadas.....  | <b>98</b>  |
| <b>Figura 34.</b> Cuantificación del área, distancia recorrida y velocidad de desplazamiento de las células de las líneas <i>HeLa</i> estables .....   | <b>99</b>  |
| <b>Figura 35.</b> Fenotipo de las células de las líneas estables <i>A549</i> generadas.....  | <b>101</b> |
| <b>Figura 36.</b> Cuantificación del área, distancia recorrida y velocidad de desplazamiento de las células de las líneas <i>A549</i> estables .....   | <b>102</b> |
| <b>Figura 37.</b> Ensayo de cierre de herida en las líneas estables <i>HeLa</i> y <i>A549</i> .....  | <b>108</b> |
| <b>Figura 38.</b> Las células que poseen las variantes patogénicas de VRK1 acumulan más daño oxidativo en el ADN, observado con 8-oxo-G .....  | <b>109</b> |
| <b>Figura 39.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar los niveles de H4K16ac ante daño en el ADN .....  | <b>112</b> |
| <b>Figura 40.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 mR89Q, mY213H y mD263G no son capaces de rescatar la formación de focos de $\gamma$ H2A.X ni de 53BP1 ante daño en el ADN .....  | <b>117</b> |
| <b>Figura 41.</b> Ensayos quinasa en los que se observa que las variantes patogénicas de VRK1 que poseen actividad catalítica (mR89Q, mL195V, mR219I), son capaces de fosforilar a los sustratos H2A.X y 53BP1 <i>in vitro</i> ante daño en el ADN ..... | <b>120</b> |
| <b>Figura 42.</b> La fosforilación de TIP-60 ante daño en el ADN no se recupera en las líneas <i>A549</i> que expresan las variantes de VRK1 .....   | <b>123</b> |
| <b>Figura 43.</b> Las células que expresan variantes patogénicas mR89Q, mY213H y mD263G de VRK1 muestran variaciones en el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 9 de la H3 .....   | <b>129</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 44.</b> Las células que expresan variantes patogénicas mR89Q, mY213H y mD263G de VRK1 muestran variaciones en el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 ..... | <b>132</b> |
| <b>Figura 45.</b> A los tres días de silenciamiento del gen <i>VRK1</i> los niveles de coilina se mantienen, pero no se forman cuerpos de Cajal en células <i>HeLa</i> .....                            | <b>134</b> |
| <b>Figura 46.</b> Se rescata la formación de los CBs en la línea estable mR219I <i>HeLa</i> .....   | <b>138</b> |
| <b>Figura 47.</b> Durante la mitosis, se fosforila el residuo Ser184 de la coilina y se rescata esta fosforilación con la expresión de la quinasa VRK1 murina .....                                     | <b>140</b> |
| <b>Figura 48.</b> La fosforilación de la serina 184 de la coilina se pierde en la mayoría de las líneas <i>HeLa</i> que expresan las variantes patogénicas de mVRK1 .....                               | <b>143</b> |
| <b>Figura 49.</b> La variante patogénica de VRK1 murino mR89Q, rescata la formación de los CBs en las células .....   | <b>143</b> |
| <b>Figura 50.</b> El residuo Ser184 de la coilina se encuentra fosforilado en las células que expresan las variantes patogénicas murinas de VRK1 mR89Q y mR387H .....                                   | <b>144</b> |
| <b>Figura 51.</b> Los niveles de coilina no disminuyen en presencia de las variantes patogénicas de VRK1 mL195V, mR219I, mT228M, mR89Q y mR387H.....  | <b>146</b> |
| <b>Figura 52.</b> En presencia de las variantes patogénicas de VRK1 mL195V, mR219I, mT228M, mR89Q y mR387H, la coilina se encuentra fosforilada en el residuo serina 184 .....                          | <b>147</b> |
| <b>Figura 53.</b> La interacción Coilina-VRK1 se ve alterada cuando se expresan las variantes patogénicas de la quinasa.....  | <b>151</b> |
| <b>Figura 54.</b> VRK1, SMN, VCP y coilina interaccionan entre sí.....  | <b>154</b> |
| <b>Figura 55.</b> VCP y SMN interaccionan tanto en el núcleo como en el citosol. ....   | <b>155</b> |
| <b>Figura 56.</b> El silenciamiento de la quinasa no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN, mientras que la coilina es más inestable cuando VRK1 se encuentra ausente .....                          | <b>156</b> |
| <b>Figura 57.</b> El silenciamiento de VRK1 produce un aumento de los niveles de ARNm de SMN, pero no de los de VCP .....   | <b>158</b> |
| <b>Figura 58.</b> Los niveles de SMN aumentan en el citosol, mientras que los de VCP lo hacen en el núcleo cuando se silencia VRK1 .....  | <b>161</b> |
| <b>Figura 59.</b> Los niveles de VCP aumentan en el núcleo cuando se silencia el gen <i>VRK1</i> y al tratar las células con doxorubicina .....   | <b>164</b> |
| <b>Figura 60.</b> La interacción SMN-VCP aumenta cuando se silencia VRK1.....   | <b>165</b> |
| <b>Figura 61.</b> La interacción SMN-VCP aumenta cuando se silencia VRK1, tanto en el núcleo como en el citosol.....  | <b>166</b> |
| <b>Figura 62.</b> Interacción de las variantes patogénicas de VRK1 humano con SMN y VCP .....   | <b>168</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 63.</b> Los niveles citosólicos de SMN aumentan en la mayoría de las líneas que portan las variantes patogénicas de VRK1 .....                | <b>172</b> |
| <b>Figura 64.</b> Los niveles nucleares de VCP aumentan en la mayoría de las líneas que portan las variantes patogénicas de VRK1 .....                  | <b>176</b> |
| <b>Figura 65.</b> Los niveles citosólicos de SMN aumentan en las líneas que portan las variantes patogénicas mY213H y mR321C.....                       | <b>177</b> |
| <b>Figura 66.</b> La mayoría de las líneas que portan las variantes patogénicas de VRK1 acumulan daño en el ADN .....                                   | <b>179</b> |
| <b>Figura 67.</b> Los niveles de ARNm <i>SMN</i> no se alteran en las células que portan las variantes de la quinasa VRK1.....                          | <b>181</b> |
| <b>Figura 68.</b> VCP interacciona con VRK1 y SMN sobre todo durante la fase G2/M....   | <b>182</b> |
| <b>Figura 69.</b> La interacción entre SMN y VCP aumenta cuando se silencia VRK1 en células paradas en G0 .....   | <b>183</b> |
| <b>Figura 70.</b> La interacción SMN-VCP aumenta en las líneas que poseen las variantes murinas de VRK1 .....   | <b>184</b> |
| <b>Figura 71.</b> Modelo de la interacción VCP-SMN durante el ciclo celular cuando la quinasa VRK1 está presente o ausente.....                         | <b>207</b> |
| <b>Figura 72.</b> Estructura tridimensional de VRK1 en la que se muestran algunos de los residuos que se encuentran dispuestos hacia la superficie..... | <b>209</b> |
| <b>Figura 73.</b> Modelo de hipótesis de la interacción VCP-SMN en las células que presentan las variantes patogénicas de VRK1 .....                    | <b>211</b> |
| <b>Figura 74.</b> Esquema donde se representan las enfermedades neurodegenerativas asociadas a las proteínas estudiadas.....                            | <b>213</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabla 1.</b> Cuadro clínico que presentan los pacientes con las variantes de VRK1 .....                   | <b>22</b>  |
| <b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos usados para secuenciación .....   | <b>68</b>  |
| <b>Tabla 3.</b> ARN de interferencia usados en este trabajo .....  | <b>68</b>  |
| <b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos usados para realizar RT-PCR cuantitativa .....                              | <b>68</b>  |
| <b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos usados para la mutagénesis directa de VRK1 humano ....                      | <b>69</b>  |
| <b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos usados para la mutagénesis directa de VRK1 murino .....                     | <b>70</b>  |
| <b>Tabla 7.</b> Anticuerpos usados en este trabajo .....   | <b>71</b>  |
| <b>Tabla 8.</b> Líneas celulares usadas en este trabajo .....  | <b>72</b>  |
| <b>Tabla 9.</b> Líneas celulares estables A549 portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 .....         | <b>72</b>  |
| <b>Tabla 10.</b> Líneas celulares estables <i>HeLa</i> portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ..... | <b>73</b>  |
| <b>Tabla 11.</b> Construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo .....                                 | <b>74</b>  |
| <b>Tabla 12.</b> Frecuencia alélica de las variantes patogénicas de la quinasa VRK1 .....                    | <b>77</b>  |
| <b>Tabla 13.</b> Tabla resumen de los resultados obtenidos en este trabajos .....                            | <b>213</b> |



# ÍNDICE ANEXOS

|   |            |
|---|------------|
| <b>Anexo 1.</b> Ensayo de cierre de herida en las líneas celulares estables <i>HeLa</i> .....   | <b>243</b> |
| <b>Anexo 2.</b> Ensayo de cierre de herida en las líneas celulares estables <i>A549</i> .....   | <b>247</b> |
| <b>Anexo 3.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la acetilación de la H4K16 ante daño en el ADN.....  | <b>251</b> |
| <b>Anexo 4.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la formación de focos de $\gamma$ H2A.X ante daño en el ADN.....                               | <b>257</b> |
| <b>Anexo 5.</b> Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la formación de focos de 53BP1 ante daño en el ADN.....  | <b>263</b> |
| <b>Anexo 6.</b> El silenciamiento de la quinasa no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN, mientras que la coilina es más inestable cuando VRK1 se encuentra ausente..... | <b>269</b> |



# GLOSARIO DE ABREVIATURAS

## A

aa: aminoácido  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN codificante  
ALS: esclerosis lateral amiotrófica  
APP: Amyloid precursor protein  
APS: persulfato amónico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ARNsn: Small nuclear RNA  
ARNsno: Small nucleolar RNA  
ATF-2: Activating transcription factor 2  
ATL1: Atlastin-1  
ATM: Ataxia-telangiectasia mutated  
ATP: adenosina 5' trifosfato  
ATPasas AAA: AAA- ATPases  
*Associated with a variety of Activities*  
ATR: Ataxia-telangiectasia and RAD3  
*related protein*

## B

BAB: motivo básico-ácido-básico  
BAF: Barrier to autointeraction factor  
BAX: BCL2-associated X protein  
Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large  
Bdnf: Brain-derived neurotrophic  
factor  
BRCA1: Breast cancer associated 1  
BSA: Bovine serum albumin

## C

CAMK-IV: Calcium/calmodulin  
*dependent protein kinase IV*  
CB: Cajal o Coiled body  
CDC25A: Cell division cycle 25  
*homolog A*  
Cdk: Cyclin-dependent kinase  
Chk2: Checkpoint kinase 2  
CK1: caseína quinasa de tipo 1

CREB: cAMP response element-  
binding  
Ct: Cycle threshold  
C-term: carboxilo terminal

## D

DAPI: 4', 6', diamidino-2 fenil indol  
DDR: DNA Damage response  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's  
*medium-low glucose*  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DNA-PK: DNA dependent protein  
kinase  
DNA-PKcs: DNA-dependent protein  
kinase, catalytic subunit  
dNTPs: deoxynucleotide triphosphates  
DRAM: Damage-regulated autophagy  
modulator  
DSB: Double-strand break  
DTT: ditiotreitol  
DYG: (motivo) aspártico-tirosina-  
glicina

## E

EDTA: ethylenediamine-tetraacetic  
acid  
EFG: Elongation factor G  
ERK1/2: Extracellular signal-regulated  
kinase 1/2  
EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

## F

FBS: Fetal bovine serum  
FTD: demencia frontotemporal

## G

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate  
dehydrogenase  
GFP: green fluorescent protein

GST: Glutathione S-transferase

## H

h: hora

H2A.X: histona 2A.X

HA: hemagutina

HD: Enfermedad de Huntington

HDAC: Histone deacetylase

HLBs: histone-locus Bodies

HMSN: Hereditary motor and sensory neuropathies

HR: Homologous recombination

HSP: paraplejia espástica hereditaria

## I

iCDR: inducide Centromeric Damage Response

IF: inmunofluorescencia

IP: inmunoprecipitación

IPTG: isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

## J

JMJD2a: Jumonji C domain-containing lysine demethylase

JNK: c-Jun N-terminal kinase

## K

kb: kilobase

kDa: kilodalton

KDM3A: Lysine Demethylase 3A

## L

L1CAM: L1 Cell Adhesion Molecule

L3MBTL1: Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1

LB: medio Lysogeny Broth

LEM: LAP2, emerin, MAN1 domain

## M

M: molar

MBP: proteína básica de mielina

MDC1: Mediator of DNA damage checkpoint protein 1

Mdm2: Murine doble minute 2

MEK1: Mitogen-activated protein kinase 1

MICAL: Molecule interacting with CasL

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mVRK1: VRK1 murino

m/v: relación masa/volumen

## N

NFAT: Nuclear factor of activated T cells

NBS1: Nijmegen Breakage Syndrome protein 1

NHEJR: Non-homologous end-joining repair

NLK: Nemo-like kinase

NLS: nuclear localization signal

NoLS: nucleolar localization signal

nm: nanómetro

nM: nanomolar

N-term: amino terminal

## P

PBS: phosphate buffer salinum

PCH: pontocerebellar hypoplasia

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PCR: Polympeierase chain reaction

PEI: polietilenimina

PICln: Chloride conductance regulatory protein

PKA: Protein kinase A

Plk3: Polo-like kinase 3)

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

poliQ: poliglutamina



pre-ARNm: precursor de ARNm  
PRMT5: Protein arginine methyltransferase 5.  
PVDF: Polyvinylidene fluoride

## Q

qRT-PCR: Quantitative reverse transcriptase-PCR

## R

RNF: RING finger protein  
RNPs: ribonucleoproteínas  
ROS: Radicales libres de oxígeno  
RNPhn-Q / R: ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas Q y R  
RNPs<sub>n</sub>: Small nuclear ribonucleoprotein  
RNPs<sub>no</sub>: Small nucleolar ribonucleoprotein

## S

SDS: sodium Dodecylsulfate  
SDS-PAGE: SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis  
SETDB1: SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1  
siARN: small-interference RNA  
SMA: Spinal muscular atrophy  
SmB: Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B  
SMN: Survival motor neuron  
SNAP25: Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa  
SSB: Single-strand break

## T

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBS-T: Tris buffer salino con Tween 20  
TDP-43: TAR DNA-binding protein 43  
TE: Tris-EDTA  
TIP-60/KAT5: Lysine acetyltransferase 5  
TRiC: T-complex protein Ring Complex

## U

Ub: ubiquitina  
UNRIP: UNR-interacting protein  
Ufd1-Npl4: Ubiquitin fusion degradation 1 - Nuclear protein localization 4  
UV: ultravioleta

## V

V: voltio  
VCP: Valosin contained protein  
VEA: valina-glutamina-alanina  
VHR: Von Hippel-Lindau  
VRK: Vaccinia-related kinase  
v/v: relación volumen/volumen

## W

WB: Western blot  
WRN: Werner Syndrome Protein wt: Wild type

53BP1: p53-binding protein 1  
x g: giros  
μCi: microcurio  
μg: microgramo  
μL: microlitro  
μM: micromolar  
°C: grados centígrados



# INTRODUCCIÓN



## 1. LAS PROTEÍNAS QUINASAS

Las proteínas quinasas son enzimas encargadas de fosforilar proteínas específicas, es decir, catalizan la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de treonina, serina o tirosina de las proteínas diana. El dominio quinasa o dominio catalítico de estas proteínas, formado por una secuencia de unos 250-300 aminoácidos, está altamente conservado en la evolución [1].

La fosforilación es una modificación postraduccional que regula distintos procesos celulares, como la proliferación, diferenciación o el metabolismo, mediante cambios en la localización subcelular de las proteínas, en su interacción con otras moléculas, actividad o en su estabilidad [2–3]. Esta modificación está muy regulada en la célula, dada la importancia de los procesos en los que participa. Las fosfatasa son otro tipo de proteínas capaces de eliminar el grupo fosfato añadido por las quinasas [4].

En 1995 se describió el quinoma humano, en el que se encuentran clasificadas filogenéticamente las quinasas humanas. Esta clasificación fue ampliada en 2002 por Manning y colaboradores. Hasta la fecha, se han descrito 518 genes codificantes y 106 pseudogenes con secuencias de dominio quinasa. El quinoma se divide en 8 grupos y estos a su vez, en familias. La familia de las serina-treonina quinasas VRK (del inglés *Vaccinia-related kinase*) se encuentra dentro del grupo caseína quinasa de tipo 1 (CK1) [1–5–6] y son en las que nos centraremos en este trabajo.

### 1.1. La familia VRK

La familia VRK consta de tres miembros, VRK1, VRK2 y VRK3 [7]. VRK1 fue el primer miembro descrito en 1997 por Nezu y colaboradores [8], quienes lo identificaron buscando genes expresados en tejidos altamente proliferativos, utilizando una librería de ADN complementario enriquecida en genes fetales de hígado. Posteriormente, se identificó VRK2, que presenta un 62% de homología con VRK1. Este grupo de quinasas se denominó *Vaccinia-related kinase* al presentar una alta homología con la quinasa B1R del virus *Vaccinia*, que es esencial para la replicación de su material genético [8]. Además, la

expresión de VRK1 humano y murino en virus sin B1R, es capaz de rescatar la replicación del ADN [9]. VRK3 se identificó la última en bases de datos de librerías de ADN [10].

Se ha descrito que los tres genes de VRK surgieron de una rama común que se duplicó dos veces en los vertebrados, mientras que los invertebrados solo conservan el gen ancestral [11]. En levaduras no existen ortólogos, pero el gen *hrr25* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *hhp1* de *Schizosaccharomyces pombe* se consideran los ancestros en estos organismos [12–13]. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* existe un ortólogo de VRK1 codificado por el gen *F28B12.3*, que es esencial para la proliferación de las células germinales y regula la actividad de CEP-1 (ortólogo de p53). Además, es capaz de fosforilar a BAF (del inglés *Barrier to autointegration factor*) al igual que VRK1, participando en la formación de la envoltura nuclear [14–15]. *Drosophila melanogaster* presenta el gen *NHK-1* ortólogo de VRK1 que fosforila a histona H2A en mitosis y a BAF [16–17]. Finalmente, el ratón, *Mus musculus*, presenta tres ortólogos, que se expresan sobre todo en tejidos con alta tasa proliferativa durante el desarrollo embrionario, variando su expresión dependiendo del tejido en adultos [18–19]. También se han descrito ortólogos de las quinzas VRK en *Danio rerio*, *Xenopus laevis* y *Pan troglodytes*.

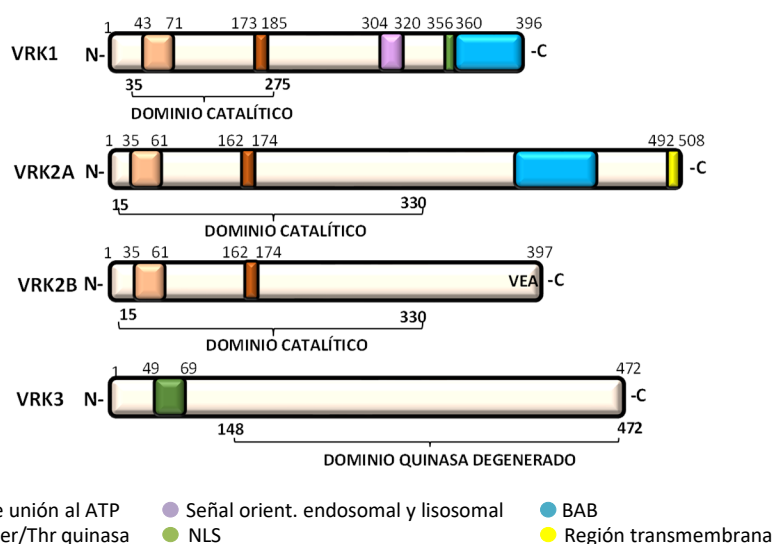
## 1.2. Estructura de las quinzas VRK

El gen *VRK1* se encuentra en la región cromosómica 14q32; y da lugar a un ARN mensajero de 13 exones. La quinza humana VRK1 consta de 396 aminoácidos. En su extremo amino terminal se encuentra el dominio Ser/Thr quinza activo (residuos 173-185), que presenta homología con el de la caseína quinza de tipo 1. En el carboxilo terminal, se localiza una secuencia de orientación endosomal y lisosomal (residuos 304-320), y una señal de localización nuclear (residuos 356-360), además de una región ácida flanqueada por dos regiones básicas (motivo básico-ácido-básico, BAB) (residuos 356-396) (Figura 1). La región carboxilo terminal no presenta homología con los otros dos miembros de VRK, por lo que se piensa que puede ser la región reguladora de la quinza [7–16–20].

- INTRODUCCIÓN -

El gen *VRK2* se encuentra en la región cromosómica 2p16 y codifica a dos isoformas, *VRK2A* y *VRK2B*, mediante procesamiento alternativo del ARNm. La isoforma *VRK2A* consta de 508 aminoácidos. Posee un dominio quinasa activo (residuos 162-174) y un sitio de unión al ATP (residuos 35-61) en su extremo amino terminal, seguido de una región transmembrana hidrofóbica (residuos 492-508), y dos motivos BAB solapados [7–21]. Por su parte, *VRK2B*, de 397 aminoácidos, comparte su secuencia con *VRK2A* hasta el aminoácido 394, donde presenta un codón de terminación reemplazando los aminoácidos 395-508 por los residuos valina-glutamato-alanina (VEA) [21]. Por tanto, esta isoforma carece de la región transmembrana y el motivo BAB se encuentra truncado (Figura 1).

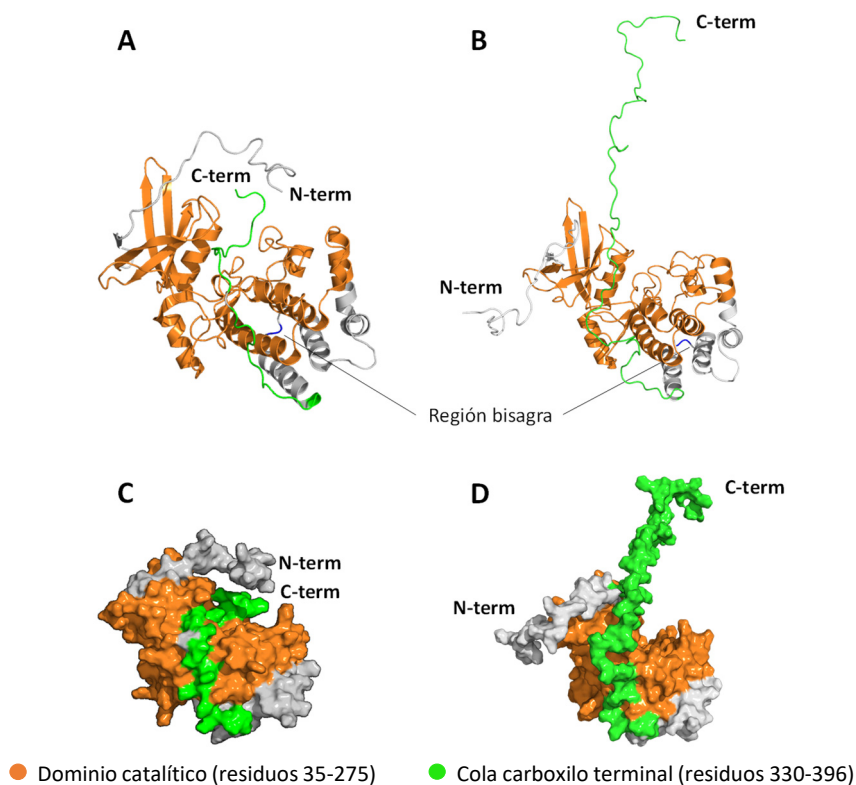
Por último, el gen *VRK3* se encuentra en la región cromosómica 19q13 y da una proteína de 474 aminoácidos. En su extremo amino terminal, posee una señal de localización nuclear (residuos 49-69) y, en el carboxilo terminal, un dominio quinasa (residuos 148-472) que hasta hace unos años se pensaba que no tenía actividad (Figura 1) [7–22]. Sin embargo, en un estudio en 2015 se describió que *VRK3* sí muestra actividad quinasa gracias a un dominio extracatalítico en el extremo amino terminal (residuos 1-147) [23].



**Figura 1. Esquema modular de la estructura de las quinases de la familia VRK.** Se muestra la leyenda del código de colores utilizado para representar los distintos dominios.

- INTRODUCCIÓN -

Se conoce la estructura tridimensional de los dominios catalíticos de los tres miembros de la familia VRK. VRK1 posee un *loop* catalítico donde está localizado el sitio de unión al ATP, que se encarga de situar el ATP de forma correcta y un motivo DYG, necesario para la transferencia del fosfato del ATP. Además, el extremo carboxilo terminal se encuentra plegado hacia el sitio catalítico gracias a los residuos glutamato 313 y lisina 314, que forman una región bisagra (Figura 2). Esto es esencial porque las interacciones que se producen entre este extremo y el sitio catalítico son fundamentales para la estabilidad estructural y actividad catalítica de VRK1. Además, ciertos sustratos interactúan con residuos del extremo carboxilo, por lo que parece que es importante para su correcta actividad [24].



**Figura 2. Representación tridimensional de VRK1.** A, B. Representación de la estructura terciaria de la conformación cerrada y abierta de VRK1. C, D. Representación de la superficie de VRK1 en conformación cerrada y abierta. Se resaltan el dominio catalítico, la región bisagra y el extremo amino (N-term) y carboxilo (C-term) terminal de la quinasa. Imagen realizada con *Pymol*, Código de PDB: 2LAV.



A diferencia de la mayoría de las quinasas, los miembros de la familia VRK poseen una  $\alpha$  hélice adicional ( $\alpha$ C4) en el dominio quinasa que les confiere activación constitutiva [22].

### 1.3. Regulación de las quinasas VRK

Existen distintos tipos de regulación de la quinasa VRK1 en respuesta a estímulos. A nivel transcripcional, se ha visto que los factores de crecimiento presentes en el suero activan a VRK1 [25]. Además, los factores de transcripción E2F y Myc activan la expresión de VRK1 al unirse a su promotor [26–27]. En 2014, se describió que EWS-FLI1, un factor de transcripción aberrante propio del sarcoma de Ewing, también es capaz de activar el promotor de VRK1 [28].

La regulación de las quinasas VRK a nivel postraduccional también es fundamental. Se ha descrito la cola carboxilo terminal de VRK1 como la región reguladora de la quinasa. La autofosforilación del residuo treonina 355 es esencial para su estabilidad [20] y actividad catalítica [29]. Así, VRK1 se autofosforila y fosforila a la histona H3, BAF o CREB (del inglés *cAMP response element-binding*) promoviendo la proliferación celular. Además, se ha visto que la actividad de VRK1 aumenta tras la exposición a luz UV, radiación ionizante o drogas como la doxorubicina que inducen daño en el ADN, sin afectar a sus niveles proteicos [31–32].

Por otra parte, la actividad tanto de VRK1 como de VRK2 se regula por interacción directa con otras proteínas, como la GTPasa Ran (del inglés *Ras-related nuclear protein*). Se ha descrito que cuando están unidas a Ran-GTP, ambas quinasas son activas, mientras que cuando lo están a Ran-GDP son inactivas [33]. También se ha visto que, durante la interfase, la macro histona H2A.1.2 interacciona con VRK1, lo que impide que fosforile a la histona H3 y BAF [34].

Por último, el estudio de la regulación potencial mediante inhibidores específicos de otras quinasas y mediante metales sobre la actividad de las quinasas VRK [35], reveló que la sensibilidad a estos inhibidores es muy baja

y diferente entre los miembros de la familia. En 2014, se describió la luteolina como un inhibidor específico de VRK1, capaz de reducir la fosforilación de BAF y de la histona H3, regulando de esta forma el ciclo celular [36].

#### **1.4. La quinasa humana VRK1**

Actualmente, el miembro de la familia VRK que está mejor caracterizado es VRK1. Se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, incluyendo el cerebral y cerebelar fetal y adulto, pero su expresión es mayor en tejidos con altos índices de proliferación, como el hepático, tímico y testicular fetales, así como en las líneas celulares tumorales [8–19]. A nivel subcelular, VRK1 es una proteína principalmente nuclear debido a la señal de localización nuclear que posee en el extremo carboxilo terminal, encontrándose libre en el nucleoplasma o asociada a la cromatina [20–37]. También se encuentra una pequeña fracción en el citosol y en las membranas del aparato de Golgi [19–20].

VRK1 participa en numerosos procesos celulares. Se ha asociado con el control de la progresión del ciclo celular y con proliferación, dado que regula distintos factores de transcripción. Se requiere para la condensación de la cromatina, desmontaje y reensamblaje de la membrana nuclear y para la fragmentación del aparato de Golgi en la mitosis y además, está implicado en respuestas al daño del ADN [25–38–40]. Actualmente, también se está estudiando su papel en procesos neurodegenerativos. A continuación se explica el papel de VRK1 en los procesos mencionados.

##### **1.4.1. Implicación de VRK1 en proliferación y progresión del ciclo celular**

Desde la caracterización de VRK1 en 1997 [8], se ha destacado la importancia de la expresión de esta quinasa en la proliferación celular. En concreto, se ha demostrado que se correlaciona positivamente con el marcador proliferativo Ki67 en las células cercanas a la capa basal de los epitelios escamosos humanos normales [26]. A su vez, muestra correlación

positiva con p63, marcador de células madre y proliferación, en epitelios escamosos de faringe [25–32], y con Cdk2, Cdk6, Ciclina A, survivina (marcadores de progresión de ciclo celular) en tumores escamosos de cabeza y cuello [26–37]. Por el contrario, al inhibir la expresión de VRK1, se reducen los niveles de los marcadores de proliferación Ciclina D1, Ciclina A y PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) entre otros, provocando una parada de ciclo celular en G0/G1 [25–32]. Además, se ha descrito que al inhibir la expresión de esta quinasa en líneas de sarcoma de Ewing, se produce una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis [28]. Así pues, VRK1 es indispensable para la correcta progresión del ciclo celular y se expresa en mayor medida en células cuya tasa proliferativa es muy elevada.

#### 1.4.2. Regulación de factores de transcripción mediada por VRK1

VRK1 puede fosforilar distintos factores de transcripción. La regulación mediada por VRK1 mejor caracterizada es la del supresor tumoral p53, que se encarga de inducir la parada de ciclo celular o la entrada en apoptosis cuando existen mutaciones en el ADN. Se degrada vía proteasoma al unirse a la ubiquitina ligasa Mdm2 (del inglés *Murine double minute 2*), mientras que al unirse a la acetiltransferasa p300, se estabiliza. Así pues, VRK1 fosforila a p53 en la treonina 18, lo que impide su unión a Mdm2, favoreciendo la acetilación de las lisinas 373 y 382 de p53 mediada por p300 [17, 28, 38]. Además, p53 también regula a VRK1. Cuando se activa p53, se induce la expresión de DRAM (del inglés *Damage-regulated autophagy modulator*) lo que promueve la degradación de VRK1 vía endocítica-lisosomal [32]. También se ha descrito que el complejo VRK1-p53 puede considerarse un buen marcador temprano de respuesta a daño en el ADN por luz ultravioleta [42].

ATF-2 (del inglés *Activating transcription factor 2*) media la activación de genes implicados en diferenciación, ciclo celular y respuesta inmune. Al igual que las quinastas PKA (del inglés *Protein kinase A*) y CAMK-IV (del inglés *Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV*), VRK1 también fosforila los residuos serina 62 y treonina 73 de ATF-2, promoviendo su acumulación y activación transcripcional [43].

VRK1 también activa al factor CREB a través de su fosforilación en la serina 133, al igual que PKA [27]. La activación de CREB y de ATF-2 mediada por VRK1, permite la unión de los factores al promotor de la Ciclina D1, induciendo su expresión y promoviendo de esta manera la transición de la fase G1 a S del ciclo celular [43].

Por último, c-Jun es un factor de transcripción que controla distintos mecanismos celulares (apoptosis, diferenciación, proliferación) al regular la expresión de factores de crecimiento y citoquinas. VRK1 fosforila las serinas 63 y 73 de c-Jun, también fosforilados por JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*), estabilizando y activando al factor [44].

#### 1.4.3. Implicación de VRK1 en la remodelación de la cromatina

La remodelación de la cromatina es esencial para numerosos procesos, como la activación y represión transcripcional o la reparación del ADN. Para ello, las histonas sufren distintas modificaciones postraduccionales: fosforilación, acetilación, metilación, sumoilación y ubiquitinación [45–46]. VRK1 fosforila a la histona 3 (H3) en la treonina 3, también fosforilada por la quinasa Haspina [38–47]. La fosforilación de esta histona está asociada a la relajación de la cromatina y transcripción génica [48].

Las histonas 2A, 2B y 4 (H2A, H2B y H4) también son dianas de VRK1. Su fosforilación conduce a la transición G2/M, al participar en la condensación de la cromatina durante este proceso [47]. La fosforilación de la variante H2A.X media además el reclutamiento de proteínas a los sitios de daño en el ADN, como se explicará posteriormente.

Así mismo, VRK1 regula indirectamente la metilación y acetilación de histonas [38]. Nuestro laboratorio ha descrito recientemente que la acetiltransferasa de histonas TIP-60 es regulada mediante la fosforilación por VRK1. Esto esencial para la relajación local de la cromatina en el sitio de daño, dado que media la acetilación de la lisina 16 de la histona 4 (H4K16ac). Este paso es necesario para el reclutamiento posterior de las proteínas reparadoras al sitio de daño en el ADN [49].

#### 1.4.4. VRK1 en la fragmentación del aparato de Golgi

La fragmentación del aparato de Golgi en pequeñas vesículas, su dispersión y reensamblaje en las dos nuevas células es esencial durante la división celular. Las quinasas MEK1 (de la siglas *Mitogen-activated protein kinase 1*) y PLK3 (de la siglas *Polo-like kinase 3*) participan durante el proceso de fragmentación de este orgánulo [50–51]. PLK3 fosforila a VRK1 en la serina 342 formándose un complejo estable en el aparato del Golgi durante G2/M. Tanto la inhibición de la expresión de VRK1 como la sobreexpresión de un mutante inactivo de esta quinasa bloquean parcialmente la fragmentación del orgánulo, por lo que VRK1 también parece ser esencial en este proceso [39].

#### 1.4.5. Implicación de VRK1 durante el ensamblaje de la envoltura nuclear

Al principio de la mitosis, la envoltura nuclear se desintegra y se vuelve a formar durante la telofase, cuando la división se ha llevado a cabo. La proteína BAF es esencial para el mantenimiento de la arquitectura nuclear, ya que se une al ADN independientemente de su secuencia y a proteínas que presentan el dominio LEM (del inglés *LAP2*, *emerin*, *MAN1 domain*) que se encuentran en la membrana nuclear interna [40–52–53]. La fosforilación de BAF por la quinasa VRK1 en la serina 4 y las treoninas 2 y 3 es esencial para que BAF se libere de la cromatina, permitiendo que se condense en ADN y se desensamble la envoltura nuclear [40].

#### 1.4.6. La respuesta a daño en el ADN y la implicación de VRK1

VRK1 es una quinasa que se activa en respuesta al daño en el ADN generado por factores endógenos y exógenos. El sistema de reparación del daño en el ADN (DDR, del inglés *Damage DNA response*) tiene como función la detección, señalización y reparación de la rotura o mutación en dicha molécula. Cuando se detecta daño en el ADN, se produce una parada en el ciclo celular para evitar su replicación y propagación a las células hijas. Entonces, el sistema DDR activa la ruta de reparación del ADN, y, posteriormente, la célula puede volver a dividirse. En cambio, si el daño ha

sido demasiado grave para poder ser reparado, la célula entra en apoptosis.

Las células presentan distintas formas de reparación del daño en el ADN, dependiendo de si se produce una rotura en una única cadena (*Single-strand breaks* o SSBs) o en las dos (*Double-strand breaks* o DSBs). Las DSBs se pueden reparar por procesos de recombinación homóloga (*Homologous recombination* o HR) o, mayoritariamente, de unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end-joining repair* o NHEJ). La detección y la señalización de las roturas de doble cadena y la fase del ciclo celular en la que se produzca el daño determinarán el mecanismo de reparación.

Se ha descrito que, cuando se produce daño en el ADN por luz ultravioleta (DSBs), VRK1 fosforila inmediatamente a p53 en la treonina 18, permitiendo su acumulación en la célula y la parada de ciclo [42]. Uno de los primeros procesos que se deben de llevar a cabo en la respuesta a DSBs es la relajación local de la cromatina. Esto está asociado a un aumento de la acetilación de H4 y H2A. VRK1 participa inicialmente regulando la acetilación de las histonas necesaria para la relajación de la cromatina, independientemente de ATM (del inglés *Ataxia-telangiectasia mutated*) y p53. De hecho, VRK1 parece que actúa *upstream* de ATM, ya que el silenciamiento del gen de la quinasa evita la activación de ATM y de otras quinastas como Chk2 (del inglés *Checkpoint kinase 2*) y DNA-PK (del inglés *DNA dependent protein kinase*) [54].

La regulación de la acetilación de las histonas se lleva a cabo gracias a acetiltransferasas. TIP-60/KAT5 (del inglés *Lysine acetyltransferase 5*), en concreto, media la acetilación del residuo lisina 16 de la H4 (H4K16ac), fosforilándose directamente por VRK1 y activándose [49–55]. La H4K16ac facilita el acceso de proteínas reparadoras al sitio de daño y su pérdida se asocia a una mala reparación de la molécula. Tras la inducción del daño, TIP-60 acetila la lisina 3016 de ATM y, posteriormente, ésta se autofosforila en los residuos serina 367, 1893, 1981 y 2996 y treonina 1885 [56]. Una vez fosforilada, ATM se recluta a los sitios de daño, gracias al complejo MRN (formado por Mre11-Rad50-NBS1). Por su parte, la fosforilación de NBS1 (del inglés *Nijmegen Breakage Syndrome protein 1*) por VKR1 media el

reclutamiento de otras proteínas que están también implicadas en la reparación [57].

Tras el reclutamiento del complejo MRN, la variante de la histona H2A.X se fosforila en la serina 139 (denominándose  $\gamma$ H2A.X) [58], gracias a las quinasas VRK1, ATM, ATR (del inglés *Ataxia-telangiectasia and RAD3 related protein*) y DNA-PKcs (del inglés *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), lo que promueve la acumulación de otras proteínas en estos sitios [38–59]. Una de las proteínas es MDC1 (del inglés *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) que reconoce a  $\gamma$ H2A.X, favoreciendo la formación de un bucle de retroalimentación positivo que permite amplificar la respuesta [55].

Además de la acetilación y fosforilación, la ubiquitinación de las histonas también es esencial para el reclutamiento de proteínas mediadoras de respuesta al daño. Así pues, tanto el reclutamiento de MCD1 como la ubiquitinación de H2A/H2A.X permiten la acumulación de las proteínas 53BP1 (del inglés *p53-binding protein 1*) y BRCA1 (del inglés *Breast cancer associated 1*) en los sitios de daño [60]. 53BP1 interacciona con  $\gamma$ H2A.X y MDC1, pero también depende de otras modificaciones, como H3K79me2 y H4K20me2 [61–65]. Además, tanto ATM como VRK1 fosforilan las serinas 25 y 29 de 53BP1, pero esto no es indispensable para la formación de focos [31–66]. No obstante, el silenciamiento de VRK1 provoca no solo que se disminuya el número de focos de reparación, sino también su tamaño. Así, la acumulación de 53BP1 media la reparación por unión de extremos no homólogos, que es la que se lleva a cabo generalmente en las células (Figura 3).

- INTRODUCCIÓN -

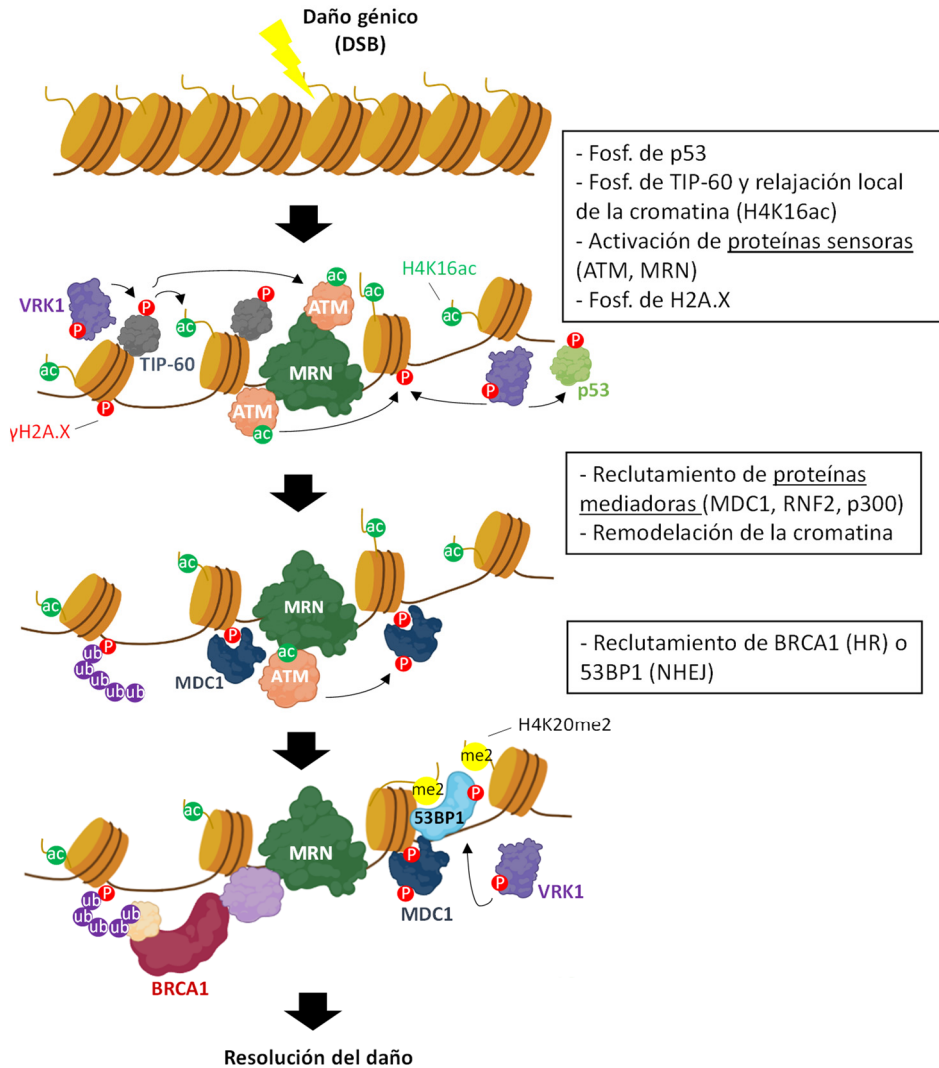


Figura 3. Esquema resumen de las principales proteínas y modificaciones epigenéticas implicadas en la respuesta al daño genético (DSBs) que permiten el reclutamiento de BRCA1 y 53BP1 (adaptado de [67]).



#### 1.4.6. Patrón epigenético de la histona H3 y la implicación de VRK1

La regulación epigenética es clave para el desarrollo y funcionamiento correcto de todas las células del organismo. Esta regulación engloba distintos mecanismos, como la metilación del ADN, la remodelación de la cromatina y las modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas. Centrándonos en las modificaciones postraduccionales de las histonas, la acetilación y metilación de residuos específicos determinan la condensación de la cromatina y, por tanto, el bloqueo de la transcripción del ADN, o que por lo contrario, la cromatina se encuentre relajada y haya transcripción. El patrón de acetilación y metilación de los residuos lisina 9 y 27 de la histona H3 (H3K9ac/me2/3, H3K27ac/me2/3) cambia con la edad, así como en distintas enfermedades neurodegenerativas. Un gen muy estudiado es *Bdnf* (del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*), crítico para el aprendizaje y la memoria de los individuos. En las células del hipotálamo de ratones de avanzada edad, los niveles de esta proteína se encuentran muy reducidos. Investigaciones recientes han descrito que en el promotor de *Bdnf*, los niveles de la marca epigenética H3K27ac se encuentran reducidos, mientras que los de H3K27me3 aumentan en ratones de avanzada edad, sugiriendo que este cambio de conformación abierta a cerrada de la cromatina es la base de la reducción de los niveles proteicos BDNF [68].

A grandes rasgos, en la enfermedad del Parkinson, la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en las células del sistema nervioso conduce a la muerte neuronal. Un estudio reciente ha descrito, utilizando cultivos celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) y *Drosophila*, que la sobreexpresión de esta proteína deriva en un aumento de los niveles de metilación de la H3K9 (H3K9me y H3K9me2) en los promotores de los genes *L1CAM* (del inglés *L1 Cell Adhesion Molecule*), involucrado en la adhesión celular, y *SNAP25* (del inglés *Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa*), en la sinapsis neuronal, reduciendo los niveles de estas proteínas en las células neuronales [69].

Por otra parte, se ha observado un aumento de las marcas epigenéticas H3K27ac y H3K4me3 en promotores de distintos genes relacionados con la respuesta inmune y una disminución en los genes involucrados en la sinapsis en modelos de ratón con Alzheimer. Además, en células de pacientes

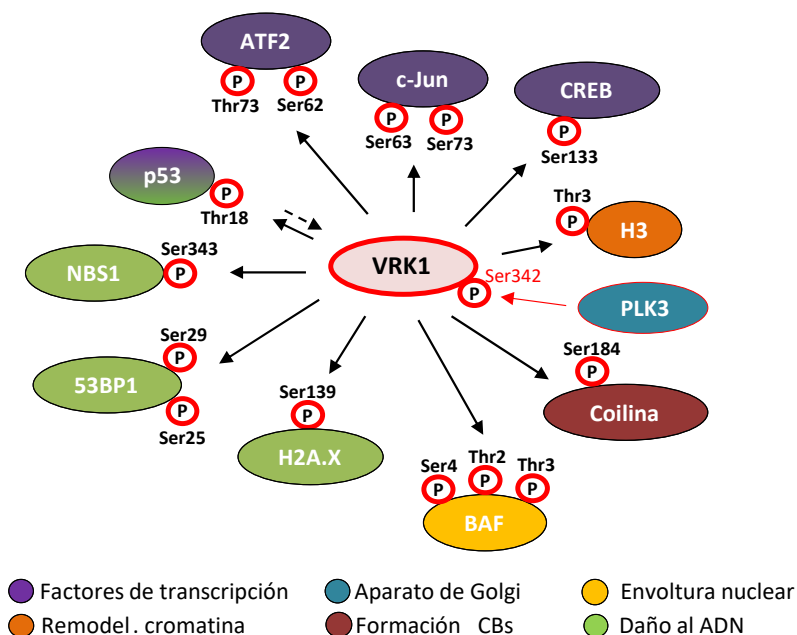
jóvenes con enfermedad de Huntington, se ha descrito una disminución de la marca epigenética H3K27ac cerca de genes involucrados en la sinapsis y diferenciación neuronal [70].

En las neuronas espinosas medianas (MSNs) de ratones, se ha observado que una disminución de la marca epigenética H3K27me3 resulta en una reducción de transcripción de distintos genes, muchos relacionados con la activación de muerte celular, que conduce a una neurodegeneración progresiva y a una muerte temprana. El aumento en esta marca epigenética también puede ser deletéreo. La pérdida de ATM en ataxia-telangiectasia conduce a la estabilización de la histona metiltransferasa EZH2 (del inglés *Enhancer of zeste homolog 2*), que aumenta los niveles de H3K27me3 en el cerebelo de ratones y humanos. De hecho, si se inhibe esta enzima en ratones deficientes en ATM se frena la neurodegeneración, y los niveles de H3K27me3 disminuyen. Por tanto, es necesario un balance de esta marca epigenética para mantener la funcionalidad de las neuronas [71].

Es esencial que exista una exhaustiva regulación en la represión y activación de distintos genes durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso y en el mantenimiento de las células progenitoras y su diferenciación a células maduras. La histona metiltransferasa EZH2 y la deacetilasa HDAC4 (del inglés *Histone deacetylase 4*) juegan un papel importante en estos procesos. EZH2 metila H3K27. Durante la neurogénesis, es necesaria la expresión de EZH2 en las células, lo que conllevará una subida en los niveles de H3K27me3 en muchos promotores génicos, controlando la proliferación de las células madre neurales. De hecho, se han encontrado mutaciones en esta enzima en pacientes con el síndrome de Weaver, caracterizados por el crecimiento excesivo general del cuerpo (alta estatura, obesidad), macrocefalia y dificultades en el aprendizaje. Por otra parte, la actividad acetiltransferasa de HDAC4 es esencial en la formación de la sinapsis entre neuronas y en el *pruning* celular (proceso por el que se destruyen axones y dendritas de las sinapsis neuronales, para eliminar las neuronas extra y sus conexiones durante el desarrollo), cuando las neuronas ya se encuentran diferenciadas y dispuestas en su lugar correspondiente del organismo [72].

- INTRODUCCIÓN -

En nuestro laboratorio, hemos observado cambios en estos patrones epigenéticos al eliminar VRK1 de las células (datos no publicados). Sin embargo, no conocemos el mecanismo por el cual la quinasa regula esta acetilación y metilación. No obstante, esta regulación tiene que ser indirecta, afectando a la actividad catalítica, estabilidad, degradación de las enzimas que llevarán a cabo estos cambios epigenéticos: acetilasas, deacetilasas, metilasas o demetilasas. Dada la importancia de la regulación epigenética de las histonas y el desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas asociadas a variantes patogénicas de VRK1, los patrones de acetilación y metilación de distintos residuos de la histona H3 en presencia de estas variantes serán analizados en el siguiente trabajo.



**Figura 4. Esquema resumen de los sustratos más importantes de VRK1 con los residuos de fosforilación específicos.** Se muestran en distintos colores los procesos en los que participan estas proteínas.

### 1.5. La quinasa humana VRK2

La quinasa VRK2 presenta dos isoformas, VRK2A y VRK2B, debido al procesamiento alternativo del ARN mensajero [21]. Ambas isoformas se expresan en todos los órganos, pero en mayor medida en corazón, músculo esquelético, páncreas, leucocitos de sangre periférica, testículos y, en menor medida, en riñón y cerebro [8]. En las células, la isoforma VRK2A se encuentra en las membranas de las mitocondrias, retículo endoplasmático y envoltura nuclear y VRK2B, no asociada a membranas, se encuentra predominantemente en el núcleo [7–21]. Ambas isoformas son serina/treonina quinazas con capacidad de autofosforilación y comparten la mayoría de los sustratos. Fosforilan *in vitro* a caseínas, a las histonas H2B y H3, a la proteína básica de mielina (MBP), BAF y p53 [7–21].

VRK2 participa en la modulación de la transcripción de genes en respuesta a hipoxia a través de la proteína JNK [73], actúa como modulador negativo en la ruta de señalización de ERK1/2 (del inglés *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) en respuesta a EFG (del inglés *Elongation factor G*) [74] y fosforila la serina 32 del factor NFAT (del inglés *Nuclear factor of activated T cells*), lo que hace que aumente la transcripción de la proteína ciclooxigenasa-2 y se favorezca la invasión tumoral [75]. VRK2 también participa en la regulación de la apoptosis de dos formas: interacciona de forma directa con la proteína anti-apoptótica Bcl-xL (del inglés *B-cell lymphoma-extra large*) y regula la expresión del gen BAX (del inglés *BCL2-associated X protein*). Se ha descrito que al silenciar VRK2, aumentan los niveles de Bax en las mitocondrias y se favorece la liberación del citocromo c y la activación de caspasas. Así, al silenciar este gen, aumenta la muerte celular y se incrementa la sensibilidad de las células a agentes quimioterapéuticos [76].

### 1.6. La quinasa humana VRK3

La quinasa VRK3 se expresa, al igual que VRK1 y VRK2, en todos los órganos, de forma más elevada en riñón, hígado y testículos. En la célula, se localiza principalmente en el núcleo [7–19–77].

VRK3 fosforila a BAF en la serina 4, participando en la rotura de la envuelta nuclear durante el ciclo celular [23]. También actúa de andamiaje

para la formación de complejos proteicos [22] y regula la ruta de señalización de ERK1/2. Forma un complejo con la proteína VHR (del inglés *Von Hippel-Lindau*) y ERK1/2, regulando negativamente la ruta de señalización de ERK, pero a su vez, ERK1/2 regula positivamente la expresión de VRK3, generándose de esta forma un bucle de retroalimentación [77].

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

Se ha estudiado la deficiencia de las quinasas VRKs a nivel de organismo, utilizando ratones hipomórficos para VRK1 que expresan un 15% de la quinasa. Los ratones son viables pero estériles. En los machos es debido a un defecto progresivo de las células espermatogónicas que conduce a la ausencia total de la mitosis y meiosis de estas células en los ratones adultos. Las hembras nacen estériles por fallos en el desarrollo de los oocitos [78]. Esto indica una alteración en la recombinación meiótica. Además, estos ratones no presentan cambios en otros tejidos, pudiendo deberse a que se realizan las funciones por parte de los otros miembros de la familia quinasa [79–80].

En 2015, se realizó un estudio en el que se vio que ratones que expresaban la variante patogénica R358X de VRK1, presentaban fallos en la migración de los precursores neurales independientemente de la actividad quinasa y, posteriormente, defectos en la progresión celular de estos precursores de forma dependiente de la actividad de VRK1. Se describió que los fallos en la migración eran debidos a que VRK1 juega un papel fundamental en la ruta de señalización de la Reelina, observándose una disminución de la expresión del gen *APP* (del inglés *Amyloid precursor protein*) en las células del organismo de estos ratones [81].

### 1.8. Las quinasas VRK en síndromes neuromotores

La quinasa VRK2 fue la primera que se asoció a patologías neurodegenerativas. En 2011 se describió un polimorfismo de un solo nucleótido 50 kb *upstream* del gen *VRK2* que provoca la sobreexpresión de la quinasa, lo que se asocia a mayor riesgo de sufrir esquizofrenia [82]. Se ha visto que los pacientes con esta variante presentan defectos en la

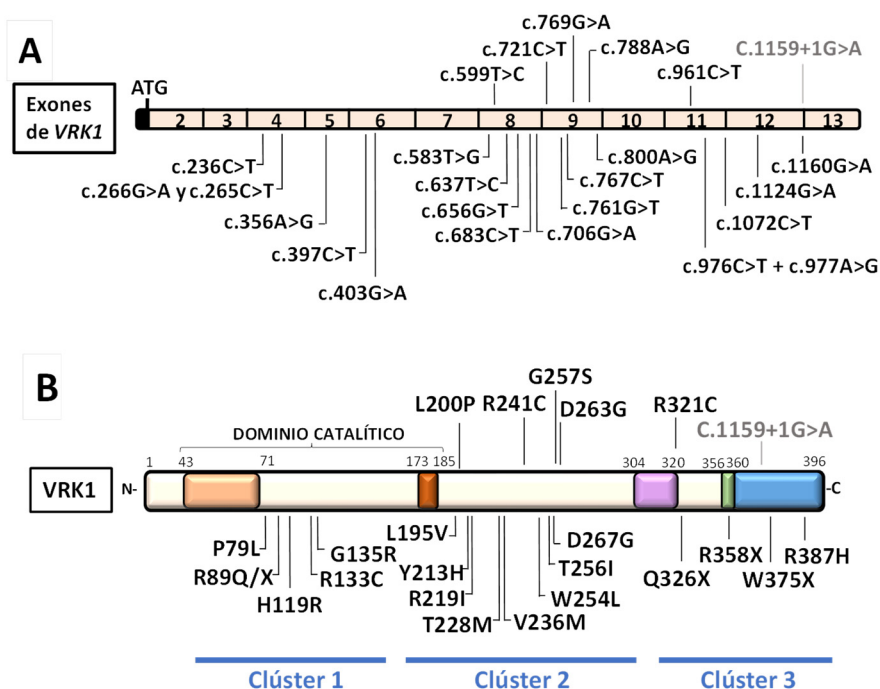
conectividad de la materia blanca en áreas cerebrales [83]. Además, también se asocia a otras enfermedades como trastorno bipolar, epilepsia o enfermedad de Huntington, favoreciendo la formación de agregados de huntingtina a través de la regulación negativa de la chaperonina TRiC (del inglés *T-complex protein Ring Complex*) [22–84–85].

Sin embargo, no solo VRK2 está involucrada en enfermedades neuromotoras y neurodegenerativas. En 2009, se identificó la variante R358X, que generaba una proteína truncada. La presentaban tres niños de una familia consanguínea de judíos *Ashkenazi* diagnosticados con atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelar (SMA-PCH, del inglés *Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia*). Estos niños presentaban un cuadro clínico de microcefalia, retraso en el desarrollo, leve retraso mental y ataxia, que condujo a debilidad muscular severa y muerte a edades tempranas (9-11 años) [86]. Las atrofas musculares espinales o SMAs son un conjunto de trastornos heterogéneos que conllevan a la degeneración de las neuronas motoras alfa o inferiores, situadas en el asta anterior de la médula espinal. En el 80-90% de los casos, se debe a la alteración del gen *SMN1* (del inglés *Survival motor neuron 1*), del que se hablará más adelante. Sin embargo, existen otros tipos de SMA que no están asociados a *SMN1* [87] y muchos de ellos se deben a mutaciones puntuales en los exones del gen *VRK1* que generan una quinasa truncada o con cambios en un aminoácido (Tabla 1). Así, los pacientes que presentan mutaciones en la quinasa VRK1 diagnosticados hasta ahora, presentan enfermedades o trastornos del sistema nervioso, ya sean enfermedades de las motoneuronas (esclerosis lateral amiotrófica o ALS, del inglés *Amyotrophic lateral sclerosis*, en la que las dos motoneuronas se encuentran afectadas o SMA, en la que como se ha mencionado, solo la inferior se encuentra afectada) o neuropatías sensitivomotoras hereditarias (HMSN, del inglés *Hereditary motor and sensory neuropathies*, también denominadas Charcot-Marie-Tooth) o axonales.

En 2011, se describieron cuatro pacientes que presentaban la mutación en homocigosis R133C [88–89] y que padecían déficit mental y, en 2013, se identificó la primera mutación en heterocigosis compuesta R89Q/V236M en dos hermanas con HMSN y microcefalia [90]. Desde entonces, se han

- INTRODUCCIÓN -

identificando distintas variantes de VRK1 en pacientes con trastornos neurodegenerativos. Hoy en día existen 25 implicadas en estas enfermedades, cuatro de ellas generan proteínas truncadas (R89X, Q326X, R358X y W375X) y otras dos, son mutaciones en intrones (Figura 5). La mutación c.1159+1G>A se produce en el sitio de *splicing* 5' del intrón 12, lo que provoca un cambio en el marco de lectura del ARNm (se añaden 35 pares de bases al exón 12) y un codón de terminación prematuro [91]. Por otra parte, la mutación en el intrón 8 c.710-14T>C podría afectar al *splicing* del mensajero, pero no está descrita la proteína que se produce (no se representa en la figura 5).



**Figura 5. Mutaciones de VRK1 identificadas hasta ahora.** **A.** Esquema de los exones del ARNm de VRK1 donde se indican las mutaciones descritas. **B.** Esquema de las variantes patogénicas de la proteína VRK1 descritas. Se indican los clústers en los que separamos las mutaciones según su posición en la estructura secundaria.

En la Tabla 1 se recogen dichas variantes y las principales características neurológicas que manifiestan los pacientes.

- INTRODUCCIÓN -

**Tabla 1. Cuadro clínico que presentan los pacientes con las variantes de VRK1.** SMA-PCH: atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelar, HMSN: neuropatía sensitivomotora hereditaria, ALS: esclerosis lateral amiotrófica, Ns: no se ha descrito.

| Mutaciones en el gen VRK1            | Homocigosis c.1072C>T  |                                 | Homocigosis c.397C>T | Heterocigosis c.266G>A y c.706G>A          |  | Homocigosis c.1072C>T  |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|----------------------|--|--|--|
| Variante patogénica de VRK1          | R358X/R358X  |                                 | R133C/R133C          | R89Q/V236M                                 |  | R358X/R358X  |
| Dominios de VRK1 afectados           | Extremo C-terminal y NLS                                     |                                 | Dominio quinasa      | Dominio quinasa                            |  | Extremo C-terminal y NLS   |
| Clínica                              | SMA-PCH  |                                 | Ns                   | HMSN y microcefalia                        |  | HMSN y microcefalia prenatal   |
| Origen                               | Ashkenazi, Israel  |                                 | Irán                 | USA  |  | Ashkenazi, USA   |
| Nº de casos                          | 1  | 1                               | 4                    | 1  | 1  | 1  |
| Microcefalia                         | Sí   | Sí                              | Ns                   | Sí   | Sí   | Sí   |
| Deficiencia mental                   | Sí   | Sí                              | Sí                   | No   | No   | No   |
| Desarrollo motor                     | Lento  | Lento                           | Ns                   | Lento                                      | Lento                                      | Lento  |
| Degeneración muscular                | Rápida   | Rápida                          | Ns                   | Rápida                                     | Ns   | Rápida   |
| Insuficiencia respiratoria           | No   | No                              | Ns                   | Sí   | Ns   | Ns   |
| Ataxia                               | Sí   | Sí                              | Ns                   | No   | No   | No   |
| Reflejo del tendón (DTR)             | Brusco   | Brusco                          | Ns                   | Ausente                                    | Normal                                     | Reducido   |
| Estudios de cerebro y médula por MRI | Vermis cerebeloso reducido y cisterna cerebelomedular grande | Hipoplasia cerebelosa y pontina | Ns                   | Microcefalia con patrón giral simplificado | Microcefalia con patrón giral simplificado | Microcefalia con patrón giral simplificado y vermis cerebeloso no desarrollado |
| Referencias                          | [86]   |                                 | [88]                 | [90]                                       |  |  |



- INTRODUCCIÓN -

Continuación **Tabla 1.**

|                                      |                                   |  |                                   |  |                       |   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------|---|
| Mutaciones en el gen <i>VRK1</i>     | Heterocigosis c.356A>G y c.961C>T | Heterocigosis c.356A>G y c.1072C>T                                       | Heterocigosis c.403G>A y c.583T>G | Heterocigosis c.683C>T y c.1072G>T       | Homocigosis c.1124G>A |   |
| Variante patogénica de <i>VRK1</i>   | <b>H119R/R321C</b>                | <b>H119R/R358X</b>   | <b>G135R/L195V</b>                | <b>T228M/R358X</b>                       | <b>W375X/W375X</b>    |   |
| Dominios de <i>VRK1</i> afectados    | Dom. quinasa y extr. C-term.      | Dom. quinasa y extr. C-term. y NLS                                       | Dominio quinasa                   | Dominio quinasa y extr. C-terminal y NLS | Motivo BAB            |   |
| Clínica                              | ALS                               | SMA distal   | ALS                               | HMSN distal                              | SMA distal            |   |
| Origen                               | Hispanico, USA                    | Ashkenazi, Australia   | Australia                         | Reino Unido                              | China                 |   |
| Nº de casos                          | 1                                 | 2  | 1                                 | Ns                                       | 1                     | 1   |
| Microcefalia                         | No                                | No   | Sí                                | No                                       | Ns                    | Ns  |
| Def. mental                          | No                                | No   | No                                | No                                       | No                    | No  |
| Desarrollo motor                     | Normal                            | Normal   | Normal                            | Lento                                    | Normal                | Normal  |
| Deg. muscular                        | Rápida                            | Rápida   | Rápida                            | Lenta                                    | Rápida                | Rápida  |
| Ins. respiratoria                    | Sí                                | Sí   | Sí                                | No                                       | Ns                    | Ns  |
| Ataxia                               | No                                | No   | No                                | No                                       | No                    | No  |
| Reflejo del tendón (DTR)             | Ns                                | Brusco en las extremidades superiores y ausente en las inferiores        |                                   | Brusco                                   | Ausente               | Brusco en las extremidades sup. y ausente en las inf. |
| Estudios de cerebro y médula por MRI | Normal                            | Atrofia de la médula espinal y atrofia generalizada moderada del cerebro |                                   | Normal                                   | Normal                | Normal  |
| Referencias                          | [92]                              | [93]   |                                   | [94]                                     | [95]                  |   |

- INTRODUCCIÓN -

Continuación **Tabla 1.**

| Mutaciones en el gen <i>VRK1</i>     | Homocigosis c.1124G>A                          | Homocigosis c.1159+1G>A   |         | Homocigosis c.1159+1G>A   | c.236C>T                          | Heterocigosis c.656G>T y c.761G>T | Heterocigosis c.767C>T y c.800A>G |
|--------------------------------------|--|---|---------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Variante patogénica de <i>VRK1</i>   | <b>W375X/W375X</b>                             | <b>VRK1 wild type hasta el residuo T386 seguido por -HKLNSFAX</b> |         | <b>VRK1 wild type hasta el residuo T386 seguido por -HKLNSFAX</b> | <b>P79L/P79L</b>                  | <b>R219I/W254L</b>                | <b>T256I/D267G</b>                |
| Dominios de <i>VRK1</i> afectados    | Motivo BAB                                     | Motivo BAB  |         | Motivo BAB  | Dominio quinasa                   | Dominio quinasa                   | Dominio quinasa                   |
| Clínica                              | HMSN juvenil                                   | SMA distal adulta   |         | Enf. de motoneurona inferior con reflejos bruscos                 | Microcefalia congénita progresiva | HMSN distal                       | ALS                               |
| Orígen                               | China  | Irán  |         | Irán  | Arabia                            | Líbano                            | Japón                             |
| Nº de casos                          | 1  | 1   | 1       | 1   | 3                                 | 2                                 | 1                                 |
| Microcefalia                         | No   | No  | No      | No  | Sí                                | No                                | No                                |
| Def. mental                          | No   | No  | No      | No  | Ns                                | No                                | Sí                                |
| Desarrollo motor                     | Ns   | Normal  | Normal  | Lento   | Lento                             | Lento                             | Normal                            |
| Deg. muscular                        | Rápida   | Rápida  | Rápida  | Rápida  | Ns                                | Lenta                             | Rápida                            |
| Ins. respiratoria                    | Ns   | Sí  | Sí      | No  | Ns                                | No                                | No                                |
| Ataxia                               | No   | No  | No      | No  | Ns                                | No                                | No                                |
| Reflejo del tendón (DTR)             | Ausente en las extr. inf. y normal en las sup. | Ausente   | Ausente | Brusco  | Ns                                | Brusco                            | Brusco en las extr. inferiores    |
| Estudios de cerebro y médula por MRI | Normal   | Normal  | Normal  | Normal  | Ns                                | Normal                            | Quiste pineal                     |
| Referencias                          | [96]   | [91]  |         |   | [97]                              | [98]                              | [99]                              |

- INTRODUCCIÓN -

Continuación **Tabla 1.**

|                                      |                          |        |                      |   |  |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------|--------|----------------------|---|--|--------------------------------------|
| Mutaciones en el gen <i>VRK1</i>     | Homocigosis c.1160G>A    |        | Homocigosis c.637T>C | Heterocigosis c.976C>T y c.1072C>T                        | Heterocigosis c.265C>T y c.769G>A                                  | Heterocigosis c.710-14T>C y c.721C>T |
| Variante patogénica de <i>VRK1</i>   | <b>R387H/R387H</b>       |        | <b>Y213H/Y213H</b>   | <b>Q326X/R358X</b>  | <b>R89X/G257S</b>  | <b>Ns y R241C</b>                    |
| Dominios de <i>VRK1</i> afectados    | Motivo BAB               |        | Dominio quinasa      | Extr. C-term. y NLS                                       | Dominio quinasa y pérdida de una copia de <i>VRK1</i> desde el R89 | Ns y dominio quinasa                 |
| Clínica                              | Neuropatía axonal distal |        | HMSN distal y SMA    | Síndrome de displasia de la unión diecéfalo-mesencefálica | ALS  |                                      |
| Origen                               | Sefardí, Israel          |        | España               | Ns  | Portugal   |                                      |
| Nº de casos                          | 1                        | 1      | 1                    | 1   | 1  | 1                                    |
| Microcefalia                         | No                       | No     | No                   | Sí  | No   | No                                   |
| Def. mental                          | No                       | No     | No                   | Ns  | No   | No                                   |
| Desarrollo motor                     | Normal                   | Normal | Normal               | Ns  | Normal   | Normal                               |
| Deg. muscular                        | Lenta                    | Lenta  | Lenta                | Ns  | Rápida   | Rápida                               |
| Ins. respiratoria                    | Sí                       | No     | No                   | Ns  | No   | No                                   |
| Ataxia                               | Ns                       | Ns     | Ns                   | Ns  | Ns   | Ns                                   |
| Reflejo del tendón (DTR)             | Ns                       |        | Ns                   | Ns  | Brusco   | Brusco                               |
| Estudios de cerebro y médula por MRI | Normal                   |        | Normal               | Cerebelo pequeño  | Normal   |                                      |
| Referencias                          | [100]                    |        | [101]                | [102]   | [103]  |                                      |

- INTRODUCCIÓN -

Continuación **Tabla 1.**

| Mutaciones en el gen <i>VRK1</i>     | Homocigosis<br>c.788A>G          | Homocigosis<br>c.961C>T | Heterocigosis<br>c.706G>A y c.961C>T | Heterocigosis<br>c.599T>C y c.1160G>A |
|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Variante patogénica de <i>VRK1</i>   | <b>D263G/D263G</b>               | <b>R321C/R321C</b>      | <b>V236M/R321C</b>                   | <b>L200P/R387H</b>                    |
| Dominios de <i>VRK1</i> afectados    | Dominio quinasa                  | Extr. C-term            | Dominio quinasa y extr. C-term       | Dominio quinasa y extr. C-term        |
| Clínica                              | Paraplejia espástica hereditaria | SMA                     | SMA distal                           | HMSN distal                           |
| Orígen                               | Senegal                          | Hispánico               | Hispánico, USA                       | España                                |
| Nº de casos                          | 2                                | 1                       | 1                                    | 1                                     |
| Microcefalia                         | No                               | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Def. mental                          | Leve                             | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Desarrollo motor                     | Normal                           | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Deg. muscular                        | Lenta                            | Ns                      | Lento                                | Ns                                    |
| Ins. respiratoria                    | No                               | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Ataxia                               | No                               | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Reflejo del tendón (DTR)             | Brusco                           | Ns                      | Ns                                   | Ns                                    |
| Estudios de cerebro y médula por MRI | Normal                           | Normal                  |                                      | Ns                                    |
| Referencias                          | [104]                            | [105]                   |                                      | [106]                                 |

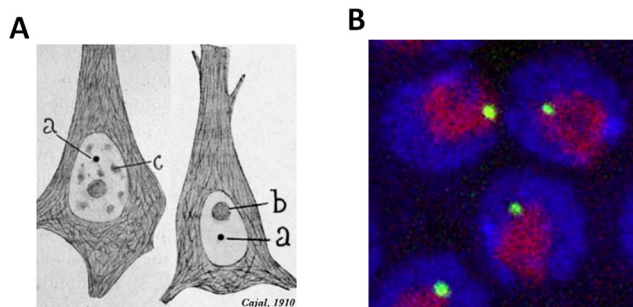
Cabe destacar que no se han realizado estudios de caracterización de las variantes patogénicas de la quinasa, sino que solo se han diagnosticado clínicamente a los pacientes con dichos trastornos, a excepción del estudio en el que se describieron las variantes R219I y W254L [98]. En nuestro laboratorio se ha estudiado la estabilidad y actividad quinasa de las primeras ocho variantes descritas (R358X, H119R, R321C, R133C, R89Q, V236M, G135R, L195V), así como la capacidad de formar cuerpos de Cajal de algunas de ellas [107]. Dado que se han descrito nuevas variantes relacionadas con enfermedades neurodegenerativas que no se han caracterizado, una parte de este trabajo se centrará en el estudio de las mismas.

## 2. Coilina y cuerpos de Cajal

### 2.1. Cuerpos de Cajal

Los cuerpos de Cajal (CBs, del inglés *Cajal bodies* or *Coiled bodies*) son unas estructuras descritas por primera vez en 1903 por Santiago Ramón y Cajal, quien los definió cuerpos accesorios del nucléolo, debido a su común asociación en las neuronas. Son pequeños orgánulos nucleares (0,2-2  $\mu\text{m}$ ) dinámicos durante el ciclo celular que se observan, especialmente, en células con alta tasa proliferativa y metabólicamente muy activas, como las tumorales y las neuronas [108] (Figura 6).

Todas las proteínas que se concentran en los CBs, como coilina, Cdk2/ciclina E (del inglés *Cyclin-dependent kinase 2*), SMN (del inglés *Survival motor neuron*) o fibrilarina, se encuentran también libres en el nucleoplasma. Por ello se piensa que la función principal de estas estructuras es aumentar la eficacia de los procesos que se producirían en el nucleoplasma a menor velocidad [109]. Están implicados en la biogénesis de ribonucleoproteínas (RNPs) asociadas a procesos de *splicing*, procesamiento de ARN mensajeros de histonas y a la formación de los telómeros. Además, los CBs también colaboran en la maduración de las RNPs nucleolares (RNPsno, del inglés *Small nucleolar ribonucleoproteins*), encargadas de procesar pre-ARN ribosómico [110].



**Figura 6. Representación de los cuerpos de Cajal.** **A.** Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal, 1910. a. Cuerpo de Cajal, b: nucleolo, c: *speckles*. **B.** Inmunofluorescencia en la que se observa el núcleo de células del folículo ovárico de *D. melanogaster* con el nucleolo en rojo (se marca con fibrilarina) y los cuerpos de Cajal en verde (se marca con coilina) [111].

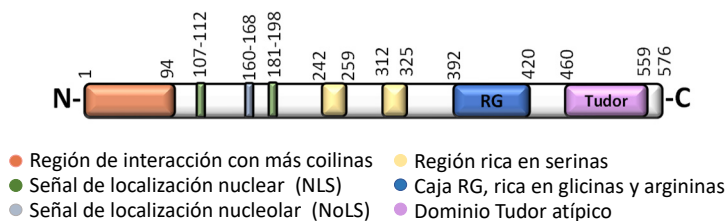
## 2.2. p80-coilina

La coilina es la proteína estructural o de ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Mientras que el 70% de la coilina total celular se encuentra libre en el nucleoplasma, solo el 30% forman parte de los CBs [112]. No se conoce la función de la coilina libre.

### 2.2.1. Estructura de coilina

El gen *p80-coilin* se encuentra en la región cromosómica 17q22-23 y codifica una proteína de 576 aminoácidos [113]. En su extremo amino terminal posee un dominio implicado en interacciones intermoleculares (residuos 1-94), esencial para su oligomerización y formación de los cuerpos de Cajal [114]. En el carboxilo terminal, un dominio Tudor, caracterizado por estar formados por *loops* desestructurados (residuos 460-559). Esta región se cree que se encarga de la regulación de oligomerización y del número de CBs que presentan las células [115]. Además, posee una región rica en argininas y glicinas (caja RG) necesaria para la interacción con SMN situada en los aminoácidos 392-420 (Figura 7).

## - INTRODUCCIÓN -

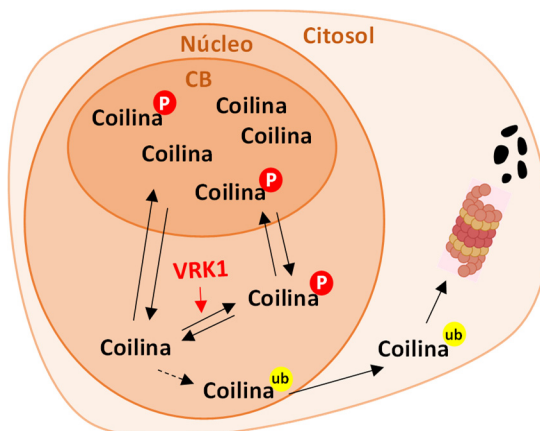


**Figura 7. Esquema modular de la estructura primaria de coilina.** Se muestra la leyenda del código de colores utilizado para representar los distintos dominios.

### 2.2.2. Modificaciones postraduccionales de la coilina

Muchas funciones de la coilina están reguladas por modificaciones postraduccionales. Se ha descrito que las argininas de la caja RG pueden ser dimetiladas simétricamente gracias a PRMT5 (del inglés *Protein arginine methyltransferase 5*). Así, estos aminoácidos modificados interactúan con el dominio Tudor de SMN, permitiendo el ensamblaje de los CBs. También se ha estudiado el efecto de la fosforilación de la coilina en distintos residuos. Se ha visto que esta proteína se fosforila por las quinasas Cdk2/ciclina E y VRK1 durante la mitosis, produciendo el desensamblaje de los CBs durante esta fase del ciclo. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha observado que VRK1 fosforila a la coilina en el residuo serina 184 [116]. Cuando se inhibe la expresión de esta quinasa, la coilina se degrada vía proteasoma y los cuerpos de Cajal no se forman [117] (Figura 8). Además, el estado de fosforilación de la coilina también es importante para su interacción con SMN, SmB (del inglés *Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B*), RNPsn (del inglés *Small nuclear ribonucleoproteins*) y ARNs [118].

- INTRODUCCIÓN -



**Figura 8.** Modelo de la regulación del ensamblaje de los cuerpos de Cajal por VRK1. P: fosforilación; ub: ubiquitinación.

Actualmente está empezando a adquirir importancia el estudio de la ubiquitinación y la sumoilación de distintos residuos de la coilina. Se ha visto que estas modificaciones postraduccionales tienen distintas funciones, desde la pérdida de interacción de la coilina con distintas proteínas hasta un cambio en la localización celular de dicha proteína [119]. Por tanto, parece que es esencial conocer el efecto de estas modificaciones de la coilina, para poder explicar la dinámica de los cuerpos de Cajal así como la relación con otras proteínas implicadas en distintos procesos neurodegenerativos.

En este trabajo se analizará la fosforilación de la coilina en la serina 184 en células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 descritas y la capacidad de dichas células de formar eficientemente CBs, ya que es un mecanismo molecular que puede estar alterado en los pacientes. Además, también es importante estudiar más a fondo la relación de la quinasa con otras proteínas de los CBs, como SMN, para poder explicar su papel en los procesos neurodegenerativos asociados, así como la relación de todas ellas con la proteína VCP (del inglés *Valosin contained protein*), ya que, como se explicará más adelante, es una proteína muy conocida implicada en enfermedades neurodegenerativas.



### 3. SMN (*Survival motor neuron*)

La proteína de supervivencia de las motoneuronas o SMN es uno de los principales componentes de los cuerpos de Cajal, pero además se encuentra en otras estructuras nucleares denominadas geminas, y en el citoplasma [120–122]. En las neuronas, se encuentran así mismo en los conos de crecimiento neural y en los axones, donde tienen una función esencial (Figura 9). SMN se expresa en todos los órganos, siendo sus niveles más altos en cerebro, riñones e hígado, y menores en fibroblastos y linfocitos [123–124].

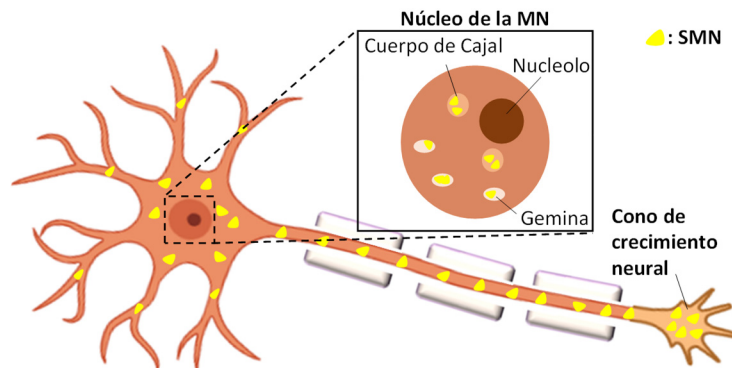
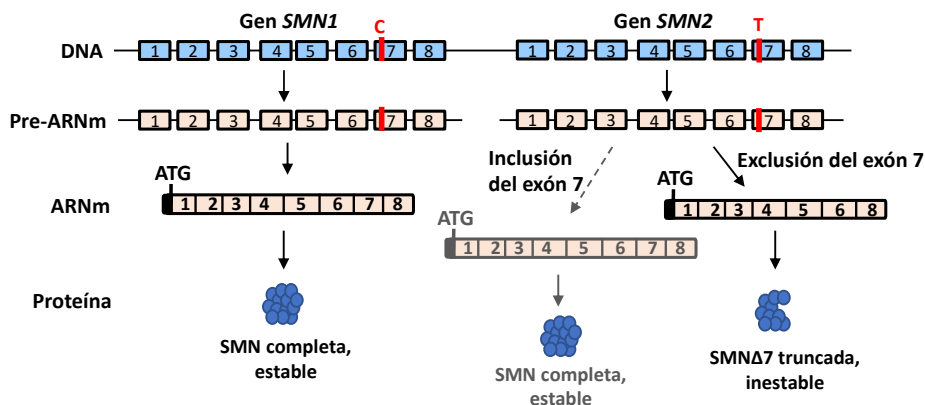


Figura 9. Esquema de una motoneurona (MN) en crecimiento donde se indica la localización de SMN (representada en amarillo).

El gen *SMN* se encuentra en la región cromosómica 5q13. Existen dos copias, una telomérica (*SMN1*) y una centromérica (*SMN2*), que difieren por cinco nucleótidos que no afectan a la secuencia codificante de la proteína. De esta forma, el gen *SMN2* por *splicing* alternativo puede dar tres ARNm: *SMN $\Delta$ 5*, *SMN $\Delta$ 7* y *SMN $\Delta$ 5,7* que carecen del exón 5, 7 o ambos, respectivamente, y el ARNm que codifica SMN completo. El gen *SMN1* produce principalmente la proteína SMN de longitud completa, mientras que *SMN2* da lugar a la proteína que carece del exón 7 mayoritariamente. Se ha descrito que el cambio de citosina (C) a timina (T) en el codón 280 (al inicio del exón 7) del gen *SMN2*, provoca que el 90% de los ARNm codificados no posean este exón. Esto se debe a que es un nucleótido clave para el correcto *splicing* alternativo de la molécula. La proteína generada carece de la capacidad de oligomerizarse, lo que provoca una rápida degradación de la misma vía ubiquitina-proteasoma [123–125–127] (Figura 10). En el 95% de

los casos descritos de atrofia muscular espinal se ha detectado una delección en el gen *SMN1*, expresándose la proteína solo a partir del gen *SMN2* y viéndose de esta manera los niveles proteicos disminuidos. Se ha descrito también que estos niveles están relacionados inversamente con la gravedad de la enfermedad [128].

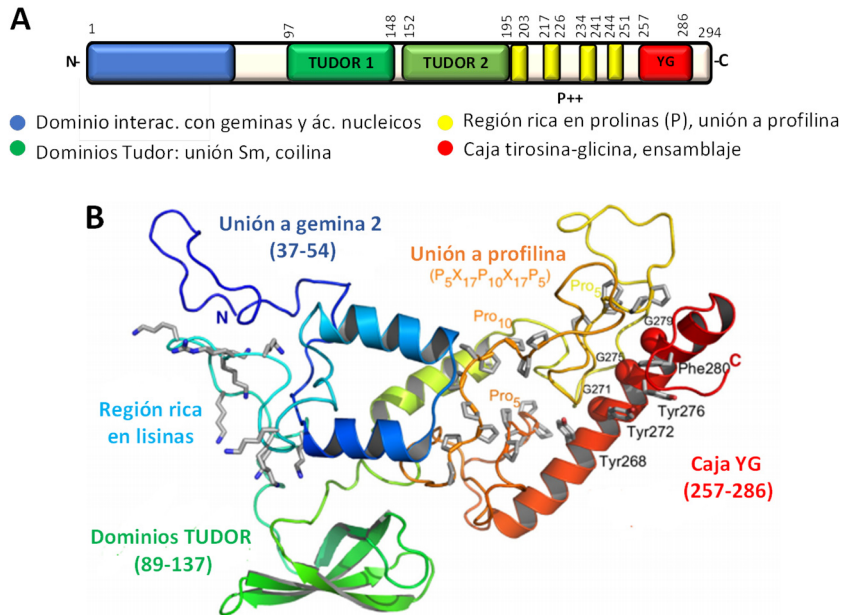


**Figura 10. Esquema en el que se presenta la diferencia entre *SMN1* y *SMN2*.** Los genes *SMN1* y *SMN2* codifican la proteína SMN. El cambio C-T en el exón 7 de *SMN2* altera el *splicing* de la mayoría de los ARNm *SMN2* que codifican una proteína inestable y truncada, ya que no poseen dicho exón (modificado de [130]). ARNm: ARN mensajero.

### 3.1. Estructura de SMN

SMN consta de 294 aminoácidos. El dominio amino terminal (residuos 1-64) estabiliza el complejo SMN y, además, presenta una región de unión a las geminas, ácidos nucleicos y un dominio implicado en interacciones intermoleculares con otras moléculas de SMN. Seguidamente, posee una región rica en lisinas (K++) que permite su unión a los ARN nucleares de pequeño tamaño (ARNsn, del inglés *S*mall *n*uclear *R*NA), y dos dominios Tudor (Tudor1, residuos 97-148 y Tudor2, residuos 152-195) esenciales para su unión con las proteínas Sm, fibrilarina y coilina. En su dominio carboxilo terminal (residuos 202-294), SMN presenta varias regiones de poliprolina (P++) responsables de su unión con la profilina, además de una caja YG conservada (rica en tirosinas y glicinas) que permite su oligomerización y unión a las geminas (Figura 11). También, se ha propuesto un motivo

“QNQKE” implicado en su localización citoplasmática y de su funcionalidad [122–131–135].



**Figura 11. Esquema de la estructura de SMN completa.** A. Esquema modular de la estructura primaria de SMN. Se muestra la leyenda del código de colores utilizado para representar los distintos dominios. B. Modelo de la estructura terciaria de SMN modificado de [134].

### 3.2. Funciones de SMN

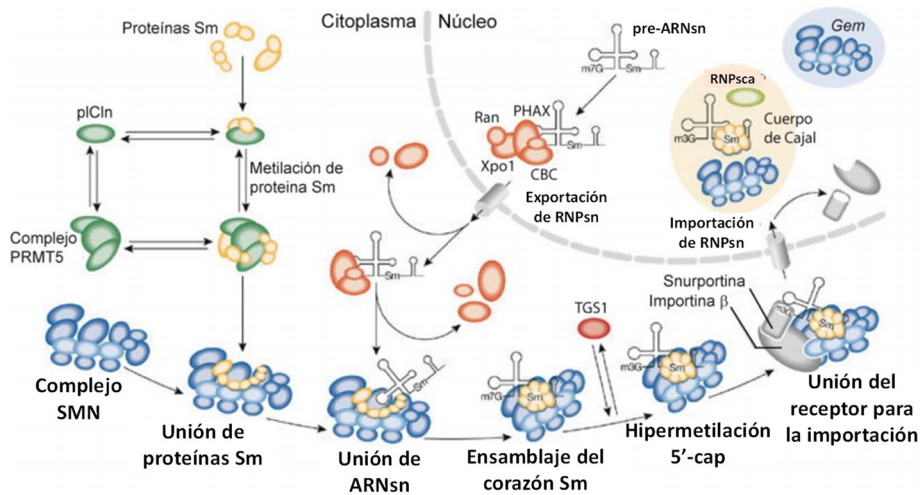
La función más estudiada de SMN es el papel que desarrolla en la biogénesis de las ribonucleoproteínas y en el proceso de *splicing* de los pre-ARNm. Sin embargo, también tiene una función importante en la formación de los axones de las neuronas. Además, regula otros procesos esenciales para mantener la sinapsis, orientación a los axones, actúa como proteína anti-apoptótica, en la traducción local, en la homeostasis de ubiquitina y en el transporte mitocondrial correcto y desempeña una función importante en la reparación del ADN, traducción y síntesis de selenoproteínas, procesamiento de ARNm de histonas, formación de gránulos de estrés, mantenimiento del citoesqueleto y señalización celular [134].

### 3.2.1. Implicación del complejo SMN en la biogénesis de las ribonucleoproteínas y en el proceso de *splicing*

SMN oligomeriza y forma un complejo proteico estable de gran tamaño al unirse directamente a las geminas 2, 3, 5 y 7, y de forma indirecta a la 4 y 6 a través de las geminas 3 y 7 respectivamente [136]. La proteína UNRIP (del inglés *UNR-interacting protein*), también forma parte de este complejo [137].

El proceso de *splicing* se descubrió en 1977 [138–139] y es esencial para el control de la expresión de los genes de las células eucariotas. Resumidamente, la biogénesis de las ribonucleoproteínas comienza con la transcripción de los ARNs U1, U2, U4, U5 y U6. Estos ARNs creados en el núcleo se modifican añadiéndoles la caperuza de 7-metilguanosa en el extremo 5' y la cola de poliA en el 3' que señala la terminación de la transcripción. De esta forma, este transcrito ya se puede exportar al citosol donde se unirá a un complejo formado por las proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F y G), previamente unidas a la proteína pICln (del inglés *Chloride conductance regulatory protein*) y a la arginina metil transferasa PRMT5, formándose un gran complejo compuesto por SMN/Sm/Geminas. Seguidamente, se producen otras modificaciones que permite el importe de nuevo al núcleo del complejo, liberándose las RNPs que se dirigirán a los cuerpos de Cajal donde madurarán a través de distintas modificaciones. Es esencial la unión de SMN a la región RG que posee la coilina para que estas RNPs se localicen en los cuerpos de Cajal. Cuando las RNPs son activas, se ensamblan con el espliceosoma en los sitios de transcripción participando de esta manera en la maduración de los ARNs [121–136–140–144] (Figura 12).

## - INTRODUCCIÓN -



**Figura 12. Esquema del papel de SMN en el ensamblaje de las RNPsn y maduración de los pre-RNA mensajeros** (modificado de [145]). ARNsn: ARN nuclear de pequeño tamaño, RNPsn: ribonucleoproteína nuclear de pequeño tamaño.

### 3.2.2. Papel de SMN en la reparación del ADN

Una de las primeras consecuencias en el músculo esquelético de ratones con SMA, así como en las células de los testículos, es el daño en el ADN [146–147]. Las células eucariotas utilizan la recombinación homóloga tanto para la reparación del ADN como para intercambiar material genético entre los cromosomas homólogos durante la meiosis. La recombinasa eucariota RAD51 tiene un papel esencial en este proceso de reparación. Esta recombinasa interactúa con la gemina 2 y con el complejo SMN-gemina 2, y esta interacción es necesaria para que el proceso se finalice correctamente [134].

SMN también juega un papel indirecto en la respuesta al daño en el ADN, ya que la deficiencia de esta proteína conduce a una reducción en los niveles de expresión de la histona H2A.X, debido a los fallos en el *splicing* de su ARNm [148].

Por otra parte, se ha visto que cuando existe daño en el ADN, la histona H3 interactúa con SMN, posicionándose el complejo en el centrómero, donde participa en la respuesta al daño centromérica inducida (iCDR, del inglés *Inducide Centromeric Damage Response*) [149].

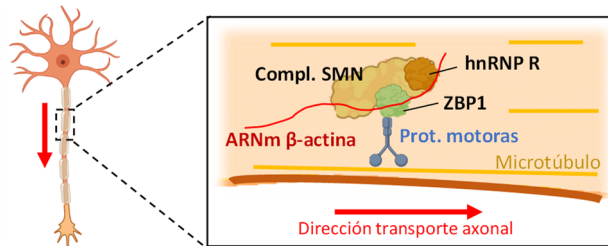
### 3.2.3. Papel de SMN en las neuronas: SMN como causante de la SMA

Hoy en día no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual los bajos niveles de SMN causan atrofia muscular espinal [122–129]. Se han propuesto distintas hipótesis sobre ello. Una de ellas postula que el defecto de la síntesis de las RNPs afecta al *splicing* de genes importantes en las motoneuronas, otras apuntan al papel que tiene SMN en los axones neurales. También se sugiere una mezcla de ambas, que el defecto de las RNPs afecte al *splicing* de genes esenciales en los axones.

La actividad de SMN es máxima en la médula espinal durante la fase embrionaria y el desarrollo post-natal temprano y disminuye manteniéndose constante posteriormente. Esto sugiere que durante el desarrollo neuronal se necesitan altos niveles de RNPs, lo que podría explicar que se vean afectadas sobre todo las células del sistema neuro-motor [150]. Al analizar muestras de médula espinal y cerebro de modelos animales con SMA se observa una reducción de los niveles de RNPs y de un gran número de genes involucrados en el transporte axonal y de genes relacionados con canales iónicos dependientes de voltaje [151].

Por otra parte, modelos de ratón con SMA poseen bajos niveles de ARNm y proteína beta-actina, un acortamiento del axón y menor crecimiento del cono neural y, en un modelo de pez cebra que carece de SMN, se han descrito defectos en un subconjunto de genes implicados en la sinaptogénesis y mantenimiento de las uniones neuromusculares [144–152]. Además, en las neuronas motoras de pacientes con SMA se ha observado una ausencia de SMN en los conos de crecimiento axonal. SMN interacciona con las proteínas RNPhn-Q/R (del inglés *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins Q/R*) lo que permite el transporte de los ARNm a lo largo del axón. Así, es necesaria la unión de SMN y RNPhn R para que esta última interaccione con el ARNm de la beta-actina, regulando así el crecimiento axonal (Figura 13). Por tanto, la deficiencia de SMN afecta al transporte y la traducción de los ARNm axonales necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las motoneuronas [153].

- INTRODUCCIÓN -



**Figura 13. Esquema del papel de SMN en el transporte de ARNm a lo largo del axón neuronal.**

También, en pacientes con SMA se ha identificado una reducción de los niveles de plastina 3, proteína que estabiliza los filamentos de beta-actina [154]. Parece que la sobreexpresión de SMN disminuye la severidad de la enfermedad en modelos animales. Todo ello apoya la teoría de que los bajos niveles de esta proteína afectan al crecimiento axonal derivando en SMA.

En nuestro laboratorio se ha visto que SMN interacciona con VRK1, pero ésta no la fosforila en ninguna fase del ciclo celular (datos no publicados). Sin embargo, aún no está clara la relación entre estas dos proteínas. Como se mencionó anteriormente, SMN interacciona con coilina, que a su vez está relacionada con otras proteínas implicadas en patologías neurodegenerativas, como es ataxina-1 [155]. En patologías como la ataxia espinocerebelosa o la distrofia muscular espinal, Ataxina-1 sufre una expansión en su tracto de poliglutaminas, lo que promueve su acumulación en forma de agregados proteicos que secuestran otras proteínas, entre ellas VCP/p97, provocando la muerte de la célula [156].

#### **4. La ATPasa VCP/p97 (*Valosin contained protein*)**

La proteína VCP forma parte de la familia I de ATPasas AAA tipo II (del inglés *AAA- ATPases Associated with a variety of Activities*). VCP se encuentra muy relacionada con enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito varias mutaciones en el gen que la codifica que causa la enfermedad ósea de Paget, demencia frontotemporal, miopatía por cuerpos de inclusión, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. El primer síntoma de la mayoría de estas enfermedades es debilidad muscular que aparece en los pacientes de edades comprendidas entre los 50-60 años, y que pueden derivar en cambios de personalidad, pérdida del habla y del juicio [157–160].

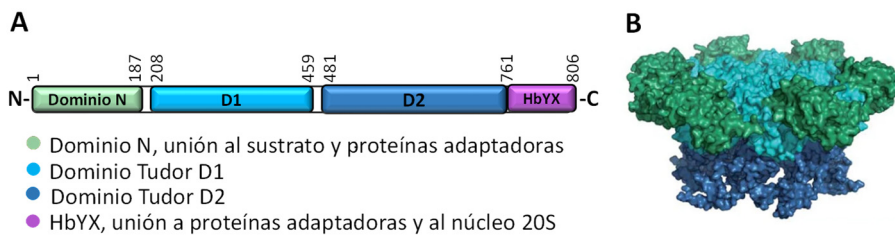
VCP es una proteína muy abundante en la célula (aproximadamente constituye el 1% de la proteína celular total). Se localiza principalmente en el citoplasma, asociado a las membranas del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático, aunque también se encuentra en el núcleo y nucleolo en menor grado [161–163].

##### **4.1. Estructura de VCP**

El gen *VCP* se encuentra en el cromosoma 9 (9p13.3) y codifica una proteína de 806 aminoácidos. Esta proteína es un homohexámero constituido por dos anillos de diferentes tamaños apilados uno encima del otro dejando un canal axial central [160]. Cada subunidad posee un dominio amino terminal seguido de dos dominios ATPasa en tándem (dominios D1 y D2) conectados por dos polipéptidos de pocos aminoácidos (N-D1 y D1-D2). El dominio amino terminal (residuos 1-187) interacciona con cofactores y proteínas adaptadoras como p47, sustratos ubiquitinados y lípidos [164–166]. Los dos dominios D1 y D2 poseen los motivos *Walker A* y *B*, esenciales para la hidrólisis del ATP. Sin embargo, el dominio D2 (residuos 481-761) presenta la actividad enzimática principal, siendo el D1 (residuos 208-459) el responsable de la oligomerización de la proteína para formar el hexámero [167]. Por último, el extremo carboxilo terminal (residuos 761-806) posee un residuo hidrófobo (Hb), una tirosina (Y), y un residuo variable (X). Este motivo HbYX media interacciones con distintas proteínas y con el núcleo 20S del proteasoma, mediante la fosforilación de la tirosina (Figura 14) [168]. Se



considera que es la región reguladora de la proteína, dado que se han identificado quinasas que la fosforilan y también se han detectado posibles dianas de acetilación en ella [169–170].



**Figura 14. Estructura de VCP.** A. Esquema modular de la estructura de una subunidad de VCP. B. Visualización molecular de una subunidad de VCP. Se muestra la leyenda del código de colores utilizado para representar los distintos dominios [171].

## 4.2. Funciones de VCP

El papel más estudiado de VCP en la célula es la función que tiene en la degradación de proteínas por autofagia y por el proteasoma gracias a su marcaje con ubiquitinas, pero también esta proteína es fundamental para la replicación del ADN, reparación del daño en el ADN, regulación del ciclo celular, reensamblaje de la membrana nuclear y de Golgi y en la señalización inmunológica [166–172–173]. Además, está implicada en el desarrollo correcto de las 7ko neuronas y en el metabolismo de los ARN mensajeros, al igual que SMN. A continuación, se explican brevemente algunas de las funciones mencionadas.

### 4.2.1. Papel de VCP en la degradación de proteínas

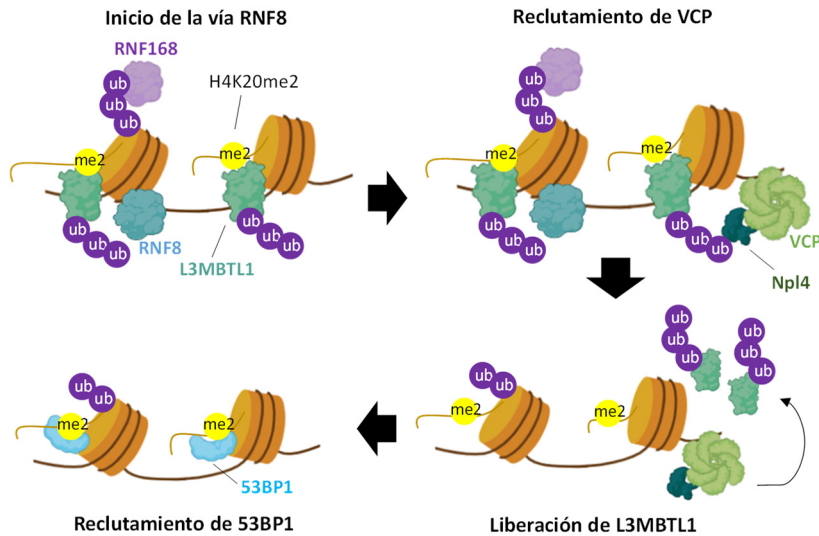
Las proteínas que se degradan por el proteasoma se marcan con cadenas de ubiquitina, unidas entre ellas a través de la lisina 48 [174]. VCP interacciona con las proteínas poliubiquitinadas y con varios elementos de la maquinaria de degradación actuando, en muchos casos, como una chaperona que ayuda en la degradación de los sustratos marcados para ello [166]. Por otra parte, las proteínas mal plegadas se llevan a la cara citosólica del retículo endoplasmático donde se marcan con ubiquitinas. VCP, asociado

a los cofactores Ufd1-Npl4 (del inglés *Ubiquitin fusion degradation 1 - Nuclear protein localization 4*), se une a las proteínas ubiquitinadas y gracias a la hidrólisis del ATP se empujan hacia el citoplasma para que se degraden vía proteasoma [175].

Como se ha mencionado anteriormente, en determinadas enfermedades neurodegenerativas (como en las ataxias, la enfermedad de Huntington, Parkinson o Alzheimer) causadas por la acumulación de agregados proteicos, se ha observado que VCP agrega con la ataxina-1 y con huntingtina que poseen el tracto de poliQ, quedando parcialmente atrapada en estas estructuras, lo que conlleva neurotoxicidad y muerte de las neuronas [176].

#### 4.2.2. Papel de VCP en la reparación del daño en el ADN

Hoy en día no se conoce con exactitud la función exacta de VCP frente al daño en el ADN. Se ha observado que VCP se localiza en el núcleo, en las zonas de rotura del ADN y que interacciona con proteínas relacionadas con la reparación del daño, como BRCA1 y la helicasa WRN (de las siglas *Werner Syndrome Protein*) [169–172–177]. Además, se ha descrito que las quinasas ATM, ATR y DNA-PK la fosforilan en el residuo serina 784 tras daño en el ADN [178]. En 2011, se propuso un novedoso mecanismo molecular en el que posicionaba a VCP como una proteína esencial para el reclutamiento de 53BP1 a los sitios de daño del ADN. Ante rotura de doble cadena en el ADN y, posteriormente a la fosforilación de H2A.X, se reclutan las ubiquitin-ligasas RNF8 y RNF168 (del inglés *RING finger protein*), lo que conlleva la ubiquitinación de las proteínas que se encuentran en estos sitios de daño. Esto conduce al reclutamiento de VCP y su cofactor Npl4, que induce a la liberación de L3MBTL1 (del inglés *Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1*, proteína que se asocia a la modificación epigenética H4K20me2, al igual que 53BP1) de la cromatina, y entonces 53BP1 se puede unir al sitio de daño (Figura 15), activándose el mecanismo de reparación NHEJ [179].



**Figura 15. Modelo de la función de VCP en el reclutamiento de 53BP1 a los sitios de daño en el ADN (modificado de [138])** ub: ubiquitina, me2: H4K20me2.

#### 4.2.3. Regulación del ciclo celular por VCP

Aunque se sabe que VCP participa en la regulación del ciclo celular, su papel en la progresión de G1 a S en células de mamífero no está claro. Se ha demostrado que esta proteína participa en la degradación de p27 y p21, promoviendo la entrada de las células en fase S. VCP exporta del núcleo a p27 durante la fase G1 temprana e interacciona con dicha proteína ubiquitinada en el citosol mediando su degradación vía proteasoma [180].

Además, VCP también participa durante la replicación del ADN en la fase S [181], así como durante la mitosis, facilitando la degradación de la fosfatasa CDC25A (del inglés *C*ell *d*ivision *c*ycle *25* homolog *A*), ayudando a eliminar a AuroraB ubiquitinada de los cromosomas o regulando el desensamblaje del huso acromático al final de la mitosis [182–184].

#### 4.2.4. Papel de VCP en las neuronas

VCP está específicamente involucrado en la correcta formación y funcionamiento de las neuronas. Las espinas dendríticas son modificaciones de la membrana celular de las dendritas, ricas en actina, esenciales para la

comunicación neuronal. Muchas de ellas presentan retículo endoplásmico (RE) liso que participa en mantener la homeostasis de calcio intracelular. Se ha observado que VCP junto con su cofactor p47 y ATL1 (del inglés *Atlastin-1*, GTPasa que modula la morfología y la función del retículo endoplasmático en las dendritas), regula la formación del RE y actúa en la síntesis de las proteínas controlando la formación de las espinas dendríticas [185–186].

En distintas enfermedades neurodegenerativas, la pérdida de la función mitocondrial por diversos motivos es un mediador clave de la disfunción axonal y muerte de la célula, dado que en las neuronas la mayor parte del ATP se genera en estos orgánulos. Recientemente, se ha descrito que VCP tiene un papel crucial en el transporte de las mitocondrias a través del axón de las motoneuronas. Se ha visto en modelos de *Drosophila*, que cuando VCP no se expresa en los niveles adecuados, se favorece el transporte de las mitocondrias hacia el cuerpo de la neurona, reduciéndose la densidad mitocondrial en los axones. Se puede rescatar el fenotipo eliminando una copia de la cadena pesada de la dineína o elevando los niveles del adaptador de la quinesina, denominado *Miro*, que facilita el movimiento mitocondrial hacia el axón interaccionando con la cadena pesada de la quinesina. Por ello, se sugirió que VCP debería trabajar junto con un adaptador de la dineína específico para el transporte de las mitocondrias aún no identificado, esencial para su transporte hacia los axones [187].

Por último, la proteína TDP-43 (del inglés *TAR DNA-binding protein 43*) tiene distintas funciones en el empalme de los pre-ARNm, represión transcripcional y en la regulación postraducciona. Por otra parte, los miembros de la familia MICAL (del inglés *Molecule interacting with CasL*) están asociadas a la organización de los filamentos de actina, posibilitando el crecimiento axonal de las neuronas y el tráfico de membranas. Se ha observado en motoneuronas que se produce la deslocalización de TDP-43 al citoplasma y un patrón alterado del *splicing* del ARNm MICAL cuando existen distintas mutaciones en VCP. Todo ello conduce a estrés oxidativo, pérdida de función mitocondrial, defectos en el desarrollo de las neuronas y su consiguiente muerte [188–189]. Sin embargo, el mecanismo de acción exacto de VCP en este proceso es desconocido.

- INTRODUCCIÓN -

Así, la última parte de este trabajo se centrará en la relación de VCP y de SMN y coilina con la quinasa VRK1, con objetivo de intentar dilucidar el mecanismo por el cual, las variantes descritas de la quinasa están implicadas en síndromes neuromotores en los que estas proteínas tienen un papel esencial.



## OBJETIVOS

- Caracterizar las variantes patogénicas de la quinasa VRK1, centrándonos en su estabilidad, actividad catalítica, respuesta en la reparación del daño en el ADN, formación de los cuerpos de Cajal y patrón epigenético de las lisinas 9 y 27 de la histona H3.
- Analizar la relación entre la quinasa VRK1 y las proteínas SMN y VCP, estudiando su posible interacción y el efecto del silenciamiento de la quinasa y el de sus variantes patogénicas sobre estas proteínas.





# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL ADN

### 1.1. Obtención y purificación del ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de *Escherichia coli* se usaron dos kits comerciales, según interesase extraer mayor (*Maxi-prep*) o menor (*Mini-prep*) cantidad de ADN.

Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala (*Mini-prep*) se utilizó el kit *NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel)* y se siguió el protocolo del fabricante. A partir de un cultivo saturado de *E. coli* crecido en medio LB (del inglés *Lysogeny Broth*), se centrifugó 1 mL a 11.000 x g durante 30 seg recogiendo así las bacterias. Seguidamente, se lisaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11.000 x g durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante a una columna con membrana sílica y se centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. Después, la membrana se lavó dos veces y se eluyó el ADN utilizando agua o un tampón TE (10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA), centrifugando a 11.000 x g durante 1 min.

Para la extracción a gran escala del ADN plasmídico (*Maxi-prep*) se utilizó el kit *GeneJet Plasmid Maxiprep de Thermo Fisher scientific*. En este caso, se centrifugaron 400 mL de cultivo saturado de *E. coli* a 5.000 x g en la centrífuga *Avanti™ J-25 (Beckman Coulter, Inc.)* durante 10 min, recogiendo de esta forma las bacterias. Seguidamente, se lisaron a temperatura ambiente, se neutralizó el lisado y se centrifugó a 20.000 x g durante 20 min. El sobrenadante se mezcló con etanol 96% (v1:1), se transfirió a una columna con membrana sílica y se centrifugó a 2.000 x g durante 2-3 min. Seguidamente, la columna se lavó tres veces con solución de lavado y se eluyó el ADN con un tampón de elución.

### 1.2. Cuantificación de ADN plasmídico

Para conocer la concentración y la pureza del ADN plasmídico purificado se utilizó el espectrofotómetro *NANODrop (NanoDrop Technologies)*. Además, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% para confirmar dicha concentración.

### 1.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Para separar los fragmentos de ADN según su tamaño se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% m/v preparados en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). Este tampón tiene un pH 8, lo que es importante dado que la migración del ADN a través de estos geles depende de la carga iónica del medio y de la carga negativa de los fosfatos del ácido nucleico. Además, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/mL) al tampón de electroforesis para la visualización del ADN, ya que este compuesto se intercala entre las bases nitrogenadas y emite fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta. Esta fluorescencia fue captada por una cámara acoplada al analizador de imagen *Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad)*. Se utilizó como marcador de peso molecular el *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* de *Thermo Fisher Scientific*. Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de entre 60 y 80 V.

### 1.4. Generación de vectores de ADN recombinante

Las construcciones de ADN recombinante que fueron generadas en el laboratorio se obtuvieron mediante la inserción de secuencias de las ADN codificante de VRK1 humano o murino en los vectores pCCLF-HA, pGEX4T1-GST y pLenti-C-HA-IRES-BSD. Para ello, se digirieron tanto el vector como la secuencia de VRK1 desde otros vectores con endonucleasas de restricción (*Thermo Fisher Scientific*), se ligaron con la enzima *T4 ADN-Ligasa (Thermo Fisher Scientific)* y finalmente, las construcciones obtenidas se transformaron en bacterias competentes de *E. coli* (cepa DH5α o BL21) cultivadas con su antibiótico de resistencia (ampicilina 10 µg/mL, cloranfenicol 10 µg/mL, kanamicina 25 µg/mL) e incubadas a 37 °C durante toda la noche.

Posteriormente, se extrajo el ADN por *Mini-prep* y se secuenció la construcción. Se utilizaron los programas informáticos *Chromas (Technelysium Pty)* y *Blast (National Library of Medicine, NCBI)* para el análisis y el alineamiento de las secuencias. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación se detallan en la Tabla 2.

### 1.5. Transformación de plásmidos en *E. coli*

Se utilizaron los plásmidos de ADN recombinante para transformar bacterias *E. coli* competentes de las cepas DH5 $\alpha$  (para producir ADN plasmídico) o BL21 (para producir proteínas recombinantes), mediante choque térmico. Se descongelaron las bacterias preservadas a -80 °C a las que se las añadió 50-100 ng del ADN de interés. Se incubaron 30 min en hielo y posteriormente se realizó la transformación con choque térmico durante 42 seg a 42 °C. Después, se añadieron 600  $\mu$ l de LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación. Por último, se eliminó el LB mediante centrifugación suave y se plaquearon las bacterias en placas Petri con LB-agar y el antibiótico de resistencia. Se incubaron a 37 °C durante toda la noche y se verificó por secuenciación la presencia del plásmido en las colonias obtenidas. Las que resultaron positivas se guardaron en glicerol al 20% v/v a -80 °C.

### 1.6. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones en nucleótidos puntuales se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del sistema comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*. Para ello, se prepararon las reacciones de PCR (del inglés *Polymerase chain reaction*) usando 50 ng del ADN molde, 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido diseñado con la mutación de interés (Tabla 5 y 6), 0,2 mM de dNTPs (*Roche*), tampón 1x [76 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 9,5% DMSO, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y una unidad de la enzima *PFU ADN polimerasa (Biotools)* en un volumen final de 25  $\mu$ L.

Tras la adición de la enzima, la PCR se llevó a cabo durante 16-18 ciclos de la siguiente manera: 5 seg a 94°C (desnaturalización inicial), 30 seg a 94°C (desnaturalización), 1 min a 50-60°C (hibridación), 14 min a 72°C (elongación) y 15 min a 72°C (elongación final).

El ADN molde se eliminó incubando el producto de la PCR con la enzima *DpnI (Thermo Fisher Scientific)*, que actúa sobre el ADN metilado y hemimetilado cortándolo, pero no sobre las copias mutadas. El producto de PCR se transformó en bacterias *E. coli* y se seleccionaron las colonias por su

resistencia específica al antibiótico, secuenciando finalmente el ADN para verificar la mutación en el nucleótido deseado.

## 2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ARN

### 2.1. Purificación del ARN

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos y, tras el tratamiento adecuado, se extrajo el ARN con el kit *RNAeasy Mini Kit (Quiagen)* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se lisaron las células con el *buffer* RLT complementado con  $\beta$ -mercaptoetanol, que inactiva las ribonucleasas. Se transfirió la muestra, a la que se le añadió previamente un volumen de etanol al 70%, a una columna con membrana sílica para la purificación de ARN y, tras lavarlo con distintos tampones, se eluyó de ella usando agua libre de RNasas.

### 2.2. Cuantificación del ARN

Para conocer la concentración del ARN plasmídico purificado se utilizó el espectrofotómetro *NANODrop (NanoDrop Technologies)*. Las muestras cuyos ratios 260/280 y 260/230 nm estaban por debajo de 1,7 se descartaron puesto que esto es un indicador de que las muestras pueden estar contaminadas con proteínas u otros compuestos.

### 2.3. RT-PCR cuantitativa

La RT-PCR cuantitativa o qRT-PCR (del inglés *Quantitative reverse transcriptase-PCR*) permite la amplificación y cuantificación de una molécula de ARN, dado que la enzima transcriptasa reversa usada permite la síntesis de ADN a partir del ARN, el cual es amplificado por PCR. El número de copias de la muestra de ARN se puede conocer gracias al ciclo límite o Ct (*Cycle threshold*, número de ciclos necesarios para que la fluorescencia sea mayor a la del fondo) que son inversamente proporcionales a la cantidad de ARN de la muestra ( $ARN = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Se utiliza el compuesto *SYBR Green*, que se une al ADN según se va amplificando, siendo la intensidad de la fluorescencia emitida por ésta proporcional a la cantidad de producto de PCR producido. Así pues, se utilizó el kit comercial *iTaq Universal SYBR Green One-Step (Bio-*

*rad*) y los oligonucleótidos indicados en la tabla 4 para realizar la qRT-PCR. Se usó el termociclador *iCycle* (*Bio-rad*) para llevar a cabo la reacción y se analizaron los datos con el programa *BioRad Iq5* (*Bio-rad*). Se normalizaron los niveles de ARN de cada experimento usando los del gen *GAPDH* (del inglés *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) de cada muestra.

### 3. TÉCNICAS DE MANIPULACION DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Purificación de proteínas de fusión con GST

La expresión y purificación a gran escala las proteínas de fusión a GST (del inglés *Glutathione S-transferase*) se llevó a cabo a partir de la cepa *E. coli* BL21, que habían sido transformadas con los plásmidos pGEX-4T-GST con las secuencias de las proteínas de interés. Estos vectores presentan un promotor *lac* que permite inducir la expresión de la proteína químicamente con lactosa o con un análogo, como el isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Para ello, primeramente, se preincubaron las bacterias con los plásmidos de interés durante toda la noche en medio LB con ampicilina (50 µg/mL) en agitación a 37 °C. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo recogiendo las bacterias y eliminando el sobrenadante, con el objetivo de eliminar las betalactamasas del medio. Se resuspendieron las bacterias en 200-800 mL de LB con ampicilina y se incubaron en agitación durante 1-2 horas a 37 °C, hasta que se alcanzó la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de 0,6. En este punto, el cultivo se encuentra en su fase exponencial de crecimiento, por lo que es el momento en el que se puede inducir la expresión de la proteína con IPTG (*Roche*) a 0,2 mM. Se dejó el cultivo 2-3 h a 37 °C o toda la noche a 15 °C en agitación y se recogieron las bacterias por centrifugación a 8.000 x g durante 10 min. Se resuspendió el *pellet* en tampón de lisis (20 mM Tris a 4 °C a pH8, 500 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0,025% NaN<sub>3</sub>, 0,2 µg/mL lisozima, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF, 5 mM DTT, 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL leupeptina) y se sonicó la suspensión a baja potencia a 4 °C realizando 6 pulsos de 30 seg descansando 10 seg entre cada uno con el sonicador *Vibra Cell* (*Sonics*). Se incubó 30 min en hielo y, pasado ese tiempo, se centrifugó a 19.000 x g durante 20 min. Las proteínas expresadas eran solubles y se encontraron en el sobrenadante al realizar una electroforesis en gel *SDS-PAGE* (del inglés *Sodium Dodecylsulfate* - *polyacrilamide Gel*

*Electrophoresis*) seguida de una tinción con azul de *Coomassie* (apartado 3.4. de Materiales y Métodos) de una alícuota de dicha fracción. Así pues, se incubó el sobrenadante con la resina *Glutathion Sepharose 4B beads (GE Healthcare)*, que tiene alta afinidad por el epítipo GST, a 4 °C durante 2-8 h en agitación orbital. Posteriormente, se lavó la resina 3 veces con PBS frío junto con los inhibidores de proteasas y se eluyó la proteína de fusión. Para ello, se utilizó una solución de 20 mM de glutatión reducido en 50 mM Tris-HCl pH 8 y se fue centrifugando cada 10 min a 400 x g la muestra, quedándonos con el sobrenadante, que es donde se encuentra nuestra proteína de fusión eluída. Para comprobar que se había purificado correctamente, se realizó una electroforesis en gel *SDS-PAGE* seguida por una tinción con azul de *Coomassie* y se determinó su concentración mediante técnicas colorimétricas utilizando *BIORAD protein assay (Bio-Rad)* y la proteína seroalbúmina bovina (*BSA*, del inglés *Bovine serum albumin*) para crear una recta patrón.

### 3.2. Purificación de la proteína de fusión BAF-HIS

La purificación de la proteína BAF etiquetada con histidina se llevó a cabo a partir de *E. coli* BL21, transformadas previamente con el plásmido pET con la secuencia codificante de la proteína cedido por el laboratorio de Matt Wieber (Universidad de Nebraska). Este vector presenta, al igual que las proteínas de fusión con GST utilizadas, un promotor *lac* inducible con IPTG.

Resumidamente, las bacterias se preincubaron en medio LB con ampicilina (50 µg/mL) en agitación a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recogieron, resuspendieron y se incubaron en agitación durante 1-2 h a 37 °C, hasta alcanzar la  $DO_{600nm}$  de 0,6, momento en el que se indujo la expresión de la proteína con IPTG a 0,2 mM. Se dejó el cultivo toda la noche a 15 °C en agitación y posteriormente, se recogieron las bacterias. Se resuspendió el *pellet* en tampón de lisis (20 mM Tris a 4 °C a pH8, 500 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0,025%  $NaN_3$ , 5 mM imidazol, 0,2 µg/mL lisozima, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL leupeptina) y se sonicó la suspensión a baja potencia como se ha descrito en el apartado anterior. Se incubó 30 min en hielo y se centrifugó a 19.000 x g durante 20 min. La proteína no se encontró en la fracción soluble, por lo que se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en un segundo tampón de lisis



compuesto por 20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 6 M urea. Posteriormente, se incubó el sobrenadante con la resina *Ni Sepharose™ High Performance* (GE Healthcare), que tiene alta afinidad por la histidina, durante 2 h en agitación orbital. Se lavó la resina 6 veces con junto con los inhibidores de proteasas y se eluyó la proteína de fusión. Para ello, se utilizó una solución de 20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 6 M urea y 500 mM de imidazol que permite que se separe la proteína de la resina. Para verificar la purificación de la proteína, se realizó una electroforesis en gel *SDS-PAGE* seguida de un *Western Blot* y tinción con azul de *Coomassie*.

### 3.3. Electroforesis en geles *SDS-PAGE*

Se llevaron a cabo electroforesis en geles *SDS-PAGE* en condiciones desnaturalizantes para la separación de proteínas según su tamaño. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y se une a ellas confiriéndoles carga negativa debido a sus grupos sulfato. De esta forma, la carga de la proteína se enmascara por las moléculas de SDS, lo que posibilita que las proteínas migren hacia el polo positivo según su masa molecular. Se utilizaron diferentes concentraciones de acrilamida para preparar el gel separador (*resolving*) según el tamaño de la proteína a analizar: geles del 7,5% de acrilamida para proteínas grandes de más de 120 kDa, del 10% para proteínas de entre 30 y 120 kDa y del 12,5% o 15% para las que pesaban entre 7 y 30 kDa. Para la preparación de estos geles, se utilizó acrilamida al 7,5-15% y bis-acrilamida al 0,13-0,4% en 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 y 3,5 mM SDS. Encima de estos geles, se preparó el gel concentrador (*stacking*) utilizando acrilamida al 4,8% y bis-acrilamida al 0,128% en 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 y 3,5 mM SDS. Se añadió a ambos geles APS (persulfato de amonio) y TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina) para su solidificación. Las muestras de proteínas, antes de cargarlas en el gel, se procesaron resuspendiéndolas en tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2,3% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 5%  $\beta$ - mercaptoetanol) e hirviéndolas durante 5 min. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes utilizando un tampón con 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicina y 1,7 mM SDS. Se usó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (Bio-Rad).

### 3.4. Tinción con azul de *Coomassie*

La tinción con azul de *Coomassie* se utilizó para ver las proteínas en los geles de poliacrilamida. Esta tinción se preparó con 0,5% de *Coomassie brilliant blue R250* (Merck), 50% de metanol (*Sigma-Aldrich*) y 10% de ácido acético glacial (Merck), y se añadió directamente a los geles, incubándolos, posteriormente, durante 10-30 min en agitación suave. Pasado ese tiempo, se lavaron con la solución de destinción, compuesta por 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial, hasta que las bandas de proteínas se podían ver claramente. El gel se escaneó con el equipo *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*).

### 3.5. Transferencia húmeda y *Western blot* de extractos proteicos

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en *SDS-PAGE*, se realizó la transferencia húmeda de dichas moléculas a membranas de PVDF *Immobilon-P* o *Immobilon-FL* (*Millipore*) para su detección con anticuerpos específicos. Para ello se siguió el protocolo descrito por Towbin en 1979 [186]. Primeramente, se activaron las membranas durante 30 seg con metanol (*Sigma-Aldrich*) y se realizó la transferencia durante 30-90 min a 90 voltios en un tampón compuesto por 25 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicina y 10-20% metanol. La concentración de metanol varía en función del peso molecular de las proteínas que vamos a transferir, siendo mayor cuanto menor es la proteína. Una vez terminada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 20 min a temperatura ambiente con leche desnatada o BSA al 5% en tampón TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl y 0,1% Tween-20) según las indicaciones del anticuerpo a utilizar posteriormente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo específico primario siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Tabla 7). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios *Goat Anti-Mouse IgG*, *DyLight™ 680* y *Goat anti-Rabbit Ig-G*, *DyLight™ 800* (*Thermo Fisher Scientific*) durante una hora en oscuridad a una dilución 1:10.000. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se escanearon con el equipo *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* (*LI-COR Biosciences*) que recoge la fluorescencia emitida por los anticuerpos secundarios.

En determinados casos, el anticuerpo secundario que se utilizó estaba conjugado con peroxidasa (*ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody* de *Amersham Bioscience* o *Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase Conjugate* de *Sigma-Aldrich*). En estas ocasiones, después de incubar con dicho anticuerpo secundario las membranas (dilución 1:10.000), la luminiscencia se detectó tras la incubación con *ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)* usando películas de rayos X (*Fujifilm*).

## 4. LÍNEAS CELULARES

### 4.1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se especifican en la Tabla 8, 9 y 10. Se cultivaron, en general, en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose*) de *Sigma-Aldrich* suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS, del inglés *Fetal bovine serum*), 2 mM de L-glutamina, y los antibióticos penicilina (50 unidades/mL) y estreptomina (50 µg/mL) de la casa comercial *Gibco-Life Technologies-Invitrogen*. Las líneas se cultivaron en un incubador a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad relativa, en placas *Style* de 100 x 20 mm, 60 x 15 mm o 35 x 15 mm (*Thermo Fisher Scientific*), o bien en multiplacas de 96, 24, 12 o 6 pocillos, según el experimento a realizar. Para levantar las células de las placas se utilizó *TrypLE™ express* de *Gibco-Life Technologies-Invitrogen*. Además, las células se observaron con un microscopio óptico invertido *Zeiss Axiovert 25 (Carl Zeiss AG)* y para su contaje, se utilizó un *Coulter Counter* de la serie Z (*Life Sciences*).

### 4.2. Generación de líneas celulares estables

Las líneas celulares estables utilizadas se generaron a partir de las líneas *A549* y *HeLa* usando vectores lentivirales mediante transducción lentiviral como se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM de L-glutamina, penicilina (50 unidades/mL), estreptomina (50 µg/mL) y 10 µg/mL de blasticidina (*InvivoGen*). La blasticidina es el antibiótico de selección de las células que presentaban el vector lentiviral con la resistencia a dicho antibiótico. Al cabo

de una semana de la infección, las células que no se infectaron murieron, mientras que las que expresaban las proteínas introducidas y la resistencia al antibiótico sobrevivieron. La expresión de dichas proteínas se comprobó realizando un *Western blot* con los anticuerpos específicos de las proteínas y mediante inmunofluorescencia.

### 4.3. Clonación de célula única de líneas celulares estables

Con el objetivo de eliminar la heterogeneidad causada por la inserción aleatoria de los vectores lentivirales en el genoma de las células y poder establecer líneas celulares con unas características genéticas similares se llevó a cabo una clonación de célula única utilizando el citómetro *BD FACSAria™ III* (*BD Biosciences*). Para ello, las células infectadas se recogieron y se filtraron con un filtro de 35  $\mu\text{m}$  (*Falcon 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube* de *Corning Life Sciences*) para eliminar los agregados celulares. Las células se separaron con el citómetro anteriormente nombrado, en función a la relación entre tamaño y forma, en placas de 96 pocillos de forma que solo cayese una célula por pocillo. Estos pocillos contenían 150  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de blasticidina. Pasadas dos semanas de crecimiento, se pasaron los clones a placas sucesivamente mayores hasta conseguir un cultivo celular estándar y poder comprobar tanto por *Western Blot* como por inmunofluorescencia la expresión de la proteína de cada clon.

## 5. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO MONOCAPA

### 5.1. Transfección con JetPEI™

La sobreexpresión transitoria de proteínas se realizó transfectando las células con el ADN plasmídico de interés (Tabla 11). Las células se sembraron 24 h antes de transfectarlas, de forma que alcanzasen una confluencia del 50-70% durante ese día. La transfección se realizó con el polímero catiónico *JetPEI™* (*Polyplus transfection*) según las instrucciones del fabricante. Este polímero compacta el ADN en partículas cargadas positivamente, que se unen a las cargas negativas de los proteoglicanos de la membrana celular y se introducen a la célula por endocitosis. Así pues, el ADN se resuspendió en un volumen de NaCl 150 mM, y de la misma manera, el *JetPEI* (se añaden 2

$\mu$ L de *JetPEI* por cada microgramo de ADN). Se mezcló y se incubó durante 20 min y se añadió la mezcla sobre las células. La cantidad de ADN de cada plásmido a transfectar viene especificada en cada experimento, aunque la concentración final de ADN en cada experimento se mantuvo constante.

## 5.2. Transfección con *Lipotransfectin*

Para la supresión de la expresión de VRK1 mediante ARN de interferencia, se utilizó el reactivo *Lipotransfectin* (*Solmeclas*) y los siARN específicos (*Dharmacon RNA Technologies*) recogidos en la tabla 3. A su vez, se utilizó el siARN *ON-TARGET plus siControl Nontargeting siRNA* (*Dharmacon RNA Technologies*) que no tiene diana en células humanas como control de la transfección en los experimentos. El reactivo *Lipotransfectin* contiene subunidades lipídicas que forman liposomas de naturaleza catiónica. Estas cargas permiten su unión al ARN (cargada negativamente) y la fusión con la membrana celular e introducción en las células.

Las células se sembraron en medio DMEM sin antibiótico en estos casos para facilitar la transfección. Se diluyó la *Lipotransfectin* en un volumen de *Opti-MEM* (*GIBCO-life technologies*) y, pasados 5 min, se le añadió el siARN específico resuspendido a su vez también en *Opti-MEM*. Se incubó durante 20 min la mezcla y se añadió la mezcla sobre las células. Tras 12 h, se reemplazó el medio de cultivo por medio con antibiótico para eliminar el reactivo.

## 6. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

Se utilizó la transducción lentiviral para introducir ADN en las células de forma altamente eficiente, dado que los vectores usados son capaces de transducir células tanto en interfase como en mitosis. En la tabla 11 se recogen los vectores lentivirales usados. Para la obtención de los lentivirus, se tiene que proporcionar a las células plásmidos que codifiquen las proteínas de empaquetamiento lentiviral, así como para la maquinaria de replicación del material genético viral. Así pues, se transfectan los vectores lentivirales junto con los vectores *pCMV-dRp8.91* (codifica las proteínas Gag y Pol) y *pMD26-VSV-G* (codifica la proteína Env) según se indica a continuación.

Primeramente, se sembraron células *HEK-293T* y, a las 24 horas, se transfectaron con 9 µg del vector lentiviral y de los dos vectores de empaquetamiento según se ha explicado en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. A las 24 h de transfección, se cambió el medio y se sembraron las células *A549* y *HeLa*. Al día siguiente, se realizó la transducción añadiendo sobre las células *A549* y *HeLa* el medio de las *HEK-293T*, previamente filtrado con un filtro de 0,45 µm (*Acrodisc Syringe Filters, Pall Corporation*) al que se le añadió 4 µg/mL de polibreno (*Sigma-Aldrich*). El polibreno es una molécula de carga positiva que permite a las glicoproteínas virales unirse a los receptores ya que puede asociarse a la membrana celular neutralizando su carga. Se repitió este proceso otras dos veces a las 12 h y posteriormente se añadió 10 µg/mL de blasticidina al medio, dado que el vector lentiviral posee el gen de resistencia.

Se infectó en paralelo una placa con un vector que expresa GFP pero que no posee la resistencia al antibiótico, como control de transfección, transducción y selección.

## **7. EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES**

### **7.1. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo**

La obtención de extractos proteicos a partir de células en cultivo se llevó a cabo lisando las células con un tampón de lisis suave en un volumen variable. Este tampón está compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1 mM EDTA, y se le añadieron inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 µg/mL de leupeptina y 10 µg/mL de aprotinina) y fosfatasas (1 mM de fluoruro de sodio y 1 mM de ortovanadato de sodio). Una vez lisadas, se incubó la suspensión durante 20-30 min y se centrifugó a 16.100 x g a 4°C durante 20 min. Las proteínas se encontraron en la fracción soluble.

Para cuantificar la concentración de proteína obtenida, se usó el método *Bradford* o *BCA*. El *Bradford* se basa en el cambio de color que sufre el colorante *G-250 Coomassie* que, cuando se une a las proteínas, cambia de pardo a rojo-azulado, lo que hace que su máximo de absorción cambie de 465 a 595 nm. Se utilizó el reactivo *Bio-Rad Protein assay* de *Bio-Rad* y para generar la recta patrón se utilizó BSA de *Bio-Rad*. Por su parte el *BCA* (del

inglés *Bicinchoninic acid*) se basa en la capacidad que tienen las proteínas de reducir los iones  $\text{Cu}^{+2}$  del reactivo BCA a  $\text{Cu}^{+1}$ , adquiriendo un color morado proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra. Se usó el kit *BCA assay* de *Thermo-Fisher*.

## **7.2. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo con *buffer* RIPA**

Para la obtención de extractos proteicos celulares, incluidas proteínas nucleares como histonas, se lisaron las células con el tampón de lisis RIPA, compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1 mM EDTA y los inhibidores de proteasas y fosfatasa indicados en el apartado anterior. Se incubaron las muestras 10 min a 4 °C y se sonicaron a baja potencia dando 2 pulsos de 15 seg descansando 5 min entre cada uno. Con esto se fragmenta el ADN quedando libres las proteínas contenidas en el núcleo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 10 min. Las proteínas se localizaron en la fracción soluble. Se midió la concentración de proteína con el método de *Bradford* o BCA explicados anteriormente.

## **7.3. Fraccionamiento citosol-núcleo de extractos proteicos**

Para la obtención de las proteínas del citosol y núcleo a partir de un cultivo celular, se utilizó, primeramente, un tampón de lisis de fracción citosólica compuesto por 10 mM HEPES pH 7,6 (*Sigma- Aldrich*), 40 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5% glicerol (*Sigma- Aldrich*), 0,5% *Igepal* (*Sigma- Aldrich*), al que se le añadió inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinina) y fosfatasa (1 mM NaF y 1 mM ortovanadato de sodio). Para ello, se recogieron las células en un *Falcon* de 50 mL (*Corning*) y se resuspendieron en tres volúmenes de dicho tampón de lisis. Se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 800 x g 5 min a 4 °C. El sobrenadante se guardó como la fracción citosólica. Se lavó el *pellet* tres veces con el tampón de lisis de fracción citosólica, pero esta vez sin añadirle *Igepal* para prevenir la lisis de las membranas nucleares. Posteriormente, se lisó el *pellet* con el tampón de lisis de fracción nuclear complementado con los inhibidores de proteasas

y fosfatasas nombrados anteriormente. Este tampón de lisis está compuesto por 10 mM HEPES pH 7,9, 420 mM NaCl, 0,1 mM EGTA (*Sigma- Aldrich*), 25% glicerol y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Se incubó 10 min en hielo y se centrifugó a 16.100 x g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante como la fracción nuclear.

Se cuantificó la concentración de proteína en ambas fracciones con el método de *Bradford* o *BCA* explicados anteriormente.

## 8. ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS

### 8.1. Ensayos de coinmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se utilizaron entre 0,5 y 2 mg de proteína, llevándolo hasta un volumen final de 1 mL con el *buffer* de lisis utilizado para la obtención de estos extractos proteicos. Se incubaron con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4 °C, a la dilución indicada por el comerciante y, después, se añadieron 20 µL de la resina equilibrada *Protein G Agarose Resin 4 Rapid Run™* (*Agarose Bead Technologies*) durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. En este momento, nuestra proteína se encuentra unida a la resina por medio del anticuerpo. Posteriormente, se lavó la resina unida a nuestra proteína 3 veces por centrifugación suave y se añadió el tampón de carga, se hirvió durante 5 min y se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas por electroforesis y *Western Blot*. Se utilizó, como control negativo de los ensayos, un punto en el que se precipita con un anticuerpo inespecífico.

### 8.2. Ensayos de *Pull-Down*

Los ensayos de *Pull-Down* consisten en precipitar proteínas fusionadas a GST. Para ello, se transfectan estas proteínas de fusión en células eucariotas y, pasados dos o tres días, se lisaron como se explicó en el apartado 7.1. de Materiales y Métodos. Se incubaron entre 0,5 y 2 mg de extracto proteico con 40 µL de la resina *Glutathion Sepharose 4B beads* (*GE Healthcare*) equilibrada durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Se lavó la resina 3 veces por centrifugación suave y se procesaron las muestras con tampón de carga para su análisis por *Western Blot*. Se utilizó, como



control negativo de estos experimentos, una muestra en la que se precipita el GST vacío.

## 9. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Para el estudio de las características fenotípicas de las líneas celulares, se realizó la captura de imágenes con un microscopio de campo claro. Para ello, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y, pasadas las 24 h, se silenció la expresión de VRK1 endógeno como se explica en el apartado 5.2. de Materiales y Métodos. Tras 48 o 72 h, se capturaron imágenes *in vivo* con el microscopio de campo claro *Nikon Eclipse TE 2000* cada 10 min durante 24 h a un aumento del 10x. Posteriormente, se analizaron distintos parámetros de las líneas celulares (área celular, distancia recorrida y velocidad) utilizando el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

### 9.1. Ensayos de cierre de herida

Se realizaron ensayos de cierre de herida (*Wound healing assay*) para determinar la capacidad de migración de las células de las líneas *HeLa* y *A549* estables generadas. Para ello se cultivaron las células en placas de 24 pocillos y pasadas 24 horas se silenció la expresión del gen *VRK1 humano*. Posteriormente, se eliminó el suero del medio para frenar la proliferación celular y poder cuantificar de forma más precisa la migración celular. Posteriormente, cuando el cultivo alcanzó la confluencia, se realizó la herida con ayuda de una punta fina y se capturaron imágenes *in vivo* con el microscopio de campo claro *Nikon Eclipse TE 2000* cada 15 minutos durante 24. Posteriormente, se analizó el cierre de la lesión con el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

## 10. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los ensayos de inmunofluorescencia (IF) se llevaron a cabo para detectar la expresión de una proteína, su localización subcelular y colocalización con otras proteínas. Para ello, primeramente, se sembraron las células sobre cubreobjetos (*Thermo Fisher Scientific*) añadiendo polilisina al 0,01% (*Merck*) si fuese necesario y, pasadas 24-72 h, las células se trataron con paraformaldehído (*Sigma-Aldrich*) al 3% en PBS 1X durante 30 min para

fijarlas. Para reducir los grupos aldehído libres después de la fijación, se añadió a las células 20 mM de glicina (*Panreac*) durante un mínimo de 15 min. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 30 min con 0,2% de tritón X-100 (*Sigma-Aldrich*) en PBS 1X y se bloquearon en 1% de BSA y azida sódica (*Sigma-Aldrich*) en PBS 1X durante, como mínimo, 1 h a temperatura ambiente o bien, a 4 °C durante toda la noche. Para la detección de 8-oxo-G, las células se fijaron de distinta forma. Se fijaron con etanol 70% durante 5 min, se trataron con 1,5 M HCl durante 30 min y se bloquearon con 5% FBS y 0,3% Tritón X-100 en PBS durante 1 h.

Una vez fijadas y permeabilizadas, se incubaron con el anticuerpo primario a la concentración indicada por el comerciante (Tabla 7) con 1% de BSA y azida sódica en PBS 1X, durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Cuando fue necesario, se incubaron las células seguidamente con el segundo anticuerpo primario. Estos dos anticuerpos fueron siempre de distinto origen (ratón y conejo) para poderse detectar posteriormente de forma separada. Después se lavaron las células tres veces con PBS 1X para eliminar los restos de anticuerpo libre y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a los fluorocromos de cianina Cy2 (*Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L)*) y/o Cy3 (*Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L)*) de *Jackson ImmunoResearch* y/o Cy5 (*Cy<sup>TM</sup>5-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L)*) de *Jackson ImmunoResearch*) durante una hora a una dilución 1:10.000. A partir de este momento, el protocolo se realizó en oscuridad para preservar los fluoróforos. Tras esta incubación, se marcaron los núcleos con *DAPI* (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (*Roche*) diluido en PBS 1X durante 15 minutos y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con *MOWIOL 4-88* (*Calbiochem*). Finalmente, se utilizó el microscopio de fluorescencia *THUNDER Imager 3D Tissue* (*Leica Microsystems*) o el *Leica TCS SP5* (*Leica Microsystems*) y se analizaron las imágenes con el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

Para determinar el daño en el ADN, después de fijar y permeabilizar las células, se incubaron una hora a 37 °C con la mezcla de reacción TUNEL (kit *in situ Cell death Detection* de *Roche*) que contiene la enzima TdT que cataliza la adición de dUTPs marcados con fluoresceína a los extremos 3' libres del

ADN fragmentado. Posteriormente, se marcaron los núcleos con *DAPI* y se montaron los cubreobjetos con *MOWIOL*, como se indica anteriormente.

## 11. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

### 11.1. Ensayos quinasa *in vitro* con ATP radiomarcado

Los ensayos quinasa *in vitro* usando ATP radiomarcado se realizaron para estudiar la actividad serina/treonina quinasa cuando no fue posible detectar la fosforilación con anticuerpos específicos. Para ello, se usaron proteínas unidas a GST, histidina o inmunoprecipitados de extractos proteicos celulares. Para estos ensayos, se usó un tampón específico para caseína quinasa (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT y 150 mM KCl), 5 μM de ATP frío (*Roche*), 5 μCi de [γ-<sup>32</sup>P] ATP (*PerkinElmer*), 2 μg de la quinasa fusionada a GST y 1 μg de los sustratos específicos (tabla 11) y de las histonas H2A.X y H3 (*Upstate- Millipore*). Se incubaron las reacciones a 30 °C durante 45 min en agitación (100 x g) en un *Thermomixer Compact* (*Eppendorf*) y posteriormente, se procesaron las muestras añadiendo tampón de carga e hirviéndolas durante 5 min. Como control negativo de los experimentos se utilizó una muestra a la que no se añadió ATP radiomarcado. Las proteínas fosforiladas se analizaron mediante electroforesis *SDS-PAGE* y transferencia a membranas y las bandas radiactivas se detectaron al exponer las membranas a películas de rayos X (*Fujifilm*) a diferentes tiempos. Se utilizaron anticuerpos específicos (Tabla 7) como controles de carga.

### 11.2. Ensayos quinasa *in vitro* con ATP frío

Los ensayos quinasa *in vitro* utilizando ATP frío, se llevaron a cabo para analizar la actividad serina/treonina quinasa de VRK1 cuando ya estaba descrito el sitio de fosforilación y se disponía de los anticuerpos fosfoespecíficos para su detección. Se siguió el mismo procedimiento que en el aparatado anterior, utilizando el tampón específico para caseína quinasa, 2 μg de la quinasa fusionada a GST, 1 μg de los sustratos específicos (tabla 11 o de la histona H3 (*Upstate-Millipore*)) y 10 μM de ATP frío. Se incubaron las muestras a 30 °C durante 45 min en agitación y se procesaron con tampón de carga. Como control negativo de los experimentos se utilizó una muestra a la que no se añadió ATP radiomarcado. Finalmente, se realizó un *Western*

*Blot* y se incubaron las membranas con el anticuerpo fosfoespecífico correspondiente (tabla 7).

## 12. REACTIVOS Y ESTIMULACIONES

Se utilizó el inhibidor MG-132 de *Calbiochem* a 36  $\mu\text{M}$  durante 6 h para bloquear la actividad proteolítica del proteasoma 26S. Este compuesto se une a las subunidades proteicas  $\beta$  del núcleo 20S del proteasoma impidiendo su actividad.

En los estudios de estabilidad proteica, se trataron las células con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cicloheximida (*Sigma-Aldrich*), que inhibe la síntesis de proteínas al bloquear la elongación traduccional al interferir con la actividad peptidil transferasa del ribosoma.

Se utilizó la doxorrubicina (*Sigma-Aldrich*) para generar roturas de doble cadena en el ADN. La doxorrubicina es un fármaco utilizado como agente quimioterapéutico. Actúa intercalándose en el ADN bloqueando la actividad de la topoisomerasa II, lo que impide su transcripción [191].

En los ensayos de ciclo celular, se usó Timidina 2 mM 24 h (*Sigma-Aldrich*) para sincronizar las células en fase S y nocodazol 0,33  $\mu\text{M}$  12 h (*Sigma-Aldrich*) para pararlas en fase G2/M. Una alta concentración de timidina interrumpe la vía metabólica de los desoxinucleótidos y, por tanto, de la replicación del ADN. Por su parte, el nocodazol es un compuesto que inhibe la polimerización de los microtúbulos necesarios para la división celular.

## 13. SIMULACIÓN DE LA DINÁMICA MOLECULAR DE LAS VARIANTES DE VRK1

La simulación de las estructuras de las variantes de la quinasa humana VRK1 se realizaron en colaboración con David Ros Pardo, Iñigo Marcos Alcalde y Paulino Gómez Puertas, del grupo de modelado molecular del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBMSO (CSIC-UAM).

Las estructuras de las variantes de VRK1 se sometieron a 100 ns de simulación de Dinámica Molecular (MD) utilizando el paquete de dinámica molecular AMBER18 (<http://ambermd.org/>; Universidad de California-San Francisco, CA) [192]. Resumidamente, los modelos 3D se solvataron primero

con una caja solvente preequilibrada octaédrica periódica usando el módulo LEAP de AMBER, con 12 Å como la distancia más corta entre cualquier átomo en el subdominio de la proteína y los límites de la caja periódica. La simulación MD se realizó utilizando el programa PMEMD de AMBER18 y el campo de fuerza ff14SB (<http://ambermd.org/>), aplicando el algoritmo SHAKE, un paso de tiempo de 2 femtosegundos (fs) y un corte no enlazado de 12 Å. Los sistemas se relajaron inicialmente en 10000 pasos de minimización de energía, utilizando 1000 pasos de minimización del descenso más pronunciado seguidos de 9000 pasos de minimización de gradiente conjugado. Después se iniciaron las simulaciones con una fase de calentamiento de 20 picosegundos (ps), elevando la temperatura de 0 a 300 K en 10 pasos de cambio de temperatura, después de cada uno de los cuales se reasignaron las velocidades. Durante la minimización y el calentamiento, los diedros de trazas de C $\alpha$  se restringieron con una constante de fuerza de 500 kcal mol<sup>-1</sup> rad<sup>-2</sup> y se liberaron gradualmente en una fase de equilibrio en la que la constante de fuerza se redujo progresivamente a 0 durante 200 ps. Después de la fase de equilibrio, se obtuvieron 100 ns de simulación MD sin restricciones para las estructuras. Las trayectorias de MD se analizaron utilizando el software VMD [193]. Las figuras se generaron utilizando el sistema de gráficos moleculares *Pymol* (<https://pymol.org/>; Schrödinger, LLC, Portland, OR).

#### **14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para este trabajo, se han usado los programas estadísticos *IBM SPSS Statistics 25* y *Graphpad Prism 7*. Las pruebas estadísticas que se utilizaron fueron *ANOVA one-way* (o de un factor), cuando las muestras seguían una distribución normal, seguido de la prueba post-hoc Tukey para comparar las muestras 2 a 2; y el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para comparar las muestras 2 a 2.

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados para secuenciación.**

| OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA SECUENCIACIÓN                 |  |                 |
|--|--|-----------------|
| Denominación   | Secuencia 5' → 3'  | Gen secuenciado |
| VRK1 For<br>VRK1 Rev<br>HalfHVRK1                          | CCTCGTGATAAAGCAGCTCAAGCTG<br>GGACTCTCTTTCTGGTTCTTGAACGG<br>TCATAAAGAATACAAAGAAGACC   | VRK1 humano     |
| mVRK1 For<br>mVRK1 Rev<br>HalfmVRK1 For<br>HalfmVRK1 2 For | CTAAGTATTGGGGATCTGGTCTACGTGATAAAAATG<br>CATTTTTATCACGTAGACCAGATCCCAATACTTAG<br>GTACGTGCACGGGGACATCAAGGC<br>GAAAAACCTCTTTATGAAA | VRK1 murino     |

**Tabla 3. ARN de interferencia usados en este trabajo.**

| ARN DE INTERFERENCIA VRK1 HUMANO |                       |
|----------------------------------|-----------------------|
| Denominación                     | Secuencia 5' → 3'     |
| siControl (siC)                  | UGGUUUACAUGUCGACUAA   |
| siVRK1-02 (si02)                 | CAAGGAACCUGGUGUUGAAUU |
| siVRK1-03 (si03)                 | GGAAUGGAAAGUAGGAUUA   |

**Tabla 4. Oligonucleótidos usados para realizar RT-PCR cuantitativa.**

| OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA RT-PCR |  |                 |
|-------------------------------------|--|-----------------|
| Denominación                        | Secuencia 5' → 3'                                      | ARN amplificado |
| GAPDH For<br>GAPDH Rev              | GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTG<br>ACCTAACTACATGGTTTACATGTT  | GAPDH humano    |
| Pex2hVRK1 For<br>Pex2hVRK1 Rev      | CCAACGAGCTGCAAAACC<br>TGTCATGTAGACCAGACCCCC            | VRK1 humano     |
| Pex51PK For<br>Pex51PK Rev          | TGCATCTATCTGGCGGACAC<br>TCCGTGAAAAGAGGTCCATTG          | VRK1 murino     |
| SMN For<br>SMN Rev                  | TACATGAGTGGCTATCATACTGGCTA<br>AATGTGAGCACCTTCTTTCTTTTT | SMN humano      |
| VCP For<br>VCP Rev                  | CCTTGTCACGACCAAGATGGA<br>ATGGCTGGATGCTGATGACATCC       | VCP humano      |

**Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la mutagénesis directa de VRK1 humano**

| OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DE VRK1 HUMANO |   |          |
|--|---|----------|
| Denominación   | Secuencia 5'→3'   | Variante |
| P79L For<br>P79L Rev                                       | AACCCAGTGACAATGGACTTCTTTTTACTGAATAAA<br>TTTAATTCAGTAAAAAGAAGTCCATTGCTACTGGGTT                   | P79L     |
| R89Q For<br>R89Q Rev                                       | AATTAAGTTCTACCAACAAGCTGCAAACCAGAGCA<br>TGCTCTGGTTTTGCAGCTTGTGGTAGAACTTTAATT                     | R89Q     |
| H119R For<br>H119R Rev                                     | TCTGGTCTACGTGACAAAAATGGAA<br>TTCCATTTTTGCACGTAGACCAGA   | H119R    |
| R133C For<br>R133C Rev                                     | GGTTTATGATAATGGATTGCTTTGGGAGTGACCTTCAG<br>CTGAAGGTCCTCCAAAGCAATCCATTATCATAAACC                  | R133C    |
| G135R For<br>G135R Rev                                     | GGTTTATGATAATGGATCGCTTAGGAGTGACCTTCAG<br>CTGAAGGTCCTCTAAAGCGATCCATTATCATAAACC                   | G135R    |
| L195V For<br>L195V Rev                                     | GGCCTCAAATCTTCTTGTAACAAGAATCCTGACC<br>GGTCAGGATTCTGTAGTTCACAAGAAGATTTGAGGCC                     | L195V    |
| Y213H For<br>Y213H Rev                                     | AGGAGTTCATAAAGAACAACAAGAAGACCCAAAA<br>TTTTGGGGTCTTCTTTGTGTTCTTTATGAACTCCT                       | Y213H    |
| R219I For<br>R219I Rev                                     | CAAAGAAGACCCCAAATATGTCACGATGGCACT<br>AGTGCCATCGTGACATATTTGGGGTCTTCTTTG                          | R219I    |
| T228M For<br>T228M Rev                                     | CGATGGCACTATTGAATTCATGAGCATCGATGCACAAATGG<br>CCATTGTGTCATCGATGCTCATGAATTCAAATAGTCCATCG          | T228M    |
| V236M For<br>V236M Rev                                     | ATCGACGCTCACAAGGCATGGCCCCATCAAGACG<br>CGTCTTGATGGGGCCATGCCTTTGTGAGCGTCGAT                       | V236M    |
| R241C For<br>R241C Rev                                     | TCAAGAGGTGGTGATTTGGAAA<br>CCAAATCACCACCTTTGATGG   | R241C    |
| W254L For<br>W254L Rev                                     | GGTTATTGCATGCCAATTGCTTACTGGCCATCTTCTGGGAGG<br>CCTCCAAGGAAGATGGCCAGTAAGCAATTGGATCATGCAATAACC     | W254L    |
| T256I For<br>T256I Rev                                     | GATCCAATGGCTTATTGGCCATCTTCCTT<br>AAGGAAGATGGCCAATAAGCCATTGGATC                                  | T256I    |
| G257S For<br>G257S Rev                                     | CCAATGGCTTACTAGCCATCTTCCTTGG<br>GGAAGATGGCTAGTAAGCCATTGGATCA                                    | G257S    |
| D263G For<br>D263G Rev                                     | CTTCCTGGGAGGGTAATTTGAA<br>ATCTTTCAAATTACCCTCCAAG  | D263G    |
| D267G For<br>D267G Rev                                     | TGGGAGGATAATTTGAAAGGTCTAAATATGTTAGA<br>TCTAACATATTTAGGACCTTTCAAATTATCCTCCA                      | D267G    |
| R321C For<br>R321C Rev                                     | TGAAAATTTATGTGACATCTTTTGCA<br>TGCAAAAGAATGTCACATAAATTTCA  | R321C    |
| R358X For<br>R358X Rev                                     | GACCAGCCTCAAAGAAGTAGAAGAAAGAAGCAGAAGAAAGC<br>GCTTCTCTGCTTCTTCTACTTCTTTGAGGCTGGTC                | R358X    |
| W375X For<br>W375X Rev                                     | GGAACCTGGTGTGAAGATACGGAATGATCAAACACACAGACAGAGG<br>CCTCTGTCTGTGTTTTGATCATTCCGTATCTTCAACACCAGTTCC | W375X    |
| R387H For<br>R387H Rev                                     | GGAGGCCATACAGACCCACTCAAGAACCAG<br>CTTCTGGTCTTGAGTGGGCTGTATGGC                                   | R387H    |
| K179E For<br>K179E Rev                                     | AGTATGTGCATGGAGATATCGAGGCCTCAAATCTTCTGAACT<br>AGTTCAGAAGAAGATTTGSGGCCTCGATATCTCCATGCACATACT     | K179E    |

**Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la mutagénesis directa de VRK1 murino**

| OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DE VRK1 MURINO |   |          |
|--|---|----------|
| Denominación   | Secuencia 5'→3'   | Variante |
| mP79L <i>For</i><br>mP79L <i>Rev</i>                       | AACCCAGTGACAATGGACTTCTTTTCACGGAATAAA<br>TTTAATTCGGTAAAAGAAGTCCATTGCTACTGGGTT                  | mP79L    |
| mR89Q <i>For</i><br>mR89Q <i>Rev</i>                       | CACGGAATTAAGTTCTACCAGCAGGCTGCTAAACCAGAG<br>CTCTGGTTTAGCAGCCTGCTGGTAGAACTTTAATTCGGT            | mR89Q    |
| mH119R <i>For</i><br>mH119R <i>Rev</i>                     | CTAAGTATTGGGGATCTGGTCTACGTGATAAAAATG<br>CATTTTTATCAGTAGACCAGATCCCAATACTTAG                    | mH119R   |
| mR133C <i>For</i><br>mR133C <i>Rev</i>                     | GTTTATGATAATGGACTGCTTTGGGAGTGACCTTC<br>GAAGGTCCTCCAAAGCAGTCCATTATCATAAAC                      | mR133C   |
| mG135R <i>For</i><br>mG135R <i>Rev</i>                     | GTTTATGATAATGGACCGCTTTTCGGAGTGACCTTC<br>GAAGGTCCTCCGAAAGCGGTCCATTATCATAAAC                    | mG135R   |
| mL195V <i>For</i><br>mL195V <i>Rev</i>                     | GCCTCCAACCTGCTCGTAGTCAACAAGAACCTTG<br>CAGGGTCTTGACTCACGAGCAGGTTGGAGGC                         | mL195V   |
| mY213H <i>For</i><br>mY213H <i>Rev</i>                     | TGGAGTTCATAAAGAGCACAAAGGAAGATCCCAA<br>TTTGGGATCTTCTTGACTCTTTATGAACTCCA                        | mY213H   |
| mR219I <i>For</i><br>mR219I <i>Rev</i>                     | GGAAGATCCAAAATCTGCCATGACGGCACC<br>GGTGCCGTCATGGCAGATTTGGGATCTTCC                              | mR219I   |
| mT228M <i>For</i><br>mT228M <i>Rev</i>                     | GACGGCACCTGGAGTTCATGAGCATCGACGCTCACAAAGG<br>CCTTTGTGAGCGTCGATGCTCATGAACTCAGGGTGCCGTC          | mT228M   |
| mV236M <i>For</i><br>mV236M <i>Rev</i>                     | GCATCGACGCTCACAAAGGCATGGCCCCATCAAGACG<br>CGTCTTGATGGGGCCATGCCTTTGTGAGCGTCGATGC                | mV236M   |
| R241C <i>For</i><br>R241C <i>Rev</i>                       | TCAAGAGGTGGTGATTTGGAAA<br>CCAAATCACCACTCTTGATGG   | mR241C   |
| mW254L <i>For</i><br>mW254L <i>Rev</i>                     | GGTTATTGCATGATCCAGTTGCTCAGCGGCTGTCTTCTTGGAAG<br>CTTCCAAGGAAGACAGCCGCTGAGCAACTGGATCATGCAATAACC | mW254L   |
| mS256I <i>For</i><br>mS256I <i>Rev</i>                     | ATCCAGTGGCTCATCGGCTGTCTT<br>AAGACAGCCGATGAGCCACTGGAT  | mS256I   |
| mG257S <i>For</i><br>mG257S <i>Rev</i>                     | CAGTGGCTCAGCAGCTGTCTTCTTGG<br>GGAAGACAGCTGCTGAGCCACTGGATC                                     | mG257S   |
| mD263G <i>For</i><br>mD263G <i>Rev</i>                     | CTTCCTTGGGAAGGTAACCTGAAA<br>ATCTTTCAAGTTACCTTCCAAGG   | mD263G   |
| mD267G <i>For</i><br>mD267G <i>Rev</i>                     | GAAGATAACTTGAAGGTCCTAACTA<br>TAGTTAGGACCTTTCAAGTTATCTTC                                       | mD267G   |
| mR321C <i>For</i><br>mR321C <i>Rev</i>                     | CTCTATCAAAACCTATGTGATATCCTTTTACAAGGAC<br>GTCCTTGTAAGGATATCACATAGGTTTGTAGAGAG                  | mR321C   |
| mR387H <i>For</i><br>mR387H <i>Rev</i>                     | AGAGCCGCACAGACCCACAGTGTGGAG<br>GGGACTCCACTGTGGGTCTGTGCGGC                                     | mR387H   |
| mK179E <i>For</i><br>mK179E <i>Rev</i>                     | GTGCACGGGGACATCGAGGCCTCAACCTGCTCT<br>CTCTGGTTTAGCAGCCTGCTGGTAGAACTTTAATTC                     | mK179E   |



**Tabla 7. Anticuerpos usados en este trabajo**

| ANTICUERPOS                         |   |                   |                          |                                  |
|-------------------------------------|---|-------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Anticuerpo                          | Antígeno                                      | Tipo              | Dilución                 | Casa comercial                   |
| <b>53BP1 (NB100-304)</b>            | 53BP1 (350-400 aa)                            | Policlonal conejo | IF 1:400                 | Novus biologicals                |
| <b>Anti-8-oxoguanina</b>            | 8-oxoguanina                                  | Monoclonal ratón  | IF 1:400                 | Merk                             |
| <b>Acetil histona H4 (K16)</b>      | H4 2-19 aa acetilados en lisina 5, 8, 12 y 16 | Policlonal conejo | WB 1:1000<br>IF 1:200    | Abcam                            |
| <b>Coilina Pdelta</b>               | Coilina C-terminal                            | Monoclonal ratón  | IF 1:200                 | Santa cruz                       |
| <b>Coilina</b>                      | Coilina (1-237 aa)                            | Policlonal conejo | WB 1:1.000<br>IF 1:200   | Thermo-Fisher                    |
| <b>GlyRS (GARS) H-300</b>           | GARS (440-732 aa)                             | Policlonal conejo | WB 1:500                 | Santa Cruz                       |
| <b>GST tag</b>                      | Epítipo GST                                   | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Santa Cruz                       |
| <b>γH2A.X</b>                       | Ser 139                                       | Monoclonal ratón  | IF 1:400                 | Millipore                        |
| <b>H2A.X</b>                        | H2A.X C-terminal                              | Policlonal conejo | WB 1:1.000               | Cell Signaling                   |
| <b>Anti-polyHistidine</b>           | Epítipo His                                   | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Sigma-Aldrich                    |
| <b>Histona 3 #9715</b>              | Histona 3 C-terminal                          | Policlonal conejo | WB 1:5.000               | Cell Signaling                   |
| <b>H3K9ac</b>                       | H3 4-14 aa con lisina 9 acetilada             | Policlonal conejo | WB 1:1.000<br>IF 1:2.000 | Millipore                        |
| <b>H3K9me3</b>                      | Trimetilación en lisina 9 de H3               | Policlonal conejo | WB 1:800<br>IF 1:800     | Millipore                        |
| <b>H3K27ac</b>                      | Acetilación en lisina 27 de H3                | Policlonal conejo | WB 1:1.000<br>IF 1:1.000 | Millipore                        |
| <b>H3K27me3</b>                     | N-terminal de H3 con lisina 27 trimetilada    | Policlonal conejo | WB 1:800<br>IF 1:800     | Millipore                        |
| <b>HA.11 tag</b>                    | Epítipo HA                                    | Monoclonal ratón  | IF 1:500<br>WB 1:1.000   | BioLegend                        |
| <b>HA tag</b>                       | Epítipo HA                                    | Policlonal conejo | IF 1:500<br>WB 1:1.000   | Sigma-Aldrich                    |
| <b>Myc tag</b>                      | Epítipo Myc                                   | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Millipore                        |
| <b>Myc tag</b>                      | Epítipo Myc                                   | Policlonal conejo | WB 1:1.000               | Millipore                        |
| <b>p53 pThr18 ab30659</b>           | p53 fosforilada Thr18                         | Policlonal conejo | WB 1:1.000               | Abcam                            |
| <b>pRb #9308</b>                    | Ser807/811                                    | Policlonal conejo | WB 1:500                 | Cell Signaling                   |
| <b>Anti-Phosphoserine, Clon 4A4</b> | Serinas fosforiladas                          | Monoclonal ratón  | WB 1:500                 | Millipore                        |
| <b>pSer184 Coilina</b>              | Serina 184 fosforilada                        | Policlonal conejo | WB 1:1.000               | Antibody Production Services Lid |
| <b>pThr3 H3</b>                     | H3 fosforilada Thr3                           | Policlonal conejo | WB 1:500                 | Millipore                        |
| <b>Rb C-15</b>                      | Rb C-terminal                                 | Policlonal conejo | WB 1:500                 | Santa Cruz                       |
| <b>SMN (610647)</b>                 | SMN (14-732 aa)                               | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000<br>IF 1:200   | BD Transduction Laboratories     |
| <b>VCP (PA5-22257)</b>              | VCP (1-206 aa)                                | Policlonal conejo | WB 1:1.000<br>IF 1:200   | Thermo-Fisher                    |
| <b>P79/VCP</b>                      | VCP (792-806 aa)                              | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Novus biologicals                |
| <b>Anti-V5 Antibody</b>             | Epítipo V5                                    | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Sigma-Aldrich                    |
| <b>V5 tag</b>                       | Epítipo V5                                    | Monoclonal conejo | WB 1:1.000               | Abcam                            |
| <b>VRK1 1B5</b>                     |   | Monoclonal ratón  | IF 1:1.000               | Produc. propia                   |
| <b>VRK1 1F6</b>                     | VRK1 (333-396 aa)                             | Monoclonal ratón  | WB 1:1.000               | Produc. propia                   |
| <b>VRK1 VC</b>                      | VRK1 (267-396 aa)                             | Policlonal conejo | WB 1:1.000<br>IF 1:1000  | Producción propia                |
| <b>β-actina AC-15</b>               | β-actina N-terminal                           | Monoclonal ratón  | WB 1:5.000               | Sigma- Aldrich                   |

**Tabla 8. Líneas celulares usadas en este trabajo**

| LÍNEAS CELULARES |           |                          |                          |                  |
|------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| Línea celular    | Organismo | Procedencia              | Características          | Medio de cultivo |
| <i>HEK-293T</i>  | Humano    | Embrionarias de riñón    |                          | DMEM, 10%FBS     |
| <i>HeLa</i>      | Humano    | Adenocarcinoma de cérvix | Transformadas por VPH-18 | DMEM, 10%FBS     |
| <i>A549</i>      | Humano    | Carcinoma de pulmón      |                          | DMEM, 10%FBS     |

**Tabla 9. Líneas celulares estables A549 portadoras de las variantes patogénicas de VRK1. Transformadas con vector lentiviral**

| LÍNEAS CELULARES ESTABLES A549 PORTADORAS DE LAS MUTACIONES VRK1 MURINAS |                                |
|--|--------------------------------|
| Línea celular  | Características                |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD A549  |                                |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1 A549  | Expresan <i>mVRK1</i>          |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[P79L] A549                                   | Expresan <i>mVRK1</i> -[P79L]  |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R89Q] A549                                   | Expresan <i>mVRK1</i> -[R89Q]  |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[H119R] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[H119R] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R133C] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[R133C] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[G135R] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[G135R] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[L195V] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[L195V] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[Y213H] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[Y213H] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R219I] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[R219I] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[T228M] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[T228M] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[V236M] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[V236M] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R241C] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[R241C] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[W254L] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[W254L] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[S256I] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[S256I] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[G257S] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[G257S] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[D263G] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[D263G] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[D267G] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[D267G] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R321C] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[R321C] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[K179E] A549                                  | Expresan <i>mVRK1</i> -[K179E] |

**Tabla 10. Líneas celulares estables *HeLa* portadoras de las variantes patogénicas de VRK1. Transformadas con vector lentiviral**

| LÍNEAS CELULARES ESTABLES <i>HeLa</i> PORTADORAS DE LAS MUTACIONES VRK1 MURINAS |                        |
|---|------------------------|
| Línea celular   | Características        |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD <i>HeLa</i>  |                        |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1 <i>HeLa</i>  | Expresan mVRK1         |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[H119R] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[H119R] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[G135R] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[G135R] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[L195V] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[L195V] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[Y213H] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[Y213H] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R219I] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[R219I] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[T228M] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[T228M] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[V236M] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[V236M] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[S256I] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[S256I] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[R321C] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[R321C] |
| pLenti-C-HA-IRES-BSD-mVRK1-[K179E] <i>HeLa</i>                                  | Expresan mVRK1-[K179E] |

**Tabla 11. Construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo.**

| PLÁSMIDOS DE ADN RECOMBINANTE                  |                       |   |                           |  |
|--|-----------------------|---|---------------------------|--|
| Construcción                                   | Vector                | Inserto   | Uso                       | Origen   |
| His-BAF  | pET-15b               | BAF   | Expresión en bacterias    | Cedido por M. Wiebe (Universidad de Nebraska)  |
| Myc-SMN  | pCMV6-Myc-DKK         | SMN   | Expresión en eucariotas   | OriGene  |
| GST-VCP  | pCEFL-GST             | VCP   | Expresión en eucariotas   | Por clonación insertando SMN   |
| Myc-Coilina                                    | pCMV6-Myc-DKK         | Coilina   | Expresión en eucariotas   | OriGene  |
| HA-VRK1 ( <i>wild type</i> y mutantes)         | pCELF-HA              | VRK1 <i>wild type</i> y VRK1 con las mutaciones   | Expresión en eucariotas   | Por clonación insertando la isoforma 1 de VRK1 humano y mutagénesis directa a partir de HA-VRK1      |
| GST-53BP1 (1-1039 aa)                          | pGEX4T1-GST           | Fragmento 53BP1 (1-1039 aa)                       | Expresión en bacterias    | Cedido por J. Chen (Clínica Mayo, Rochester, Minnesota)  |
| GST-Coilina (160-214 aa)                       | pGEX4T1-GST           | Fragmento Coilina (160-214 aa)                    | Expresión en bacterias    | Por clonación insertando coilina (160-214 aa)  |
| GST-p53 (1-84 aa)                              | pGEX4T1-GST           | Fragmento p53 (1-84 aa)                           | Expresión en bacterias    | Cedido por Dr. D.W. Meek (Universidad de Dundee, Escocia, UK)  |
| GST-VRK1 ( <i>wild type</i> y mutantes)        | pGEX4T1-GST           | VRK1 <i>wild type</i> y VRK1 con las mutaciones   | Expresión en bacterias    | Por clonación insertando la isoforma 1 de VRK1 humano y mutagénesis directa a partir de pGEX-VRK1    |
| pMD26-VSV-G                                    | pMD26                 | VSV-G   | Envuelta vírica           | Cedido por A. Pendás (Centro de investigación del cancer, Salamanca)                                 |
| pCMV-dRp8.91-Gag-Pol                           | pCMV-dRp8.91          | Gag-Pol   | Empaquetamiento del virus | Cedido por A. Pendás (Centro de investigación del cancer, Salamanca)                                 |
| pLenti-HA-mVRK1 ( <i>wild type</i> y mutantes) | pLenti-C-HA-IRES-BSD  | VRK1 murino <i>wild type</i> y con las mutaciones | Expresión en eucariotas   | Por clonación insertando isoforma 3 de VRK1 murino y mutagénesis directa a partir de pLenti-HA-mVRK1 |
| pcDNA-V5-TIP60                                 | pcDNA3.1 TOPOTA-V5HIS | TIP-60  | Expresión en eucariotas   | Cedido por Dr. U. Maurer (Universidad de Freiburg, Alemania)   |

## RESULTADOS



## 1. Frecuencias alélicas de las variantes patogénicas de VRK1

En los últimos años, se han descrito distintas variantes de la quinasa VRK1 en pacientes jóvenes, en su gran mayoría, que padecen síndromes neuromotores. En estos trastornos se ven afectados tanto las motoneuronas, causando atrofia muscular espinal, paraplejia espástica hereditaria o esclerosis lateral amiotrófica, como los nervios periféricos, asociados a neuropatía sensitivomotora hereditaria. Estas enfermedades son complejas a nivel molecular, ya que están asociadas a un gran número de variantes génicas. Dado que la quinasa VRK1 tiene un papel esencial en distintos procesos celulares, y que, desde el año 2008, están apareciendo polimorfismos poco frecuentes en pacientes con afectación del sistema nervioso, quisimos caracterizar las variantes a nivel estructural, molecular y celular. De esta forma, intentaremos esclarecer el papel de la quinasa en las células, importante para su supervivencia y correcta función.

Primeramente, determinamos la frecuencia alélica de las variantes de VRK1 asociadas a estas enfermedades hasta ahora descritas. Para ello, usamos las bases de datos *genomAD* (v3.1.2) y *Ensemble Genomic Browser*, que nos dan información además de la proporción en la que se encuentran estos alelos en distintas poblaciones por separado. Observamos que las 25 variantes se encuentran en muy baja proporción en la población.

**Tabla 12. Frecuencia alélica de las variantes patogénicas de la quinasa VRK1.** Se indica la identificación del alelo de las variantes patogénicas en ClinVar, su referencia *dbSNP*, el tipo de mutación que se produce (VEP), la frecuencia alélica, cómo se presentan las variantes y el nombre de la población con la mayor frecuencia alélica. M: mutación con cambio de sentido (*missense*), INTR: Mutación en intrón, STOP: mutación sin sentido. AFR: africanos, ASH: judíos *Ashkenazi*.

- RESULTADOS -

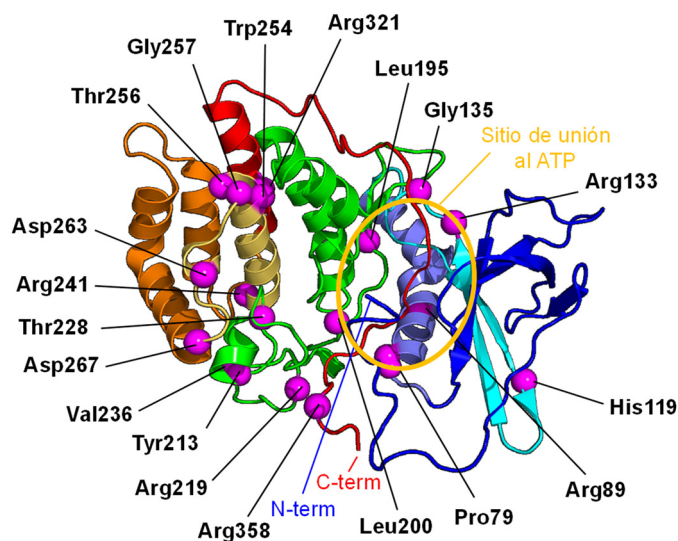
| Variante proteica                      | Clinvar (ID alelo) | Ref dsSNP    | VEP  | Frecuencia alélica  | Presentación de las variantes         | Origen pacientes                 |
|--|--------------------|--------------|------|---------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| p.Pro79Leu<br><b>P79L</b>              | -                  | -            | M    | 3,99e <sup>-6</sup> | Homocigosis                           | ARABIA                           |
| p.Arg89Gln<br><b>R89Q</b>              | 197213             | rs773138218  | M    | 3,19e <sup>-5</sup> | Heterocigosis compuesta               | USA                              |
| p.Arg89Ter<br><b>R89X</b>              | 533537             | rs772263867  | STOP | 1,31e <sup>-5</sup> | Heterocigosis compuesta               | PORTUGAL                         |
| p.His119Arg<br><b>H119R</b>            | 209204             | rs371295780  | M    | 2,83e <sup>-5</sup> | Heterocigosis compuesta               | HISPANO, AUSTRALIA               |
| p.Arg133Cys<br><b>R133C</b>            | 30243              | rs387906830  | M    | 1,20e <sup>-5</sup> | Homocigosis                           | IRÁN                             |
| p.Gly135Arg<br><b>G135R</b>            | -                  | -            | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | AUSTRALIA                        |
| p.Leu195Val<br><b>L195V</b>            | 1057157            | rs779770049  | M    | 7,96e <sup>-6</sup> | Heterocigosis compuesta               | AUSTRALIA                        |
| p. Leu200Pro<br><b>L200P</b>           | -                  | -            | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | ESPAÑA                           |
| p.Tyr213His<br><b>Y213H</b>            | 812546             | rs1595676477 | M    | -                   | Homocigosis                           | ESPAÑA                           |
| p.Arg219Ile<br><b>R219I</b>            | 619020             | rs1595676517 | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | LÍBANO                           |
| p.Thr228Met<br><b>T228M</b>            | 651537             | rs146113610  | M    | 5,57e <sup>-5</sup> | Heterocigosis compuesta               | UK                               |
| p.Val236Leu<br><b>V236M</b>            | 218924             | rs771364038  | M    | 3,98e <sup>-6</sup> | Heterocigosis compuesta               | USA, HISPÁNICO                   |
| c.710-14T>C                            | -                  | -            | INTR | -                   | Heterocigosis compuesta               | PORTUGAL                         |
| p.Arg241Cys<br><b>R241C</b>            | 971947             | rs141703130  | M    | 1,19e <sup>-5</sup> | Heterocigosis compuesta               | PORTUGAL                         |
| p.Trp254Leu<br><b>W254L</b>            | 617789             | rs1172497555 | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | LÍBANO                           |
| p.Thr256Ile<br><b>T256I</b>            | -                  | -            | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | JAPÓN                            |
| p.Gly257Ser<br><b>G257S</b>            | 425053             | rs1064797191 | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | PORTUGAL                         |
| p.Asp263Gly<br><b>D263G</b>            | 996133             | rs1428656431 | M    | 3,98e <sup>-6</sup> | Homocigosis                           | SENEGAL                          |
| p.Asp267Gly<br><b>D267G</b>            | -                  | -            | M    | -                   | Heterocigosis compuesta               | JAPÓN                            |
| p.Arg321Cys<br><b>R321C</b>            | 209205             | rs772731615  | M    | 1,95e <sup>-4</sup> | Homocigosis y heterocigosis compuesta | HISPANO, USA                     |
| p.Gln326Ter<br><b>Q326X</b>            | 619220             | rs1566713184 | STOP | -                   | Heterocigosis compuesta               | -                                |
| p.Arg358Ter<br><b>R358X</b>            | 7497               | rs137853063  | STOP | 6,39e <sup>-5</sup> | Homocigosis y heterocigosis compuesta | ASH (USA, Israel, UK, Australia) |
| p.Trp375Ter<br><b>W375X</b>            | -                  | rs184887106  | STOP | 1,59e <sup>-5</sup> | Homocigosis y heterocigosis compuesta | CHINA                            |
| c.1159+1G>A<br>Inserc. 7 aa, codón Ter | 848771             | -            | INTR | 3,98e <sup>-6</sup> | Homocigosis                           | IRÁN                             |
| p.Arg387His<br><b>R387H</b>            | 521856             | rs1420939606 | M    | 8,45e <sup>-5</sup> | Homocigosis                           | ESPAÑA, ISRAEL                   |



## 2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica

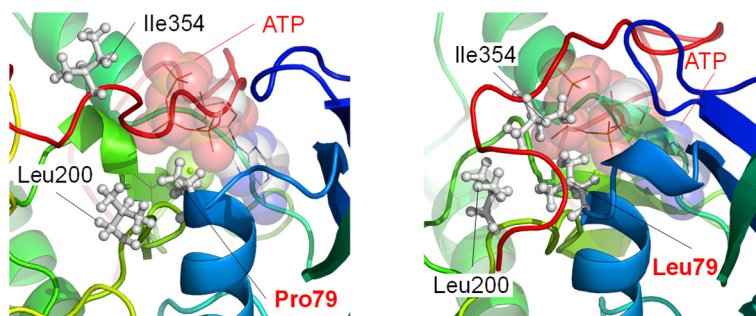
### 2.1. Modelos estructurales de las variantes patogénicas de VRK1 muestra alteraciones en la estabilidad estructural y actividad catalítica

Primeramente, quisimos determinar si existía relación entre el fenotipo de los pacientes y la estabilidad de las proteínas generadas a partir de las distintas variantes del gen *VRK1*. Para ello, estimamos la estabilidad de las variantes a nivel estructural utilizando el programa de predicción de estructura PMEMD, y utilizamos un sistema *in vivo*, transfectando células *HEK-293T* con las construcciones pCELF-HA-VRK1 que portan las distintas mutaciones. Así, a partir de la estructura tridimensional de la quinasa (PDB id: 2LAV;[24]) se llevó a cabo el modelado estructural de las diferentes variantes. R89Q, H119R, R133C, G135R, L195V, V236M, R312C, R358X no han sido incluidas en este estudio, dado que su estabilidad proteica ya ha sido analizada y publicada anteriormente [107]. Por otra parte, las variantes W375X y R387H no ha podido ser analizadas usando este sistema dado que no se dispone de la información estructural de la cola carboxilo terminal de la quinasa ya que es muy flexible.



**Figura 16. Localización en la estructura tridimensional de VRK1 de los aminoácidos afectados en los distintos pacientes.** Figura realizada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). N-term: amino terminal, C-term: carboxilo terminal.

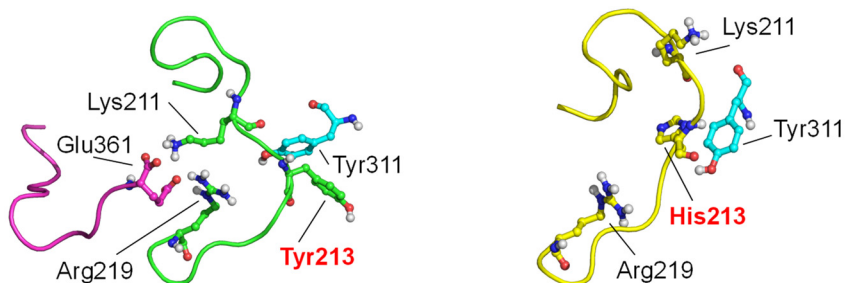
El cambio de una prolina a una leucina en el residuo 79 resulta en un contacto más estrecho de este aminoácido y Ile354, dificultando la flexibilidad del extremo carboxilo terminal y la apertura del centro activo y, por tanto, pudiendo verse afectada la actividad de la quinasa (Figura 17) (datos no publicados).



**Figura 17. Estructura de VRK1 con la mutación P79L.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). ATP: sitio de unión al ATP.

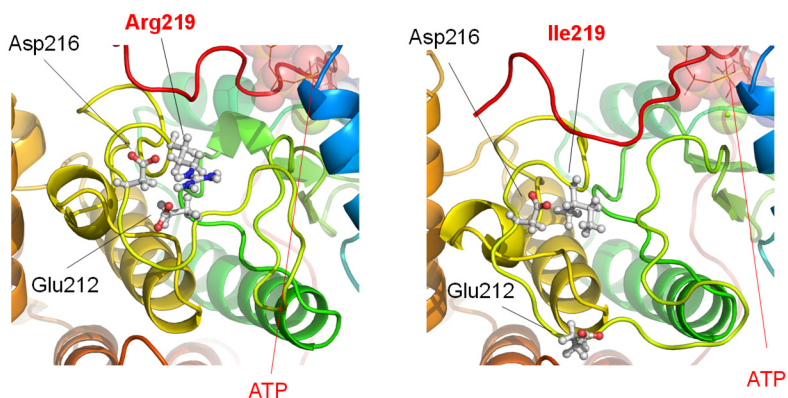
El residuo Tyr213 se encuentra en una  $\alpha$ -hélice cerca del *loop* de activación de la quinasa. El cambio de tirosina a histidina en esta posición hace que cambie de conformación la  $\alpha$ -hélice, dificultando las interacciones de los residuos Lys211 y Arg219 con Glu361, en el extremo carboxilo terminal, necesaria para la correcta activación de la quinasa. Por tanto, este cambio estructural parece que conlleva una pérdida de la actividad quinasa (Figura 18) [100].

- RESULTADOS -



**Figura 18. Estructura de VRK1 con la mutación Y213H.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR) [100].

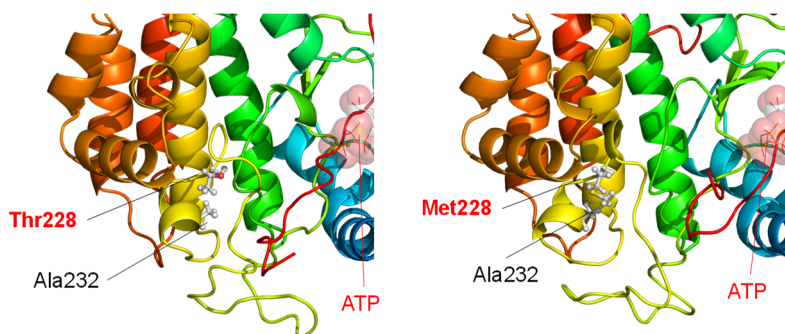
El cambio de arginina a isoleucina en el residuo 219 provoca un cambio estructural en la quinasa perdiendo la interacción con el residuo Glu212. No obstante, no parece que tenga ningún efecto directo en el centro catalítico de la proteína, ni en su estabilidad (Figura 19) (datos no publicados).



**Figura 19. Estructura de VRK1 con la mutación R219I.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). ATP: sitio de unión al ATP.

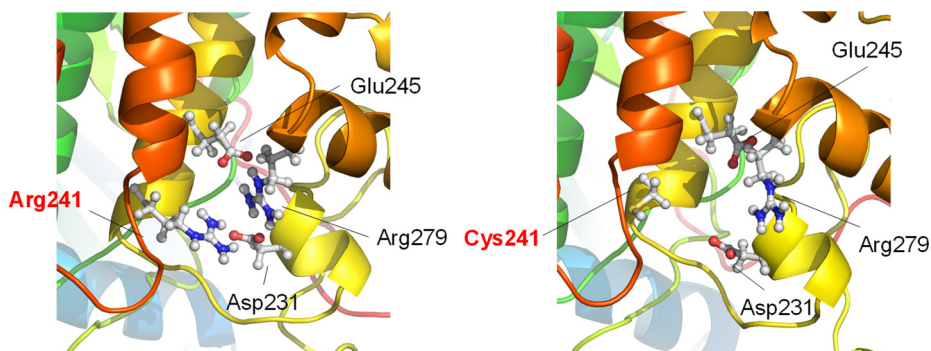
El cambio de treonina a metionina en el residuo 228, provoca la interacción del grupo metilo con el residuo Ala232, pero no parece que esto cause cambios en la estructura local de la quinasa (Figura 20) (datos no publicados).

- RESULTADOS -



**Figura 20. Estructura de VRK1 con la mutación T228M.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). ATP: sitio de unión al ATP.

Por su parte, el aminoácido Arg241, junto con Asp231, Glu245 y Arg279 forman un clúster de carga positiva que contribuye a la estabilidad de la estructura de la quinasa. El cambio de arginina a cisteína en el residuo 241, provocaría una inestabilidad local en la estructura debido a que no es capaz de mantener la interacción con los otros tres residuos cargados (Figura 21) (datos no publicados).

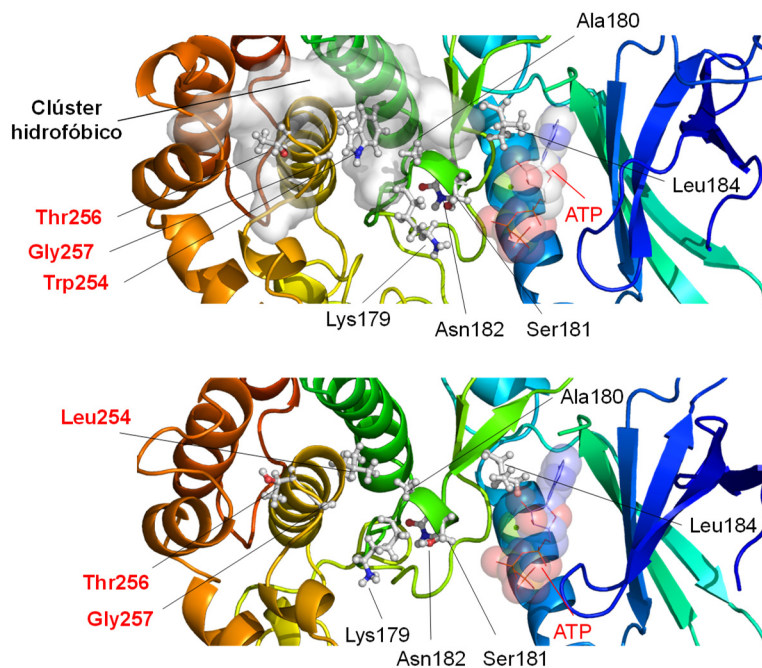


**Figura 21. Estructura de VRK1 con la mutación R241C.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR).

Los residuos Trp254, Thr256 y Gly257 se encuentran muy cerca unos de otros, formando, junto con otros aminoácidos, un clúster hidrofóbico que confiere estabilidad al centro de la quinasa. Este clúster se encuentra en contacto con el centro catalítico de la proteína, por lo que mutaciones en

- RESULTADOS -

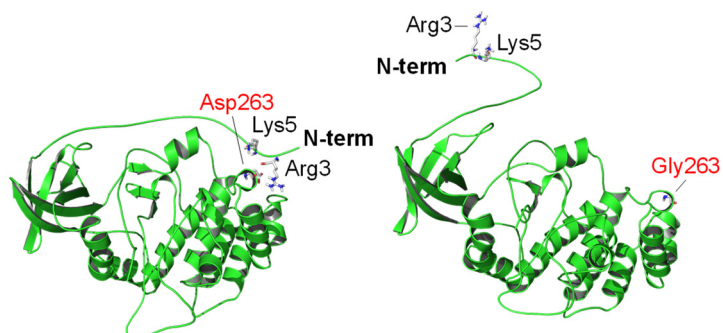
esta zona pueden resultar en cambios en su actividad catalítica y estabilidad. En el caso del cambio de triptófano a leucina (hidrofobo) en el residuo 254 parece provocar cambios en las interacciones del clúster debido a la gran diferencia de tamaño entre los dos aminoácidos, produciendo una distorsión del centro activo y posiblemente, la pérdida de la actividad catalítica (Figura 22) (datos no publicados).



**Figura 22. Estructura de VRK1 con la mutación W254L.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). ATP: sitio de unión al ATP.

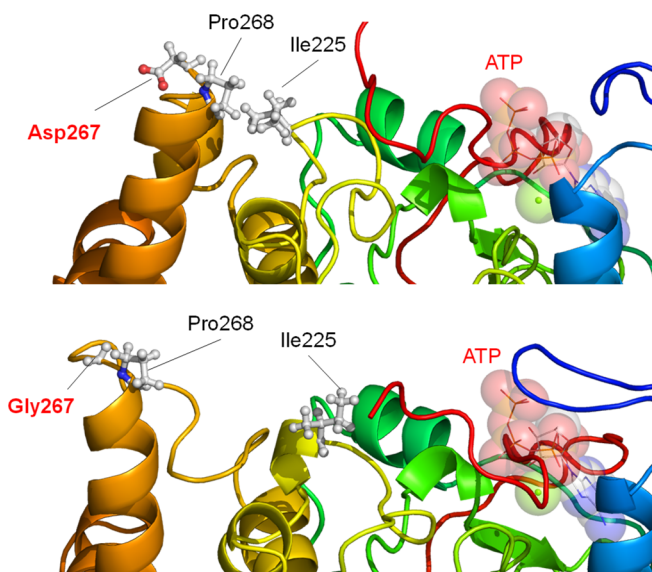
El residuo Asp263 interacciona con el aminoácido Arg3 del extremo amino terminal, y este a su vez, con Lys5, permitiendo posiblemente la regulación de la actividad quinasa o de la accesibilidad de distintos sustratos, dado que este extremo se encuentra cerca del centro catalítico de la quinasa. El cambio de ácido aspártico a glicina en el residuo 263 provoca un cambio en el plegamiento del extremo amino, al no interaccionar este nuevo residuo con Arg3 ni Lys5, lo que puede alterar tanto la regulación de la actividad como la accesibilidad del ATP al centro activo (Figura 23) [102].

- RESULTADOS -



**Figura 23. Estructura de VRK1 con la mutación D263G.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR) [102].

Por último, el cambio de ácido aspártico a glicina en el residuo 267 provoca el aumento de la distancia entre los residuos Pro268 e Ile225 de 6 a 14 Angstroms, lo que causa un cambio en la estructura local de la quinasa que podría afectar al centro activo, y por tanto a su actividad catalítica y estabilidad (Figura 24) (datos no publicados).



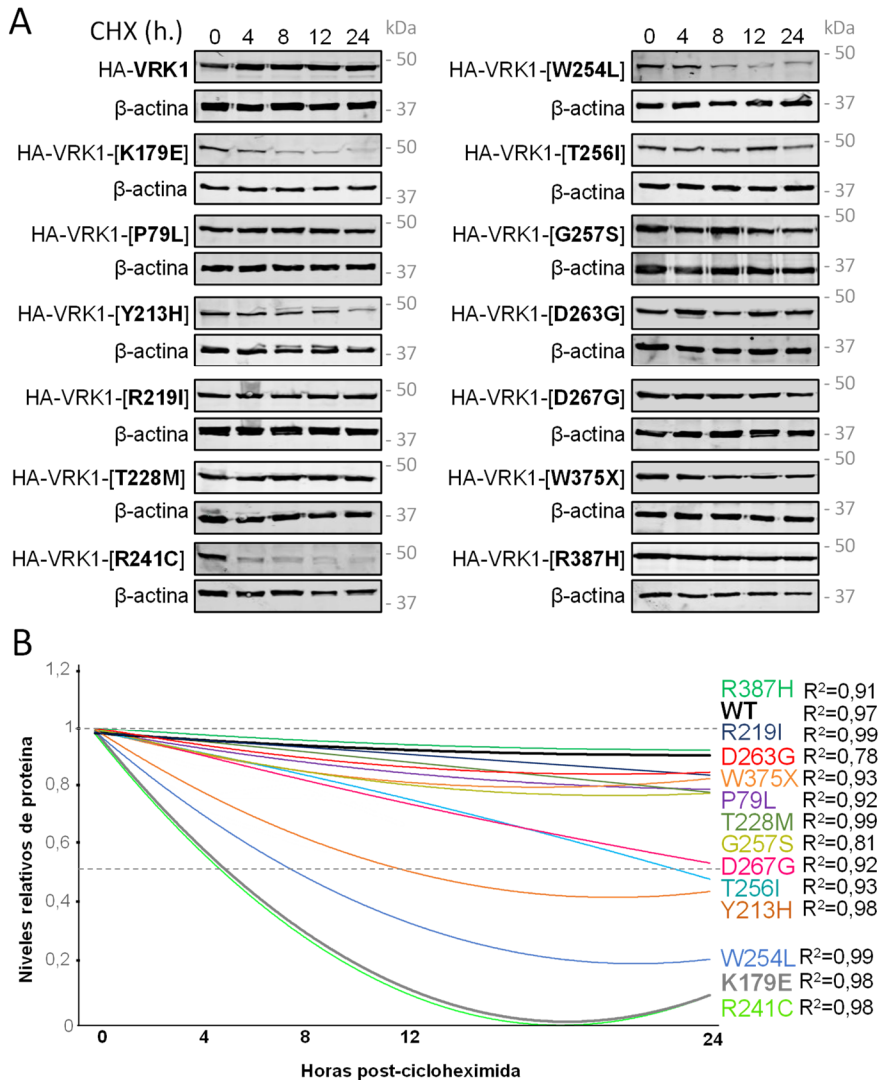
**Figura 24. Estructura de VRK1 con la mutación D267G.** Figura realizada con el programa PMEMD y representada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR). ATP: sitio de unión al ATP.

## 2.2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica *in vivo*

Para comprobar la estabilidad proteica de las distintas variantes *in vivo*, generamos mediante mutagénesis dirigida, utilizando la construcción pCELF-HA-VRK1, los distintos plásmidos portadores de las variantes y transfectamos células *HEK-293T* con ellos. Pasadas 48 h de la transfección, inhibimos la síntesis *de novo* de las proteínas tratando las células con cicloheximida 50 µg/mL y analizamos la presencia de las variantes en el extracto proteico total a lo largo de 24 horas (Figura 25). Como control, transfectamos las células con VRK1 *wt* y con el mutante artificial de VRK1 K179E que no presenta actividad quinasa y que es muy inestable en la célula. Podemos establecer tres grupos, uno de variantes estables, que se comportan como VRK1 *wt*, permaneciendo sus niveles estables a las 24 horas, otro de ligeramente inestables y el último de muy inestables (Tabla 13). Las variantes R241C y W254L son muy inestables, observándose una reducción considerable de sus niveles proteicos a las 4 horas post-cicloheximida. Los niveles de las variantes Y213H, T256I y D267G (ligeramente inestables), también disminuyen a lo largo de las 24 horas, cuando presentan el 50% de la cantidad de proteína que muestra VRK1 *wt*. Sin embargo, las variantes P79L, R219I, T228M, G257S, D263G, W375X y R387H son muy estables, no observando apenas cambios en los niveles tras las 24 horas post-cicloheximida (Figura 25).

La variante D263G se presenta en homocigosis y, T256I y D267G, en heterocigosis compuesta en los pacientes. Poseen fenotipos muy claros de desórdenes neurológicos; sin embargo, las células con la variante D263G presentarán unos niveles de quinasa estables, mientras que las que expresan las variantes T256I/D267G, los niveles serán más bajos que en condiciones normales. Por tanto, parece que la estabilidad de VRK1 podría estar asociada al fenotipo de los pacientes que las presentan, pero no es lo único en lo que radica el desarrollo de estos desórdenes neuromotores.

- RESULTADOS -



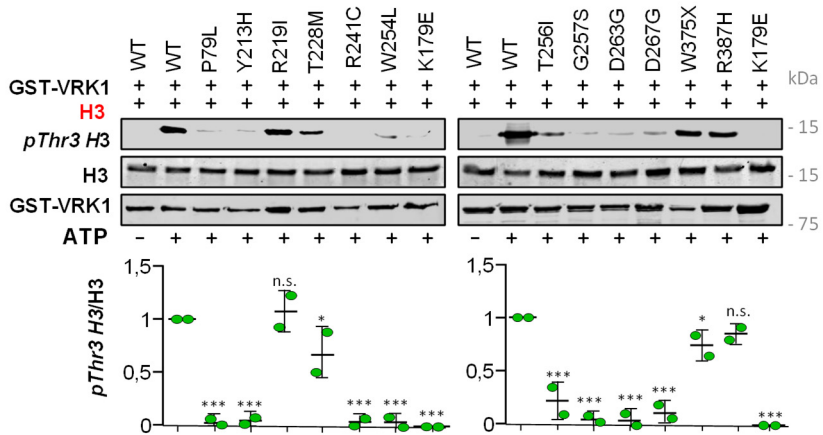
**Figura 25. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan estabilidades distintas a nivel proteico. A. Western blot** en el que se observan los niveles proteicos de las variantes de VRK1 durante 24 h post-cicloheximida. Se transfectaron células HEK-293T con las construcciones pCEFL-HA-VRK1 creadas por mutagénesis dirigida. Tras 48 h, se trataron las células con cicloheximida (50 µg/mL) y se analizaron a las 4, 8, 12 y 24 horas los niveles proteicos en Western blot utilizando el anticuerpo específico α-HA. **B. Cuantificación** de los niveles proteicos de las variantes de VRK1 durante 24 h post-cicloheximida. Se cuantificaron los niveles proteicos con respecto a los de la proteína β-actina, relativizándolos posteriormente a los valores que presentan a las 0 horas, equivalente a 1. Se realizó por duplicado el experimento, representándose las líneas de tendencia polinómica, con el valor de R que nos indica la bondad del ajuste de la curva (R=1 buen ajuste y R=0 mal ajuste).



### 3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro*

#### 3.1. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro* sobre la histona H3

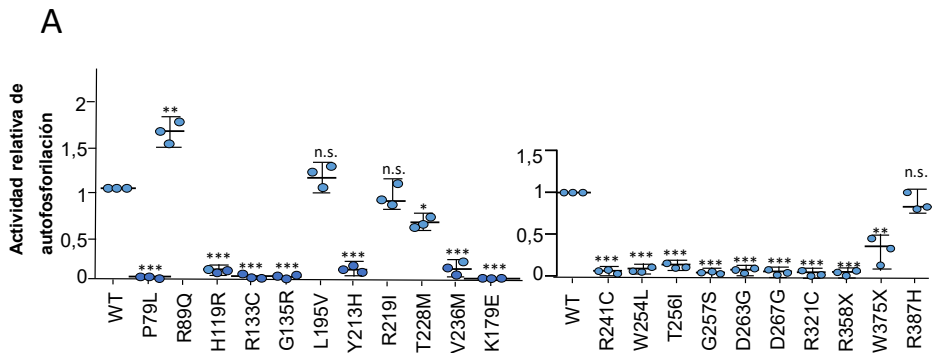
VRK1 participa en numerosos procesos celulares, fosforilando proteínas pertenecientes a distintas rutas [29–38–47–191]. Por ello, quisimos comprobar la capacidad que tienen las variantes patogénicas descritas de fosforilar sustratos caracterizados de VRK1. Uno de ellos es la histona H3, que se fosforila en el residuo treonina 3 por dicha quinasa [47]. Para realizar este experimento, primeramente, se purificaron las variantes fusionadas al epítipo GST y se realizó un ensayo quinasa *in vitro* utilizando ATP frío. Tampoco se incluyeron en estos experimentos las variantes descritas hasta el 2018, ya que los resultados del estudio de su actividad publicaron anteriormente en nuestro laboratorio [107]. Observamos que, de estas variantes recientes, solo R219I y R387H, y, en menor medida, T228M y W375X, son capaces de fosforilar la treonina 3 de la histona H3, presentando una actividad similar a la quinasa *wt* (Figura 26).



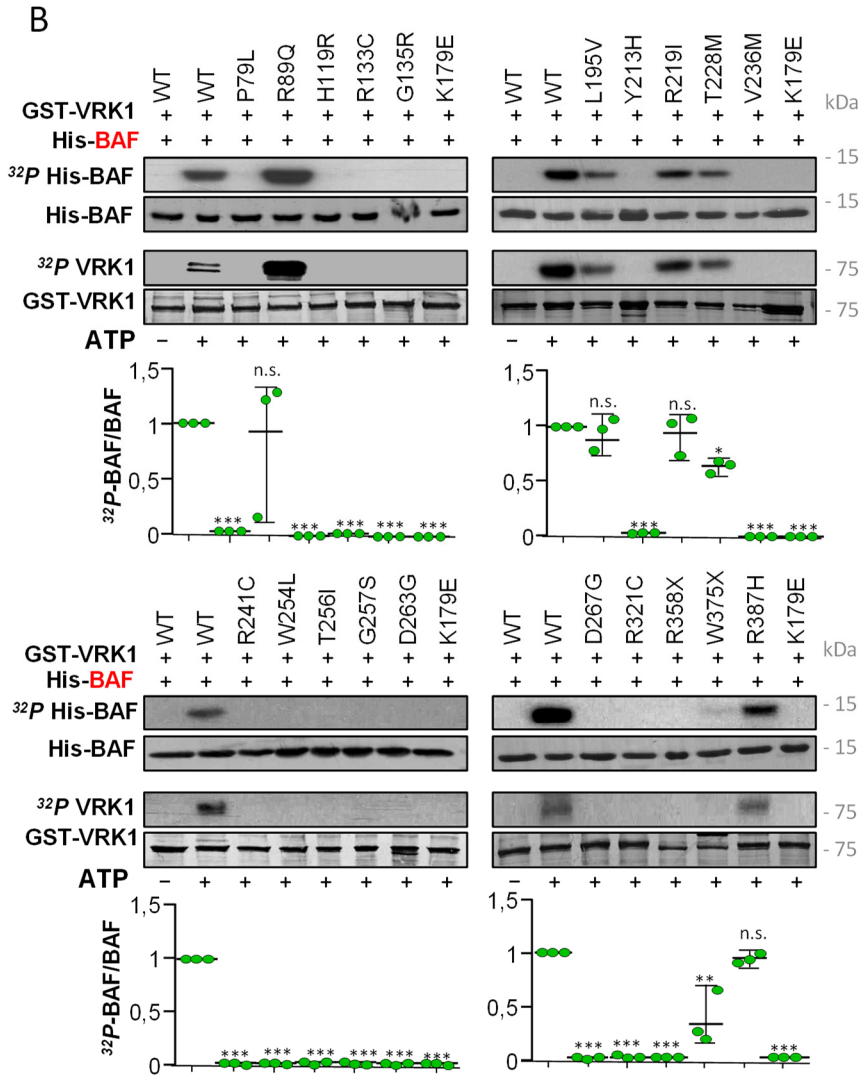
**Figura 26. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre la histona H3.** Se purificaron las variantes de VRK1 con GST y se realizó un ensayo quinasa *in vitro* usando ATP frío. Se llevó a cabo la electroforesis de las muestras, seguido del *Western blot* usando los anticuerpos específicos  $\alpha$ -pThr3 H3,  $\alpha$ -H3 y  $\alpha$ -GST. El experimento se realizó por duplicado y se analizaron los datos con el programa *Graphpad Prism 7*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar qué muestras difieren estadísticamente de VRK1 *wt* \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

### 3.2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro* sobre la proteína BAF

BAF es una proteína esencial para el ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear de la célula durante la división, uniéndose a ésta y al ADN cuando no se encuentra fosforilada, y deslocalizándose de ella al ser fosforilada durante la mitosis [14]. Se ha descrito que existen tres residuos en el extremo amino terminal fosforilables por VRK1, la serina 4 y las treoninas 2 y 3 [40]. Por este motivo, estudiamos la capacidad de las distintas variantes patogénicas de fosforilar este sustrato *in vitro*. En este experimento, se incluyen todas las variantes conocidas hasta el 2021, dado que la fosforilación de este sustrato no se había analizado hasta ahora. En este caso, llevamos a cabo el ensayo quinasa utilizando ATP radiomarcado con  $^{32}P$ , lo cual también nos permitió observar la autofosforilación de las distintas variantes de VRK1 (Figura 27A). Podemos ver que las variantes R89Q, L195V, R219I y R387H fosforilan a BAF de forma similar a la quinasa *wt*, mientras que la fosforilación por parte de T228M y W375X se encuentra reducida significativamente. El resto de las variantes no fosforilan al sustrato (Figura 27B). Por otra parte, observamos que el patrón de autofosforilación es el mismo que el de la fosforilación de este sustrato: la autofosforilación de R89Q, L195V, R219I y R387H es mayor o similar a la de la proteína *wt*, mientras que la del resto de las variantes aparece reducida (Figura 27A).



- RESULTADOS -

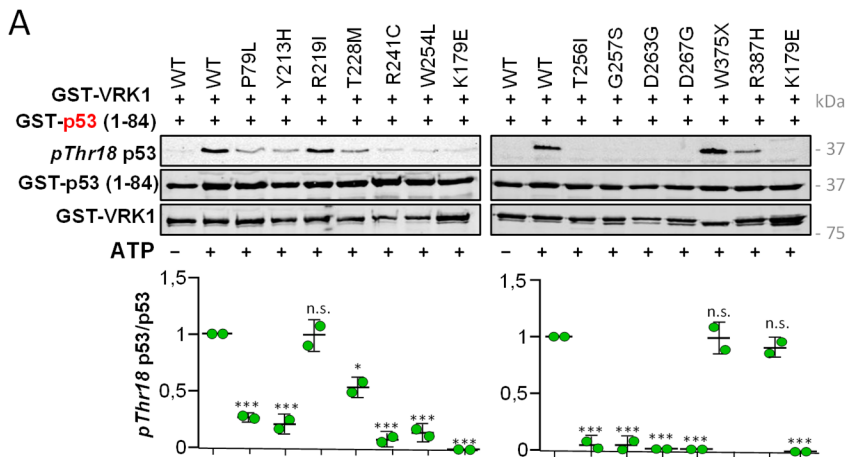


**Figura 27. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre BAF y su autofosforilación. A.** Nivel de autofosforilación de las variantes de VRK1. **B.** Fosforilación de BAF por las variantes de VRK1. Se purificaron las variantes de la quinasa con GST y BAF fusionado a His y se realizó un ensayo quinasa con ATP radiomarcado *in vitro*. Se llevó a cabo la electroforesis de las muestras, seguido del *Western blot*. La fosforilación se estudió exponiendo la membrana a películas de rayos X durante distintos tiempos y usando, posteriormente, los anticuerpos  $\alpha$ -GST y  $\alpha$ -His para analizar los controles de carga. El experimento se realizó por triplicado y se analizaron los datos con el programa *Graphpad Prism 7*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar qué muestras difieren estadísticamente de VRK1 wt.

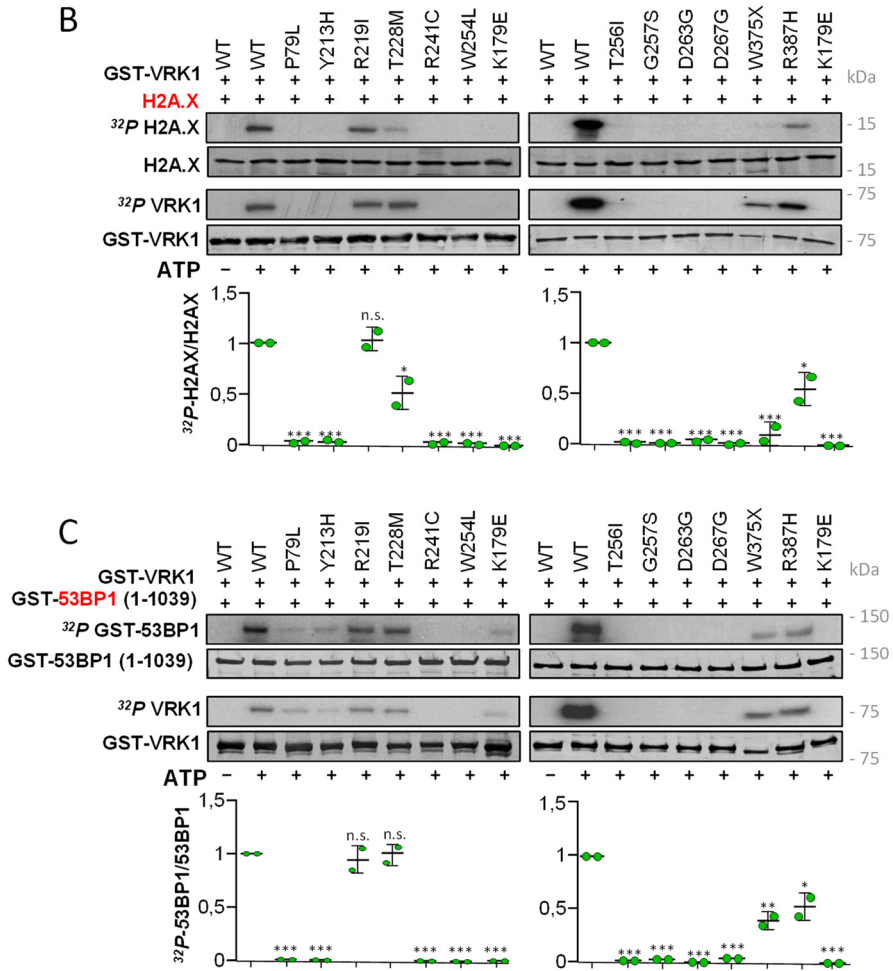
### 3.3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro* sobre proteínas implicadas en respuesta al daño en el ADN

VRK1 tiene un papel muy importante en la reparación del daño génico, fosforilando distintas proteínas que participan en dicha respuesta. Fosforila inicialmente la treonina 18 del factor de transcripción p53, estabilizándolo [29–42]. Utilizando un fragmento de p53 fusionado a GST que posee el dominio de transactivación de la proteína, se estudió la capacidad de las variantes de la quinasa de fosforilar a este sustrato. Se obtuvieron resultados similares a los ensayos usando como sustratos H3 y BAF: R219I, R387H y W375X, y, en menor medida, T228M fosforilan a p53 (Figura 28A).

La fosforilación de la variante de la histona H2A, H2A.X, en la serina 139 por VRK1 es esencial al inicio de la reparación del daño en el ADN [38]. Más tarde, también cabe destacar la acumulación de 53BP1 en los sitios de daño, que permitirá resolver el daño por NHEJ [195]. La proteína 53BP1 también es sustrato de VRK1, fosforilándola en el residuo serina 25 y 29 [31]. Mediante ensayos quinasa usando ATP radiomarcado, vimos que la variante R219I era capaz de fosforilar a H2A.X al igual que la proteína *wt*, mientras que la actividad quinasa de las demás variantes se encontraba significativamente reducida (Figura 28B). En el caso de 53BP1, obtuvimos que, además de la variante R219I, T228M fosforilaba a este sustrato en igual medida que la proteína *wt* (Figura 28C).



- RESULTADOS -

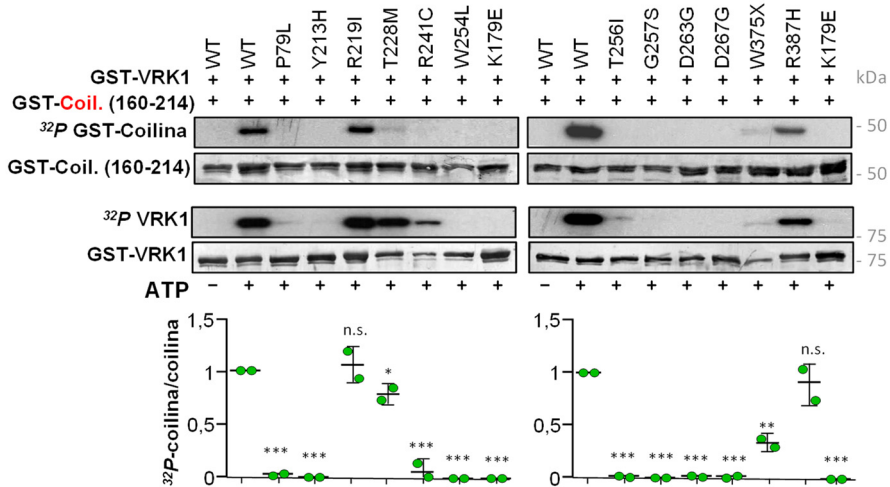


**Figura 28. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre p53, H2A.X y 53BP1.** A. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre p53. Se purificaron las variantes de VRK1 y un fragmento de p53 fusionado a GST y se realizó un ensayo quinasa con ATP frío *in vitro*. Se estudió la fosforilación por medio de *Western blot* usando los anticuerpos específicos  $\alpha$ -pThr18 p53 y  $\alpha$ -GST para revelar los controles. B. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre H2A.X. Se purificaron las variantes de la quinasa con GST y se realizó un ensayo quinasa con ATP radiomarcado *in vitro*. Tras la electroforesis y *Western blot* de las muestras, se analizó la fosforilación exponiendo la membrana a películas de rayos X y se revelaron los controles de carga utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -GST y  $\alpha$ -H2A.X. C. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre 53BP1. Se purificaron las variantes de VRK1 y un fragmento de 53BP1 con el epítipo GST y se realizó un ensayo quinasa con ATP radiomarcado <sup>32</sup>P. Se llevó a cabo la electroforesis de las muestras y *Western blot*. Posteriormente, se analizó la fosforilación exponiendo la membrana a películas de

rayos X durante distintos tiempos y se revelaron los controles de carga utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -GST. Se realizaron por duplicado los experimentos y los datos se analizaron con el programa *Graphpad Prism 7*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar qué muestras difieren estadísticamente de VRK1 wt \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

### 3.4. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro* sobre coilina

Por último, quisimos estudiar la actividad quinasa de las variantes sobre la proteína coilina, dado que la fosforilación de ésta por parte de VRK1 en la serina 184 es esencial para que se formen los cuerpos de Cajal en las células [116–117]. Utilizando ATP radiomarcado con  $^{32}P$  realizamos el ensayo quinasa *in vitro* con las proteínas puras, observando que las variantes R219I y R387H fosforilan dicho sustrato al igual que la quinasa wt, mientras que T228M y W375X también lo hacen, pero en menor nivel (Figura 29).



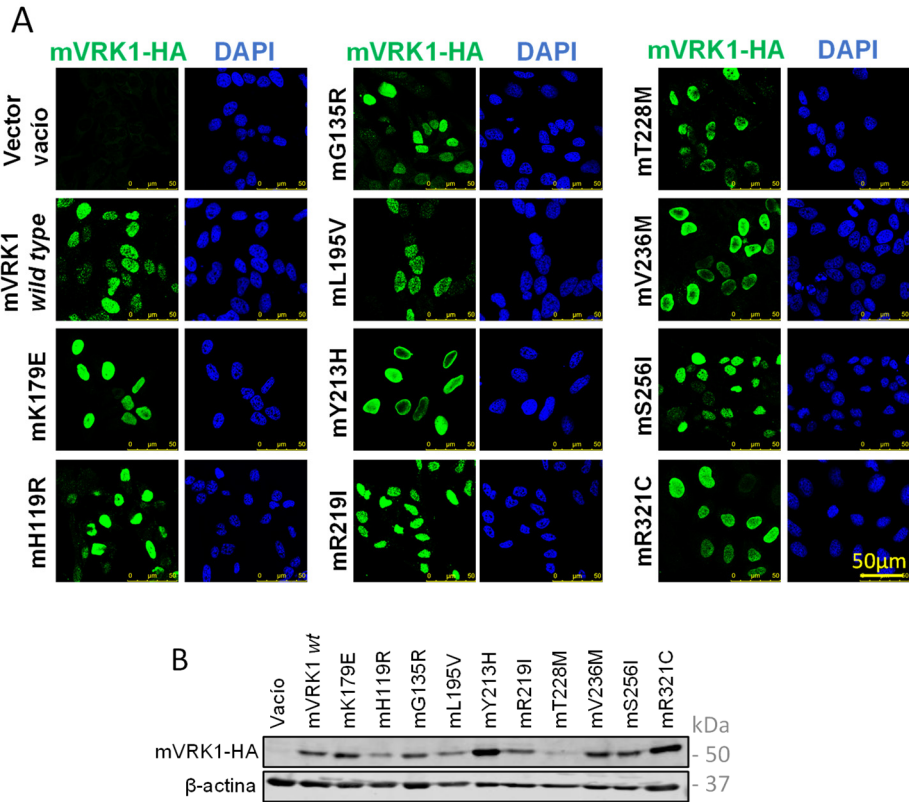
**Figura 29. Fosforilación de las variantes patogénicas de VRK1 sobre coilina.** Se purificaron las variantes de VRK1 y un fragmento de coilina fusionado a GST y se realizó un ensayo quinasa con ATP radiomarcado *in vitro*. Tras la electroforesis y *Western blot* de las muestras, se estudió la fosforilación exponiendo la membrana a películas de rayos X y los controles de carga se revelaron usando el anticuerpo específico  $\alpha$ -GST. El experimento se realizó por duplicado y los datos se analizaron con el programa *Graphpad Prism 7*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar qué muestras difieren estadísticamente de VRK1 wt \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

#### **4. Generación de líneas estables *HeLa* y *A549* portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino**

Una vez estudiada la estabilidad y la actividad quinasa, quisimos determinar, utilizando un sistema *in vivo*, cómo se comportan las variantes ante distintas respuestas en las que la quinasa se encuentra implicada e intentar dilucidar la relación de ellas con proteínas importantes en síndromes neuromotores. Por ello, creamos líneas *HeLa* y *A549* que expresan de forma estable las variantes patogénicas de VRK1 mediante transducción lentiviral. Sabemos que la viabilidad celular se ve comprometida cuando deplecionamos el gen de esta quinasa. Por este motivo, insertamos el gen *VRK1 murino* en el genoma de dichas células, dado que la quinasa murina rescata el fenotipo de la humana cuando ésta no se expresa (Figura 32) [7–78]. Para observar el efecto real de estas variantes patogénicas, al realizar los experimentos deplecionamos inicialmente el gen *VRK1 humano* usando distintos siARNs específicos de este gen, que no reconocen el del *VRK1 murino*.

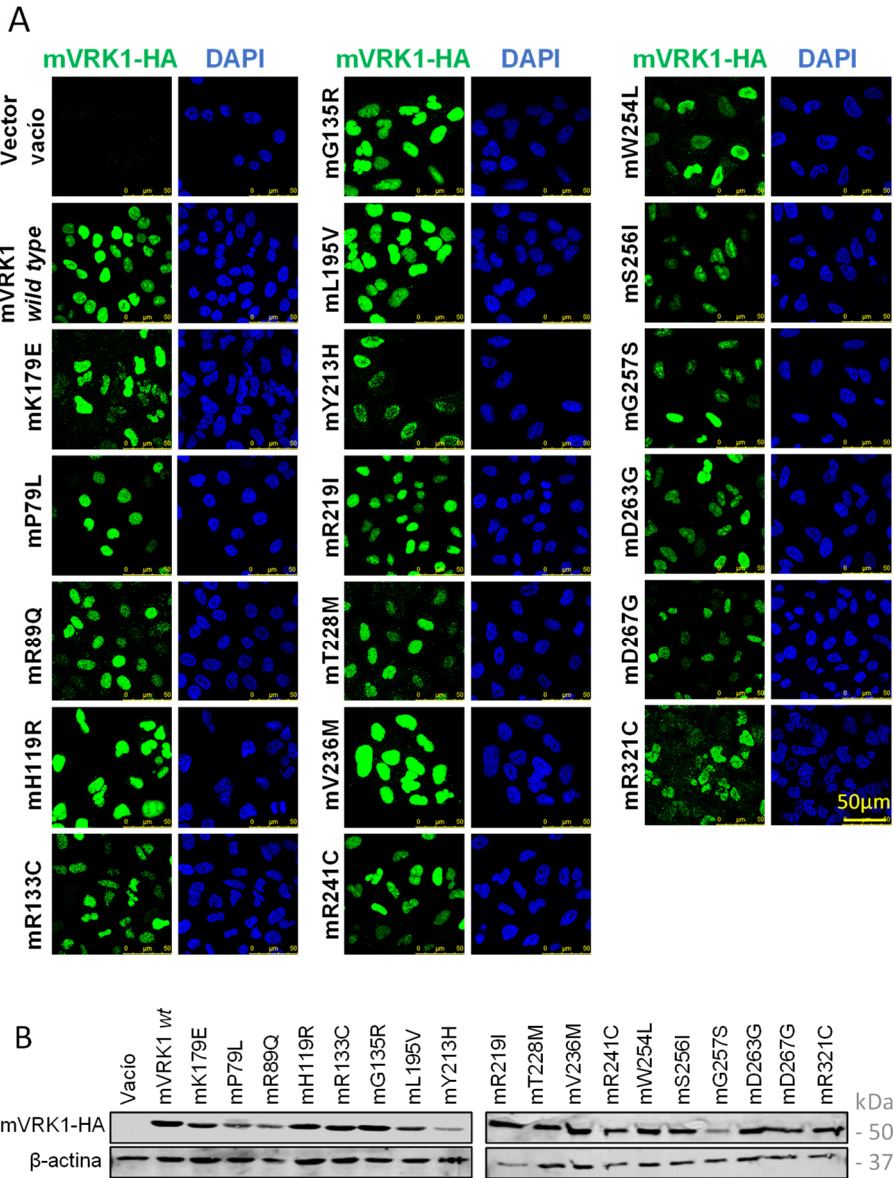
Generamos las líneas denominadas vacío, mVRK1 *wt* y mK179E para utilizarlas como controles en los experimentos realizados. La línea vacío fue transducida con el vector pLenti-HA vacío, por tanto, no expresa VRK1 murino, comportándose como células *A549* o *HeLa* sin infectar. La línea mVRK1 *wild type*, fue transducida con el vector pLenti-mVRK1-HA, por lo que expresa la quinasa murina *wild type*. Al deplecionar el VRK1 endógeno humano de estas células, se recuperará el fenotipo. Por último, las células de la línea mK179E presentarán la quinasa murina mutada en la posición 179 que expresa una proteína sin actividad quinasa.

Después de generar las líneas estables, para eliminar la variedad que se produce debido a la inserción aleatoria del gen en el ADN al usar vectores virales, separamos por citometría células únicas y elegimos aquellos clones que expresan la quinasa murina en niveles parecidos, comprobándolo tanto por inmunofluorescencia como por *Western blot*. Los clones elegidos se muestran en las figuras 30 y 31.



**Figura 30. Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murino en los clones elegidos de las líneas estables *HeLa*.** **A.** Inmunofluorescencia de los clones elegidos de las líneas *HeLa*. Las células se fijaron y permeabilizaron y se detectaron las variantes murinas utilizando el anticuerpo específico  $\alpha$ -HA (R). **B.** *Western Blot* de los clones elegidos de las líneas *HeLa*. Se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) para detectar las variantes de mVRK1.

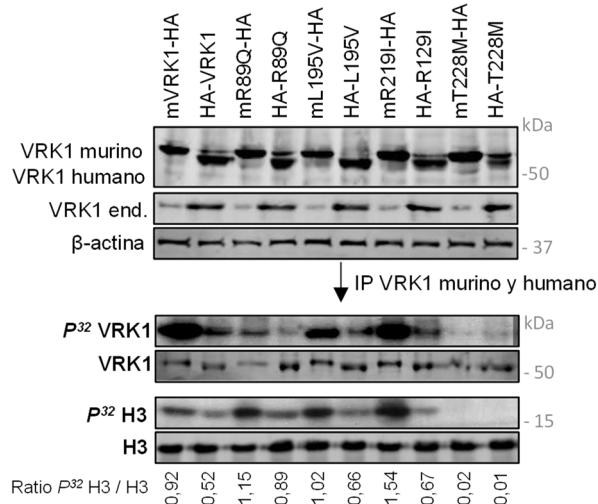




**Figura 31. Expresión de las variantes patogénicas de VRK1 murino en los clones elegidos de las líneas estables A549. A.** Inmunofluorescencia de los clones elegidos de las líneas A549. Se detectaron las variantes de mVRK1 utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -HA (R). **B.** *Western Blot* de los clones elegidos de las líneas A549. Se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) para detectar las variantes de la quinasa.

- RESULTADOS -

Quisimos comprobar inicialmente que las variantes de la quinasa que habíamos visto que poseían actividad catalítica (R89Q, L195V, R219I, T228M), también eran activas en las células de las líneas estables que presentan las variantes murinas y transfectado células con las construcciones pCELF-HA-VRK1 que portan las mutaciones humanas. Para ello, hicimos inmunoprecipitaciones de las variantes y realizamos un ensayo quinasa con ATP radiomarcado, incubando las muestras con proteína H3 pura. Observamos que, en todos los casos, se corrobora que las variantes murinas tienen mayor capacidad de fosforilación que las humanas [7], y que, excepto T228M que parece que no tiene prácticamente actividad, se comportan de igual forma que en los ensayos quinasa usando las proteínas humanas puras (Figura 32).



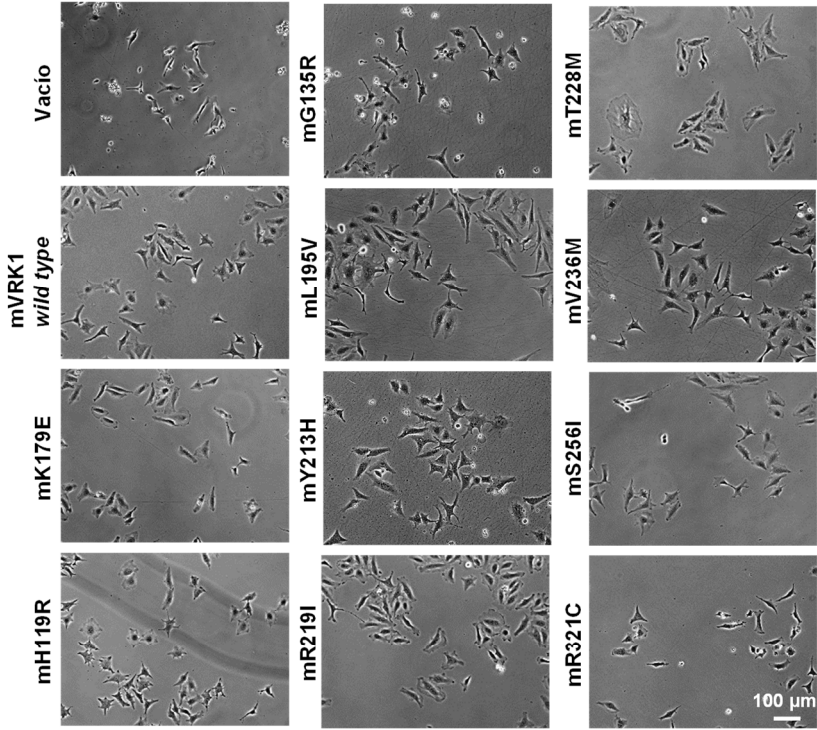
**Figura 32. La autofosforilación y fosforilación de H3 del VRK1 murino es mayor que la de VRK1 humano.** Se sembraron células de las líneas estables A549 que expresan las variantes de la quinasa murina mR89Q, mL195V, mR219I y mT228M y se silenció el gen *VRK1 humano* con el siARN específico, siVRK1-02. Por otra parte, se sembraron células A549 y se transfectaron con las construcciones pCELF-HA-VRK1 humanas y portadoras de las variantes R89Q, L195V, R219I y T228M. Se realizó la inmunoprecipitación VRK1 con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (R) de 0,5 mg de extracto y se realizó un ensayo quinasa con ATP radiomarcado, usando H3 como sustrato de la quinasa. Tras la electroforesis y *Western blot* de las muestras, se analizó la fosforilación exponiendo la membrana a películas de rayos X y los controles de carga se revelaron usando el anticuerpo específico  $\alpha$ -GST y  $\alpha$ -H3. Los datos se analizaron con el programa *ImageJ*.

#### **4.1. Caracterización fenotípica de las líneas estables *HeLa* y *A549* portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino**

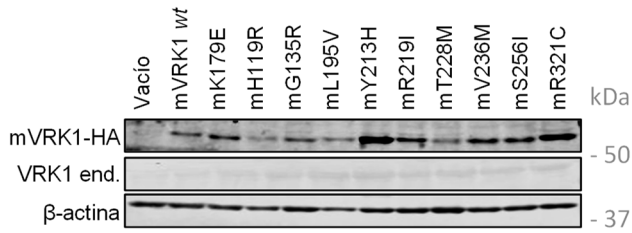
Quisimos estudiar en primer lugar, si existían diferencias entre las líneas estables en cuanto a morfología y motilidad debido a las variantes que expresaban. Para ello, tomamos capturas de imagen y vídeos de las líneas con un microscopio de campo claro, previamente habiendo silenciado la expresión del VRK1 humano endógeno. Cuantificamos el área celular, la distancia recorrida y la velocidad de células que presentan las variantes patogénicas y comparamos este parámetro con las líneas que poseen mVRK1 *wt*.

Observamos que las células de las líneas mG135R, mL195V, mY213H y mV236M presentan mayor área celular comparadas con las de las células que presentan la quinasa *wt* (Figura 33 y 34A). En cuanto a su motilidad, cabe destacar que las líneas mH119R y mG135R se desplazan a una velocidad menor, recorriendo menos espacio, que la que presenta la quinasa *wt* (Figura 34B y C), asemejándose más a la línea denominada vacío, que no presenta ni VRK1 humano ni murino. No se observan diferencias significativas en las demás líneas.

A

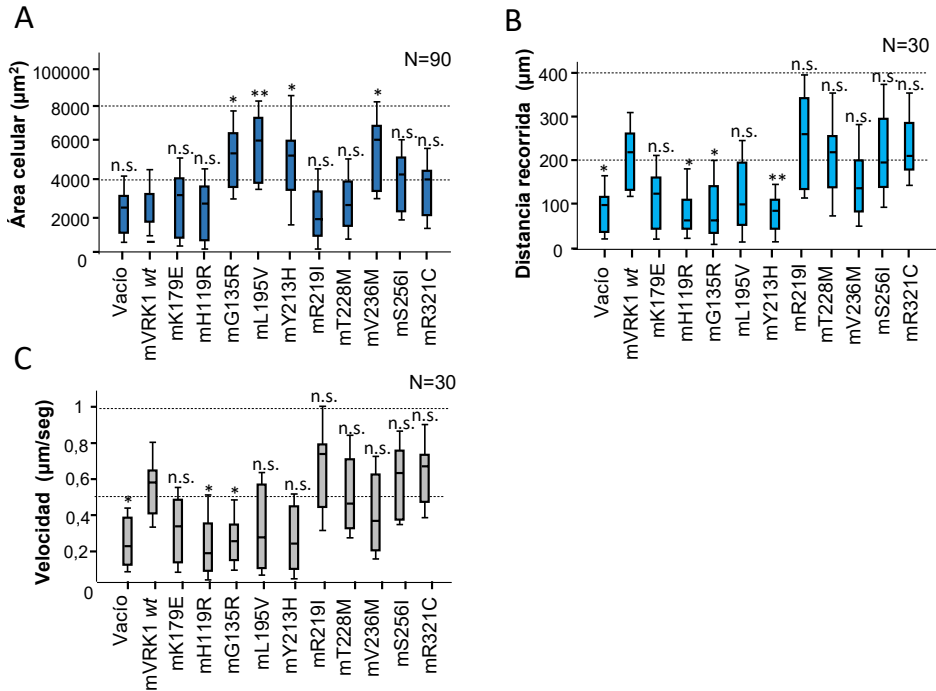


B



**Figura 33. Fenotipo de las células de las líneas estables *HeLa* generadas. A.** Capturas de imagen de campo claro de las líneas estables *HeLa* generadas. Se silenció el gen *VRK1* endógeno con el siVRK1-02 específico de dicho gen, 3 días antes de tomar las capturas de las imágenes. Aumento 10x. **B. Western Blot** de las líneas estables *HeLa*. Se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) para detectar las variantes murinas de la quinasa y  $\alpha$ -1F6 que reconoce la proteína VRK1 humana, como control de la depleción del gen.

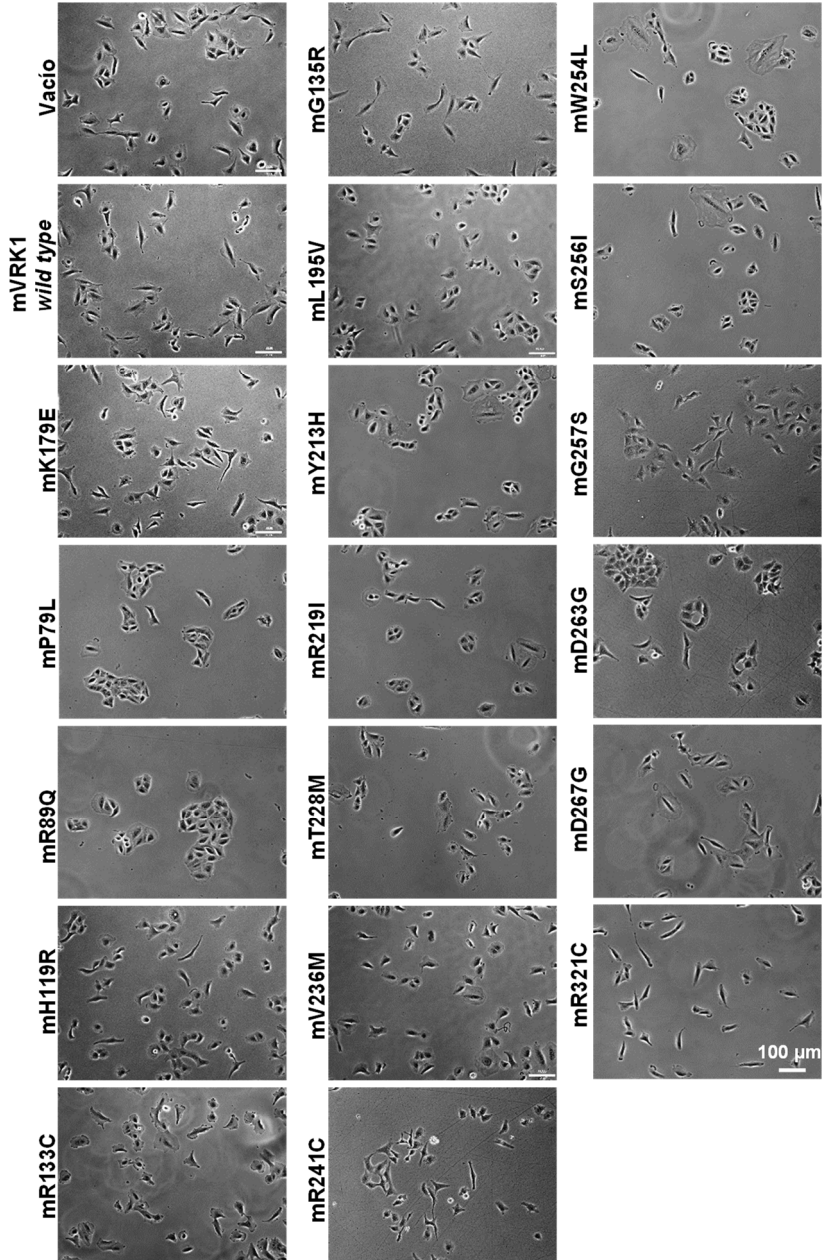
- RESULTADOS -



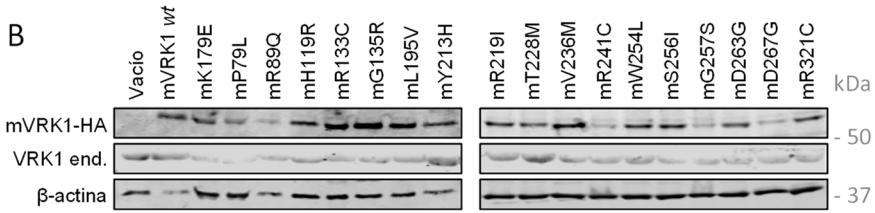
**Figura 34. Cuantificación del área, distancia recorrida y velocidad de desplazamiento de las células de las líneas *HeLa* estables.** **A.** Cuantificación del área de las células de las líneas estables *HeLa*. Se analizó el área de 90 células usando el programa *ImageJ*. **B.** Cuantificación de la distancia recorrida por las células de las líneas estables *HeLa*. Se representa la distancia recorrida por 30 células. **C.** Cuantificación de la velocidad de desplazamiento de las células de las líneas estables *HeLa*. Se cuantificó la velocidad de 30 células. Los datos se analizaron con el programa *ImageJ* y *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras difieren de mVRK1 wt \*p<0.05; \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0005.

Por otra parte, con respecto a las líneas generadas A549, se observa que las que expresan mH119R y mT228M son significativamente menores que las que presentan mVRK1 wt (Figura 36A), mientras que las demás poseen un área similar. Sin embargo, sí que se observan diferencias más claras en las diferentes líneas en cuanto a su motilidad. La velocidad de las células de las líneas mH119R, mL195V, mV236M, mK179E y la línea que presenta el vector vacío son significativamente menores comparadas con la línea estable mVRK1 wt (Figura 36C).

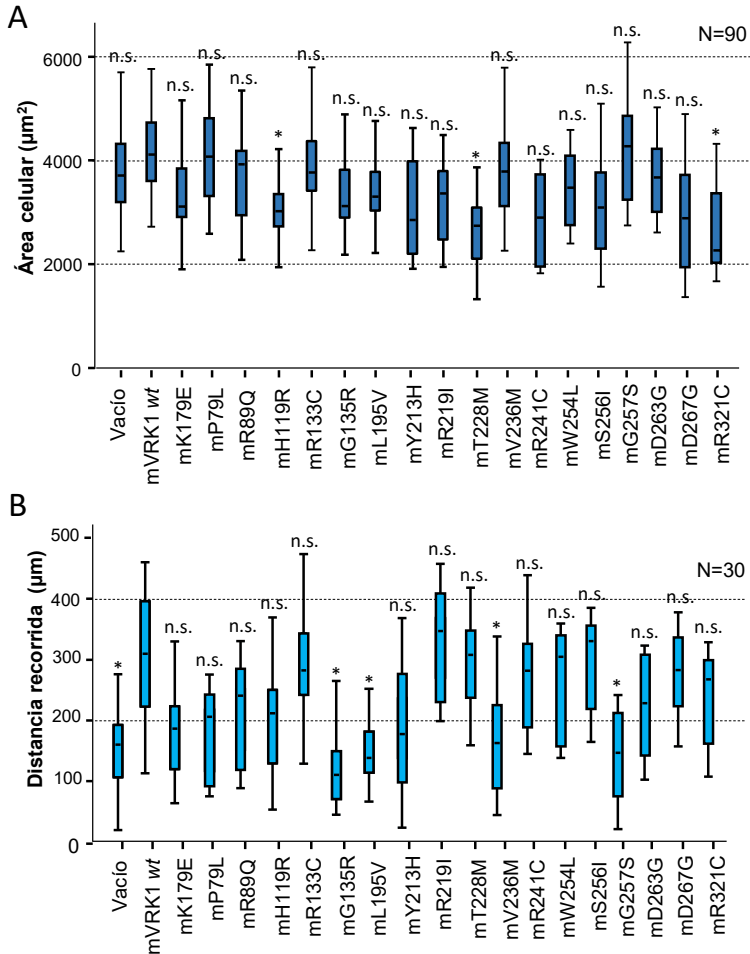
A

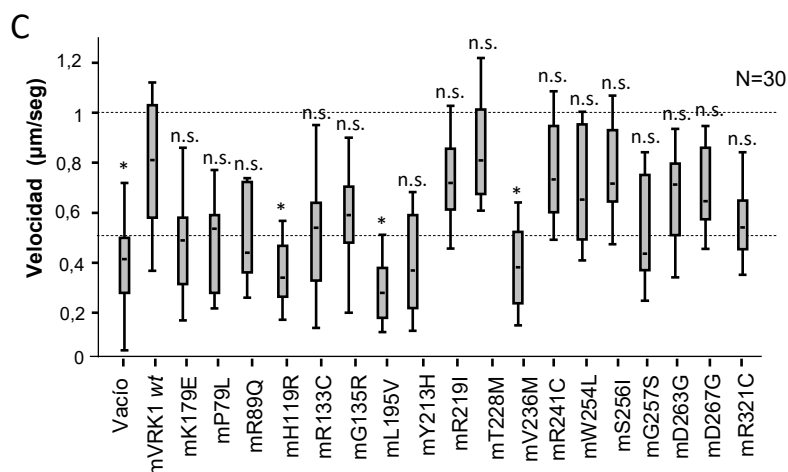


- RESULTADOS -



**Figura 35. Fenotipo de las células de las líneas estables A549 generadas. A.** Capturas de imagen de campo claro de las líneas estables A549. Se silenció el gen *VRK1* endógeno con el siVRK1-02 específico del gen, 3 días antes de tomar las capturas de las imágenes. Aumento 10x. **B.** Western Blot de las líneas estables A549. Se usó el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) para detectar las variantes de mVRK1 y  $\alpha$ -1F6 como control de la depleción del gen.





**Figura 36. Cuantificación del área, distancia recorrida y velocidad de desplazamiento de las células de las líneas A549 estables. A.** Cuantificación del área de las células de las líneas estables A549. Se cuantificaron 90 células usando el programa *ImageJ*. **B.** Cuantificación de la distancia recorrida por las células de las líneas estables A549. Se cuantificó la distancia recorrida por 30 células. **C.** Cuantificación de la velocidad de desplazamiento de las células de las líneas estables A549. Se representa la velocidad de 30 células. Los datos se analizaron con el programa *ImageJ* y *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras difieren con el valor de mVRK1 wt \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

Podemos concluir que la motilidad de las células que expresan la variante patogénica mH119R se ve reducida con respecto a las células que no tienen mutado el gen *VRK1*, comportándose como las que no presentan *VRK1* endógeno (línea vacío). Las células que poseen las variantes mL195V y mV236M también parece que sufren alteraciones en el movimiento.

#### 4.2. Estudio de la migración de las líneas estables *HeLa* y *A549* portadoras de las variantes patogénicas de *VRK1* murino

Viendo que existían diferencias en cuanto a la motilidad celular de las distintas líneas estables, quisimos estudiar más a fondo esta característica. Se ha descrito que *VRK1* es esencial para la migración neuronal independientemente de su actividad quinasa, viéndose alterada la ruta de la Reelina cuando la quinasa se encuentra mutada en las células [81]. De esta forma, realizando ensayos de cierre de herida (*Wound healing assays*),



- RESULTADOS -

eliminando tanto el VRK1 endógeno como el suero del medio (se disminuye la proliferación celular y se favorece la migración), evaluamos la migración celular.

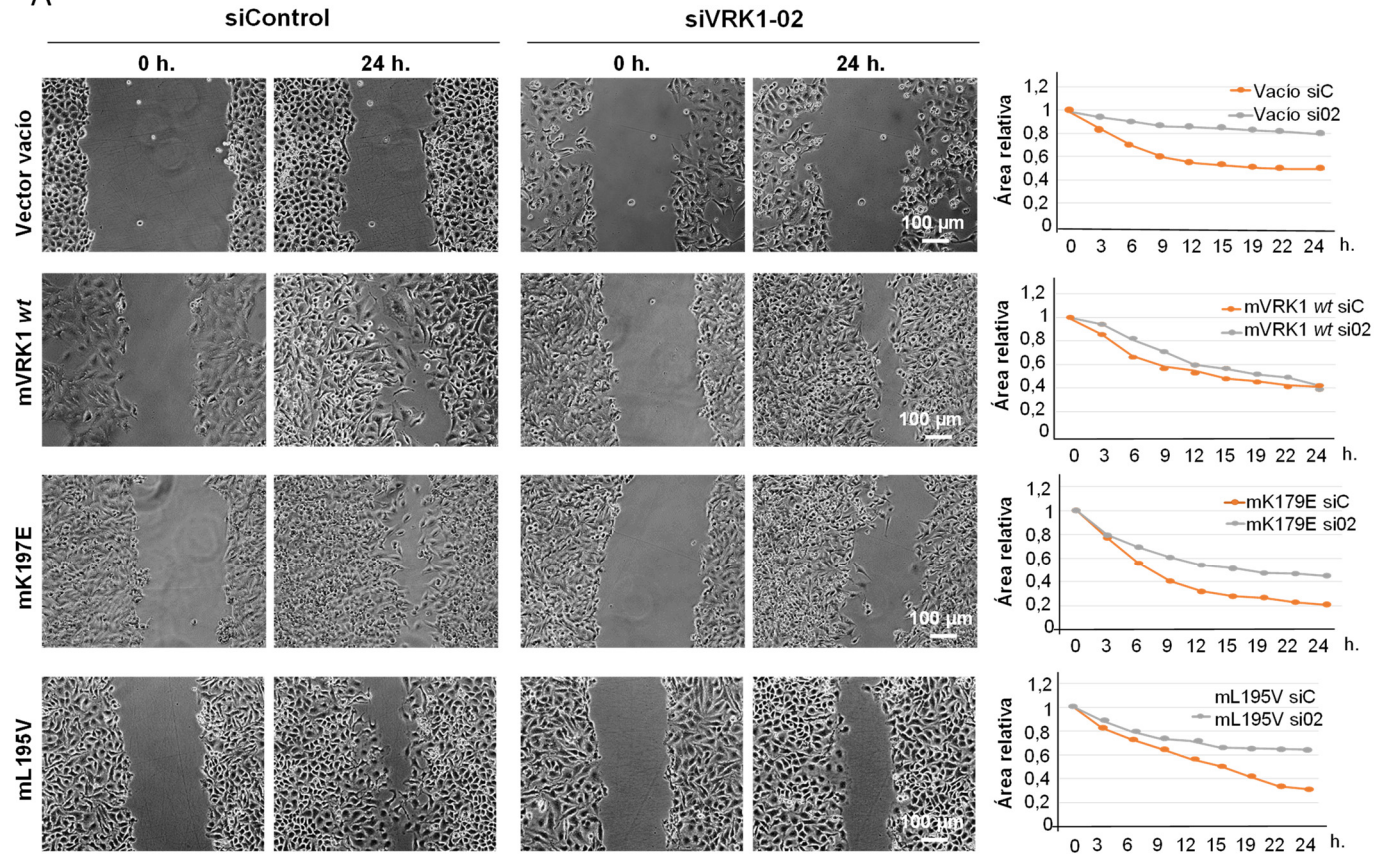
Comprobamos que cuando las células no poseen VRK1 humano ni murino (línea vacío) tanto en *HeLa* como en *A549*, la migración se ve reducida, mientras que parece que las quinasas *wt* e inactiva (K179E) murinas rescatan el fenotipo en las dos líneas celulares, sin verse diferencias en la migración celular (Figura 37). En cuanto al resto de las líneas, observamos una bajada de la migración muy marcada al estudiar las que poseen las variantes mL195V y mV236M tanto en *HeLa* como en *A549*. La variante L195V se encuentra en heterocigosis compuesta con G135R en un paciente que presenta microcefalia y atrofia moderada del cerebro. Por su parte, V236M se ha descrito en conjunto con R89Q en dos pacientes con neuropatía sensitivomotora y microcefalia con patrón giral simplificado. Las líneas estables *A549* que expresan mG135R y mR89Q presentan también una reducción de la migración (Figura 37B).

Además, cabe destacar que la capacidad de migración se encuentra reducida en las células que expresan mS256I y mR321C en *HeLa*, así como mP79L, mH119R, mG135R, mY213H y mD267G en *A549* (Figura 37). Los ensayos de herida de todas las líneas se recogen en la figura 37 y anexo 1 y 2.

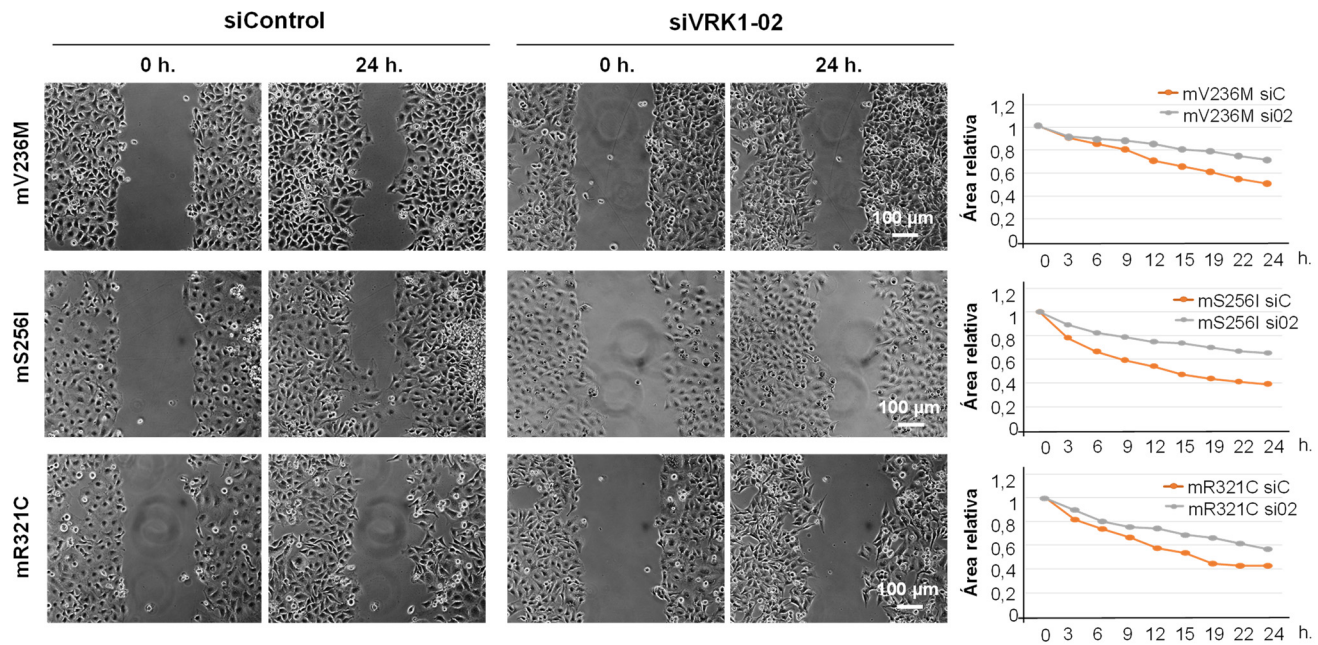
Con todo esto corroboramos que las variantes que vimos anteriormente que tenían afectada la motilidad celular (mL195V y mV236M) presentan menor capacidad de migración, así como que el defecto de la migración es independiente de la actividad quinasa, dado que la migración en las líneas mK179E que expresan una quinasa inactiva, no se ve demasiado afectada (Figura 37).

- RESULTADOS -

A

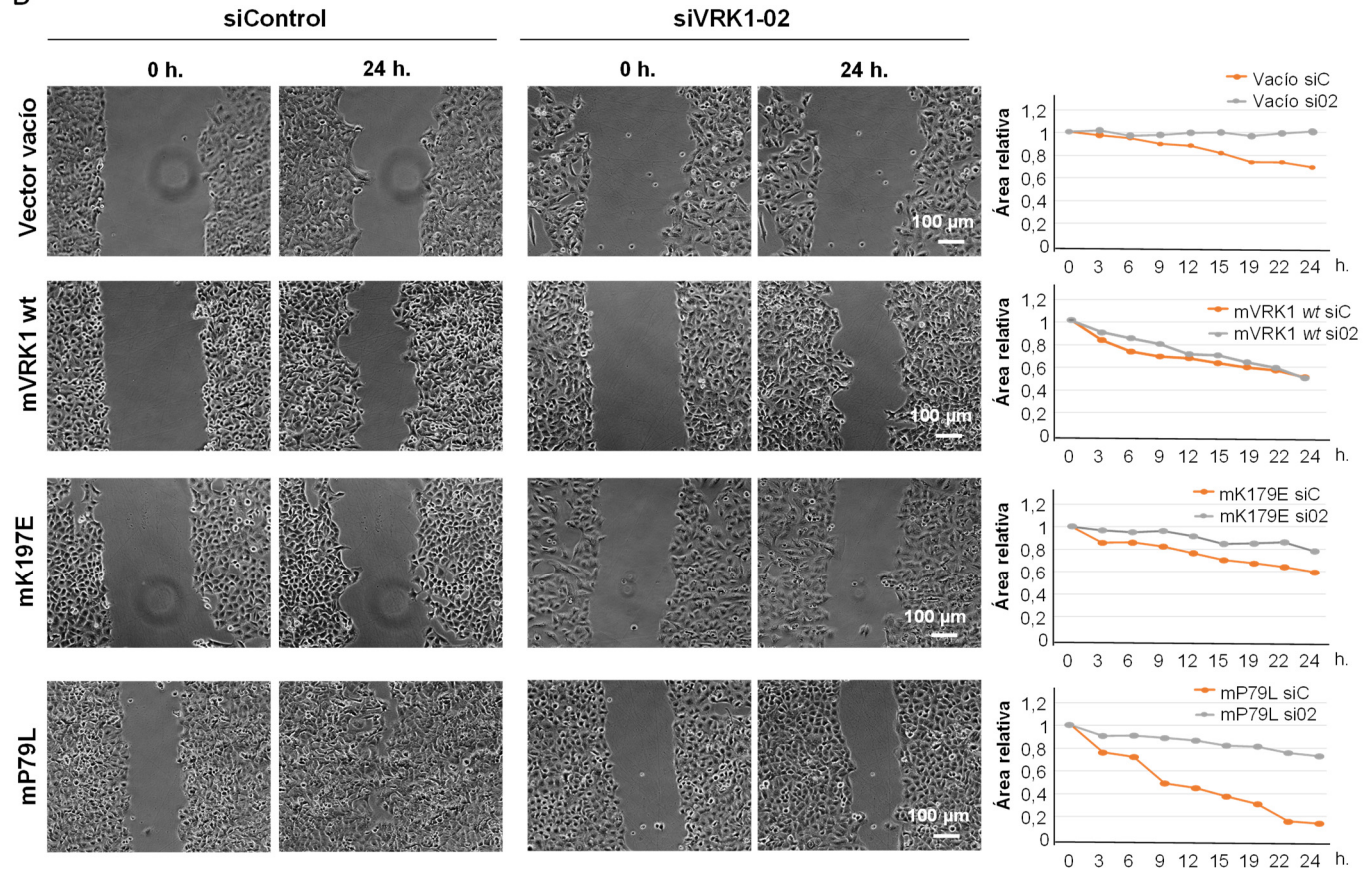


- RESULTADOS -

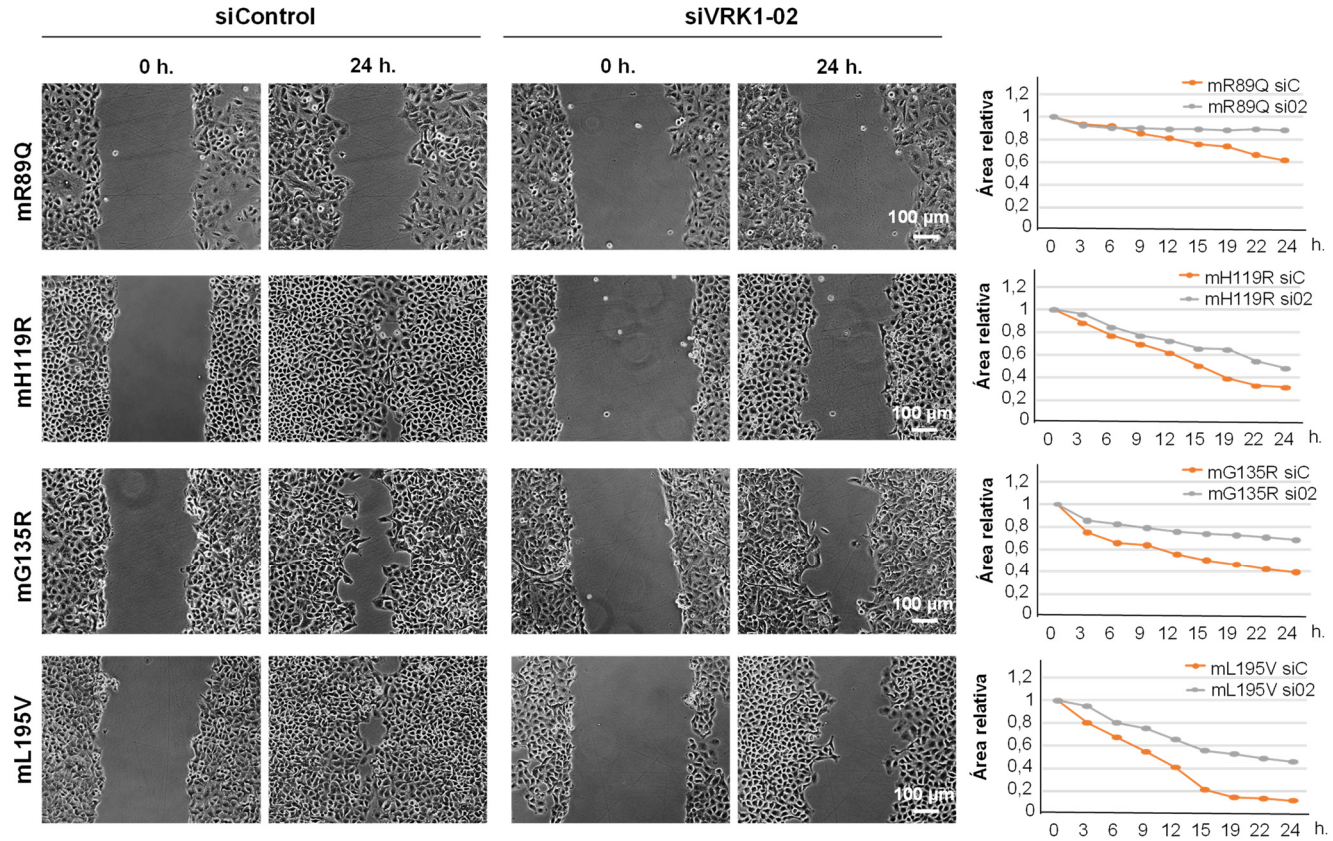


- RESULTADOS -

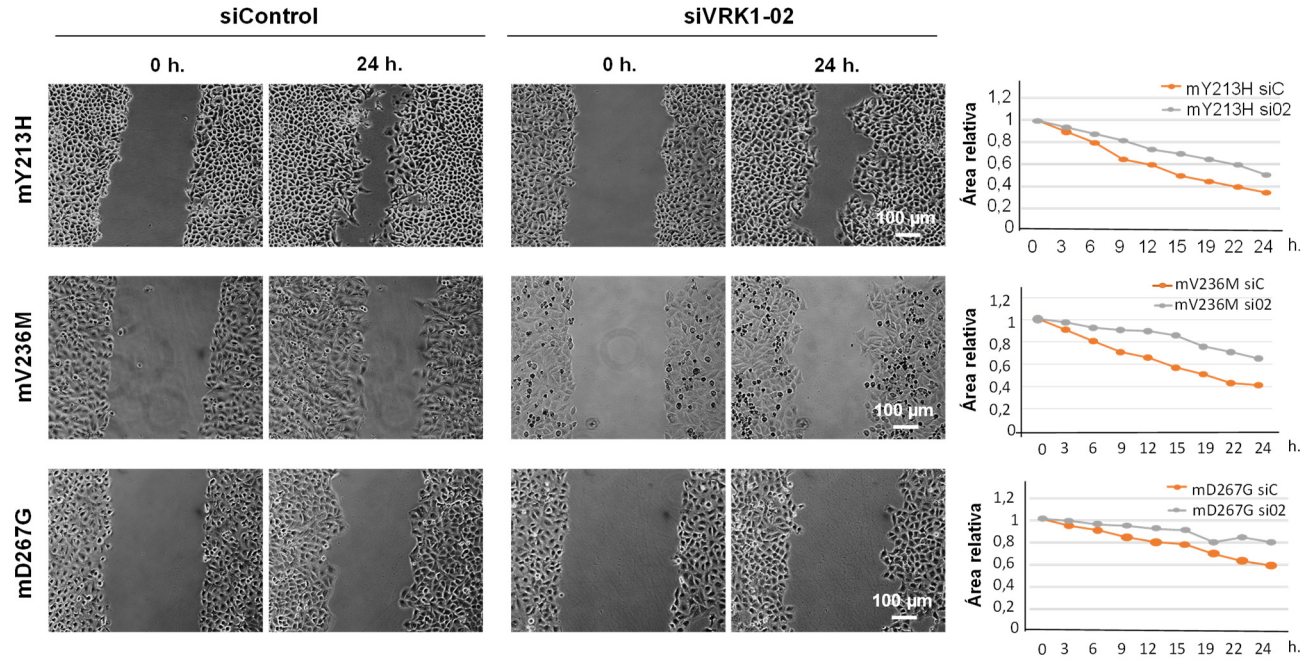
B



- RESULTADOS -



- RESULTADOS -



**Figura 37. Ensayo de cierre de herida en las líneas estables *HeLa* (A.) y *A549* (B.).** Se representan los ensayos en los que se observan defectos en la migración celular. Se sembraron células en placas de 24 pocillos. Pasadas 24 h se silenció el gen *VRK1 humano* con un siARN específico. Pasadas 24 h se eliminó el suero del medio. A las 72 h, se realizaron las heridas y se tomaron capturas de imagen de campo claro cada 10 min durante 24 h. Se cuantificó el área de la herida utilizando el programa *ImageJ*. Se representa la captura de imagen tomada a las 0 y 24 h, y la gráfica donde se muestra el cierre de la herida en las líneas con *VRK1* endógeno y sin él. El experimento se realizó dos veces, obteniendo resultados similares. Se representa una réplica.

## 5. Las células de las líneas A549 portadoras de las variantes de VRK1 tienen alterada la ruta de reparación del daño en el ADN

### 5.1. Las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 acumulan más daño oxidativo en su ADN

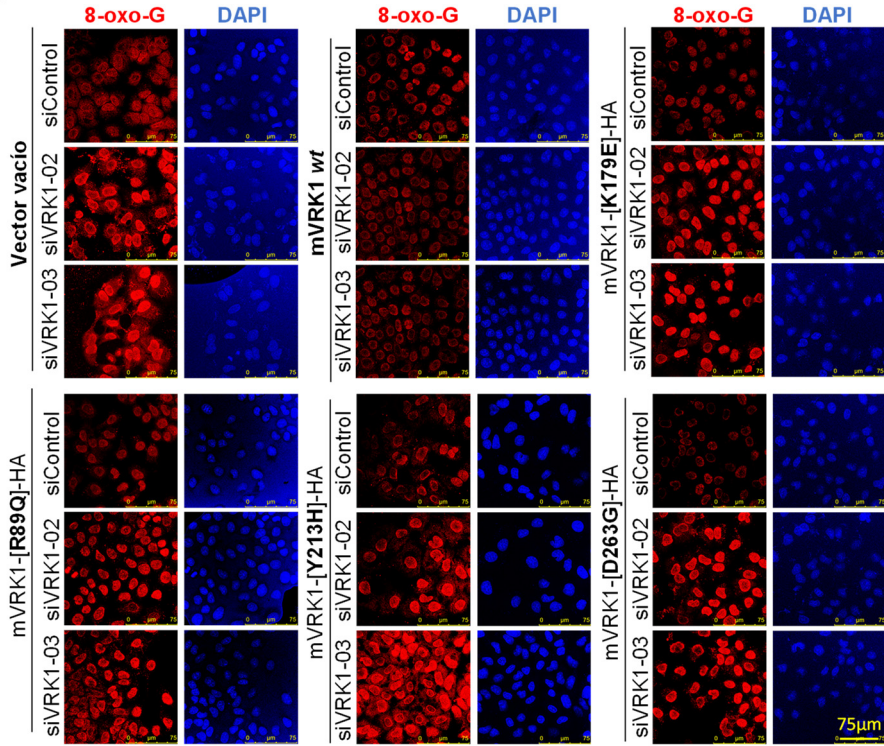
Las neuronas son especialmente sensibles al estrés oxidativo producido por las especies reactivas derivadas del oxígeno molecular (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*), debido a su alta demanda energética [196]. Éstas generan inicialmente alteraciones en las bases nitrogenadas del ADN, como la oxidación de la guanina (8-oxoguanina, entre otras) que, si no son reparadas, puede conducir a roturas en el ADN y posterior muerte neuronal [197]. Debido a que los pacientes que portan las variantes de esta quinasa poseen distintos síndromes neuromotores, quisimos saber si estas células acumulaban más daño por estrés oxidativo que cuanto expresaban la quinasa no mutada.

Para ello, analizamos los niveles de 8-oxoguanina (8-oxo-G) en las líneas A549 control, mR89Q, mY213H y mD236G. Elegimos estas líneas dado que las dos últimas variantes son las más estudiadas en nuestro laboratorio. A su vez, analizamos mR89Q ya que expresa una quinasa con actividad catalítica. Así, por inmunofluorescencia, habiendo silenciado previamente el gen *VRK1* endógeno, pudimos observar que los niveles de 8-oxo-G eran mayores cuando se presentaban las variantes en las células. Solo se aprecia un nivel bajo de la modificación cuando se trata de la línea portadora de mVRK1 *wt* (Figura 38).

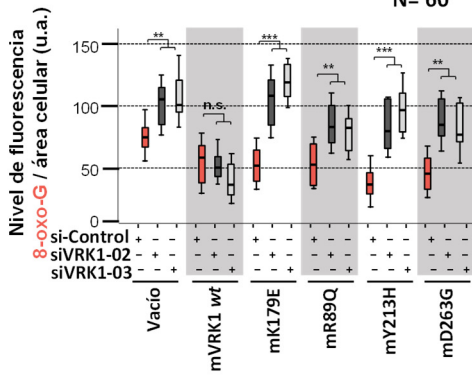
**Figura 38. Las células que poseen las variantes patogénicas de VRK1 acumulan más daño oxidativo en el ADN, observado con 8-oxo-G. A.** Inmunofluorescencia de 8-oxo-G en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron a las 24 h con dos siARNs específicos del gen *VRK1 humano* y un siControl. A las 24 h se quitó el suero del medio. Tras 48 h, se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. **B.** Cuantificación de la fluorescencia de 8-oxo-G por área celular de 60 células con el programa *ImageJ*. Se analizaron los datos con *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ . **C.** *Western blot* en el que se observa el silenciamiento del gen *VRK1 humano* con los dos siARNs y la expresión de la variante murina.

- RESULTADOS -

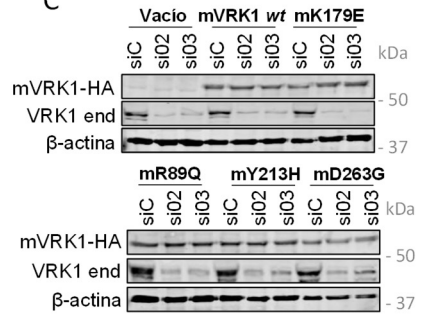
A



B



C



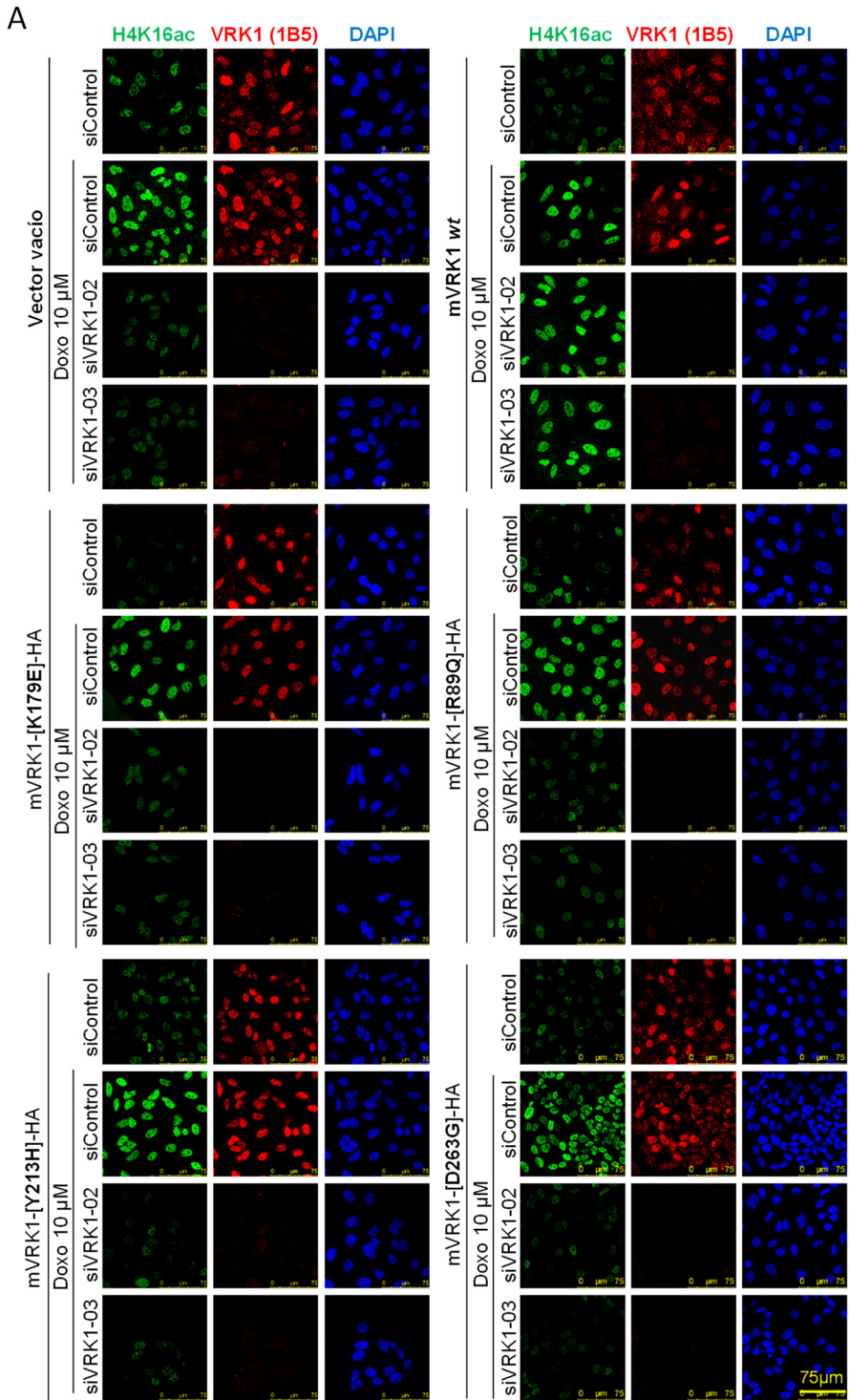


## **5.2. Los niveles de la acetilación del residuo Lys16 de la histona H4 no se recuperan en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN**

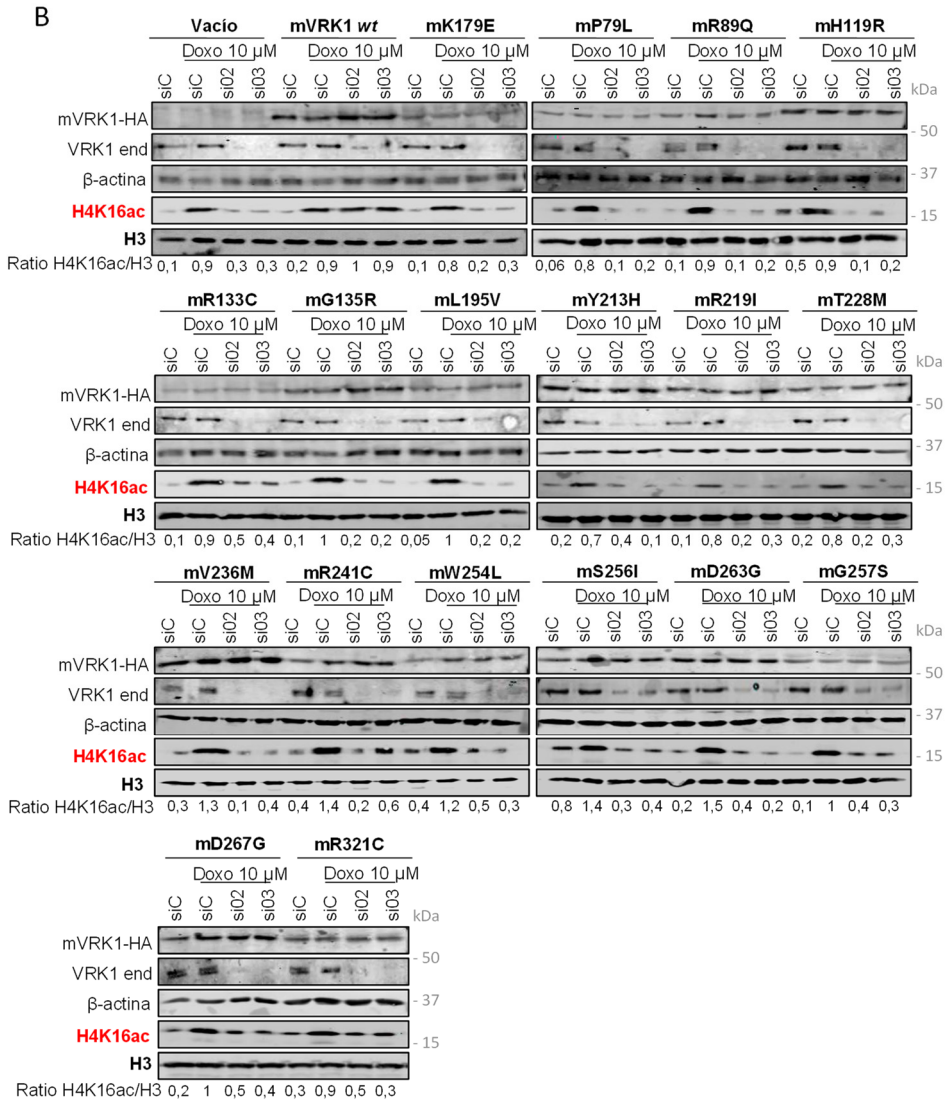
Durante el desarrollo del sistema nervioso, es esencial la correcta reparación de las roturas que se producen en el ADN, pero también en neuronas post-mitóticas, debido a los altos niveles de ROS que se producen durante su metabolismo [196]. Las líneas que portan las variantes de VRK1 acumulan daño oxidativo que podrían conducir a roturas en la molécula. Al ser VRK1 esencial en esta respuesta, analizamos si las distintas variantes eran capaces de reparar el daño.

Para generar dichas roturas (de doble cadena o DSBs) y estudiar detalladamente este proceso, tratamos las células con doxorubicina y analizamos distintas proteínas involucradas en la ruta de reparación. Al ser VRK1 esencial a lo largo de todo este proceso, analizamos la acetilación de la H4K16 (H4K16ac), que es un proceso temprano en respuesta a DSB, la formación de focos de  $\gamma$ H2A.X, proceso intermedio y la formación de focos de 53BP1, más tardío.

VRK1 participa indirectamente en la regulación de los niveles de H4K16ac, viéndose que, al no expresarse esta quinasa, no se recupera la acetilación del residuo, alterándose toda la ruta de reparación [49]. De esta forma, quisimos analizar en células de las líneas estables *A549* la recuperación de los niveles de esta modificación de la H4. Para ello, silenciamos el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos y, posteriormente, tratamos las células con doxorubicina 10  $\mu$ M 2 h, previamente habiendo quitado el suero del medio. Observamos tanto por inmunofluorescencia como por *Western blot*, la bajada de los niveles de esta acetilación cuando las variantes están presentes en las células (Figura 39 y anexo 3). Se muestra en la figura principal las inmunofluorescencias de las líneas control y de las variantes mR89Q, mY213H y mD263G. El resto de variantes se recogen en la figura del anexo 3, junto con la cuantificación de los niveles de fluorescencia.



- RESULTADOS -



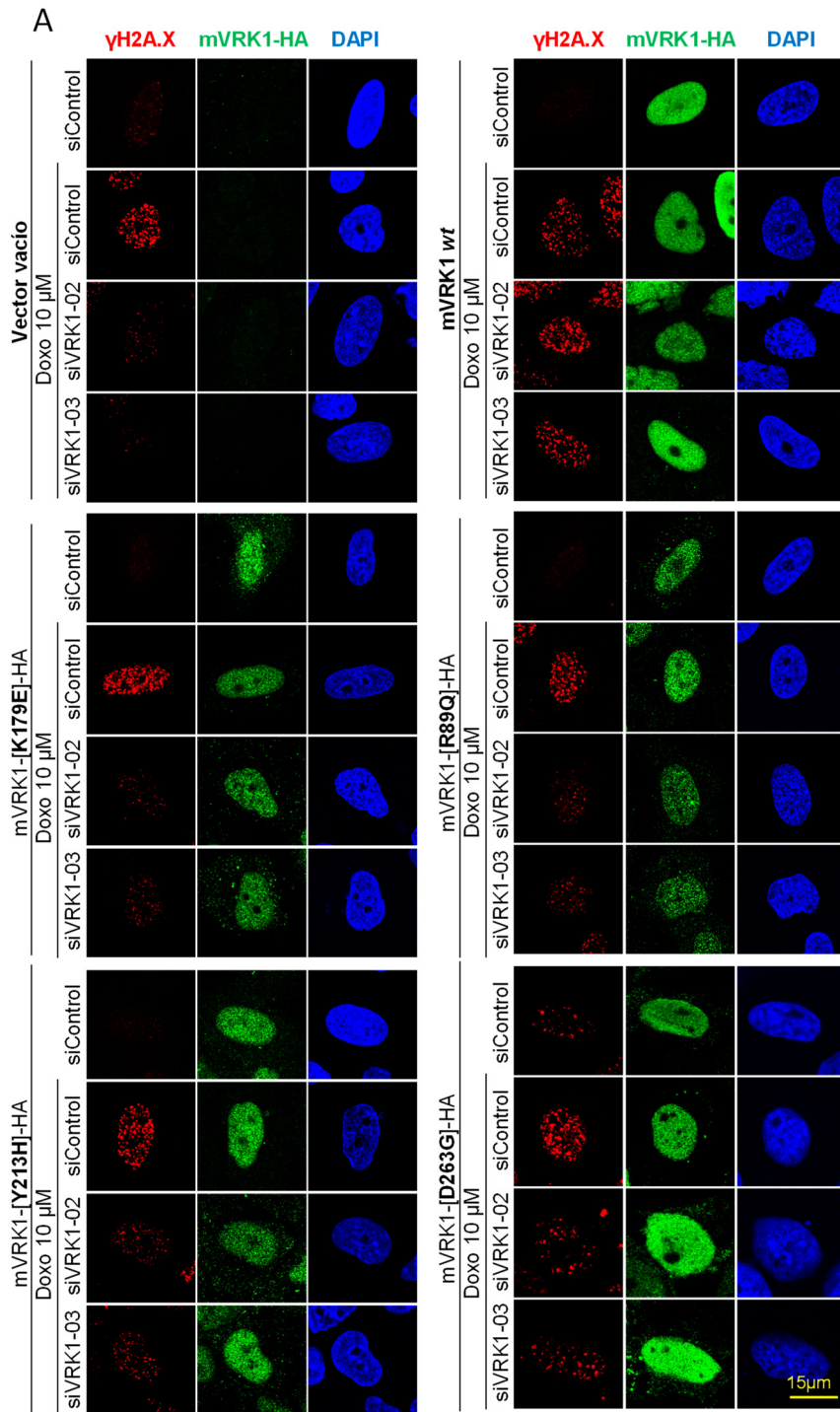
**Figura 39. Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar los niveles de H4K16ac ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron a las 24 h con dos siARNs específicos del gen *VRK1* humano y un siControl que no tiene diana en las células. A las 24 h se quitó el suero del medio. Pasadas 48 h, se añadió doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h. **A.** Inmunofluorescencia de H4K16ac en las líneas estables control, mR89Q, mY213H y mD263G. Se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. Se marca como control de silenciamiento el VRK1 humano endógeno, con el anticuerpo específico  $\alpha$ -1B5. **B.** Western blot de H4K16ac de los extractos proteicos de las líneas estables. Se lisaron las células sobrantes con Buffer RIPA sonicando. Se representa la ratio H4K16ac/H3 de cada muestra.

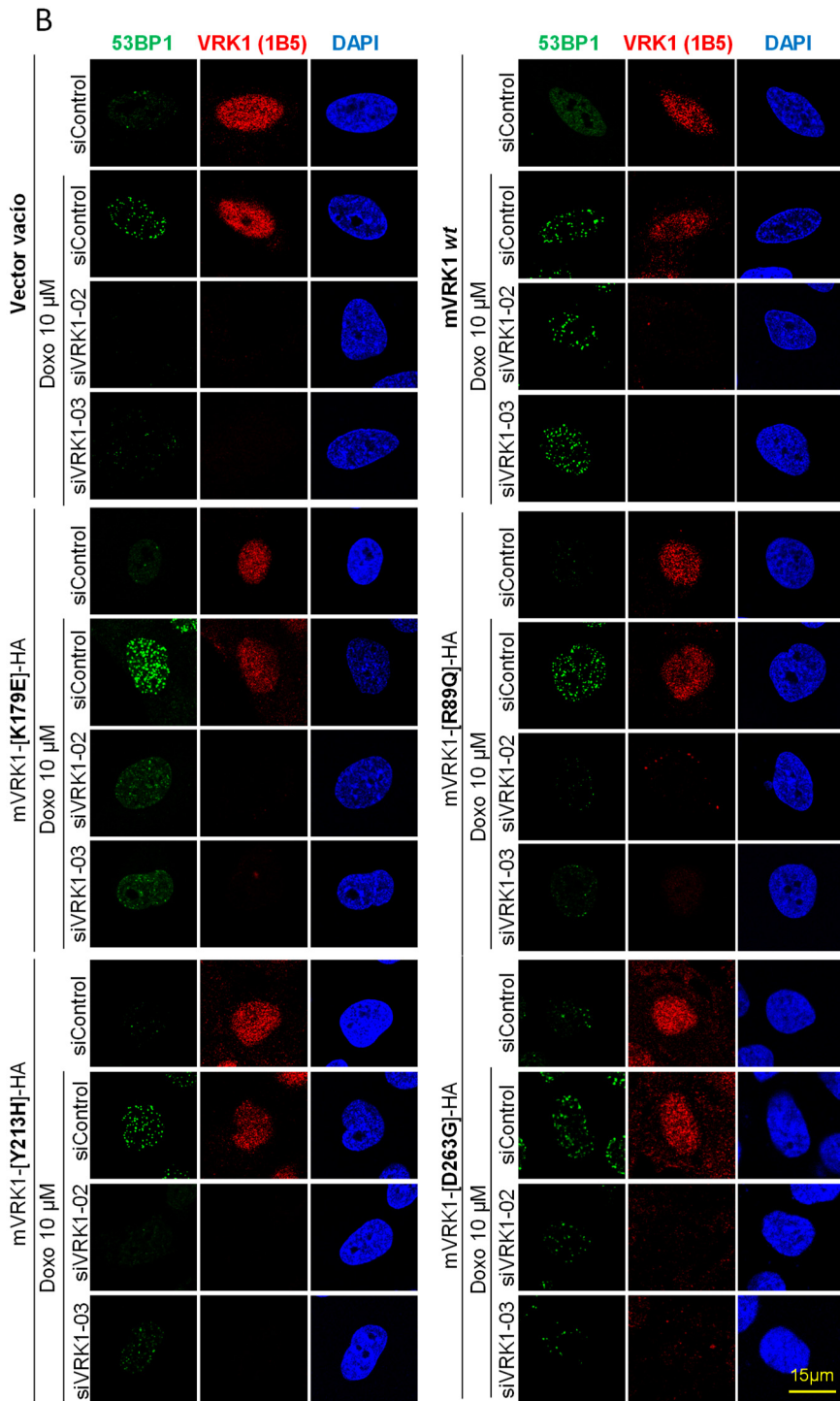
### **5.3. La formación de focos de $\gamma$ H2A.X y 53BP1 se ve alterada en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN**

Posteriormente, en la ruta de reparación de daño del ADN, VRK1 fosforila a la variante de la histona H2A.X en el residuo serina 139 ( $\gamma$ H2A.X), acumulándose en los sitios de daño, formando focos [38]. Así, se pueden apreciar por microscopía confocal o de fluorescencia focos muy claros de reparación en los núcleos celulares. De esta forma, estudiamos la formación de estos focos utilizando las líneas celulares A549 en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Observamos que ninguna de las líneas que portan las variantes es capaz de recuperar el número de focos, ni el tamaño que tenían antes de eliminar el VRK1 humano de las células (Figura 40A y anexo 4).

53BP1 es otro sustrato de VRK1 que participa en la reparación del daño en fase tardía [195]. Observamos que al igual que ocurría con  $\gamma$ H2A.X, ninguna de las líneas recupera el número de focos de 53BP1 que se forman al expresar el VRK1 humano endógeno e inducir daño con doxorrubicina (Figura 40B y anexo 5).

- RESULTADOS -



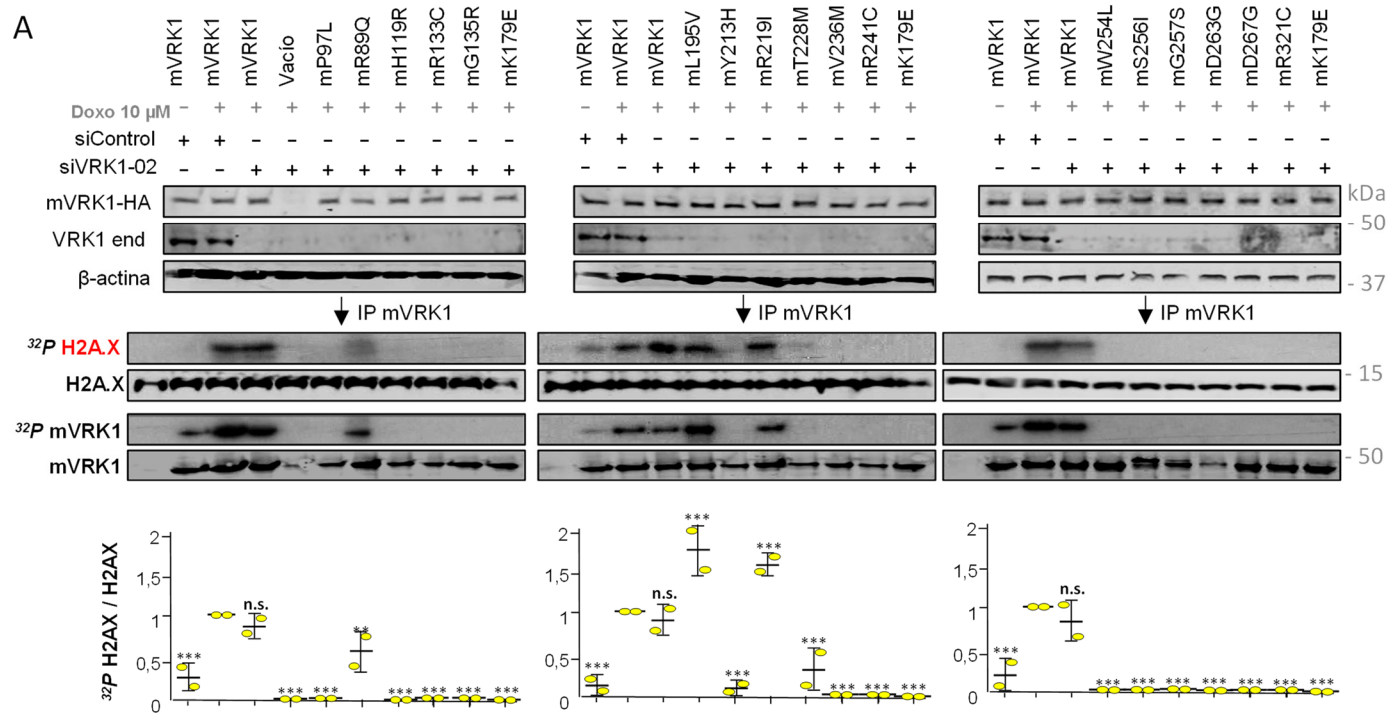


**Figura 40. Las variantes patogénicas de VRK1 mR89Q, mY213H y mD263G no son capaces de rescatar la formación de focos de  $\gamma$ H2A.X ni de 53BP1 ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron a las 24 h con dos siARNs específicos del gen *VRK1 humano* y un siControl. A las 24 horas se quitó el suero del medio. Pasadas 48 h, se añadió doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h y se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. **A.** Inmunofluorescencia de los focos de  $\gamma$ H2A.X en las líneas estables control, mR89Q, mY213H y mD263G. Se marca con el anticuerpo específico  $\alpha$ -1B5 el VRK1 endógeno como control de su efectivo silenciamiento. **B.** Inmunofluorescencia de los focos de 53BP1 en las líneas estables control, mR89Q, mY213H y mD263G. Se marca con el anticuerpo específico  $\alpha$ -HA las variantes murinas de la quinasa como control de su expresión en las líneas.

Para la formación de los focos de  $\gamma$ H2A.X y 53BP1 es necesaria la fosforilación de las proteínas por parte de la quinasa. En base a los resultados obtenidos, quisimos comprobar si las quinasas murinas eran capaces o no de fosforilar estos dos sustratos. Por ello, hicimos ensayos quinasa con ATP radiomarcado con  $^{32}P$ , utilizando H2A.X y un fragmento de 53BP1 purificado con GST y las variantes murinas inmunoprecipitadas de extractos proteicos, obtenidos de cultivos tras tratar las células con los siARNs correspondientes y doxorubicina 10  $\mu$ M 2 h. Vimos que las variantes, mL195V y mR219I y, en menor medida mR89Q, se autofosforilaban y activaban a las dos proteínas ante daño en el ADN al igual que la quinasa *wt* (Figura 41).

- RESULTADOS -

A







**Figura 41. Ensayos quinasa en los que se observa que las variantes patogénicas de VRK1 que poseen actividad catalítica (mR89Q, mL195V, mR219I), son capaces de fosforilar a los sustratos H2A.X y 53BP1 *in vitro* ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron a las 24 h con el siVRK1-02 específico del gen *VRK1 humano* o el siControl, sin diana. A las 24 h se quitó el suero del medio. Pasadas 48 h, se añadió doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h, se lisaron las células y se realizaron IPs de las variantes murinas con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (R) de 500  $\mu$ g de extracto proteico. **A.** Ensayo quinasa *in vitro* con ATP radiomarcado con  $^{32}P$ , utilizando 1  $\mu$ g de H2A.X como sustrato. Se llevó a cabo la electroforesis de las muestras, seguido del *Western blot*, y se analizó la autofosforilación de las variantes y la fosforilación del sustrato exponiendo las membranas a películas de rayos X durante distintos tiempos. Se usó como control negativo de los experimentos una muestra con 1  $\mu$ g de H2A.X sin quinasa, al que también se añadió ATP radiomarcado. Se utilizaron los anticuerpos específicos  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -H2A.X como controles de carga. **B.** Ensayo quinasa *in vitro* con ATP radiomarcado, utilizando 1  $\mu$ g de un fragmento de 53BP1 (1-1039 aa) con el epítipo GST como sustrato. Se llevó a cabo la electroforesis de las muestras, seguido del *Western blot*, y se estudió tanto la autofosforilación de las variantes como la fosforilación del sustrato exponiendo las membranas a películas de rayos X. Se usó como control negativo de los experimentos una muestra con 1  $\mu$ g de 53BP1 (1-1039 aa) sin quinasa, al que también se añadió ATP radiomarcado. Se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -GST como controles de carga. Se realizó en los dos experimentos un *Western blot* por separado para corroborar el silenciamiento correcto del gen *VRK1 humano*, así como para ver los niveles de expresión de las variantes en las líneas celulares. Los experimentos se realizaron por duplicado y se analizaron los datos con el programa *Graphpad Prism 7*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar la significación estadística con respecto a mVRK1 wt \*p<0.05; \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0005.

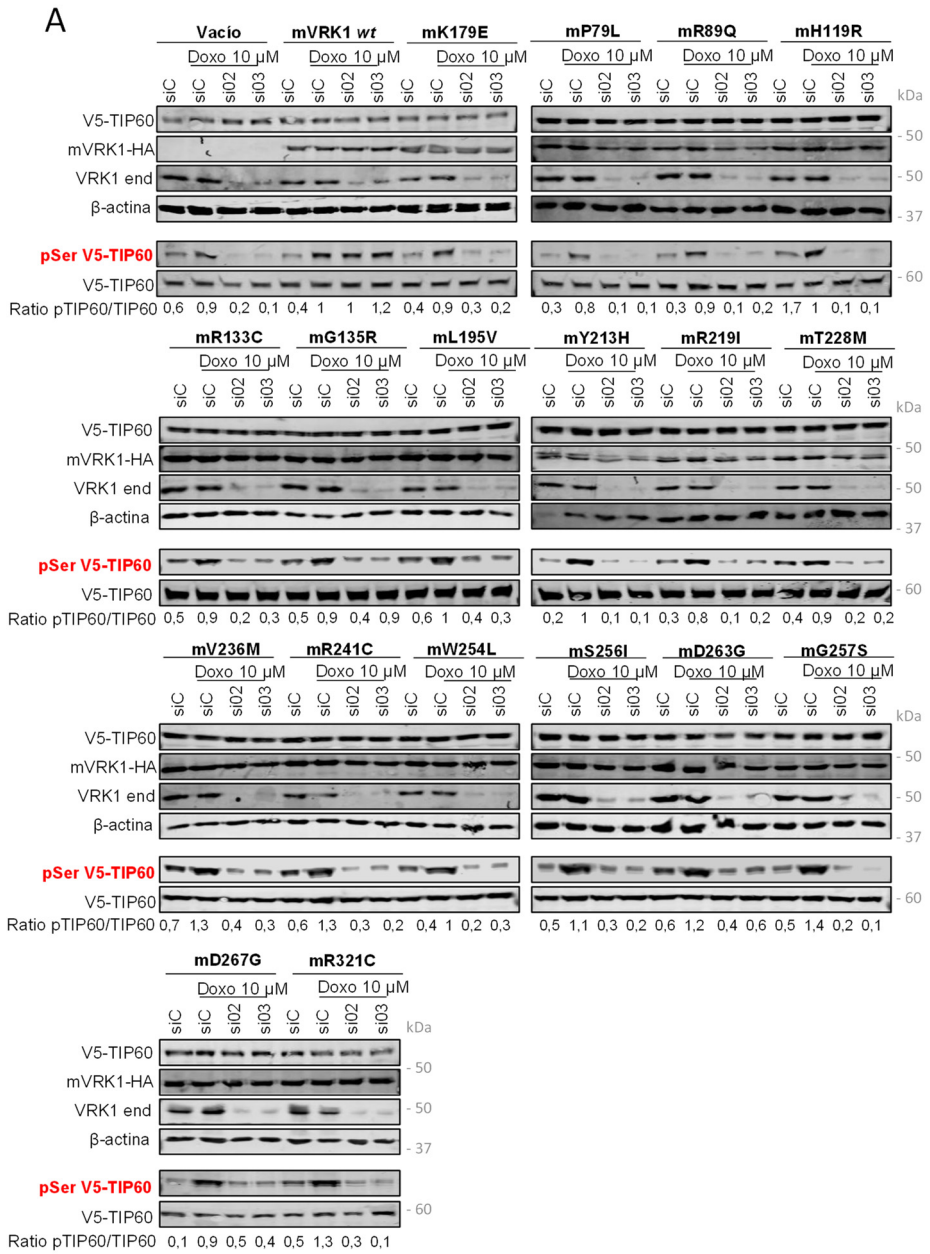
A la vista de estos resultados podemos concluir que las células que portan las variantes patogénicas de VRK1 estudiadas, tienen alterada la ruta de reparación del daño en el ADN. Las variantes mR89Q, mL195V y mR219I son capaces de fosforilar *in vitro* a las proteínas H2A.X y 53BP1 cuando dañamos el ADN. Con los experimentos realizados no podemos afirmar que estas variantes fosforilen H2A.X y 53BP1 *in vivo*. Solo podemos concluir que no se forman los focos de reparación necesarios para reparar las roturas del ADN.

#### 5.4. La fosforilación TIP-60 se ve disminuida en las células portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 ante daño en el ADN

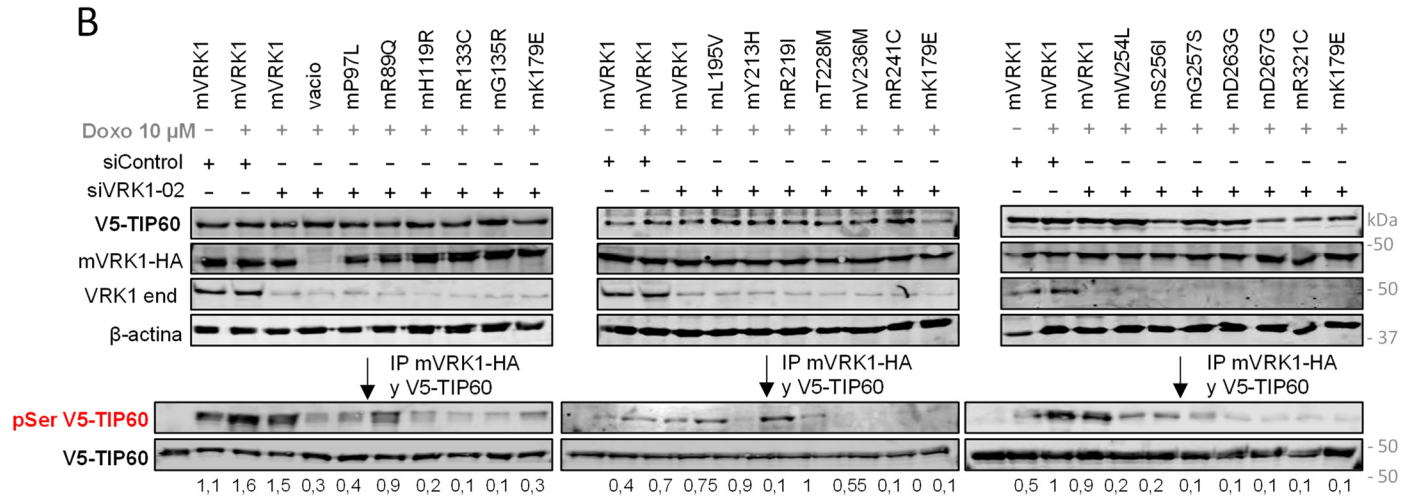
Recientemente, hemos publicado que TIP-60 es la acetiltransferasa que media la acetilación de la H4K16 y se activa mediante fosforilación por VRK1 [49]. Al observar pérdida de dicha acetilación en presencia de las variantes, hipotizamos que la fosforilación de TIP-60 se podría ver afectada. Para analizarlo, silenciamos el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos y, posteriormente, tratamos las células con doxorubicina 10  $\mu$ M 2 h, previamente habiendo quitado el suero del medio. Observamos que el VRK1 murino rescata la fosforilación de TIP-60 cuando no se expresa la proteína humana, mientras que disminuye significativamente, al observar dicha fosforilación en la línea vacío y en la que expresa la mutación mK179E. Analizando los resultados en las líneas que portan las variantes patogénicas, obtuvimos que ninguna de ellas es capaz de recuperar la fosforilación de TIP-60 cuando silenciamos el gen *VRK1 humano* (Figura 42A).

Comprobamos que las variantes de VRK1 murinas eran capaces de fosforilar a su sustrato TIP-60. Para ello, realizamos un ensayo quinasa utilizando ATP frío, usando TIP-60 y las proteínas quinasa inmunoprecipitadas de células, tratadas previamente con doxorubicina en las mismas condiciones del experimento anterior. Observamos que las variantes mL195V y mR219I, son capaces de fosforilar TIP-60 *in vitro* ante daño génico, en mayor medida que mVRK1 *wt*. mR89Q también es capaz de fosforilar al sustrato, pero en menor medida que la quinasa *wt*, mientras que el resto no presentan actividad (Figura 42B).

- RESULTADOS -



- RESULTADOS -



**Figura 42. La fosforilación de TIP-60 ante daño en el ADN no se recupera en las líneas A549 que expresan las variantes de VRK1. A.** *Western blot* de TIP-60 fosforilado en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas estables A549 y se transfectaron con la construcción pcDNA-V5-TIP60 y silenciaron con dos siARN específicos del gen *VRK1 humano*, y un siControl, sin diana celular. A las 24 h se retiró el suero del medio. Tras 3 días se trataron con doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h. Se realizó la inmunoprecipitación de V5-TIP60 con el anticuerpo  $\alpha$ -V5 (R) de 1 mg de extracto y se estudió su fosforilación con el anticuerpo genérico fosfoserina (M). **B.** TIP-60 se fosforila por algunas variantes de VRK1 *in vitro*. Se sembraron células de las líneas estables A549, se transfectaron con la construcción pcDNA-V5-TIP60 y silenciaron con el siARN específico del gen *VRK1 humano* siVRK1-02 y siControl. A las 24 h se retiró el suero del medio. Tras 3 días se trataron con doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h. Se realizó la inmunoprecipitación de V5-TIP60 con el anticuerpo  $\alpha$ -V5 (R) y de las variantes de la quinasa con  $\alpha$ -HA (R) de 1 mg de extracto. Se realizó un ensayo quinasa con ATP frío y se estudió la fosforilación con el anticuerpo genérico fosfoserina (M). Como control negativo del experimento se realizó una IP de V5-TIP60 que se incubó con ATP, pero no con mVRK1. Se procesaron los datos con el programa *ImageJ* y se mostró la ratio pSer TIP-60/TIP-60. Se realizaron los experimentos por duplicado. Se representa una réplica.

- RESULTADOS -

Por tanto, podemos concluir que las células que portan las variantes patogénicas de VRK1 tienen alterada la ruta de reparación del daño génico. Parece que esta alteración ocurre desde el inicio de la ruta, viéndose disminuida la actividad de la acetiltransferasa TIP-60, al no activarse por la fosforilación de VRK1. Esto hace que la relajación de cromatina en las zonas de daño (asociada a H4K16ac) no se produzca y no se puedan señalar correctamente para su posterior reparación.

## **6. El patrón epigenético de la histona H3 en las líneas estables A549 portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 se ve alterado**

La regulación exhaustiva de las modificaciones en residuos específicos de las colas de las histonas es esencial para el desarrollo celular correcto, controlando la represión y expresión de determinados genes. Los patrones de acetilación y metilación en los residuos lisina 9 y 27 de la histona H3 se han visto alterados en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o la enfermedad de Huntington [70]. Hemos observado en el laboratorio, que VRK1 parece regular distintas enzimas modificadoras de histonas (datos no publicados). Esto nos llevó a pensar en una posible alteración del patrón epigenético de las histonas en las células portadoras de las variantes de la quinasa.

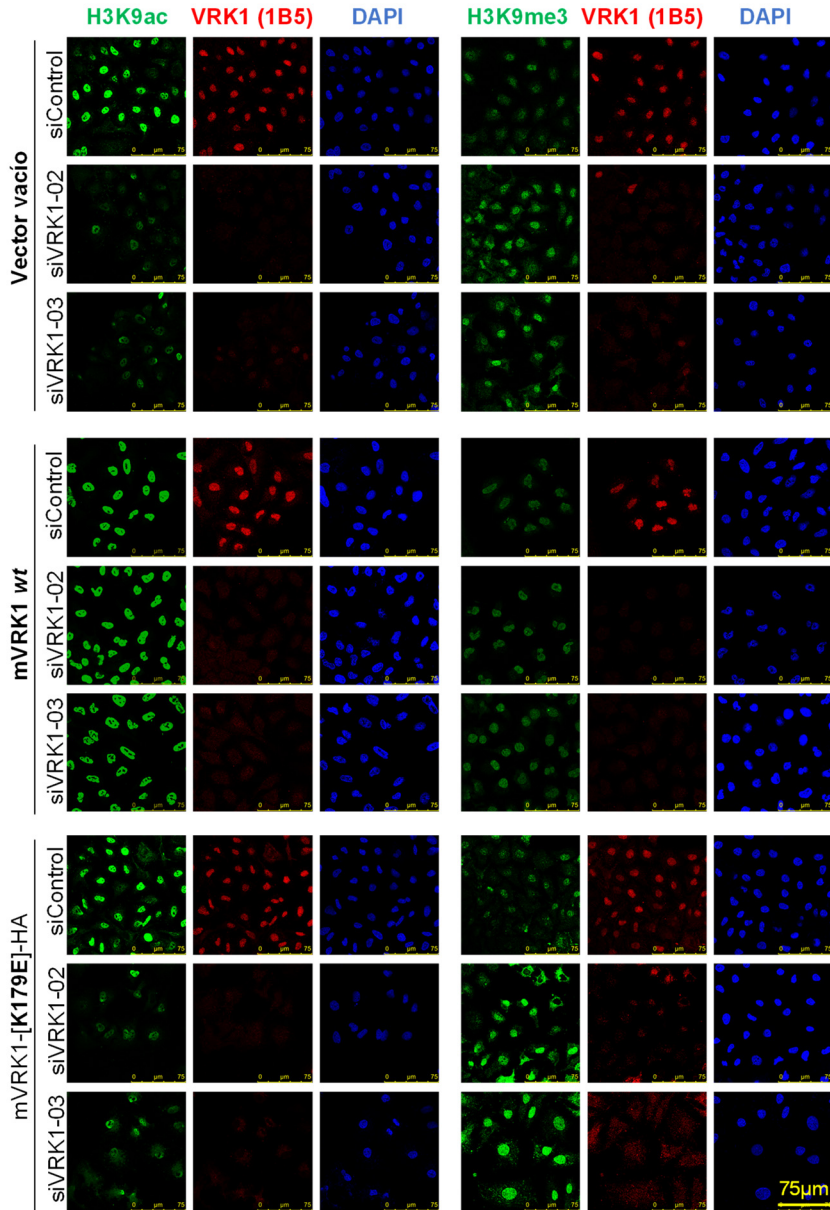
Por ese motivo, estudiamos, de forma muy preliminar, el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 9 y de la 27 de la histona H3 (H3K9ac/me3, H3K27ac/me3) en las líneas celulares generadas.

### **6.1. El patrón de acetilación y trimetilación de la H3K9 se encuentra alterado en las líneas estables**

Para estudiar el patrón de acetilación y trimetilación de H3K9 (H3K9ac/me3), silenciábamos primeramente el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos, y, estudiamos las modificaciones por medio de inmunofluorescencia y *Western blot*. Estos experimentos solo se han realizado usando las líneas control, vacío, mVRK1 *wt* y mK179E, y las que portan las variantes mR89Q, mY213H y mD263G. Observamos que, en todos los casos, existe una bajada generalizada de H3K9ac y una subida de la H3K9me3, a excepción de la línea portadora de la quinasa *wt*, en la que no hay cambios significativos en las fluorescencias de las tres muestras (Figura 43).

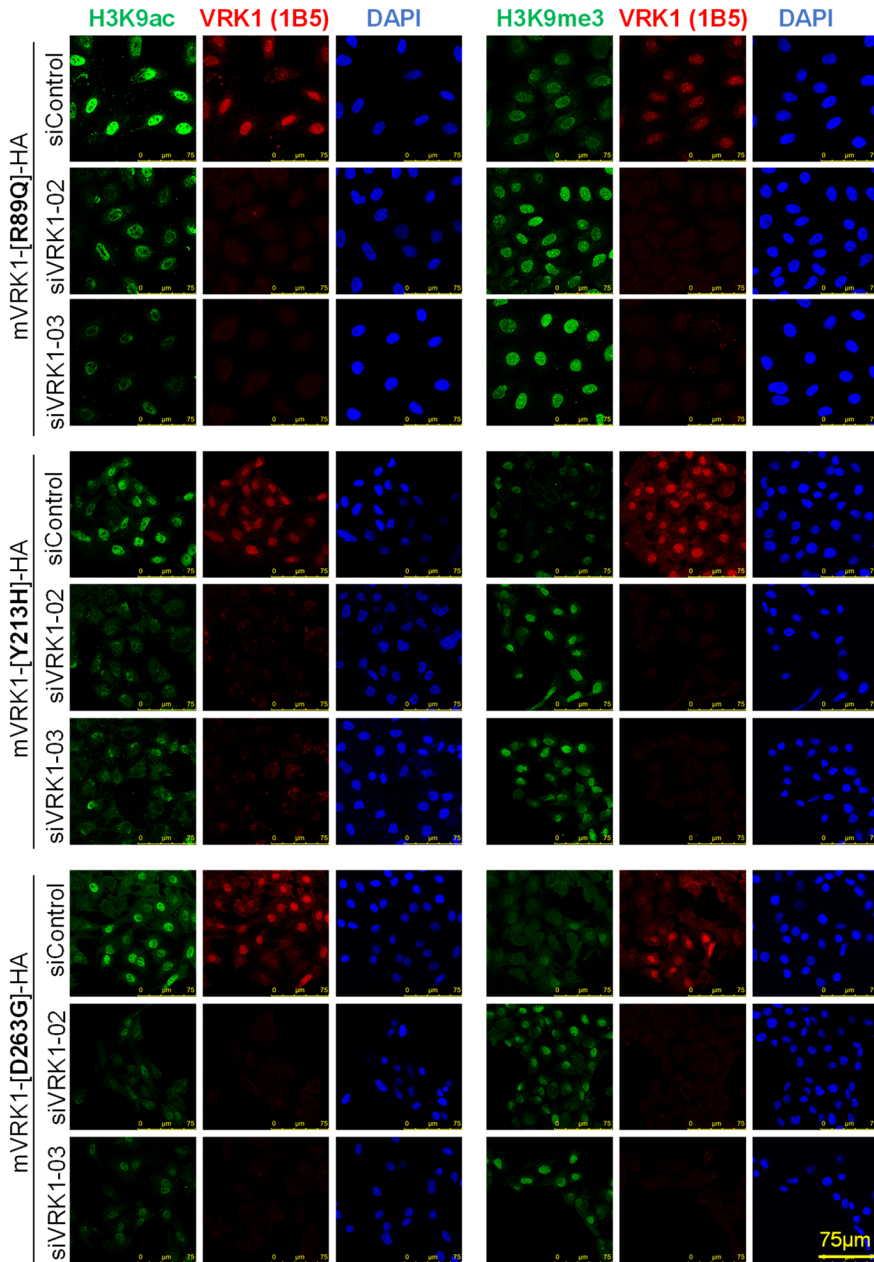
- RESULTADOS -

A

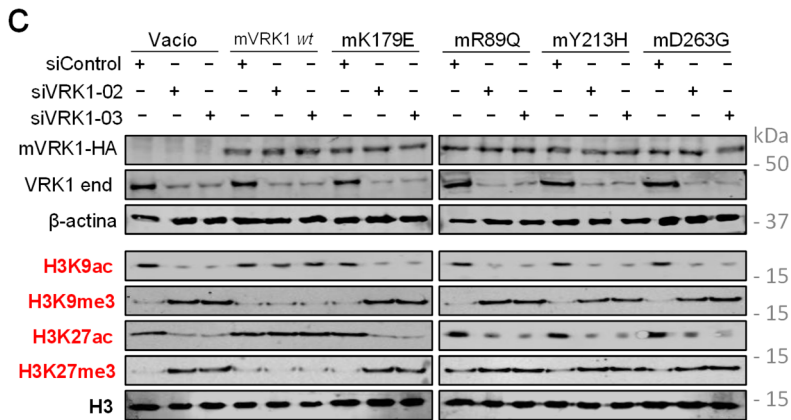
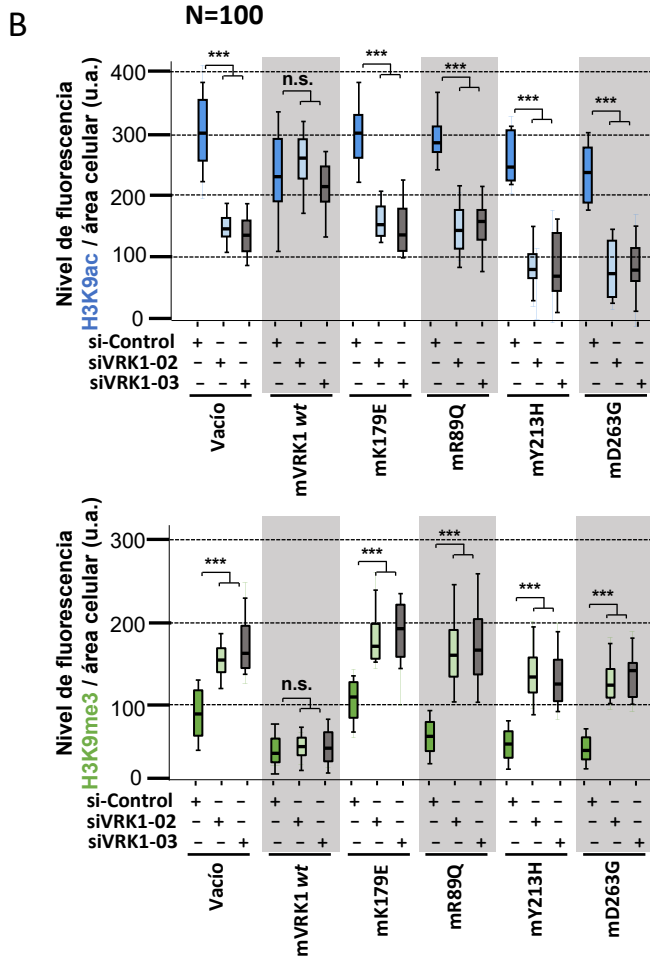




- RESULTADOS -



- RESULTADOS -



**Figura 43. Las células que expresan variantes patogénicas mR89Q, mY213H y mD263G de VRK1 muestran variaciones en el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 9 de la H3.** **A.** Inmunofluorescencia de H3K9ac/me3 en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas A549 vacío, mVRK1 wt, mK179E, mR89Q, mY213H y mD263G y se silenció el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos y un siControl. Al cabo de 24 h se eliminó el suero del medio. Pasadas 48 h, se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia detectando las modificaciones con los anticuerpos específicos y el silenciamiento efectivo de VRK1 con  $\alpha$ -1B5 (M). **B.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de H3K9ac y H3K9me3 por área celular (u.a.) de 100 células, utilizando el programa *ImageJ* y se analizaron los datos con *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ . **C.** *Western blot* en el que se observa el silenciamiento del gen *VRK1 humano* y la expresión de la variante murina. Se detectó la acetilación y trimetilación de la lisina 9 y 27 de la histona H3 con los anticuerpos específicos.

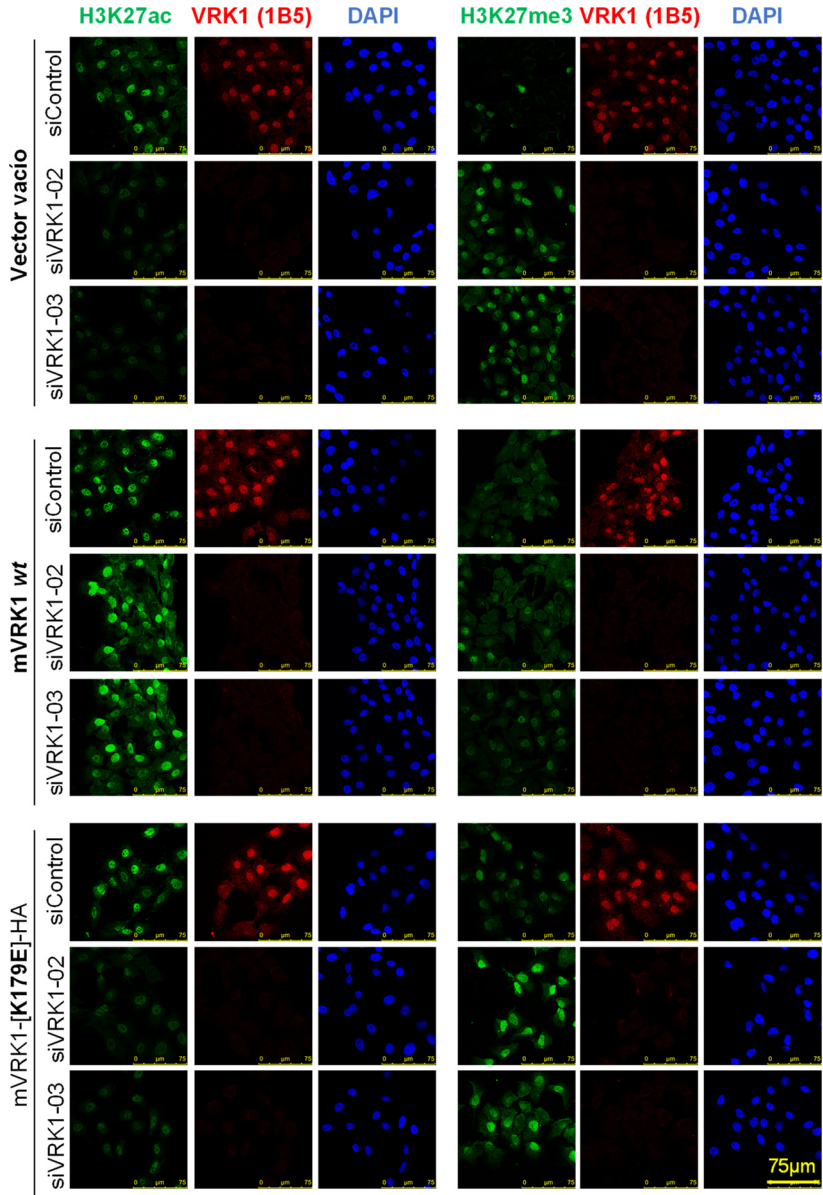
## 6.2. El patrón de acetilación y trimetilación de la H3K27 se encuentra alterado en las líneas estables

Por otra parte, los cambios en el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac/me3) también han sido ampliamente estudiados en distintas enfermedades neurodegenerativas. Hemos observado cambios en estos patrones al eliminar el VRK1 de las células (datos no publicados); sin embargo, no conocemos el mecanismo por el cual la quinasa regula esta acetilación y trimetilación. Así pues, de forma muy preliminar estudiamos estos patrones utilizando las mismas líneas que en el experimento anterior. Por medio de inmunofluorescencia y *Western blot* observamos que, al igual que ocurría con la H3K9, la acetilación del residuo se encuentra disminuida, mientras que la trimetilación aumenta cuando solo están presentes estas variantes en las células (Figura 44 y 43C). No se observan cambios en los patrones de la línea portadora de la quinasa murina wt (Figura 44 y 43C).

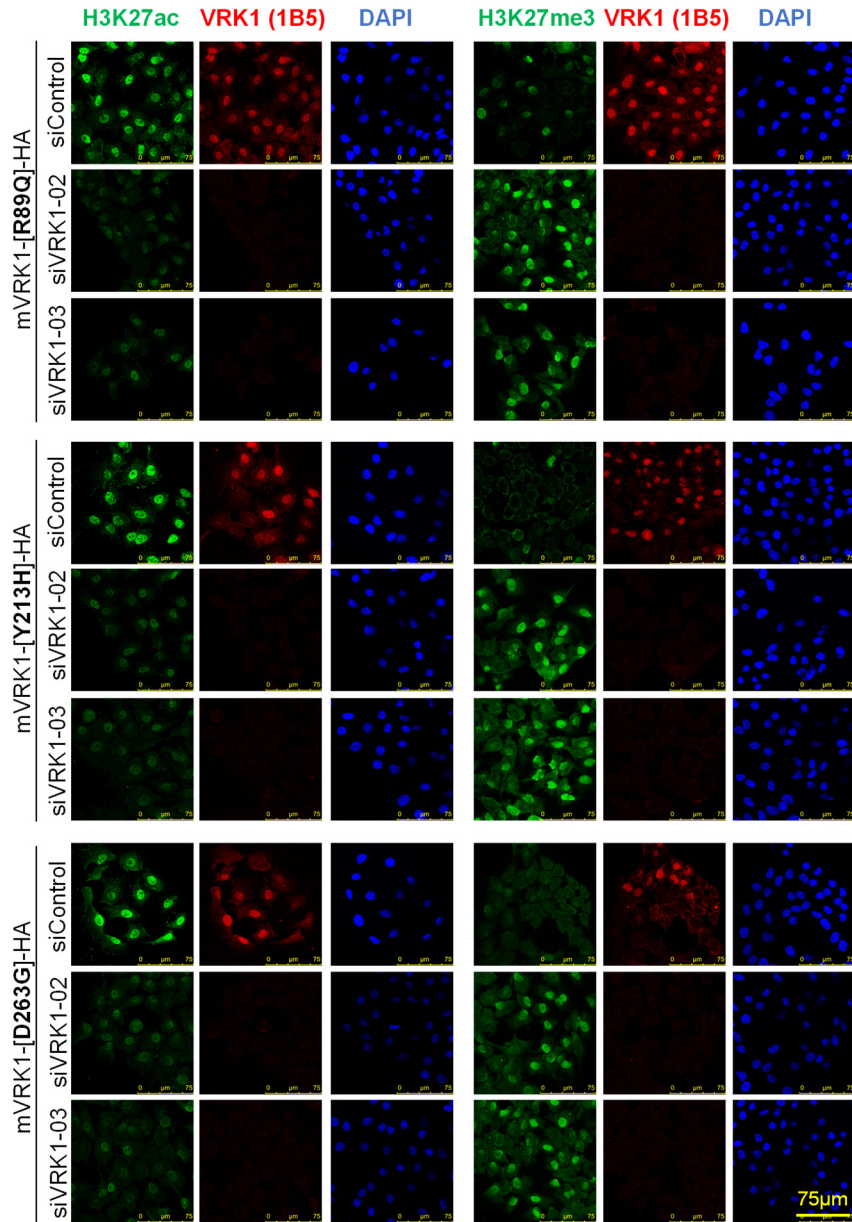
Por tanto, podemos concluir que VRK1 participa en la regulación de la acetilación y trimetilación de la H3K9 y H3K27, y en las células que portan las variantes de la quinasa dichos patrones se ven alterados, conduciendo a un estado de represión génica global. Sin embargo, se tendrá que realizar otro tipo de estudios para corroborar estos resultados.

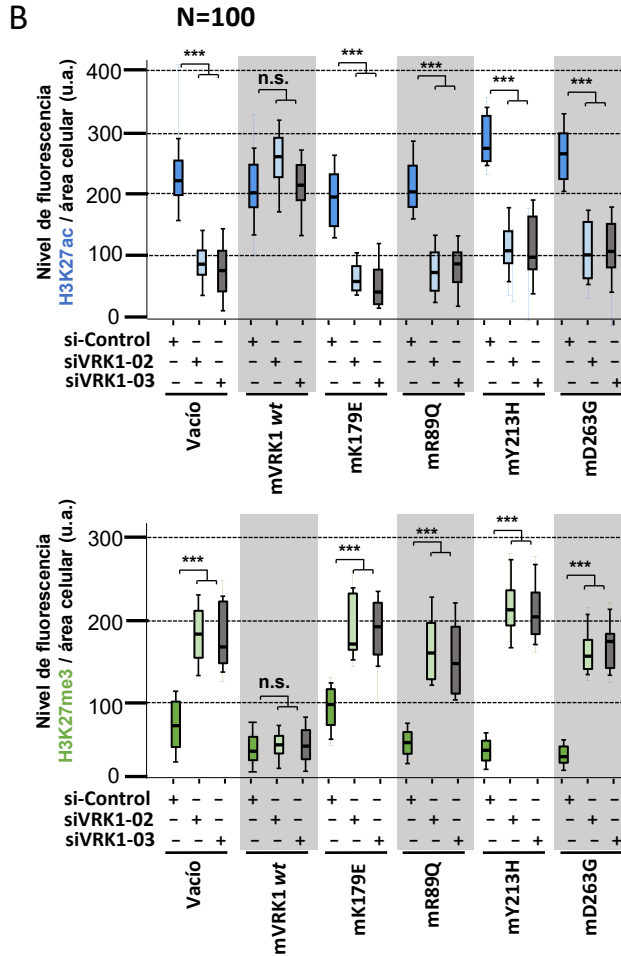
- RESULTADOS -

A



- RESULTADOS -





**Figura 44. Las células que expresan variantes patogénicas mR89Q, mY213H y mD263G de VRK1 muestran variaciones en el patrón de acetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. A.** Inmunofluorescencia de H3K27ac/me3 en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas A549 vacío, mVRK1 wt, mK179E, mR89Q, mY213H y mD263G y se silenció el gen *VRK1* humano con dos siARNs específicos y un siControl. Al cabo de 24 h se eliminó el suero del medio. Pasadas 48 h, se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia detectando las modificaciones con los anticuerpos específicos y se observó el silenciamiento efectivo de VRK1 con  $\alpha$ -1B5 (M). **B.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de H3K27ac y H3K27me3 por área celular (u.a.) de 100 células. Se cuantificó la fluorescencia utilizando el programa *ImageJ* y se analizaron los datos con el programa *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras difieren entre sí \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

## **7. La formación de los cuerpos de Cajal se ve alterada en las células que expresan la mayoría de las variantes patogénicas de VRK1**

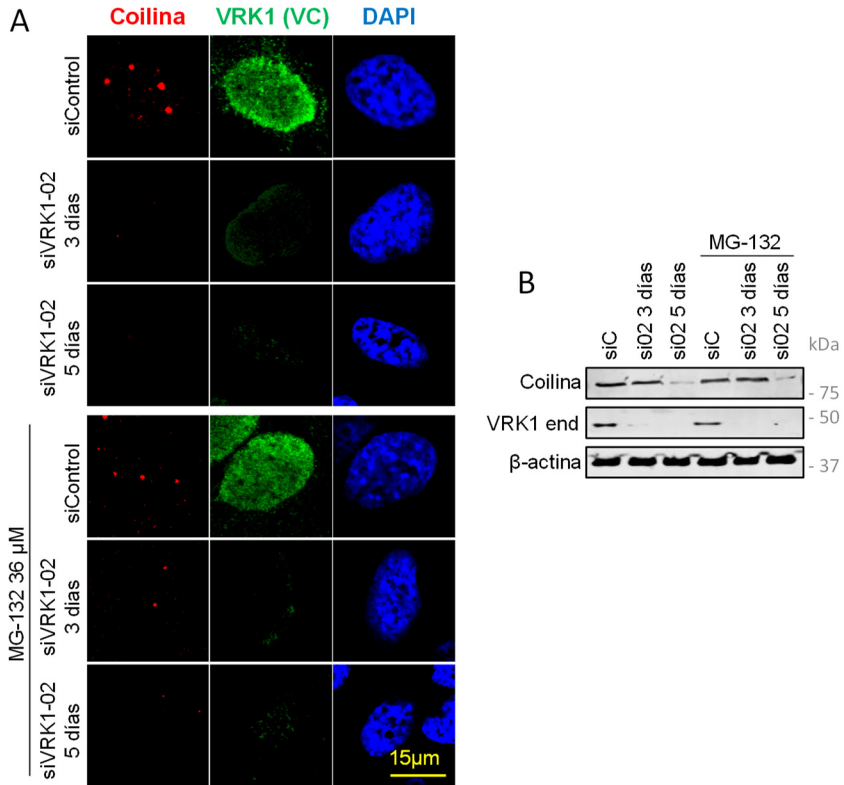
### **7.1. Se rescata la formación de los cuerpos de Cajal en la línea mR219I**

Los cuerpos de Cajal (CBs) son pequeños suborgánulos que se forman sobre todo en neuronas y células tumorales. Su función mejor caracterizada es la biogénesis de ribonucleoproteínas asociadas al *splicing*, procesamiento de ARNm de histonas y a la formación de los telómeros [110]. La proteína ‘andamio’ de los CBs es la coilina, que se asocia a SMN, a ataxina 1, implicadas en desórdenes neurodegenerativos como la atrofia muscular espinal y ataxias [155–198]. Se ha descrito que la quinasa VRK1 interacciona y fosforila a coilina al menos en el residuo serina 184, permitiéndola ensamblarse y formar los CBs. Cuando se silencia el gen *VRK1* en las células, los CBs no se ensamblan y la coilina se degrada vía proteasoma [117].

Hemos visto que la mayoría de las líneas celulares que expresan las distintas variantes de VRK1 tienen alteradas respuestas celulares importantes en el desarrollo y supervivencia celular (migración, respuesta a daño génico, cambios en los patrones epigenéticos de las histonas). Dado que el correcto ensamblaje de los cuerpos de Cajal es esencial en las neuronas debido sus altos requerimientos transcripcionales, analizamos en las líneas celulares *HeLa* generadas, la formación de estas estructuras.

Para ello, primeramente estudiamos en células *HeLa* sin infectar, el momento en el cual los CBs no se forman pero la coilina aún no se ha degradado de la célula al silenciar el gen de la quinasa, con el objetivo de tomar ese punto de referencia para estudiar el rescate de los CBs por las variantes. Observamos que al cabo de tres días de silenciamiento, los CBs no se llegan a ensamblar, pero los niveles proteicos de coilina celulares no disminuyen. Además, observamos al tratar las células con el inhibidor del proteasoma MG-132, se rescata la formación de los CBs. Sin embargo, pasados cinco días de silenciamiento del gen de la quinasa, los niveles de coilina se ven disminuidos en los extractos proteicos celulares y, aunque se

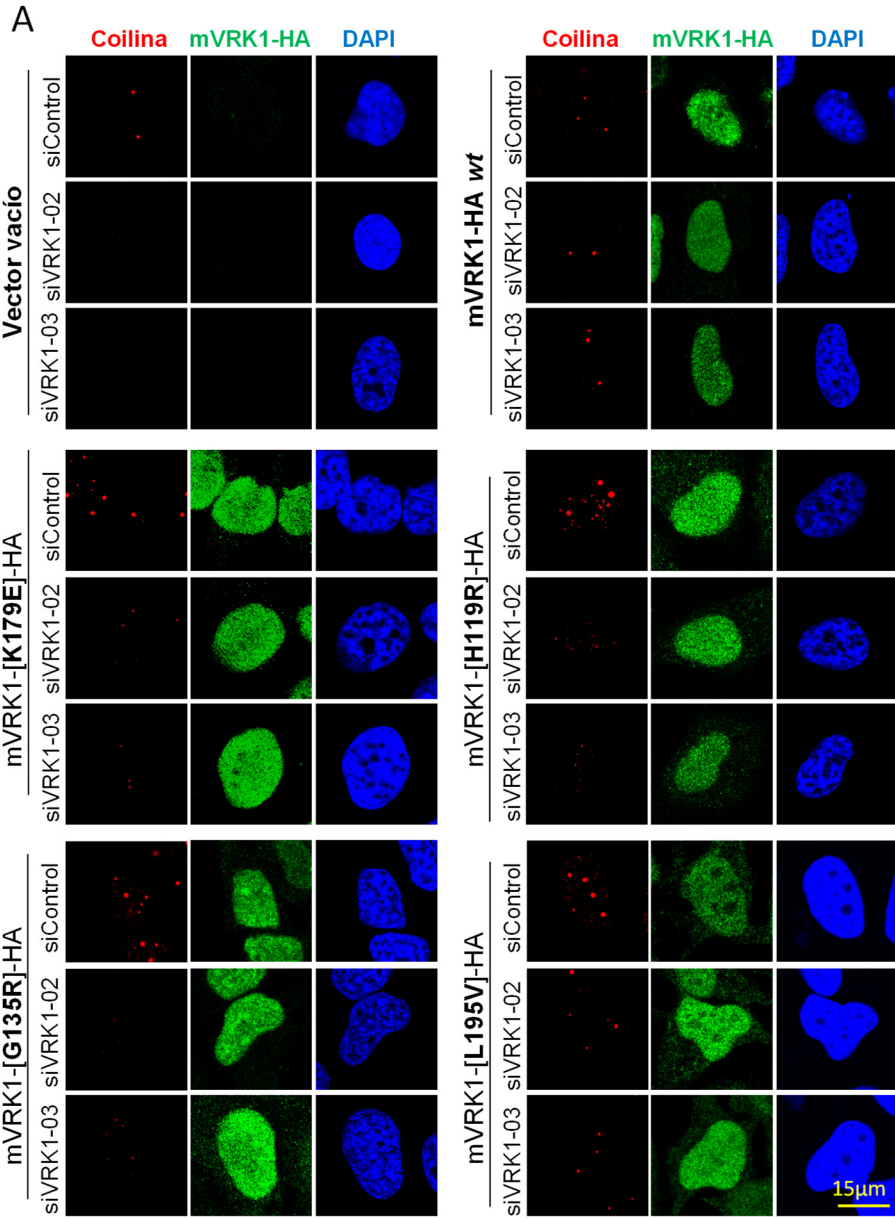
traten las células con MG-132, la formación de los CBs no se recupera (Figura 45).



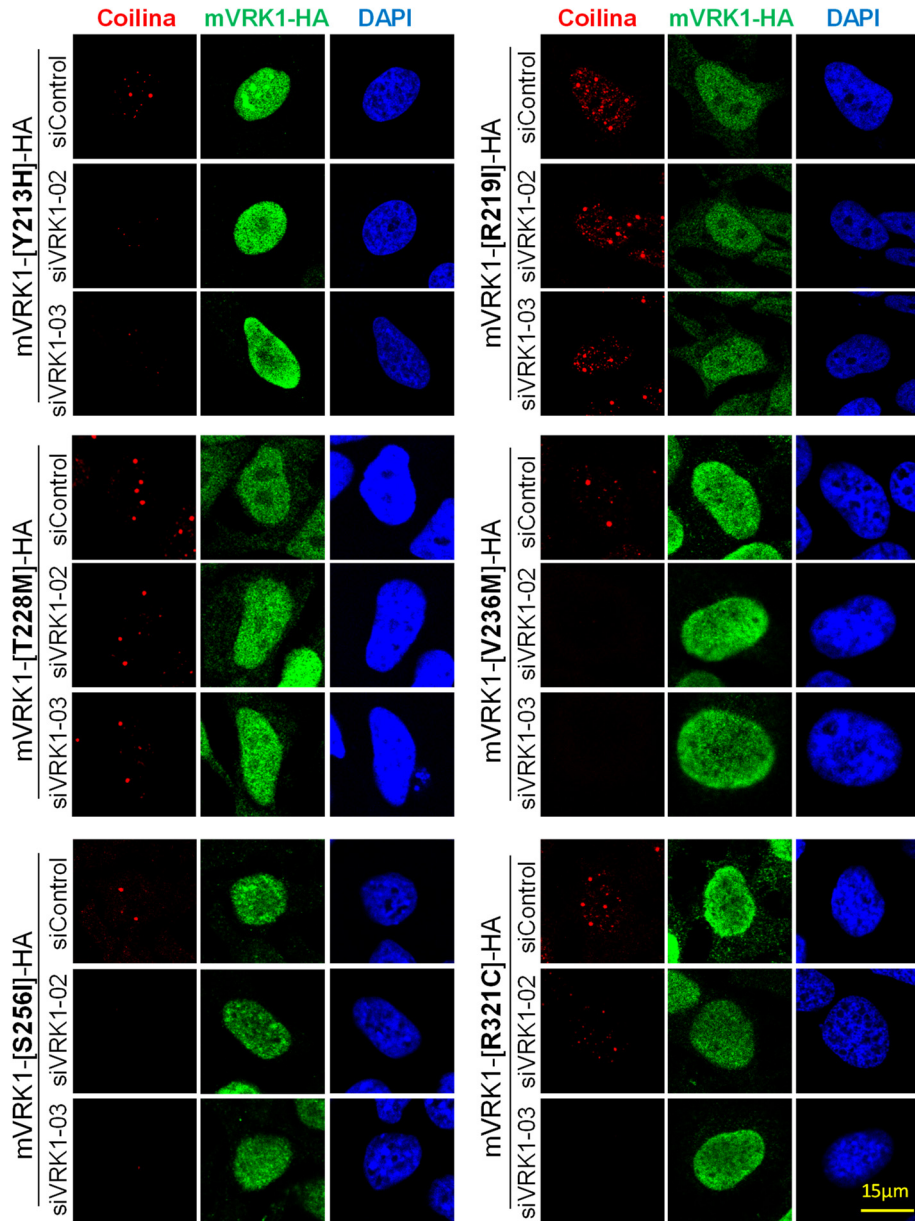
**Figura 45. A los tres días de silenciamiento del gen *VRK1* los niveles de coilina se mantienen, pero no se forman cuerpos de Cajal en células *HeLa*. A.** Inmunofluorescencia en la que se muestra que a los 3 días de silenciamiento del gen *VRK1* con un siARN específico (siVRK1-02), no se observan CBs. Sin embargo, al tratar las células con el inhibidor del proteasoma MG-132 36 μM 6 h, se muestran estas estructuras, pero no a los 5 días. **B.** *Western blot* en el que se observa que los niveles de coilina se mantienen constantes a los 3 días de silenciamiento del gen *VRK1*, pero disminuyen considerablemente a los 5 días.

Así, para estudiar el rescate de estos CBs en las líneas celulares generadas, trataremos las células con dos siARNs específicos de la quinasa humana y, después de 3 días, analizaremos su formación, cuando la coilina aún no se debería de haber degradado en las células y sería posible la formación de las estructuras.

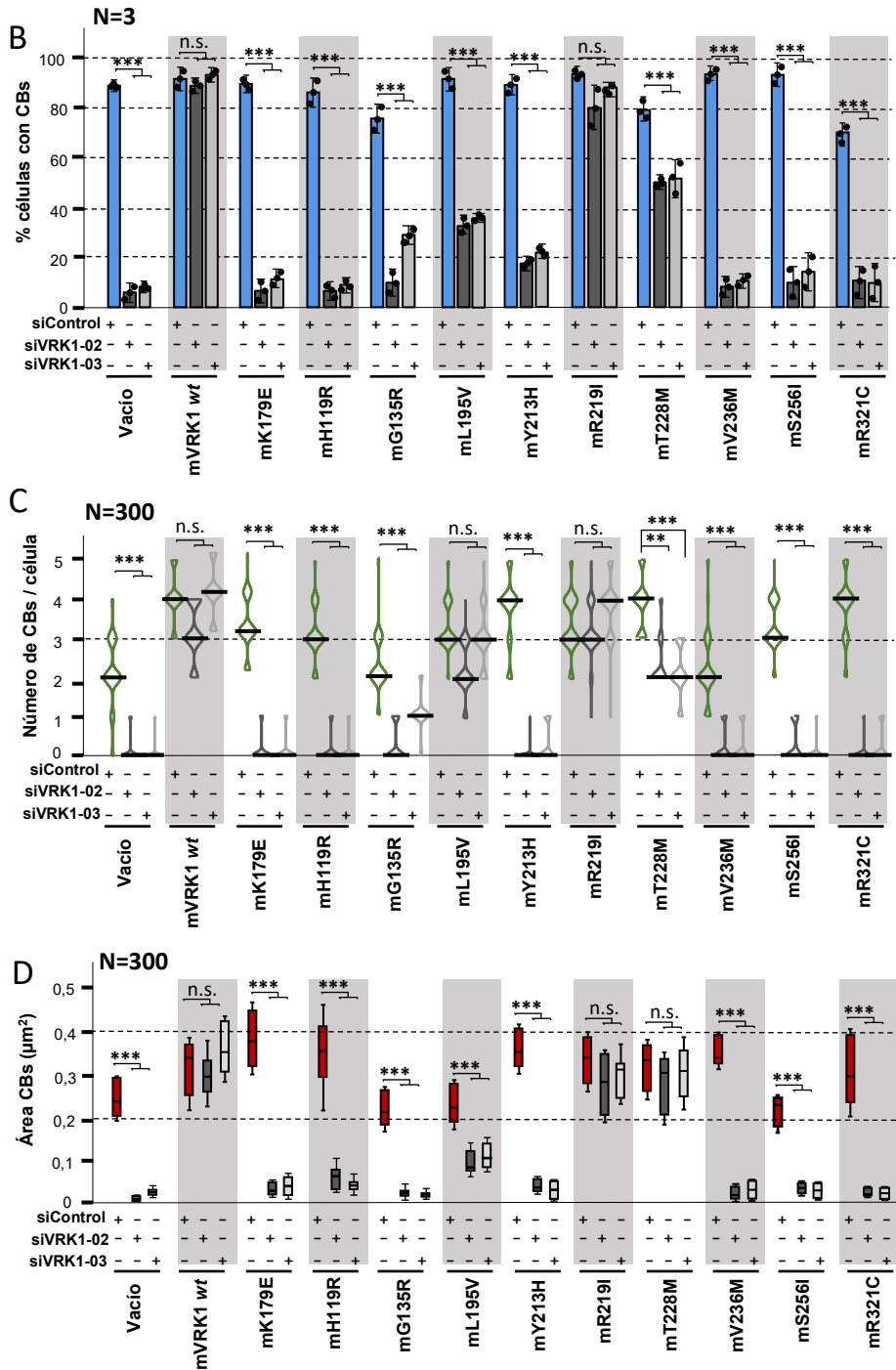




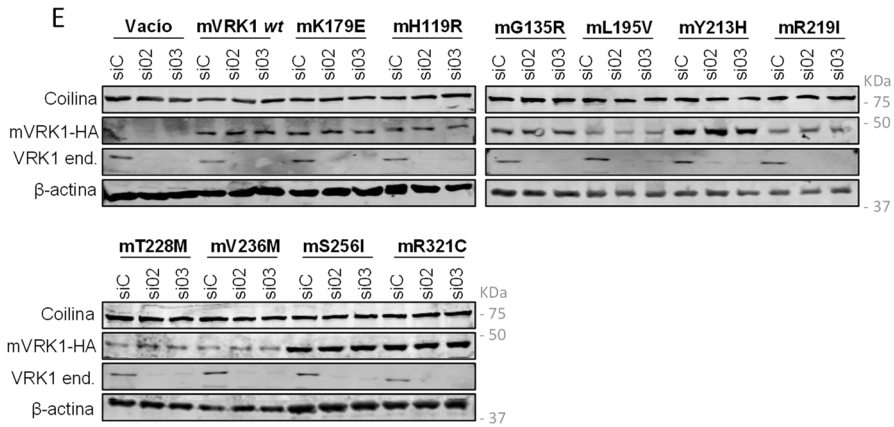
- RESULTADOS -



- RESULTADOS -



- RESULTADOS -



**Figura 46. Se rescata la formación de los CBs en la línea estable mR219I *HeLa*.** **A.** Inmunofluorescencia de los CBs (marcados con coilina) en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos. Pasadas 72 h se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia para observar los cuerpos de Cajal. **B.** Se representa el porcentaje de células que presentan CBs (N=100 células) de 3 réplicas independientes. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar la significación estadística. **C.** Se representa el número de cuerpos de Cajal que presentan las células cuantificadas (N=300 células totales). Se realizó un test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc Bonferroni para analizar la significación estadística. **D.** Se representa el área de los CBs presentes en las líneas celulares (N=300 células totales). Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían entre sí. **E.** *Western blot* en el que se observa la expresión de la coilina endógena (revelado con  $\alpha$ -Coilina (M)), de las variantes mVRK1 (revelado con  $\alpha$ -HA (M)) y el correcto silenciamiento del gen de la quinasa humana ( $\alpha$ -1F6 (M)). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

Observamos que solo se rescata la formación de los CBs en la línea estable *HeLa* que expresa la variante patogénica mR219I (Figura 46). Aproximadamente, el 80% de las células analizadas que expresan dicha variante forman CBs de unos  $0,3 \mu\text{m}^2$ , cuantificando 3 o 4 por célula (Figura 46B, C y D). En el caso de las células que expresan la variante mT228M, existe una disminución en el ensamblaje de estas estructuras del 30% (Figura 46B). Además, las células que poseen CBs, forman menor cantidad que cuando se encuentra VRK1 endógeno presente (2 CBs frente a los 4 formados cuando se expresa el VRK1 endógeno) (Figura 46C). Por otra parte, se ve muy reducido el porcentaje de células que presentan CBs en la línea mL195V, pero las que

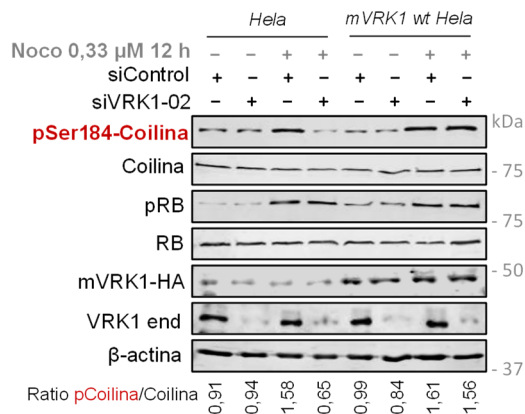
los llegan a formar, poseen un número similar a cuando se encuentra la quinasa humana presente (Figura 46B y C). Sin embargo, estas estructuras que se forman son demasiado pequeñas y puede que sean simplemente agregados de coilina, no CBs funcionales (Figura 46D).

También corroboramos que los niveles de coilina se mantienen estables en las células de todas las líneas analizadas tras los 3 días de silenciamiento del gen *VRK1 humano* (Figura 46E).

## 7.2. Durante la fase celular G2/M, el residuo serina 184 de la coilina se fosforila en las células que portan las variantes patogénicas mL195V y mR219I

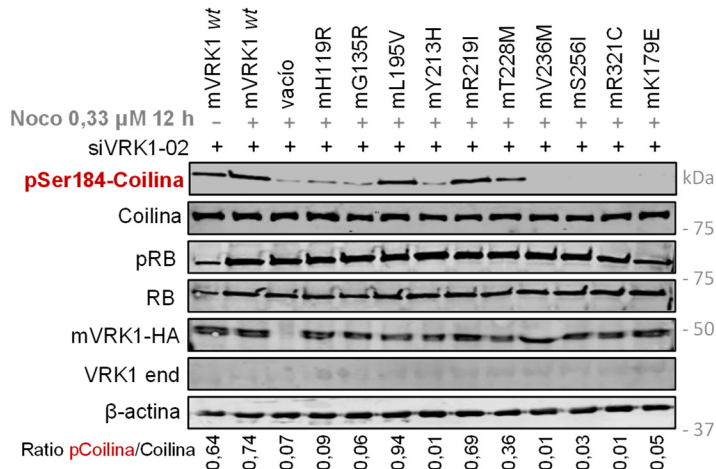
Sabemos que para la formación de los cuerpos de Cajal es necesaria la fosforilación previa de la coilina en la serina 184 durante la mitosis [117]. Una vez visto que solo las líneas que expresan la quinasa murina *wt* y la variante mR219I son capaces de recuperar la formación de los CBs, quisimos comprobar si, durante la mitosis, la serina 184 de la coilina de las líneas se encontraba fosforilada.

Para ello, primeramente corroboramos que la fosforilación de este residuo era máxima durante esta fase del ciclo, y que con la depleción del VRK1 humano, dichos niveles disminuían. La quinasa VRK1 murina además rescata los niveles de esta fosforilación durante la mitosis (Figura 47).



**Figura 47. Durante la mitosis, se fosforila el residuo Ser184 de la coilina y se rescata esta fosforilación con la expresión de la quinasa VRK1 murina.** Se sembraron células *HeLa* sin infectar y *HeLa* que expresan la quinasa murina *wt*. Pasadas 24 h, se silenció el gen de la quinasa humana con el siARN siVRK1-02 específico y un siControl. Pasadas 72 h, se trataron las células correspondientes con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y, posteriormente, se lisaron. Se realizó un *Western blot* de las muestras y se analizaron los niveles de fosforilación del residuo Ser184 de la coilina con su anticuerpo específico, relativizándolo con respecto a los niveles de coilina total (revelado con  $\alpha$ -Coilina (R)). Se utilizaron los niveles de pRB como control de parada de ciclo celular en G2/M. Se comprobó la expresión de la quinasa murina *wt* en la línea estable con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6.

Así, estudiamos la fosforilación de este residuo de la coilina en las líneas estables *HeLa*, durante G2/M y habiendo silenciado el gen de la quinasa humana. Observamos que en las células de las líneas que expresan las variantes mL195V y mR219I la coilina se encuentra fosforilada. También se detecta dicha fosforilación en las células que poseen mT228M, pero en niveles más bajos. En el resto de las líneas estables no se observa fosforilación de este residuo de la coilina (Figura 48).



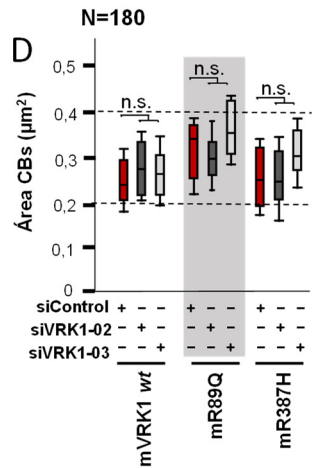
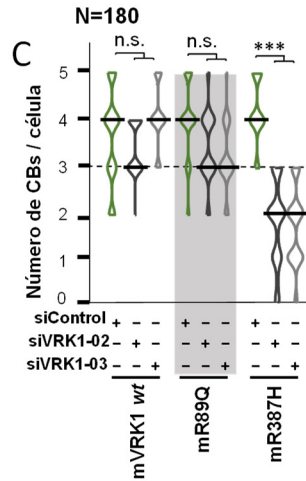
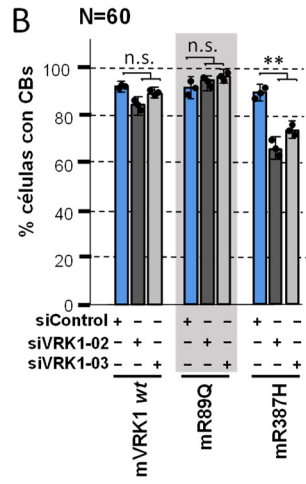
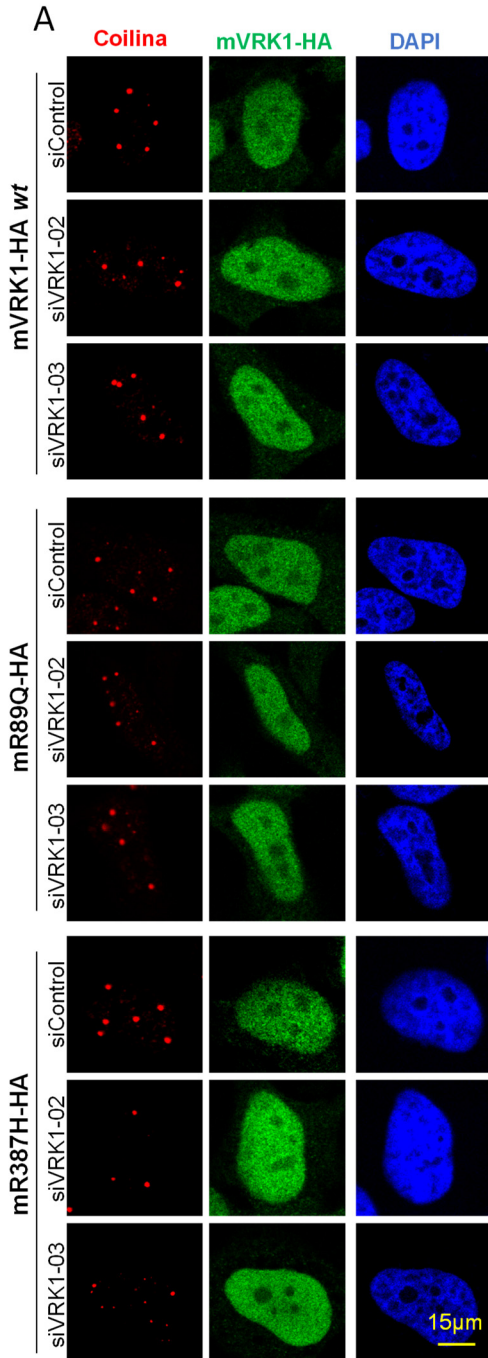
**Figura 48. La fosforilación de la serina 184 de la coilina se pierde en la mayoría de las líneas *HeLa* que expresan las variantes patogénicas de mVRK1.** Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* hasta ahora generadas. Se silenció el gen *VRK1 humano* con el siARN específico siVRK1-02 y un siControl pasadas 24 h. Tras 72 h se trataron las células con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y se lisaron las células. Se

realizó un *Western blot* de las muestras y se analizaron los niveles de coilina fosforilada en el residuo serina 184 con un anticuerpo específico. Se utilizaron los niveles de pRB como control de parada de ciclo celular en mitosis. Se comprobó la expresión de las quinasas murinas en las líneas estables con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. Se realizó el experimento por triplicado y se analizaron los datos con el programa *ImageJ*. Solo se muestra una réplica.

### **7.3. Se rescata la formación de los CBs en células que expresan la variante patogénica mR89Q, encontrándose la Ser184 de la coilina fosforilada**

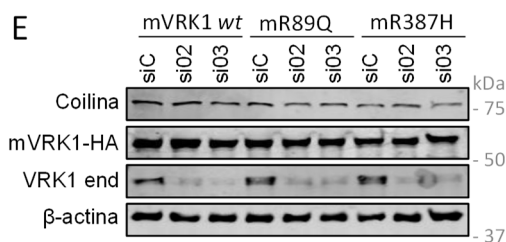
Dado que hemos observado que aparte de L195V, R219I y T228M, las variantes R89Q, W375X y R387H también son capaces de fosforilar *in vitro* en mayor o menor medida la coilina (Figura 29 y [107]) analizamos la formación de los cuerpos de Cajal en células que las expresan. No fue posible realizar el experimento con la variante W375X debido a que no poseemos aún la construcción plasmídica. Así pues, transfectando células *HeLa* con plásmidos que poseen *VRK1* murino *wt* y las mutaciones mR89Q y mR387H, y silenciando el gen de la quinasa humana durante 3 días, observamos que en las células que presentan mR89Q se rescata la formación de los cuerpos de Cajal. En presencia de mR387H, el porcentaje de células que poseen estas estructuras se ve significativamente reducido, presentando además un menor número de CBs en las que los llegan a formar (Figura 49).

- RESULTADOS -





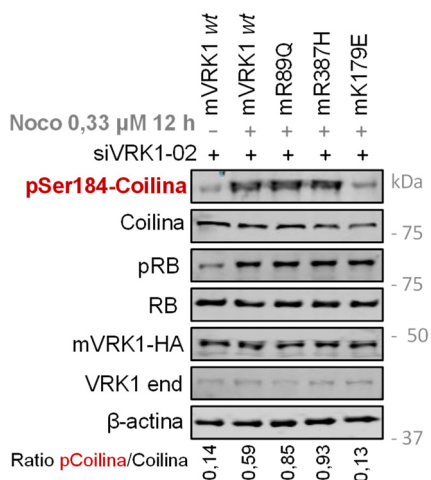
- RESULTADOS -



**Figura 49. La variante patológica de VRK1 murino mR89Q, rescata la formación de los CBs en las células.** **A.** Inmunofluorescencia de los CBs (marcados con coilina) en las células transfectadas). Se sembraron células *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1 humano* con dos siARNs específicos y un siControl. Pasadas 12 h, se transfectaron las células con las construcciones pLenti-mVRK1-HA, pLenti-mVRK1-[R89Q]-HA y pLenti-mVRK1-[R387H]-HA. Tras 72 h, se fijaron las células. Se analizó la formación de los CBs por medio de inmunofluorescencia, marcando la coilina con un anticuerpo específico. Se comprobó la expresión de las proteínas murinas usando el anticuerpo  $\alpha$ -HA (R). **B.** Se representa el porcentaje de células que presentan CBs (N=60 células) de 3 réplicas independientes. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar la significación estadística. **C.** Se representa el número de cuerpos de Cajal que presentan las células cuantificadas (N=180 células totales). Se realizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc Bonferroni para analizar la significación estadística. **D.** Se representa el área de los CBs presentes en las líneas celulares (N=180 células totales). Los datos se analizaron con el programa *ImageJ* y *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían. **E.** *Western blot* en el que se muestra la correcta expresión de las variantes murinas transfectadas y el control de silenciamiento de la quinasa humana. Se marca la coilina con el anticuerpo específico  $\alpha$ -Coilina (R). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

Además, analizamos la fosforilación de la Ser184 de la coilina de dichas células durante la mitosis. Para ello, transfectamos células *HeLa* con los plásmidos que portan las mutaciones murinas de VRK1 mR89Q y mR387H y se silenció el gen de la quinasa humana. Se trataron con nocodazol para paralarlas en fase G2/M después de 3 días de silenciamiento y se analizó la fosforilación del residuo. Pudimos comprobar que la coilina se encontraba fosforilada en las células que expresaban ambas variantes (Figura 50).

- RESULTADOS -



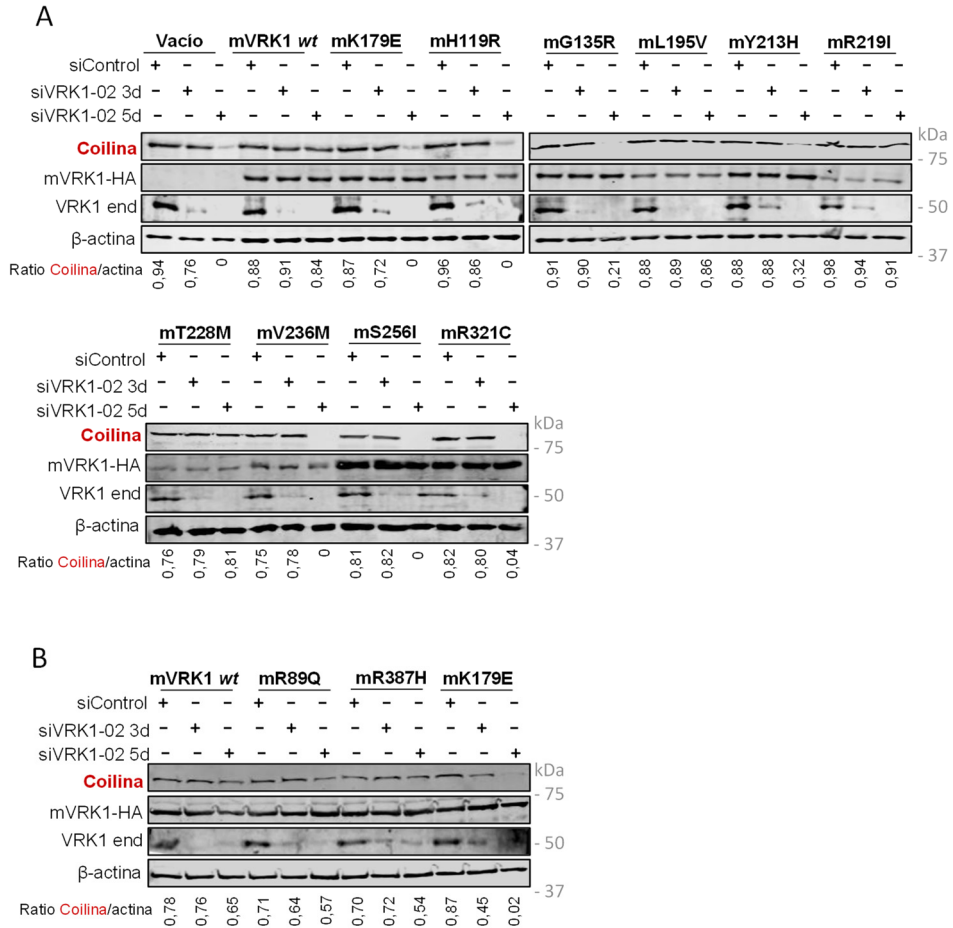
**Figura 50. El residuo Ser184 de la coilina se encuentra fosforilado en las células que expresan las variantes patogénicas murinas de VRK1 mR89Q y mR387H.** Se sembraron células *HeLa* y se transfearon con las construcciones pLenti-mVRK1-HA, pLenti-mVRK1-[R89Q]-HA, pLenti-mVRK1-[R387H]-HA y pLenti-mVRK1-[K179E]-HA. Se silenció el gen *VRK1 humano* con el siARN específico siVRK1-02 pasadas 24 h. Tras 72 h se trataron las células con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y se lisaron. Se realizó un *Western blot* de las muestras y se analizaron los niveles de coilina fosforilada en el residuo serina 184 con un anticuerpo específico. Se utilizaron los niveles de pRB como control de parada de ciclo celular en mitosis. Se comprobó la eficiencia de la transfección con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. Se realizó el experimento por triplicado y se analizaron los datos con el programa *ImageJ*. Solo se muestra una réplica.

#### 7.4. Los niveles de coilina se mantienen estables en presencia de mL195V, mR219I, mT228M, mR89Q y mR387H a los 5 días de silenciamiento del gen *VRK1 humano*, encontrándose la Ser184 de dicha proteína fosforilada

Hemos visto que a los 5 días de silenciamiento del gen de la quinasa VRK1, los niveles totales de coilina en células *HeLa* disminuían. Esto es debido a que se degrada vía proteasoma al no poder ser fosforilada por VRK1 (Figura 45 y [199]). Al haber observado que algunas de las variantes de VRK1 eran capaces de fosforilar a la coilina, lo siguiente que quisimos estudiar fue si esta fosforilación la protegía de su degradación vía proteasoma. Para ello,

- RESULTADOS -

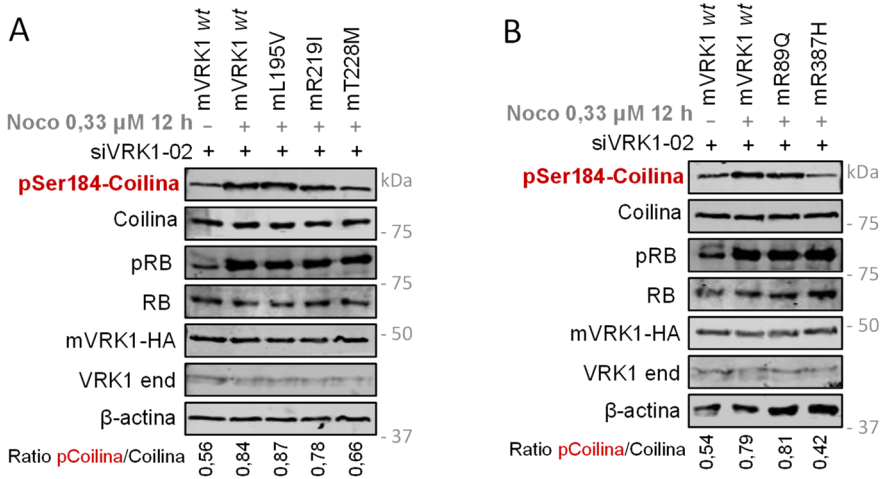
sembramos células de las líneas *HeLa* estables y silenciamos el gen *VRK1* endógeno. Después de 3 y 5 días, las lisamos y analizamos los niveles de coilina en las muestras. Observamos que los niveles de la proteína se mantienen estables a los 3 días de silenciamiento en todas las líneas estudiadas. Sin embargo, a los 5 días, se observa una bajada muy drástica de dichos niveles en la mayoría de las líneas, a excepción de en las células que expresan las variantes mL195V, mR219I y mT228M (Figura 51A). Se realizó el mismo experimento transfectando células *HeLa* con las construcciones que poseen las mutaciones mR89Q y mR387H murinas. Se observó que, tanto a los 3 días de silenciamiento del gen humano como a los 5 días, los niveles de coilina se mantenían estables (Figura 51B).



**Figura 51. Los niveles de coilina no disminuyen en presencia de las variantes patogénicas de VRK1 mL195V, mR219I, mT228M, mR89Q y mR387H.** **A.** Los niveles de coilina no disminuyen en presencia de las variantes mL195V, mR219I y mT228M. Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico o un siControl. Se lisaron las células a los 3 y 5 días (3d y 5d) y se analizaron los niveles de coilina con el anticuerpo específico  $\alpha$ -Coilina (R). Se comprobó la expresión de las variantes murinas en las líneas estables con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. **B.** Los niveles de coilina no disminuyen en presencia de las variantes mR89Q y mR387H. Se sembraron células *HeLa* y se transfectaron con las construcciones pLenti-mVRK1-HA, pLenti-mVRK1-[K179E]-HA, pLenti-mVRK1-[R89Q]-HA y pLenti-mVRK1-[R387H]-HA. Tras 12 h se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico. Se lisaron las células a los 3 y 5 días (3d y 5d) y se analizaron los niveles de coilina con el anticuerpo específico  $\alpha$ -Coilina (R). Se comprobó la expresión de las variantes murinas con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. Se realizó el experimento por duplicado y se analizaron los datos con el programa *ImageJ*. Solo se muestra una réplica. Se representa la ratio Coilina /actina.

Además, quisimos comprobar si, efectivamente, esta coilina a los 5 días de silenciamiento del gen de la quinasa humana se encontraba fosforilada en el residuo serina 184 en las líneas que expresaban mL195V, mR219I y mT228M, así como en las células que presentan mR89Q y mR387H. Para ello, observamos dicha fosforilación durante la fase G2/M, corroborando que dicho residuo se encontraba fosforilado en todos los casos. Dichos niveles de fosforilación eran ligeramente menores en las células que expresaban mT228M y mR387H comparados con los que se mostraban en las que poseían la quinasa murina *wt* (Figura 52).

- RESULTADOS -



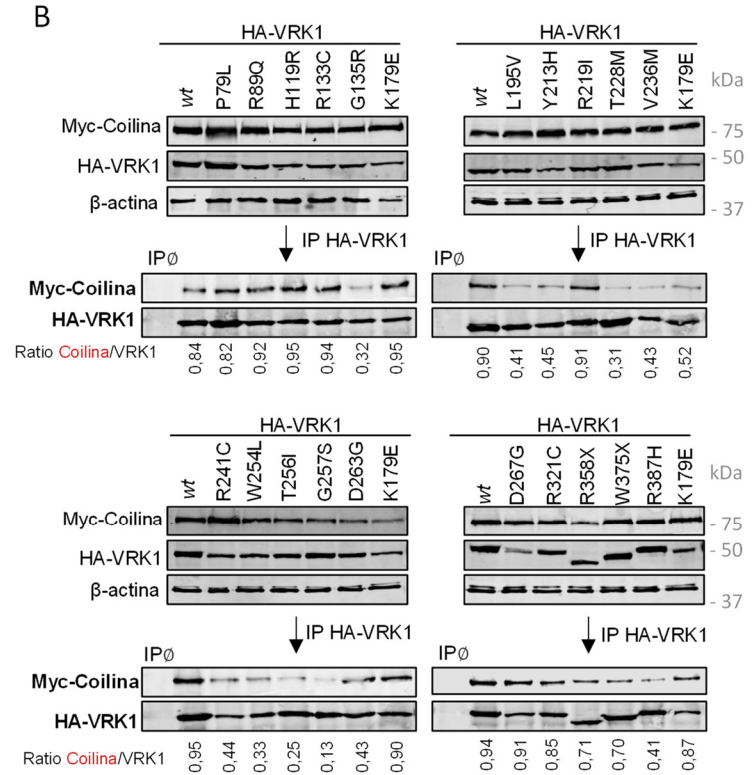
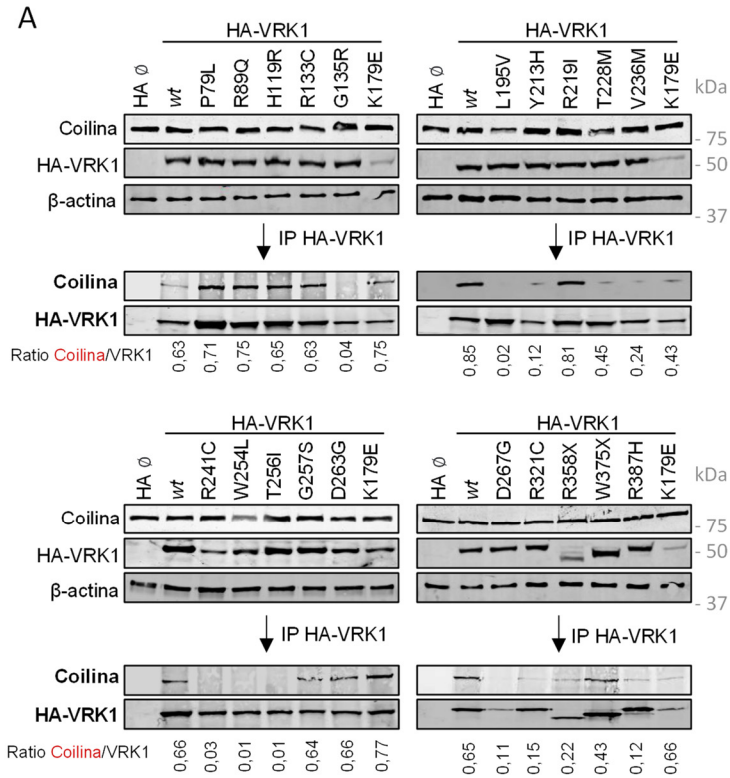
**Figura 52. En presencia de las variantes patogénicas de VRK1 mL195V, mR219l, mT228M, mR89Q y mR387H, la coilina se encuentra fosforilada en el residuo serina 184.** **A.** En presencia de las variantes mL195V, mR219l y mT228M la coilina se encuentra fosforilada en el residuo serina 184. Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico. Tras 4 días, se trataron las células con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y se lisaron. Se analizaron los niveles de coilina fosforilada en el residuo Ser184 con su anticuerpo específico. Se comprobó la expresión de las variantes murinas en las líneas estables con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. **B.** En presencia de las variantes mR89Q y mR387H la coilina se encuentra fosforilada en el residuo serina 184. Se sembraron células *HeLa* y se transfetaron con las construcciones pLenti-mVRK1-HA, pLenti-mVRK1-[R89Q]-HA y pLenti-mVRK1-[R387H]-HA. A las 12 h se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico. Pasados 4 días, se trataron las células con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y se lisaron. Se analizaron los niveles de coilina fosforilada en el residuo Ser184 con su anticuerpo específico. Se comprobó la expresión de las variantes murinas con el anticuerpo  $\alpha$ -HA (M) y la eficacia del silenciamiento del gen *VRK1 humano* con  $\alpha$ -1F6. Se realizó el experimento por duplicado y se analizaron los datos con el programa *ImageJ*. Solo se muestra una réplica. Se representa la ratio pCoilina /coilina.

Con todos estos experimentos podemos concluir que es necesaria la actividad catalítica de VRK1, aunque sea mínima, para que la coilina se pueda fosforilar y no degradarse vía proteasoma. Sin embargo, no solo la fosforilación es necesaria para la formación de los cuerpos de Cajal, dado que las células que portan las variantes mL195V, mT228M y mR387H, sufren alteraciones en su correcto ensamblaje.

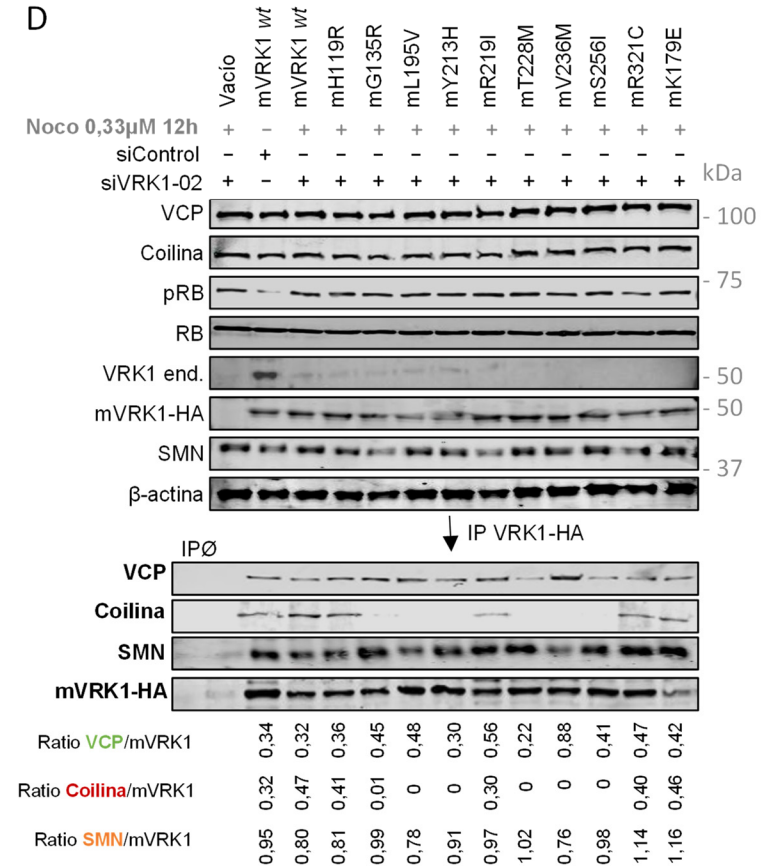
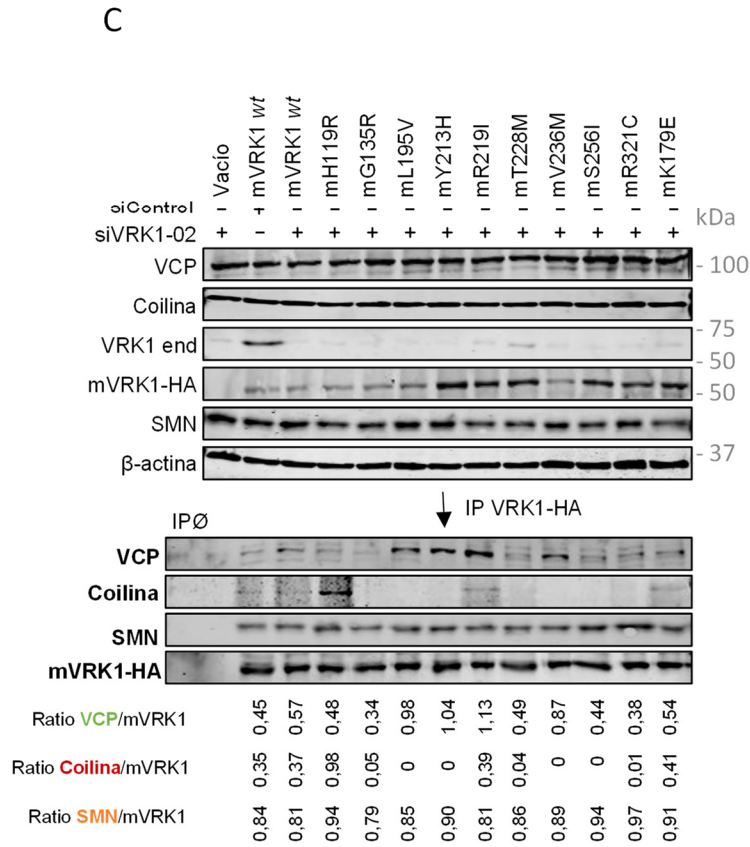
## **7.5. La mayoría de las variantes patogénicas de VRK1 pierden la interacción con la coilina**

La fosforilación de la coilina no es necesaria para su interacción con la quinasa VRK1. Sin embargo, se ha comprobado que la interacción entre estas dos proteínas es esencial que ocurra durante la mitosis para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal [117]. Así, quisimos comprobar si la interacción entre las variantes y coilina se veía alterada. Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de las variantes patogénicas humanas de VRK1 con coilina endógena y Myc-Coilina, transfectadas en la línea celular *HEK-293T*, observando una alteración en las interacciones. Se pudo observar una pérdida significativa de la interacción de dicha proteína con G135R, L195V, Y213H, T228M, V236M, R214C, W254L, T256I y G257S (Figura 53A y B). Además, quisimos comprobar que las variantes murinas de la quinasa se comportaban de igual forma en cuanto a su interacción con dicha proteína. Así pues, se realizaron nuevamente inmunoprecipitaciones de las variantes murinas con coilina endógena usando células de las líneas estables *HeLa*. Volvemos a observar una pérdida de la interacción con mG135R, mL195V, mY213H, mT228M, mV236M y mS256I tanto en células asincrónicas (Figura 53C) como en mitosis (Figura 53D), cuando dicha interacción es máxima [199].

- RESULTADOS -



- RESULTADOS -





**Figura 53. La interacción Coilina-VRK1 se ve alterada cuando se expresan las variantes patogénicas de la quinasa.** **A.** Interacción entre coilina endógena y las variantes de VRK1 humanas. Se transfectaron células *HEK-293T* con los plásmidos pCELF-HA-VRK1 que presentan las distintas mutaciones de la quinasa y, al cabo de 48 h, se inmunoprecipitaron las variantes con  $\alpha$ -HA (R) de 1 mg de extracto proteico y se detectó coilina con  $\alpha$ -Coilina (R). **B.** Interacción entre Myc-Coilina y las variantes de VRK1 humanas. Se transfectaron células *HEK-293T* con los plásmidos pCELF-HA-VRK1 que presentan las distintas mutaciones de la quinasa y pCMV6-Myc-DKK-Coilina y, al cabo de 48 h, se inmunoprecipitaron las variantes con  $\alpha$ -HA (R) de 0,5 mg de extracto proteico y se detectó coilina con  $\alpha$ -Myc (M). **C.** Interacción entre coilina y las variantes de VRK1 murinas en células asincrónicas. Se sembraron células de las líneas *HeLa* generadas y se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico. Tras 72 h, se inmunoprecipitaron las variantes con  $\alpha$ -HA (R) de 1 mg de extracto proteico y se detectó la coilina endógena, SMN y VCP. **D.** Interacción entre coilina y las variantes de VRK1 murinas en células en mitosis. Se sembraron células de las líneas *HeLa* generadas y se silenció el gen de la quinasa humana con un siARN específico. Tras 72 h, se trataron las células con nocodazol 0,33  $\mu$ M durante 12 h y se inmunoprecipitaron las variantes con  $\alpha$ -HA (R) de 1 mg de extracto proteico. Se detectó la coilina endógena, SMN y VCP. Los experimentos se realizaron por duplicado. Se presenta la ratio de las proteínas con respecto del control de la IP (HA-VRK1 o mVRK1-HA). Se representa una réplica.

Estos resultados indican que la mayoría las variantes patogénicas de VRK1 no interaccionan con coilina. La pérdida de la interacción entre esta proteína y L195V, T228M y R387H podría ser una posible causa de que los cuerpos de Cajal no se lleguen a formar correctamente en las células que las expresan.

## 8. Efecto de VRK1 en SMN y VCP

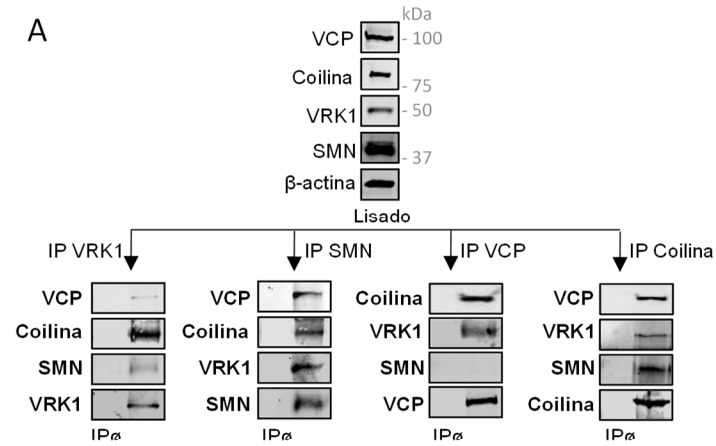
### 8.1. VRK1, SMN, VCP y coilina interaccionan entre sí

Las enfermedades neurodegenerativas SMA, ALS o HMSN tienen origen genético, pero los genes implicados son muy diversos. Una de las causas de padecer SMA, son mutaciones en el gen *SMN1*, que provocan la pérdida de esta proteína. SMN es una proteína esencial en el metabolismo de los ARNs, y se encuentra en el citosol, geminas y cuerpos de Cajal, donde interacciona con coilina [117]. Por otra parte, VCP es una ATPasa que participa en diversos procesos celulares. Mutaciones en esta proteína están relacionadas con ALS y demencia frontotemporal (FTD) [201].

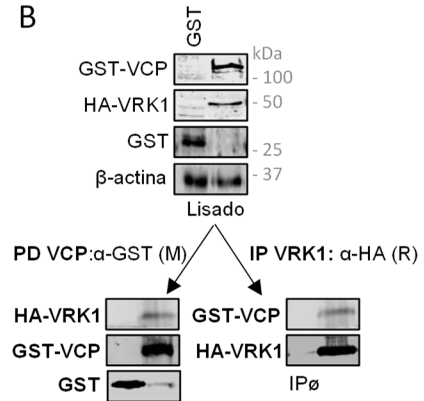
Así, dado que los pacientes que portan las variantes de la quinasa presentan enfermedades que se han visto también cuando SMN y VCP se encuentran mutadas, quisimos estudiar la relación entre la quinasa y estas proteínas. Conocemos que la quinasa VRK1 interacciona con coilina y, coilina interacciona con SMN por la región Tudor de esta [117–121]. En el laboratorio, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas de las posibles proteínas candidatas a interaccionar con VRK1, de las cuales se identificaron SMN, VCP y coilina. Por ese motivo, quisimos comprobar primeramente si estas cuatro proteínas interaccionaban entre sí, formando complejos que se viesan comprometidos cuando alguna de ellas apareciese mutada. Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de dichas proteínas endógenas (Figura 54A) o transfectadas con las construcciones pCELF-HA-VRK1, pCELF-GST-VCP, pCMV6-Myc-DKK-Coilina y pCMV6-Myc-DKK-SMN (Figura 54B, C y D) en la línea celular *HEK-293T*, observando interacción en todos los casos.

- RESULTADOS -

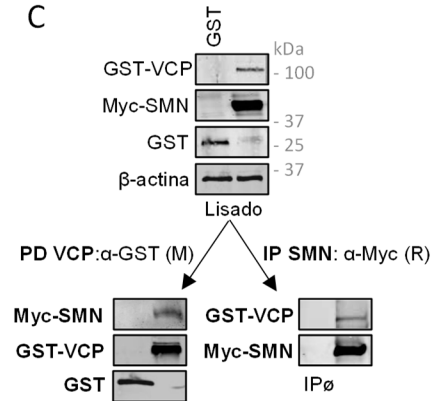
A



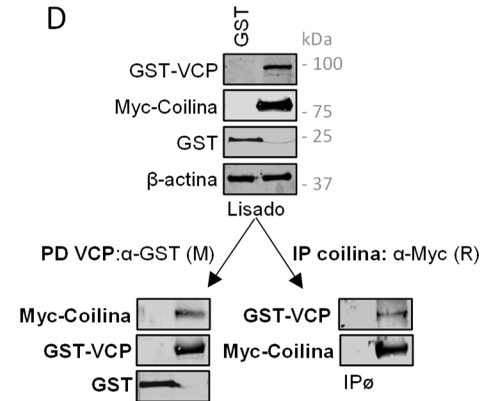
B



C



D

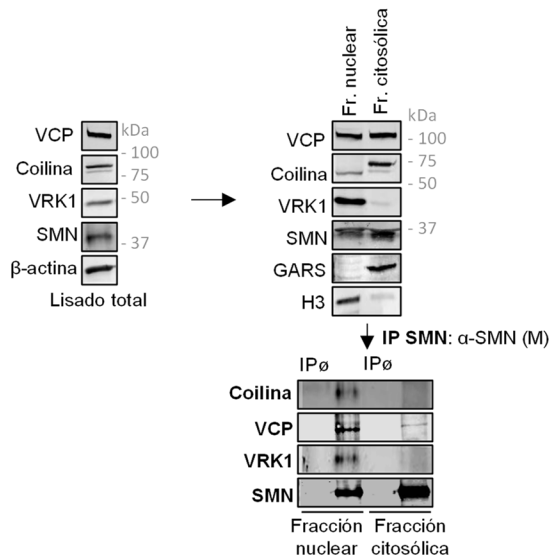


**Figura 54. VRK1, SMN, VCP y coilina interaccionan entre sí. A.** Las cuatro proteínas interaccionan entre sí. Se inmunoprecipitaron las proteínas endógenas con los anticuerpos  $\alpha$ -VC,  $\alpha$ -SMN (M),  $\alpha$ -VCP (R) y  $\alpha$ -Coilina (R) de 2 mg de extracto proteico de células *HEK-293T* y se detectaron las proteínas con los anticuerpos específicos. **B.** VRK1 y VCP cotransfectados interaccionan entre sí. Se transfectaron células *HEK-293T* con las construcciones pCELF-HA-VRK1, pCELF-GST-VCP y GST vacío y, tras 48 h, se lisaron las células y se inmunoprecipitaron las proteínas de 1 mg de extracto celular usando los anticuerpos indicados. Se detectaron las proteínas inmunoprecipitadas utilizando los anticuerpos específicos. **C.** SMN y VCP cotransfectadas interaccionan entre sí. Se transfectaron células *HEK-293T* con las construcciones pCMV6-Myc-DKK-SMN, pCELF-GST-VCP y GST vacío y, tras 48 h, se lisaron las células y se inmunoprecipitaron las proteínas de 1 mg de extracto celular usando los anticuerpos indicados. Se detectaron las proteínas inmunoprecipitadas utilizando los anticuerpos específicos. **D.** Coilina y VCP cotransfectadas interaccionan entre sí. Se transfectaron células *HEK-293T* con las construcciones pCMV6-Myc-DKK-Coilina, pCELF-GST-VCP y GST vacío y, tras 48 h, se lisaron las células y se inmunoprecipitaron las proteínas de 1 mg de extracto celular usando los anticuerpos indicados. Se detectaron las proteínas inmunoprecipitadas utilizando los anticuerpos específicos.

## 8.2. VCP interacciona con SMN tanto en el núcleo como en el citosol

VRK1 y coilina son proteínas mayoritariamente nucleares, que se regulan durante el ciclo celular, mientras que SMN y VCP se encuentran tanto en el núcleo como en el citosol. Por ese motivo, lo siguiente que quisimos analizar fue en qué compartimento interaccionaban estas proteínas. Para ello, se realizó un fraccionamiento núcleo/citosol y se estudió la interacción en los dos compartimentos, inmunoprecitando SMN. Se observó que esta proteína interacciona con coilina y VRK1 en el núcleo y con VCP tanto en el núcleo como en el citosol (Figura 55).

- RESULTADOS -



**Figura 55. VCP y SMN interactúan tanto en el núcleo como en el citosol.** Se sembraron células *HeLa*, y se realizó un fraccionamiento núcleo/citosol. Se inmunoprecipitó SMN de 0,5 mg de extractos proteicos de los dos compartimentos y se detectó VRK1, coilina y VCP con los anticuerpos específicos α-VC (R), α-Coilina (R) y α-VCP (R) respectivamente. Se utilizó la histona H3 como control de la fracción nuclear y GARS como control de la citosólica.

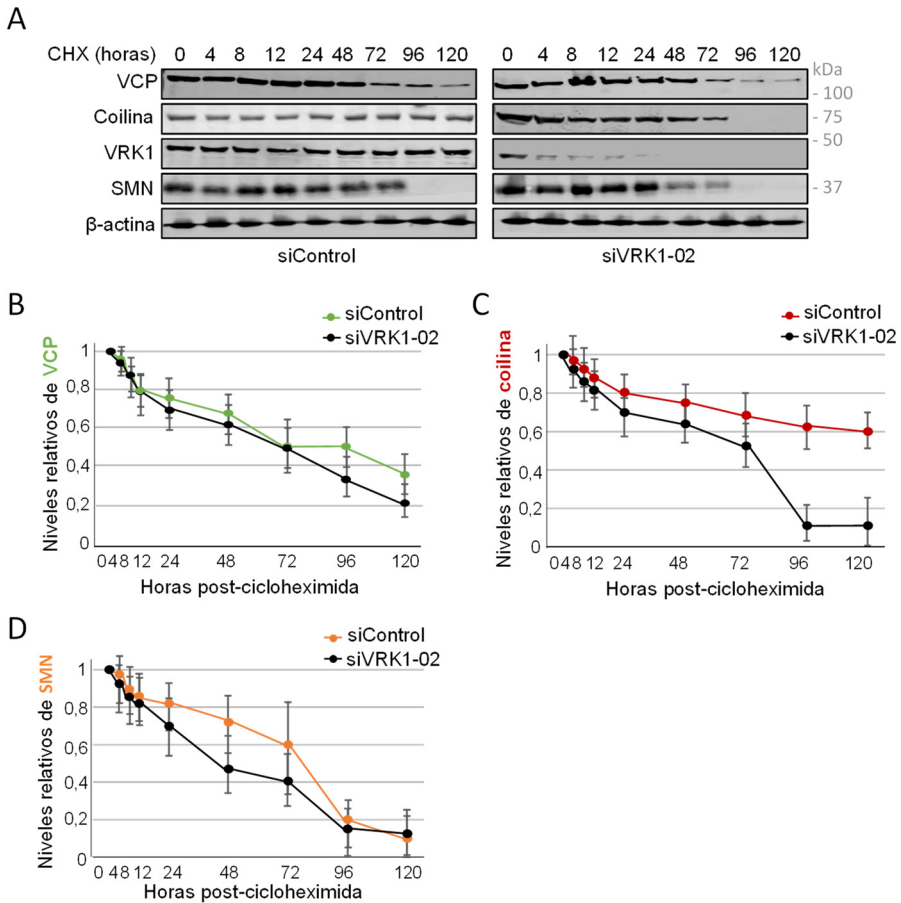
### 8.3. Efecto del silenciamiento de VRK1 sobre VCP y SMN

#### 8.3.1. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN

Dado que se ha visto que con la depleción de VRK1 se produce la pérdida de los cuerpos de Cajal, donde se encuentra y realiza su función SMN, estudiamos, primeramente, la estabilidad de esta proteína. Ya habíamos observado que coilina es más inestable, degradándose vía proteasoma cuando el gen *VRK1* se encuentra silenciado. Analizamos la vida media de estas proteínas, así como la de VCP, en células de la línea *HeLa* (Figura 56) y *HEK-293T* (anexo 6), silenciando dicho gen e inhibiendo la síntesis *de novo* de proteínas con cicloheximida.

- RESULTADOS -

Observamos que, tanto los niveles de SMN como los de VCP permanecen constantes hasta los tres días, cuando comienzan a disminuir, tanto en las células que expresan la quinasa como en las que no. Sin embargo, los niveles de coilina se mantienen estables hasta los 5 días de tratamiento en presencia de VRK1, mientras que caen bruscamente a los 3 días en ausencia de la quinasa. Por tanto, el silenciamiento de la quinasa no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN, mientras que la coilina es más inestable cuando VRK1 no se expresa en las células.



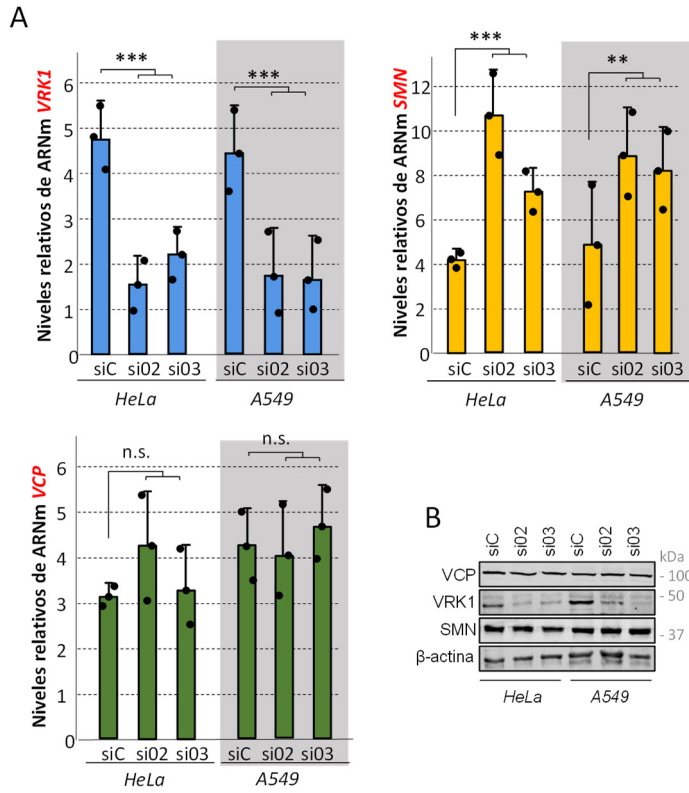
**Figura 56. El silenciamiento de la quinasa no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN, mientras que la coilina es más inestable cuando VRK1 se encuentra ausente.** **A.** *Western blot* en el que se observa la estabilidad de VCP, coilina y SMN en presencia y ausencia de VRK1. Se sembraron células *HeLa* y pasadas 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARN específico. Tras 48 h, se trataron las células con cicloheximida 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se analizó la expresión de las proteínas a los tiempos

marcados por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. Se realizaron 3 ensayos. Solo se muestra una réplica. **B.** Gráfica de la estabilidad de VCP. Se cuantificaron los niveles relativos de VCP usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos. **C.** Gráfica de la estabilidad de coilina. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos. **D.** Gráfica de la estabilidad de SMN. Se cuantificaron los niveles relativos de SMN usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos.

### 8.3.2. Al silenciar el gen *VRK1*, los niveles de ARN mensajero de VCP no se ven alterados, pero los de SMN aumentan

Dado que el silenciamiento de *VRK1* no afecta a la estabilidad proteica de SMN ni de VCP, lo siguiente que quisimos estudiar fue si tenía algún efecto a nivel de expresión génica. Analizamos los cambios en los niveles de ARNm de SMN y VCP realizando ensayos de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). Para ello, se silenció el gen de la quinasa y a los 3 días, se extrajo el ARN total de las células con el kit *RNeasy extraction kit (Qiagen)*. Se realizó la qRT-PCR y se normalizaron los valores obtenidos con los del gen *GAPDH*, utilizados como control interno del experimento. Se analizaron los niveles en células *HeLa* y *A549*. Se observó en ambas líneas un aumento en los niveles de ARNm *SMN*, pero no se apreciaban diferencias en los de VCP (Figura 57). Esto nos indica que el silenciamiento de *VRK1* parece que aumenta la expresión de SMN. Sin embargo, no se aprecian diferencias en cuanto a los niveles proteicos de esta proteína.

- RESULTADOS -

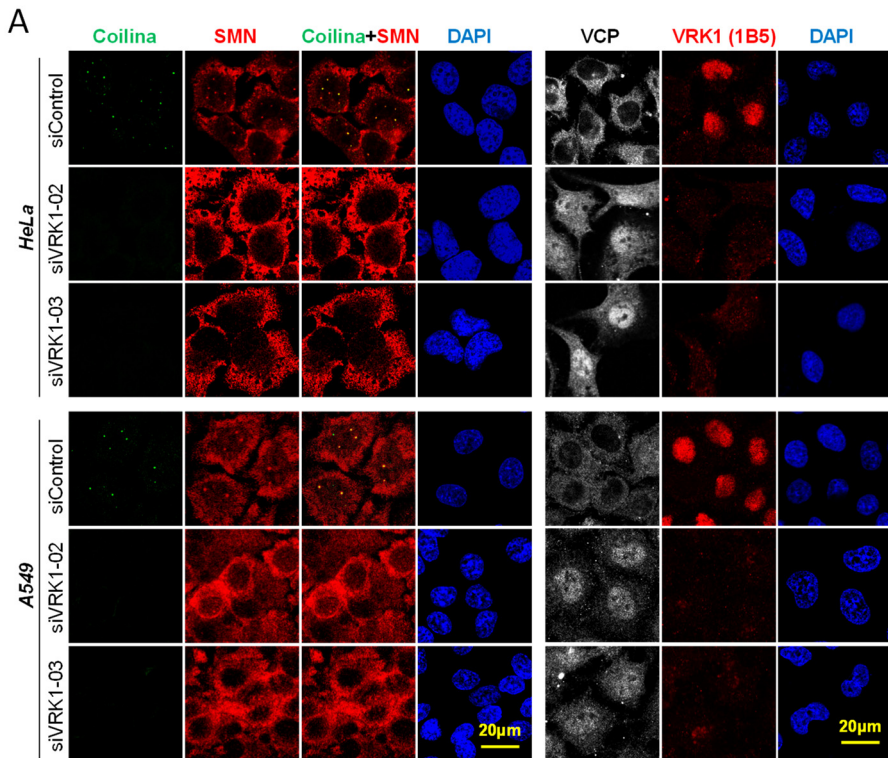


**Figura 57. El silenciamiento de VRK1 produce un aumento de los niveles de ARNm de SMN, pero no de los de VCP. A.** Se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos y un siControl de células de las líneas *HeLa* y *A549*. Pasadas 72 h, se extrajo el ARN total y se cuantificaron las muestras. Se realizó la qRT-PCR de SMN, VCP y VRK1 y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para el gen *GAPDH* (control). Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar la significación estadística. **B.** *Western blot* en el que se observa el correcto silenciamiento del gen *VRK1*. Los niveles proteicos de VCP y SMN no se alteran.

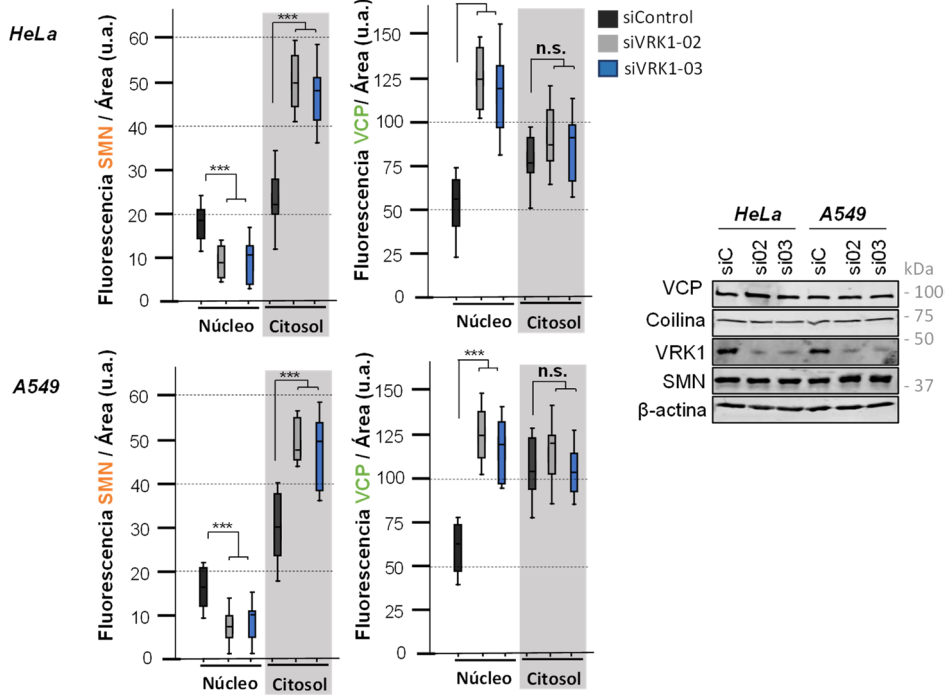


### 8.3.3. Al silenciar el gen *VRK1*, los niveles de VCP aumentan en el núcleo y los de SMN en el citosol

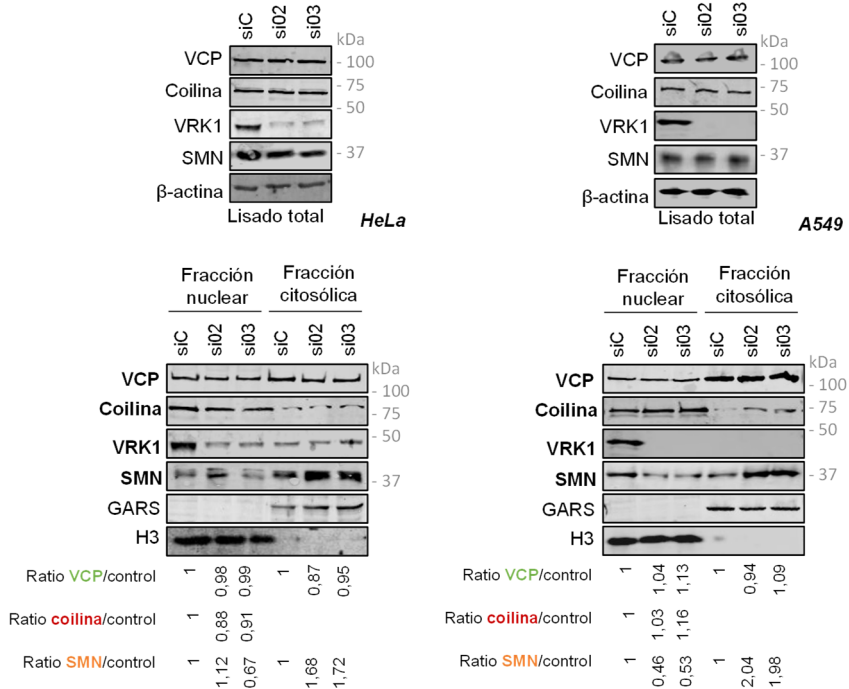
El siguiente aspecto que quisimos estudiar fue el efecto que tenía la ausencia de VRK1 en la localización celular de las dos proteínas, dado que habíamos visto que los cuerpos de Cajal no se forman en esta situación [108–199]. Observamos que los niveles de SMN aumentan significativamente en el citosol tanto por inmunofluorescencia como en el fraccionamiento, mientras que los de VCP son mayores en el núcleo por inmunofluorescencia cuando se silencia la quinasa. Sin embargo, este aumento no se observa en el *Western blot* del fraccionamiento. Corroboramos a su vez, que los cuerpos de Cajal no se forman en ninguna de las líneas *HeLa* o *A549* al silenciar el gen *VRK1*, pero los niveles de coilina se mantienen estables en el núcleo (Figura 58).



- RESULTADOS -



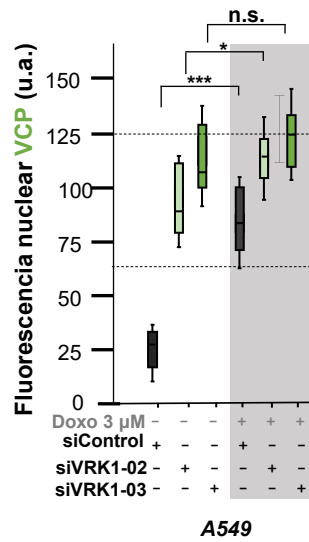
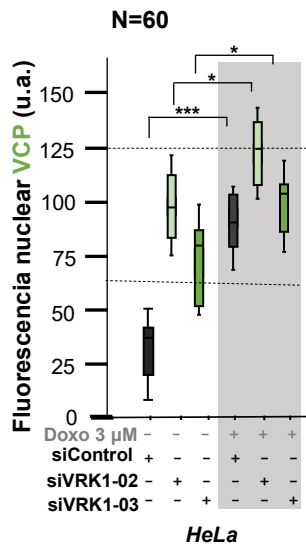
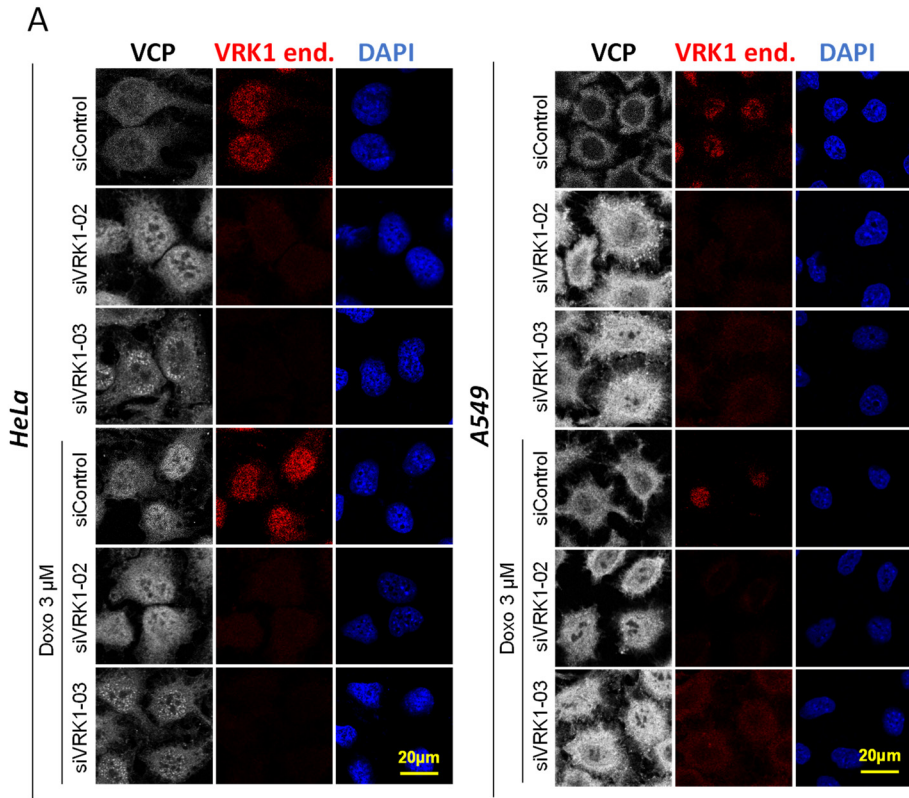
**B**



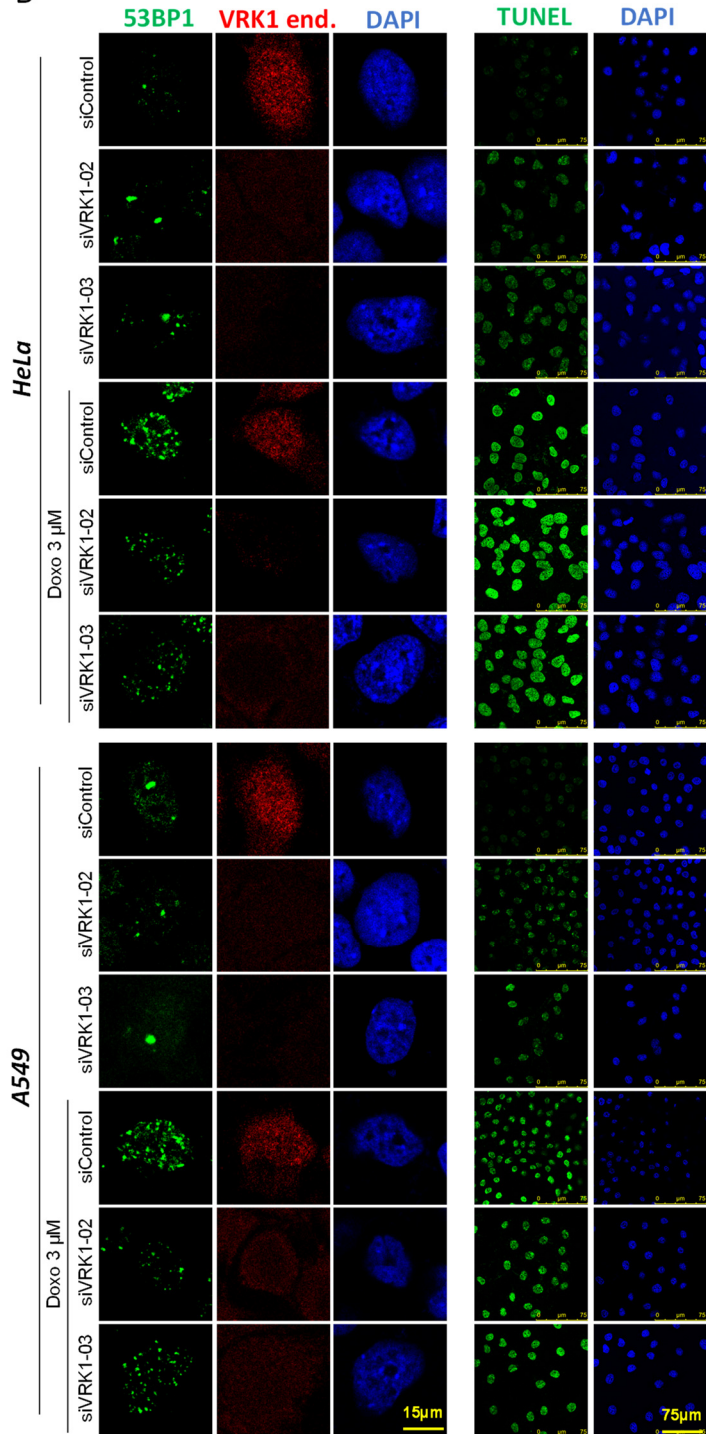
**Figura 58. Los niveles de SMN aumentan en el citosol, mientras que los de VCP lo hacen en el núcleo cuando se silencia VRK1.** **A.** Inmunofluorescencia de SMN y VCP en presencia y ausencia de VRK1. Se sembraron células *HeLa* y *A549* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos. Después de 3 días, se fijaron las células y se llevó a cabo la inmunofluorescencia. Se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -Coilina (R),  $\alpha$ -VCP (R),  $\alpha$ -SMN (M) y  $\alpha$ -1B5 (M) como control. Se cuantificó la fluorescencia de SMN y VCP de 60 células tanto en el núcleo como en el citosol con *ImageJ*. Se usó el programa *IBM SPSS 25* para analizar las diferencias. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ . A su vez se realizó el *Western blot* de las muestras. **B.** *Western blot* de VCP y SMN en presencia y ausencia de VRK1 en muestras de las fracciones citosólicas y nucleares. Se sembraron células *HeLa* y *A549* y a las 24 horas se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos. Después de 3 días, se realizó un fraccionamiento núcleo/citosol y se hizo un *Western blot* de las muestras. Se cuantificó la intensidad de cada banda proteica. Se indica la ratio relativa de cada proteína con respecto a su control, nuclear (H3) o citosólico (GARS).

#### 8.3.4. El aumento de VCP en el núcleo podría estar relacionado con el daño génico que acumulan las células al deplecionar VRK1

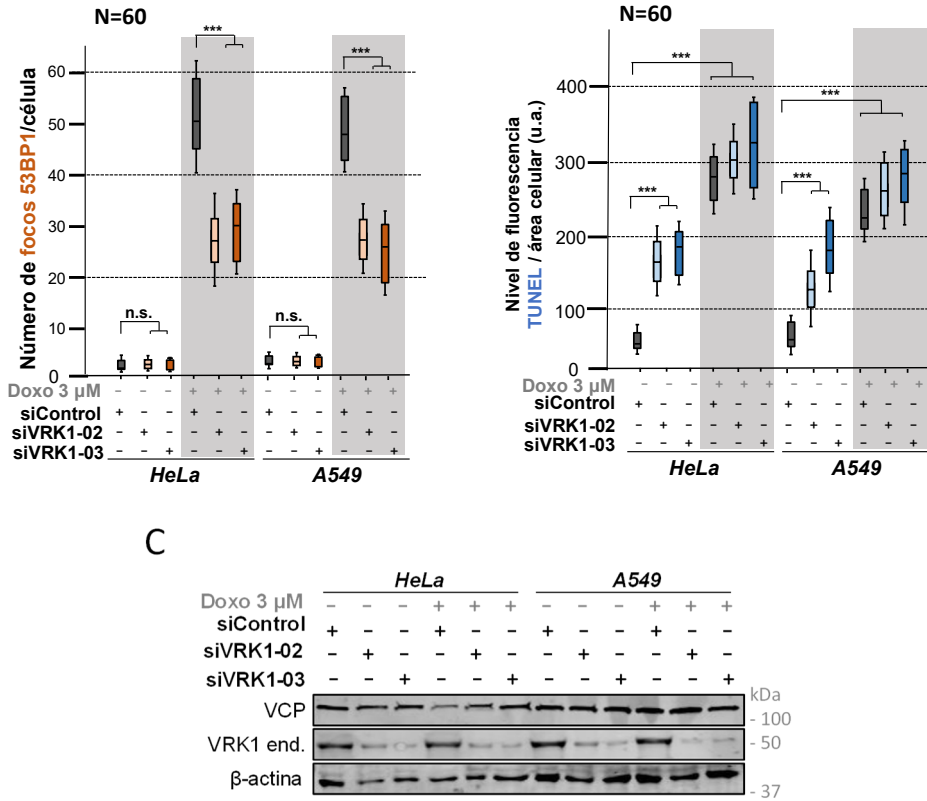
La proteína VCP está implicada en múltiples procesos celulares. Se ha observado que, en el núcleo, en presencia de DSBs, participa activamente permitiendo que la proteína 53BP1 se acumule y se reparen los sitios de daño [179]. Pensamos que el aumento nuclear de la fluorescencia de VCP podría estar relacionado con la acumulación de daño en la molécula al no expresarse VRK1. Así, tratamos células de las líneas *HeLa* y *A549* con doxorubicina para generar roturas de doble cadena en el ADN y analizamos por inmunofluorescencia los niveles de VCP en el núcleo. Además, realizamos paralelamente un ensayo TUNEL, para cuantificar DSBs. Vimos que, al tratar las células con el compuesto, expresasen o no VRK1, la fluorescencia de VCP aumenta en el núcleo (Figura 59A). Además, observamos que la ausencia de VRK1 provoca acumulación de daño endógeno. También vemos que la resolución del daño cuando se silencia VRK1 no se lleva a cabo correctamente, viéndose que no se recupera el número de focos de 53BP1 cuando se tratan las células con el compuesto (Figura 59B).



B



- RESULTADOS -

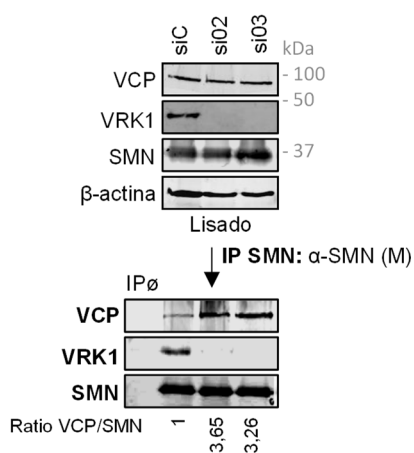


**Figura 59. Los niveles de VCP aumentan en el núcleo cuando se silencia el gen *VRK1* y al tratar las células con doxorubicina.** Se sembraron células *HeLa* y *A549* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos y un siControl. Después de 3 días, se trataron las células con doxorubicina 3  $\mu$ M durante 2 h, se fijaron, y se llevaron a cabo las inmunofluorescencias. **A.** Inmunofluorescencia de VCP de las muestras. Se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -VCP (R) y  $\alpha$ -1B5 (M) como control de silenciamiento. Se cuantificó la fluorescencia nuclear de VCP de 60 células con *ImageJ*. **B.** Inmunofluorescencia de 53BP1 y ensayo TUNEL. Se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -53BP1 (R) y  $\alpha$ -1B5 (M) como control de silenciamiento, y se realizó, por otra parte, un ensayo TUNEL. Se cuantificó el número de focos de 53BP1/célula y la fluorescencia TUNEL/célula de 60 células con *ImageJ*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ . **C.** Western blot de las muestras.

### 8.3.5. La interacción VCP-SMN aumenta al deplecionar VRK1, sobre todo en el citosol

Hemos observado que SMN y VCP interaccionan entre sí cuando VRK1 se encuentra presente y que sus niveles permanecen estables cuando la quinasa no se expresa en las células. Sin embargo, la localización celular de ambas proteínas sí se altera. Así, lo siguiente que quisimos analizar fue si la interacción VCP-SMN se veía modificada en ausencia de la quinasa en las células, y en qué compartimento celular ocurría.

Para ello, habiendo primeramente silenciado el gen *VRK1* en células *HeLa*, se realizó la inmunoprecipitación de SMN, observado que su interacción con VCP aumentaba hasta 3 veces cuando la quinasa no se expresaba en las células (Figura 60).

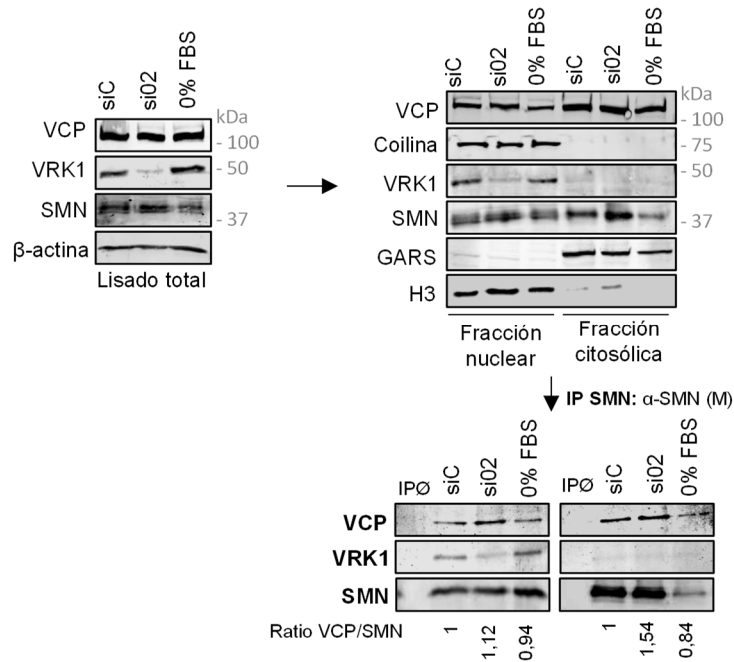


**Figura 60. La interacción SMN-VCP aumenta cuando se silencia VRK1.** Se sembraron células *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos, y un siControl. Después de 3 días se lisaron las células y se realizó la inmunoprecipitación de SMN de 2 mg de lisado celular. Se detectó VCP, VRK1 y SMN (control IP) con anticuerpos específicos. Se presenta la ratio relativa VCP/SMN.

Viendo este resultado, analizamos en qué compartimento celular se producía dicha interacción. Se realizó un fraccionamiento núcleo/citosol en células *HeLa*, observando que la subida de interacción SMN-VCP se produce tanto en el núcleo como en el citosol en mayor medida, cuando las células no

- RESULTADOS -

expresan la quinasa. Utilizamos además una muestra procedente de células a las que se les ha quitado el suero del medio como control de baja actividad catalítica de VRK1. Observamos que, en este caso, no se observan diferencias en cuanto a la interacción SMN-VCP ni en el núcleo ni en el citosol (Figura 61). Por tanto, podemos concluir de estos experimentos que la interacción de estas dos proteínas aumenta cuando no se expresa VRK1 en la célula. Cuando se expresa, aunque no tenga apenas actividad catalítica, la interacción SMN-VCP disminuye y se mantiene igual que si se tratase de la quinasa activa.



**Figura 61. La interacción SMN-VCP aumenta cuando se silencia VRK1, tanto en el núcleo como en el citosol.** Se sembraron células *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARN específico, siVRK1-02, un siControl o se eliminó el suero del medio (0% FBS). Después de 3 días se realizó el fraccionamiento núcleo/citosol y se inmunoprecipitó SMN de 0,5 mg de los extractos proteicos de las fracciones. Se detectó VCP, VRK1 y SMN (control IP) con anticuerpos específicos. Se presenta la ratio relativa VCP/SMN.



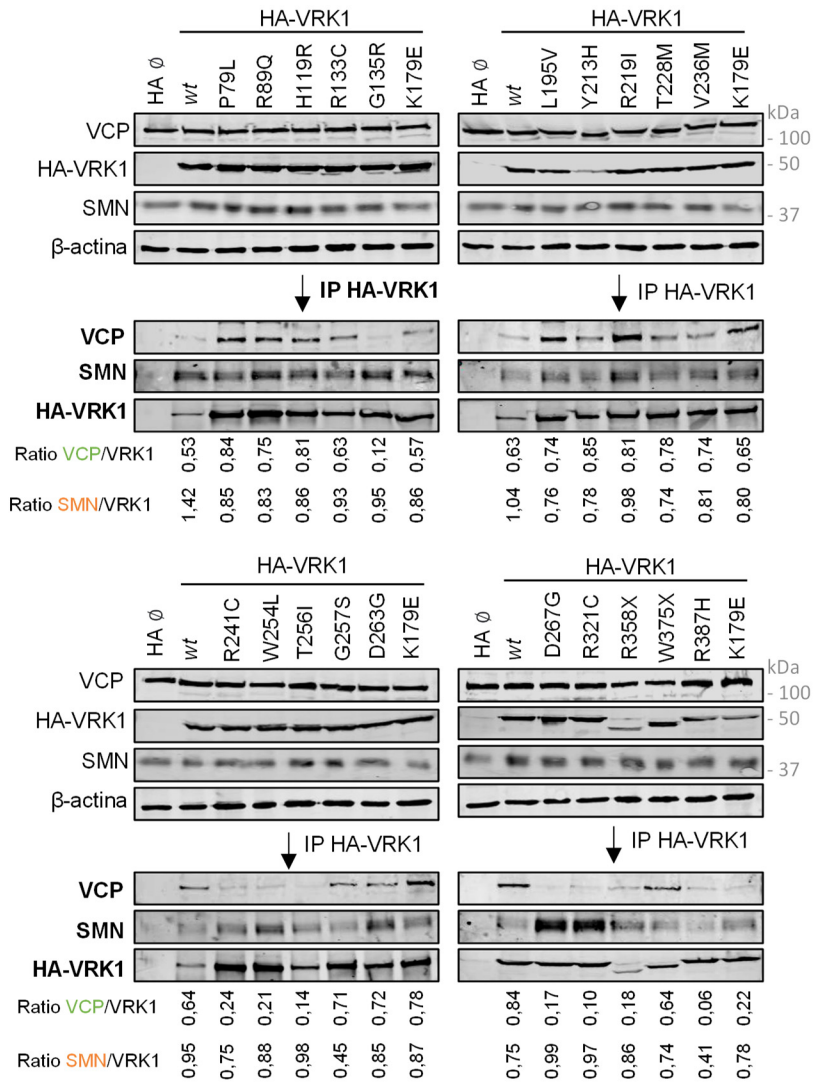
## 8.4. Efecto de las variantes patogénicas de VRK1 en SMN y VCP

### 8.4.1. Interacción de las variantes patogénicas de VRK1 humanas y murinas con SMN y VCP

Habiendo visto que VRK1 interacciona con SMN y VCP y que el silenciamiento de la quinasa provoca un cambio en las interacciones que se producen entre estas proteínas, quisimos analizar la relación de SMN y VCP con las variantes de VRK1, primeramente, estudiando la interacción entre ellas. Para ello, transfectamos células *HEK-293T* con las construcciones HA-VRK1 que portan las variantes de la quinasa humana y se realizó posteriormente su inmunoprecipitación, detectándose la presencia de SMN y VCP. No observamos apenas diferencias en la interacción de SMN con ninguna de las variantes. Sin embargo, la interacción disminuye ligeramente con las variantes G257S y R387H, mientras que aumenta con D267G y R321C (Figura 62). Por otra parte, con respecto a la interacción con VCP, sí que se observan diferencias claras entre las variantes. Dicha interacción disminuye significativamente con G135R, R241C, W254L, T256I, D267G, R321C, R358X y R387H (Figura 62).

Quisimos comprobar que las variantes murinas de VRK1 se comportaban de la misma manera en cuanto a su interacción con VCP y SMN. Así pues, se realizaron inmunoprecipitaciones de las variantes murinas y se detectó SMN y VCP endógena usando células de las líneas estables *HeLa* (Figura 53C y D). Se volvió a observar que la interacción de SMN con las variantes se mantenía igual que con la quinasa *wt*, tanto en células asincrónicas (Figura 53C) como en mitosis, cuando la interacción SMN-VRK1 es máxima (Figura 53D). En este caso, no se observaba subida de interacción con mR321C. Se vuelven a ver diferencias en cuanto a las interacciones de las distintas variantes con VCP en células durante la fase G2/M, pero no son tan claras como en células asincrónicas (Figura 53D).

- RESULTADOS -



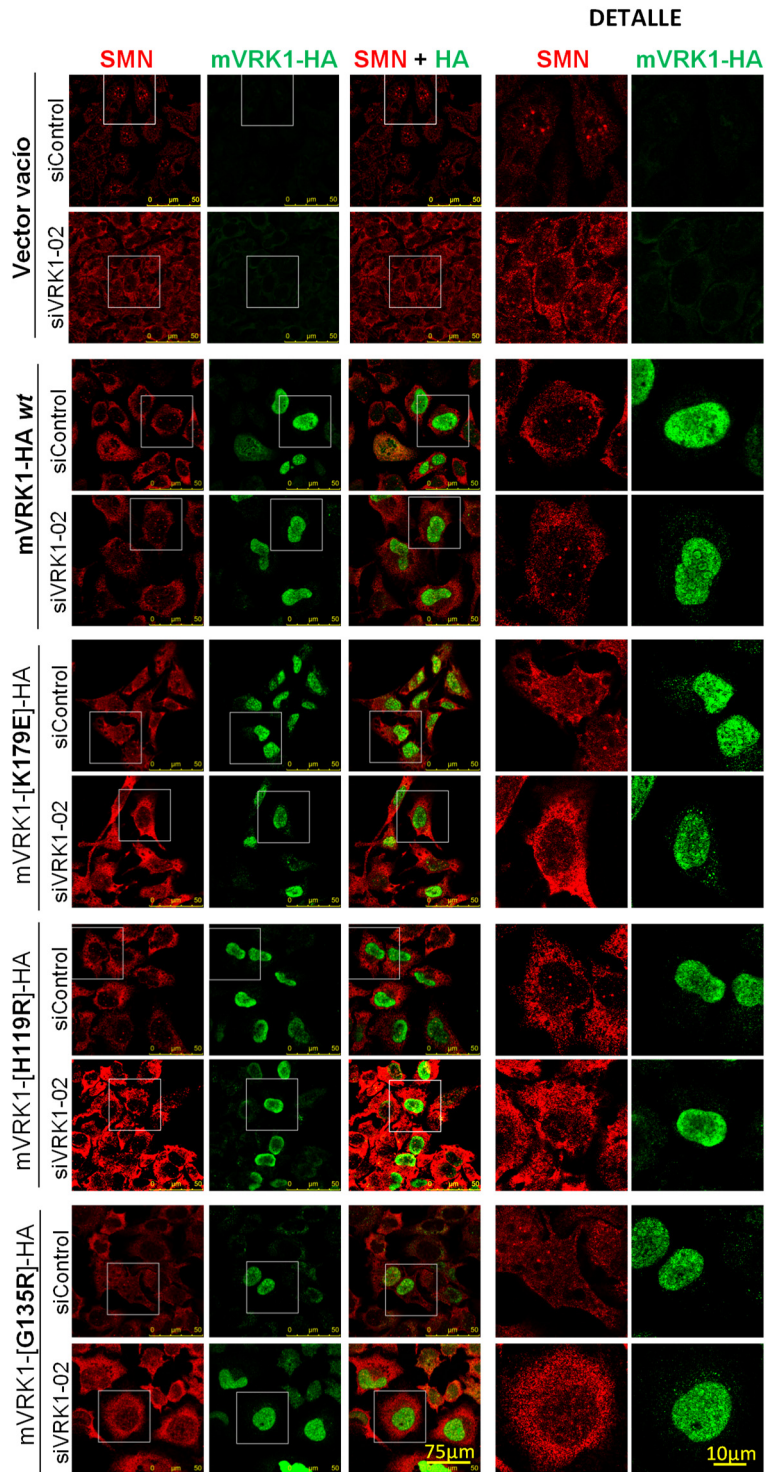
**Figura 62. Interacción de las variantes patológicas de VRK1 humano con SMN y VCP.** Se transfectaron células *HEK-293T* con las construcciones HA-VRK1 portadoras de las mutaciones de la quinasa. Tras 48 h, se lisaron las células y se realizaron inmunoprecipitaciones de las variantes usando  $\alpha$ -HA (R) de 1 mg de extracto proteico. Se detectaron SMN y VCP en las muestras con sus anticuerpos específicos. Se realizó el experimento por duplicado. Solo se muestra una réplica y su ratio VCP y SMN / VRK1 (control IP).

#### 8.4.2. Los niveles de SMN citosólicos y VCP nucleares aumentan en la mayoría de las células que portan las variantes de VRK1

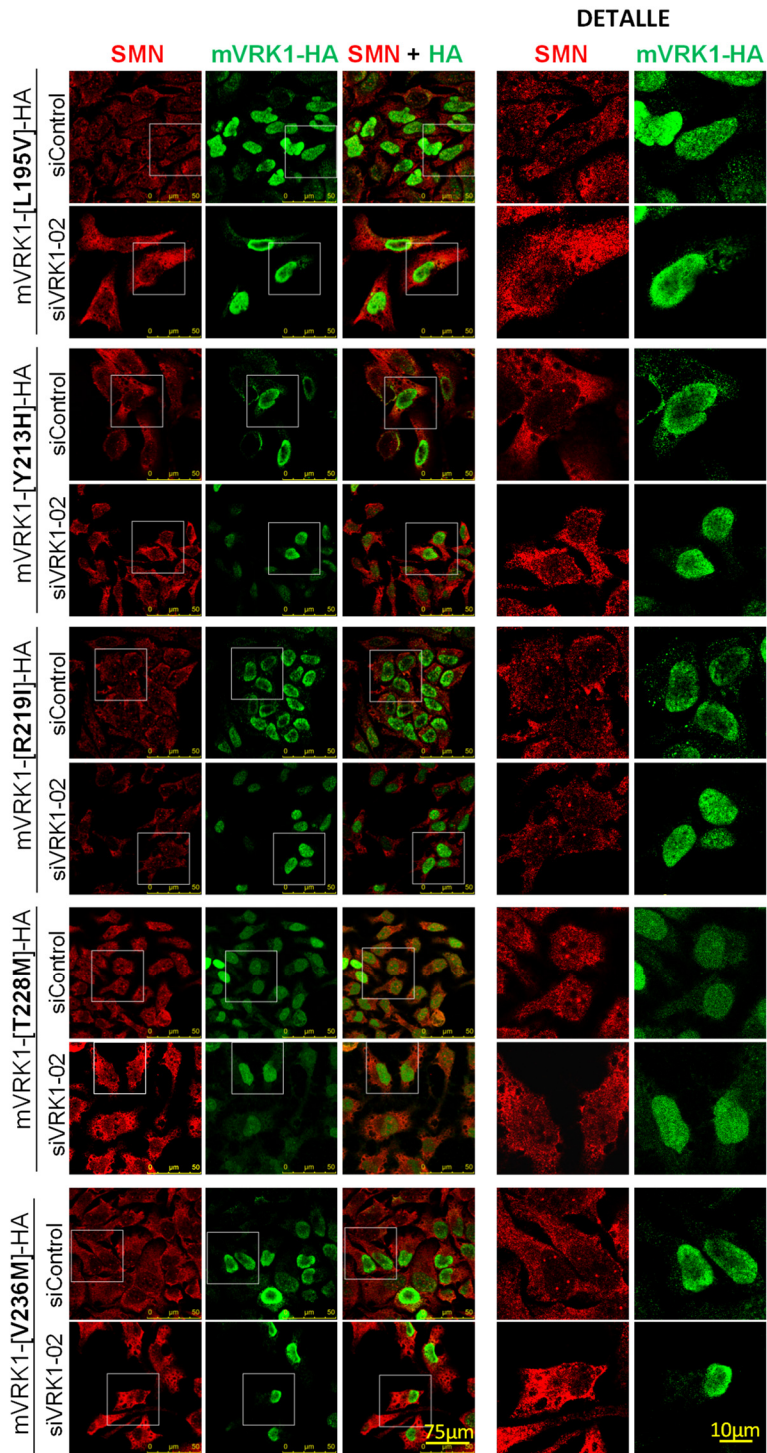
Previamente, habíamos observado alteraciones en la ubicación de SMN y VCP al silenciar el gen de la quinasa. Por ello, nos preguntamos si las distintas variantes de VRK1 afectaban también a esta localización. Así, analizamos la localización subcelular de estas proteínas por inmunofluorescencia utilizando las líneas estables *HeLa*, silenciando inicialmente el gen de la quinasa humana. Vimos que los niveles de SMN en el citosol aumentan significativamente en la mayoría de las líneas, a excepción de en las células que portan mG135R y mR219I (Figura 63).

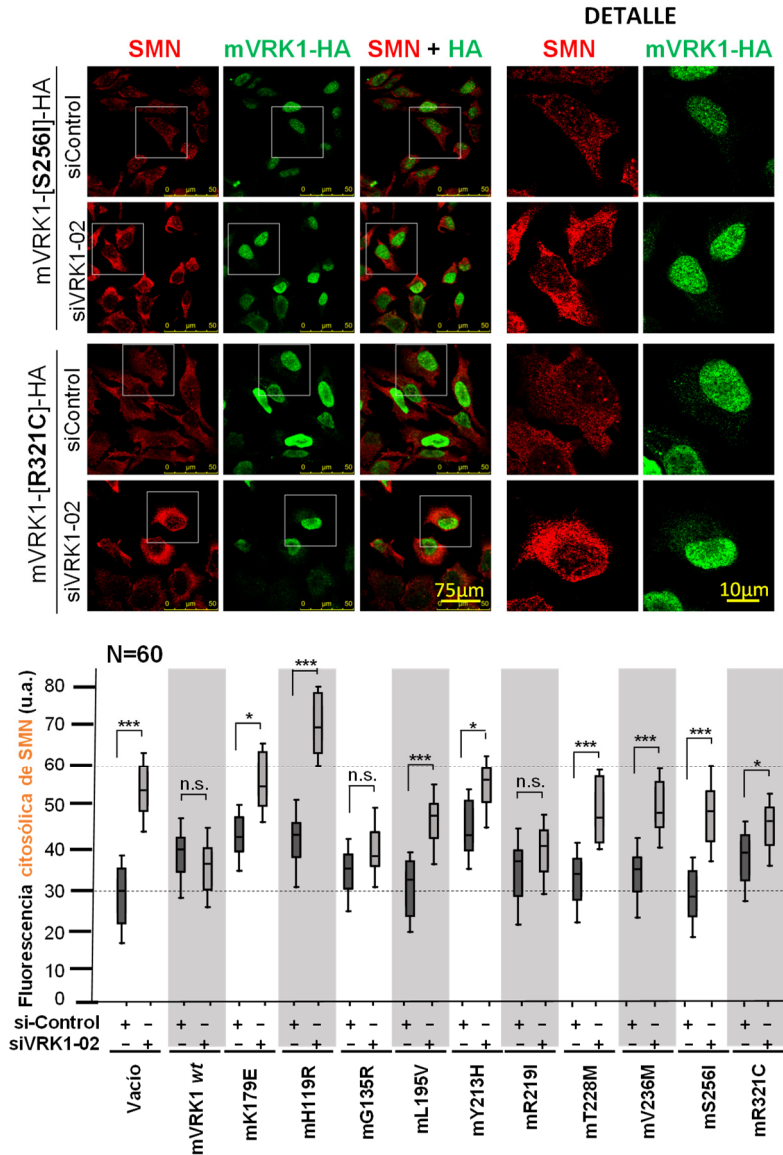
En cuanto a VCP, pudimos observar la subida de los niveles de fluorescencia en el núcleo al silenciar el gen *VRK1* endógeno, sobre todo en las células que portan mT228M, mS256I y mR321C. Sin embargo, este aumento no es significativo en las líneas que portan las variantes mH119R, mR219I, mL195V ni mK179E. Cabe destacar, que las células que expresan la quinasa K179E presentan un nivel más alto de lo normal de VCP nuclear cuando expresan también el VRK1 endógeno. Todo esto parece indicar que el aumento de VCP en el núcleo no está relacionado con la actividad catalítica de VRK1 (Figura 64).

- RESULTADOS -



- RESULTADOS -

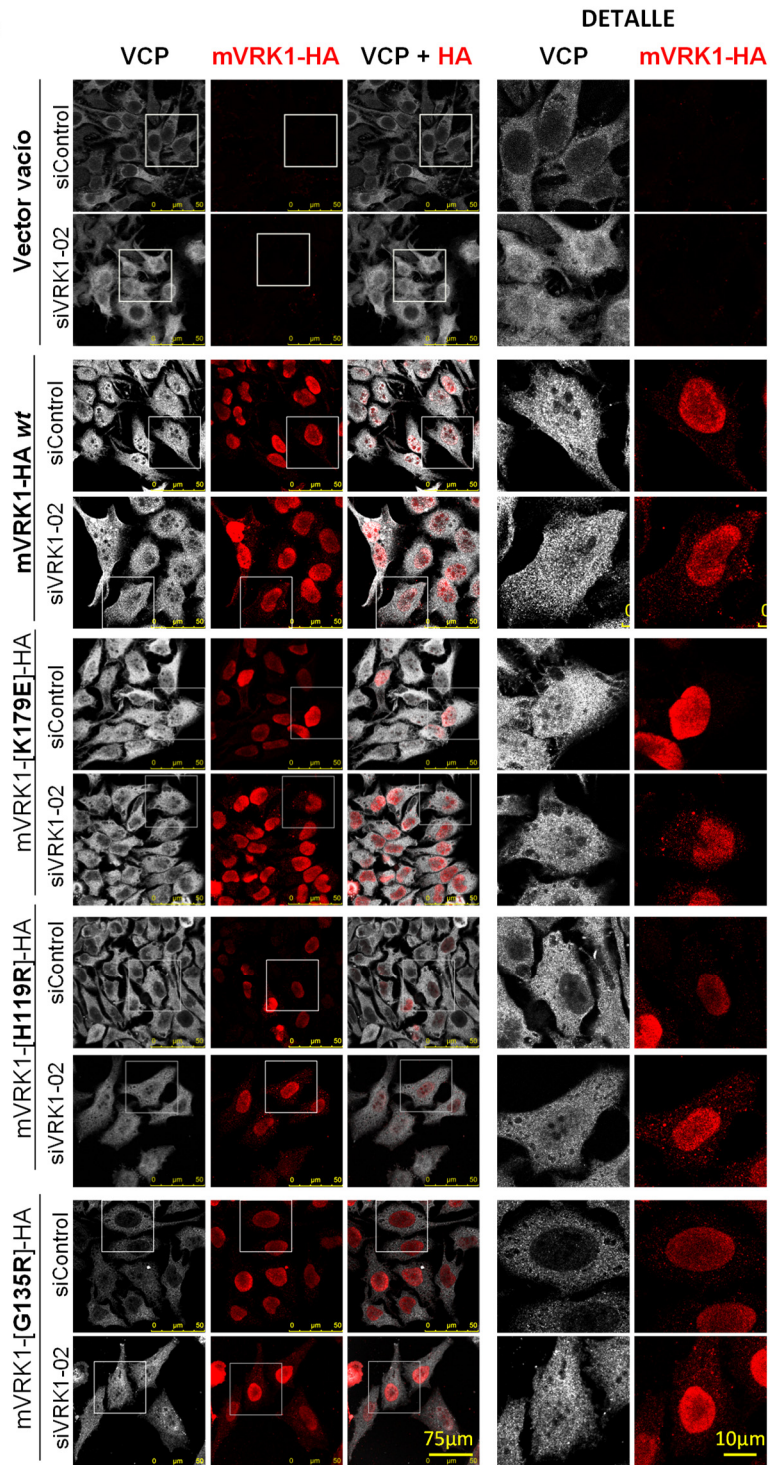




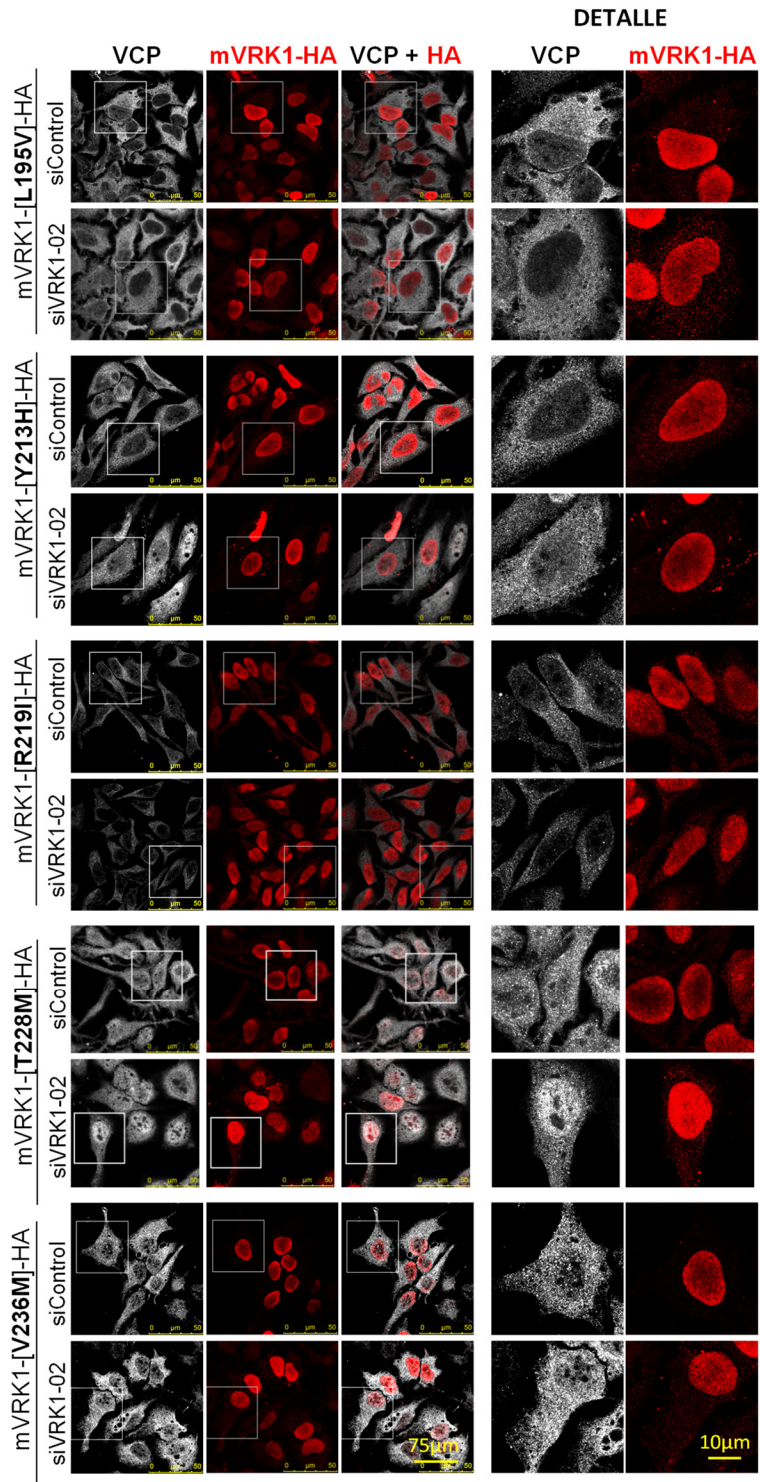
**Figura 63. Los niveles citosólicos de SMN aumentan en la mayoría de las líneas que portan las variantes patológicas de VRK1.** Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARNs específico del gen, siVRK1-02, y un siControl. Después de 3 días, se fijaron las células y se llevó a cabo la inmunofluorescencia. Se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -SMN (M) y  $\alpha$ -HA (R) como control de expresión de las variantes. Se cuantificó la fluorescencia de 60 células con *ImageJ*. Se representa el nivel de fluorescencia SMN citosólica. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

- RESULTADOS -

A

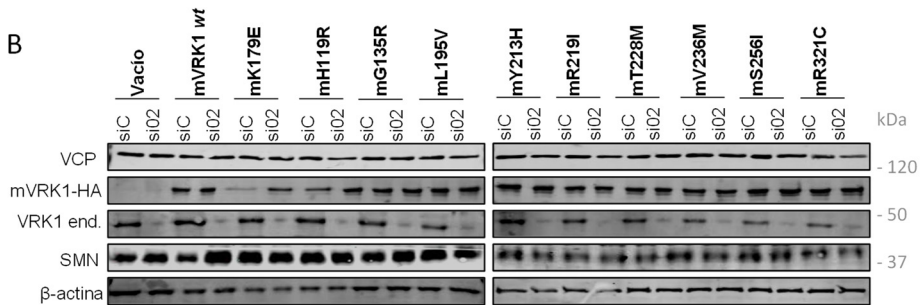
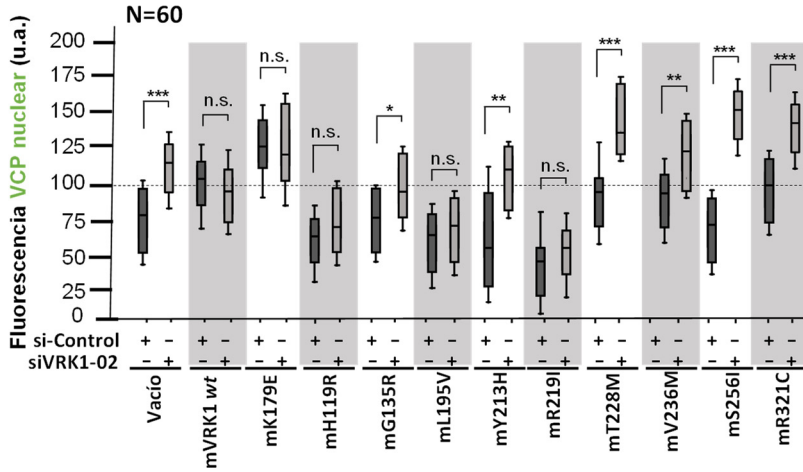
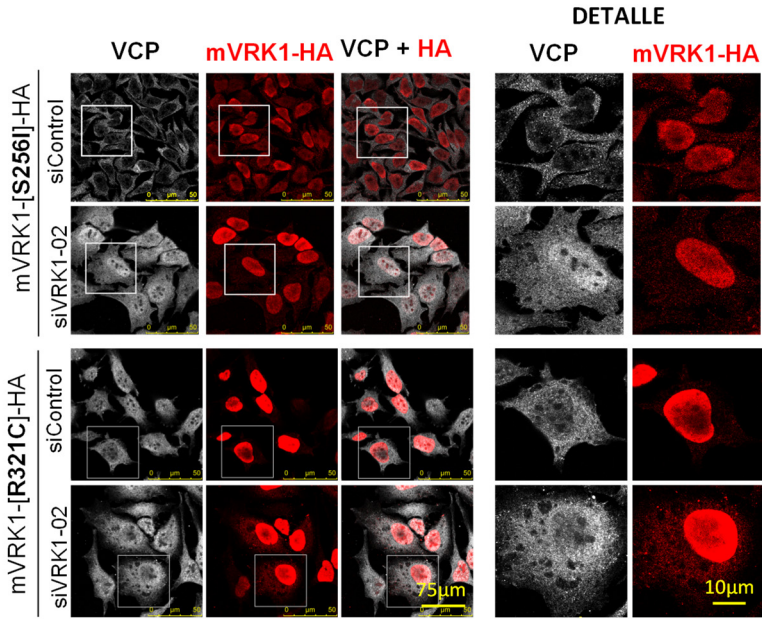


- RESULTADOS -



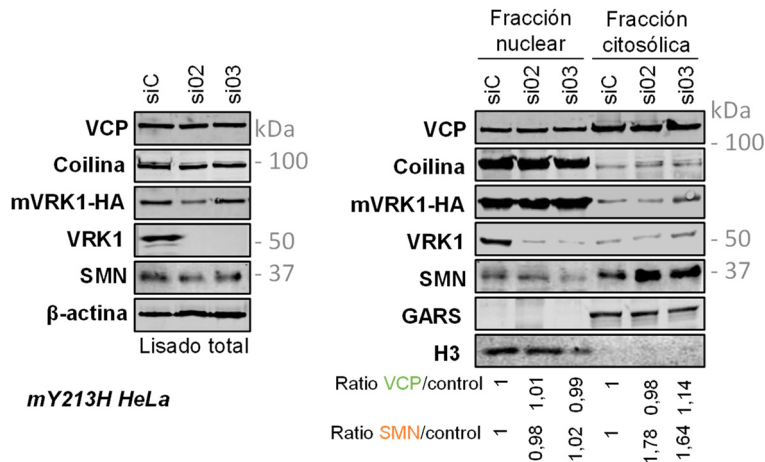


- RESULTADOS -

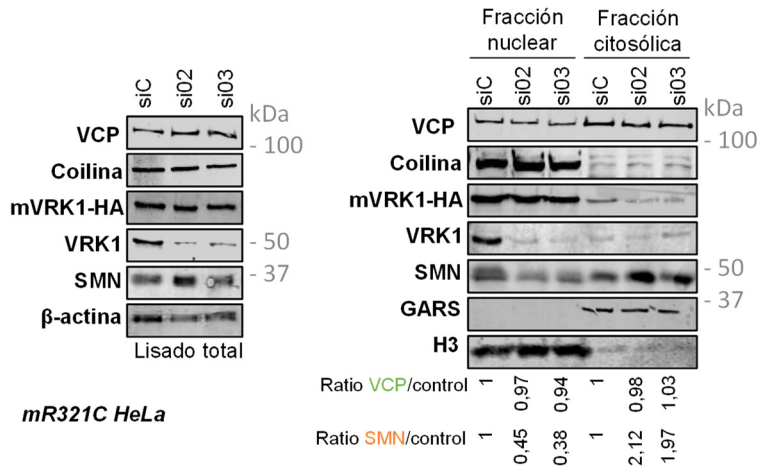


**Figura 64. Los niveles nucleares de VCP aumentan en la mayoría de las líneas que portan las variantes patogénicas de VRK1. A.** Inmunofluorescencia de VCP en las líneas estables. Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARNs específico del gen, siVRK1-02, y un siControl. Después de 3 días, se fijaron las células y se llevó a cabo la inmunofluorescencia. Se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -VCP (R) y  $\alpha$ -HA (M) como control de expresión de las variantes. Se cuantificó la fluorescencia de 60 células con *ImageJ*. Se representa el nivel de fluorescencia VCP nuclear. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$  **B.** *Western blot* de las muestras. Los niveles proteicos de SMN y VCP en las células no varían. Se detecta el VRK1 endógeno con el anticuerpo  $\alpha$ -1B5 (M) y el murino con  $\alpha$ -HA (M).

Para corroborar que los cambios en intensidad de fluorescencia están relacionados con alteraciones en la localización subcelular de las proteínas, realizamos un *Western blot* de los extractos proteicos del núcleo y del citosol de alguna de las líneas celulares. Para ello, hicimos el fraccionamiento de células que portan las variantes mY213H y mR321C. Observamos un aumento de SMN en el citosol en las células que expresan las dos variantes. En cuanto a los niveles de VCP, no se observa ninguna alteración (Figura 65).



- RESULTADOS -



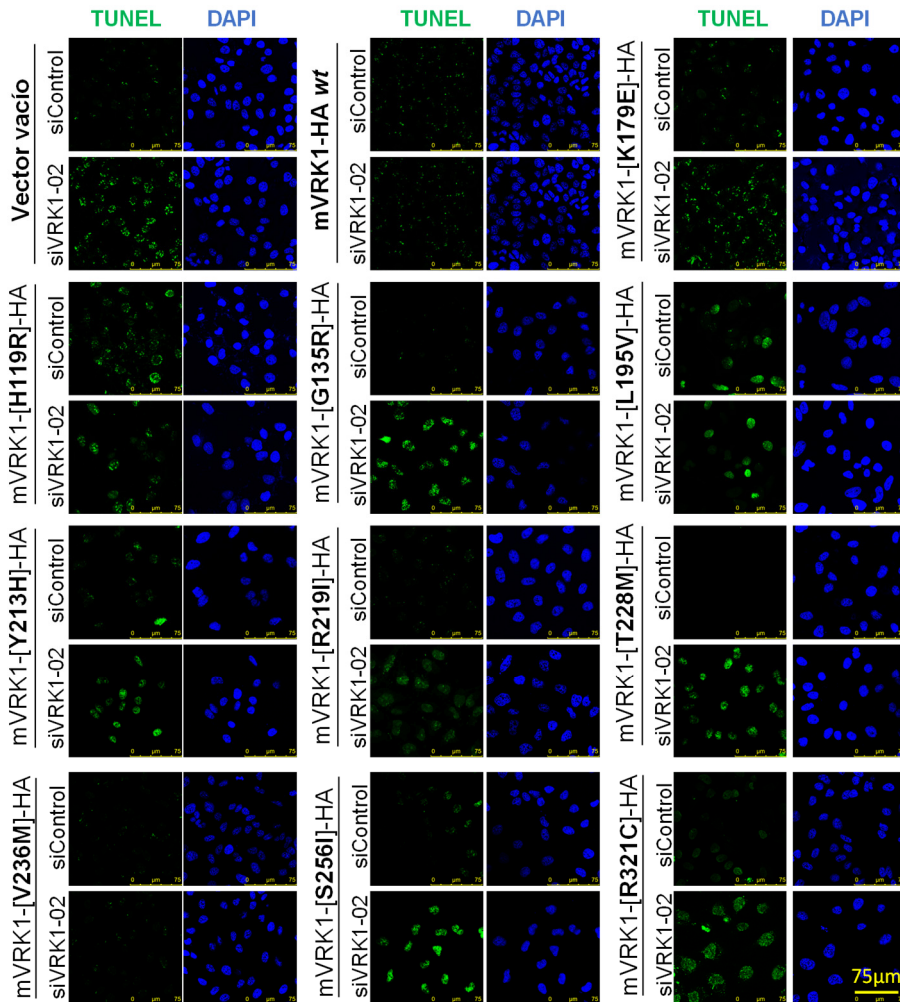
**Figura 65. Los niveles citosólicos de SMN aumentan en las líneas que portan las variantes patogénicas mY213H y mR321C.** Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* que portan mY213H y mR321C. A las 24 h se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos del gen. Después de 3 días se realizó el fraccionamiento núcleo/citosol. Se corrieron las muestras y se hizo un *Western blot*, en el que se detectó VCP, SMN, coilina VRK1 y VRK1 murino con anticuerpos específicos. Se muestra la ratio relativa VCP y SMN con respecto al control de cada compartimento, H3 o GARS.

#### 8.4.3. La mayoría de las líneas celulares que portan las variantes de la quinasa *VRK1*, acumulan más daño en el ADN

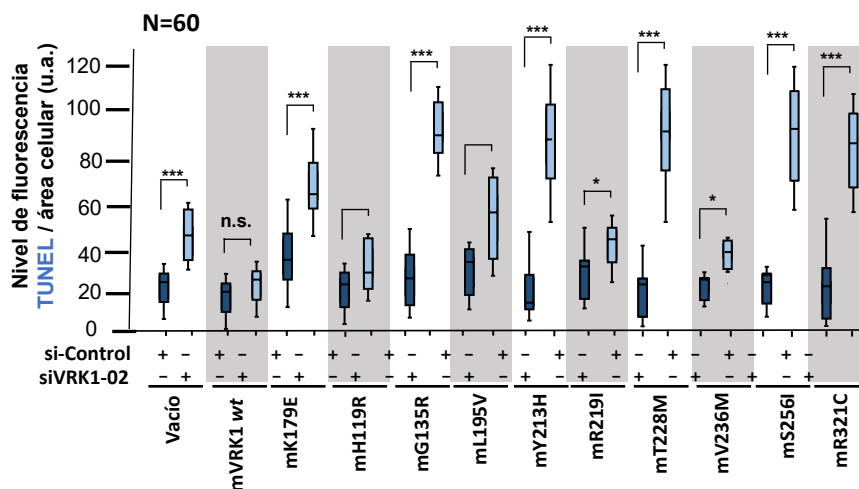
Dado que VCP está involucrada en la respuesta a daño génico y que observamos una acumulación en el núcleo de esta proteína por inmunofluorescencia cuando la analizamos en células que poseen las variantes de *VRK1*, realizamos un ensayo TUNEL para cuantificar el nivel de daño acumulado en su genoma. Observamos que, en la mayoría de las líneas, aumenta considerablemente el daño en la molécula (Figura 66). Esto podría indicar que VCP se acumula en este compartimento ante la ausencia de actividad quinasa de *VRK1*, y que la acumulación en el núcleo, puede que no sea detectable por *Western blot* debido a la falta de sensibilidad de la técnica, al ser VCP una proteína muy abundante en la célula. Además, se observa que las células de las líneas mH119R, mL195V y mR219I no

- RESULTADOS -

presentan tanto daño en el ADN como el resto. Relacionando este resultado con los niveles de VCP nucleares, se ve que dichos niveles en estas tres líneas tampoco se ven aumentados. Sin embargo, se deberían de realizar otro tipo de experimentos para comprobar realmente que este aumento de fluorescencia de VCP en el núcleo se debe realmente al aumento del daño en la molécula.



- RESULTADOS -



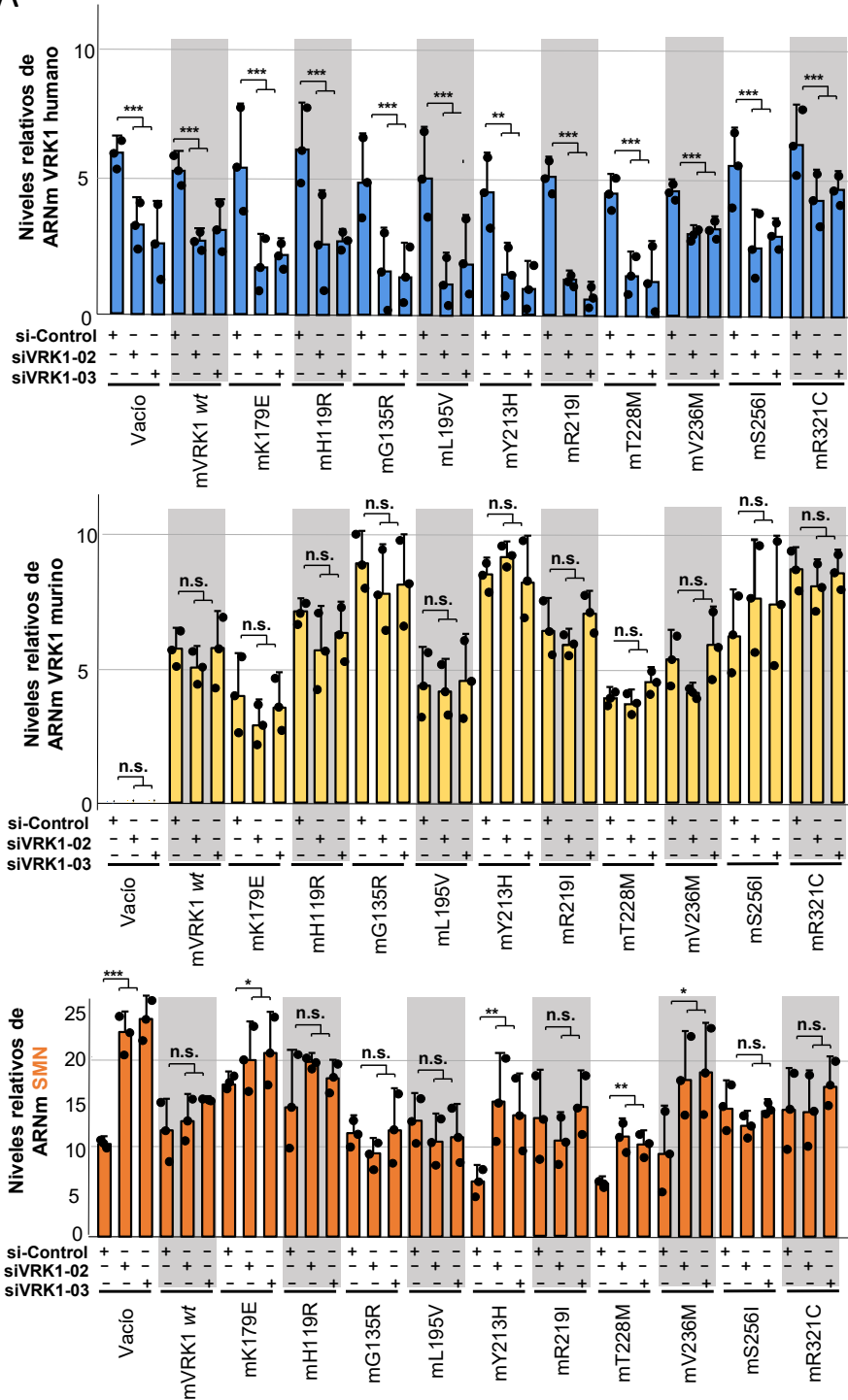
**Figura 66. La mayoría de las líneas que portan las variantes patogénicas de VRK1 acumulan daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARNs específico del gen. Después de 3 días, se fijaron las células y se llevó a cabo un ensayo TUNEL para marcar los extremos libres del ADN. Se cuantificó la fluorescencia de 60 células con *ImageJ*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni, para determinar qué muestras diferían \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

#### 8.4.4. Los niveles de ARNm de SMN no se alteran en las células que portan las variantes de la quinasa VRK1

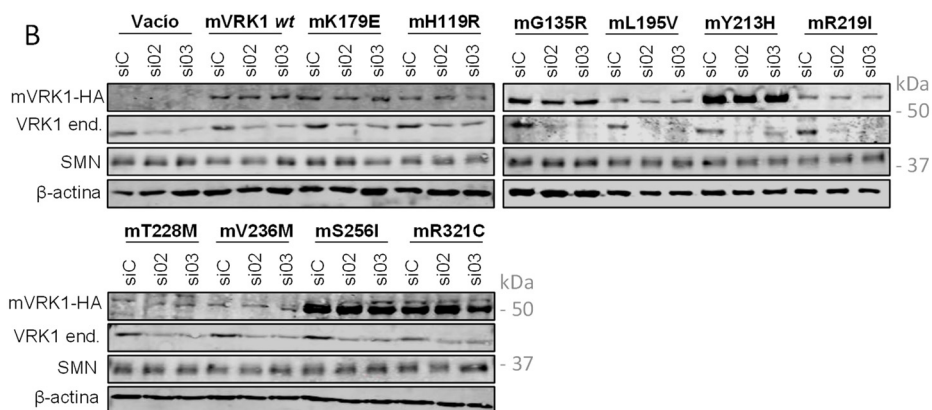
El último aspecto que quisimos estudiar fue la expresión del gen *SMN*. Hemos visto que los niveles de ARNm *SMN* aumentan significativamente cuando se silencia VRK1. Por tanto, quisimos analizar si se producía el mismo efecto cuando se presentaban en las células las variantes de la quinasa. Así, realizamos ensayos de RT-PCR cuantitativa en células de las líneas estables *HeLa*. No obtuvimos diferencias significativas en los niveles de ARNm *SMN* en la mayoría de las líneas estudiadas, aunque sí observamos un ligero aumento (Figura 67).

- RESULTADOS -

A



- RESULTADOS -



**Figura 67. Los niveles de ARNm SMN no se alteran en las células que portan las variantes de la quinasa VRK1. A.** Se silenció el gen *VRK1* con dos siARNs específicos y un siControl de células de las líneas *HeLa* estables. Pasadas 72 h, se extrajo el ARN total y se cuantificaron las muestras. Se realizó la qRT-PCR de SMN y de los controles VRK1 murino y humano y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para el gen *GAPDH*. Se realizó un test *one way-ANOVA* seguido de la prueba post-hoc Tukey para analizar la significación estadística. **B.** *Western blot* en el que se observa el silenciamiento de VRK1 y los niveles proteicos estables de SMN.

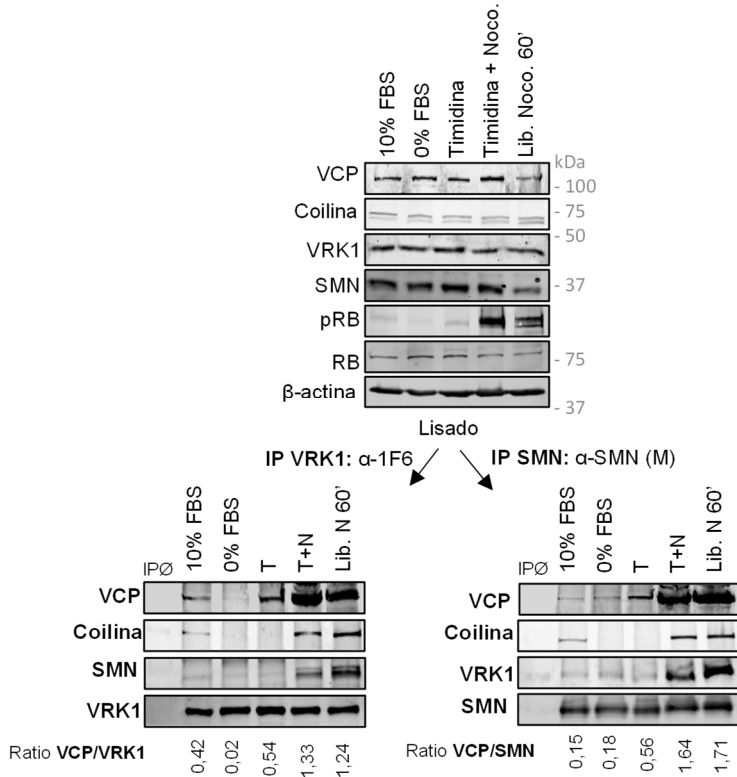
## 8.5. Estudio de las interacciones entre las proteínas VCP, VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular

### 8.5.1. VCP interacciona con VRK1 y SMN, mayoritariamente durante la fase G2/M

Sabemos que VRK1 y coilina son proteínas que se regulan durante el ciclo celular. Por ello, quisimos determinar la relación de estas dos proteínas con VCP y SMN durante las distintas fases del ciclo. Para ello, tratamos células *HeLa* con los compuestos timidina y nocodazol que nos permiten bloquearlas en fase S o G2/M, respectivamente. Así pues, sembramos células *HeLa* a las que se eliminó el suero del medio (parada en fase G0), células con medio de cultivo completo con 10% FBS (células asincrónicas), células a las que se ha tratado durante 24 horas con timidina (fase S), células tratadas con timidina seguido de nocodazol (G2/M) y, finalmente, células a las que se ha liberado del nocodazol durante 1 hora (metafase-anafase). Inmunoprecipitando tanto VRK1 como SMN pudimos observar que las proteínas interaccionaban

- RESULTADOS -

mayoritariamente durante la mitosis, detectando también dichas interacciones en células asincrónicas (Figura 68). Ya se había visto que la quinasa y coilina interaccionaban mayoritariamente durante la fase G2/M, al igual que SMN y coilina y VRK1 y SMN [199].

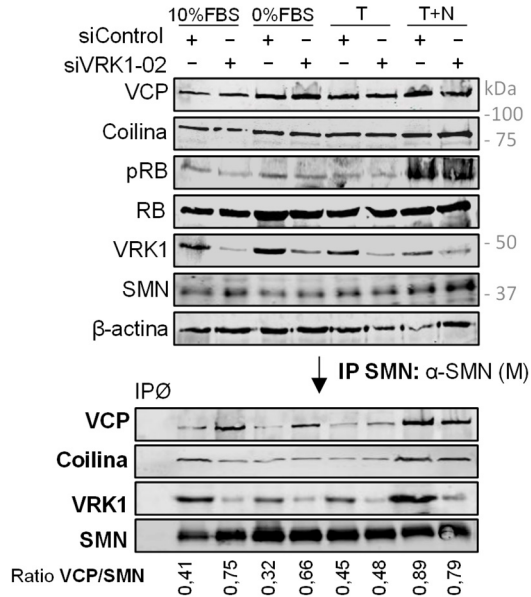


**Figura 68. VCP interacciona con VRK1 y SMN sobre todo durante la fase G2/M.** Células *HeLa* fueron privadas de suero durante 4 días, mantenidas al 10% de suero, tratadas con timidina 2 mM durante 24 h o tratadas con timidina 2 mM 24 h más 12 h de nocodazol 0,33 μM. A una de estas últimas placas, se cambió el medio, liberándolas de fase G2/M, recogiendo las células a los 60 minutos post-liberación. Se lisaron las células y se inmunoprecipitó VRK1 y SMN de 2 mg de extracto proteico. Se detectaron las proteínas en las muestras con los anticuerpos α-VCP (M), α-Coilina (R), α-1F6 (M) y α-SMN (M). Se muestra la ratio VCP/VRK1 y VCP/SMN. T: timidina, N o noco: nocodazol, lib.: liberación.



### 8.5.2. Al silenciar VRK1, la interacción VCP-SMN aumenta en células asincrónicas y G0, pero no durante la fase G2/M

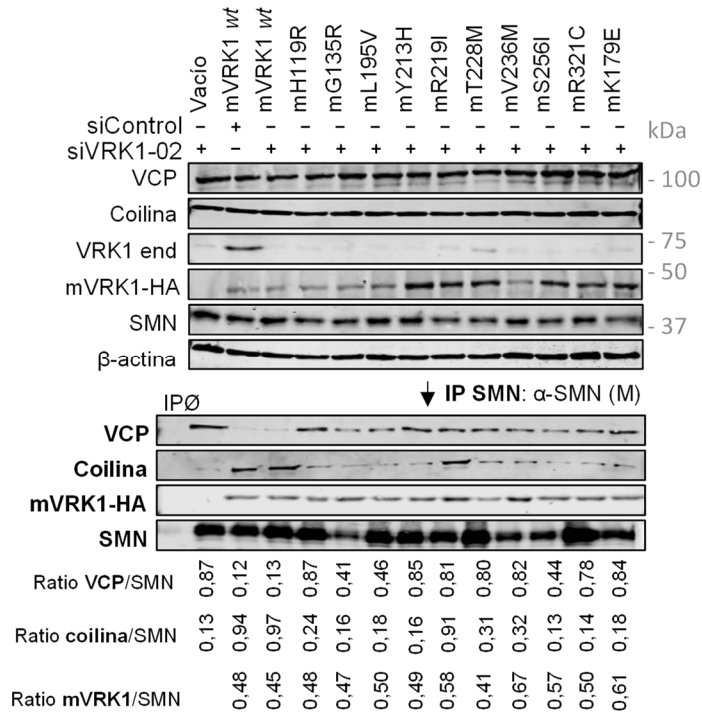
En el apartado 8.3.5. observamos un aumento en la interacción VCP-SMN al deplecionar VRK1 de la célula. Por tanto, lo siguiente que nos preguntamos fue durante qué fase del ciclo se producía este aumento de interacción, al haber comprobado que estas dos proteínas interactuaban principalmente durante la mitosis. Realizando ensayos de inmunoprecipitación de SMN en todas las fases del ciclo en células *HeLa*, habiendo silenciado inicialmente el gen de la quinasa humana, comprobamos que, inesperadamente, este aumento de interacción se producía en fase G0 (y células asincrónicas) y no durante la mitosis (Figura 69).



**Figura 69. La interacción entre SMN y VCP aumenta cuando se silencia VRK1 en células paradas en G0.** Se sembraron células *HeLa* y a las 24 h se silenció el gen *VRK1* con un siARN específico y un siControl. Tras 24 h, se eliminó el suero durante 4 días (0% FBS, G0), se mantuvieron con suero (10% FBS, asincrónicas), se las trató con timidina 2 mM durante 24 h (fase S) o se las añadió timidina 2 mM 24 h más 12 h de nocodazol 0,33  $\mu$ M (fase G2/M). Se inmunoprecipitó SMN endógena de 1 mg de extracto proteico y se detectaron las proteínas VCP, coilina y VRK1 con los anticuerpos específicos. Se representa la ratio VCP/SMN (control de la IP). T: timidina, N: nocodazol.

### 8.5.3. La interacción VCP-SMN se ve alterada en las distintas líneas celulares que portan las variantes de la quinasa

El último aspecto que quisimos estudiar fue la relación de VCP y SMN con las variantes patogénicas descritas de VRK1. Ya habíamos visto que la interacción de ellas con SMN no se veía modificada, mientras que había variantes que interactuaban más o menos con VCP tanto en células asincrónicas como en mitosis, cuando la interacción VRK1-VCP es máxima. Así pues, quisimos comprobar qué ocurría con la interacción VCP-SMN en presencia de estas variantes. En las líneas *HeLa* estables generadas, se observa que la interacción entre las dos proteínas en presencia de todas las variantes es similar a la que se produce cuando no se expresa VRK1 humano ni murino (línea vacío) en células asincrónicas. En presencia de VRK1 murino, dicha interacción es menor significativamente (Figura 70).



**Figura 70. La interacción SMN-VCP aumenta en las líneas que poseen las variantes murinas de VRK1.** Se sembraron células de las líneas estables *HeLa* y se silenció el gen *VRK1* humano con un siARN específico. A los 3 días, se lisaron las células y se inmunoprecipitó SMN de 2 mg de extracto proteico. Se detectaron las proteínas con sus anticuerpos específicos. Se muestra la ratio VCP/SMN obtenida.

## DISCUSIÓN



## **1. Frecuencias alélicas de las variantes patogénicas de VRK1**

VRK1 es una quinasa que ha sido ampliamente estudiada ya que se encuentra implicada en numerosos procesos celulares esenciales para la supervivencia celular: proliferación del ciclo celular, remodelación de la cromatina, ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear, y en la respuesta a la reparación de las roturas de doble cadena del ADN [31–32–39–40]. Además, desde el 2008, se ha observado que esta proteína también tiene un papel muy importante en el desarrollo del sistema nervioso y en la supervivencia de las neuronas. Se ha descrito que ratones que expresan sólo el 15% de esta quinasa presentan problemas motores y una reducción del tamaño del cerebro [202]. Además, los pacientes que expresan la variante patogénica R358X, poseen fallos en la guía de los axones, que provocan alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso, presentando microcefalia con un patrón giral simplificado de la vermis posterior del cerebelo [81]. Dado que se han descrito varias variantes de la quinasa en pacientes jóvenes con neuropatías variadas, nos centramos en el estudio de ellas para intentar esclarecer la relación entre la quinasa y las patologías con las que cursa.

La frecuencia alélica de estas mutaciones es muy baja en la población, encontrándose en la mayoría de los casos en poblaciones muy concretas, en las que la probabilidad de que existan las variantes en homocigosis es más alta de lo que cabría esperar. De hecho, los individuos que presentan las variantes en esta condición (R358X, R133C, W375X, R387H, Y213H, D263G) proceden de familias consanguíneas. En todos los casos, al analizar el genotipo de los padres de los pacientes se observa que son heterocigotos. Estas personas no muestran ninguna patología, lo que indica que solo cuando se presentan las mutaciones en heterocigosis compuesta u homocigosis, se desarrolla la enfermedad.

Hasta la fecha, se han descrito 25 variantes relacionadas con pacientes con síndromes neuromotores, las 20 recogidas en este trabajo, junto con R89X, L200P, Q326X, y las mutaciones en el intrón c.710-14T y c.1159+1G>A, que están siendo caracterizadas actualmente, por lo que no se incluyen resultados de ellas.

## 2. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica

La primera propiedad que estudiamos de las variantes patogénicas de la quinasa fue su estabilidad estructural y su vida media en la célula. En nuestro laboratorio hemos analizado la estabilidad de las distintas variantes utilizando dos estrategias: mediante la predicción del efecto de las mutaciones sobre la estructura de la quinasa y utilizando un sistema *in vivo*, inhibiendo la síntesis *de novo* de las proteínas y estudiando de esta forma su vida media en la célula. La variante R358X, la más estudiada hasta la fecha, genera una proteína ligeramente inestable, que carece del extremo carboxilo terminal [81]. El estudio de las variantes R89Q, H119R, R133C, G135R, L195V, V236M, R321C, así como de R358X se realizó en 2019 [107].

La quinasa humana VRK1 *wt*, es una proteína que permanece en la célula estable más de 24 horas al inhibir la síntesis proteica *de novo* [107]. Teniendo en cuenta las 20 variantes hasta ahora estudiadas, podemos establecer tres grupos según la estabilidad que presentan en la célula: variantes estables, formado por P79L, R89Q, H119R, R219I, T228M, V236M, G257S, D263G, W375X y R387H; ligeramente inestables, que incluye R133C, G135R, L195V, Y213H, T256I, D267G, R358X; e inestables, formado por W254L, R241C y R321C (tabla 13). Observando estas mutaciones en la estructura de la quinasa, vemos que, el cambio de un aminoácido a otro hace que se altere el plegamiento correcto de la proteína, perdiéndose interacciones con unos aminoácidos y/o ganándose con otros, no permitiendo la interacción entre el extremo carboxilo terminal y el dominio catalítico, o bien con el ATP o con otras proteínas que en la célula sean esenciales, comprometiendo su estabilidad.

Hemos observado que las variantes R241C, W254L y R321C son muy inestables, decayendo sus niveles proteicos rápidamente en las células. En el caso de R241C parece que esta inestabilidad proteica se debe a la pérdida de interacción con otros residuos con los que forma un clúster polar, inestabilizando localmente la estructura de la quinasa. Por otra parte, el Trp254 interacciona con una serie de residuos hidrofóbicos cerca del centro catalítico de la quinasa, estabilizando la proteína. Su cambio a leucina,

también hidrófoba, pero de tamaño mucho más pequeña, hace que se desestabilice la estructura al perderse distintas interacciones. Por último, la pérdida de estabilidad de R321C parece que viene dada por la pérdida de interacciones con los aminoácidos Asp163, Tyr167 y Arg103 localizados en su  $\alpha$ -hélice vecina [103].

Conocer la estabilidad de las variantes de la quinasa es esencial a la hora de intentar establecer una relación entre el fenotipo que muestran los pacientes y la presencia de estas variantes. Una alteración de los niveles proteicos de VRK1 podría suponer la desregulación de los procesos en los que la quinasa se encuentra implicada. Sin embargo, esta quinasa podría presentar mayor o menor actividad catalítica, de forma independiente de su actividad. Por tanto, las proteínas que son estables podrían no ser funcionales, y las inestables, podrían ser muy activas. Por ello, estudiamos también estas características de las variantes.

### **3. Las variantes patogénicas de VRK1 presentan distinta actividad quinasa *in vitro***

VRK1 fosforila y activa numerosas proteínas diana. Cuando no se expresa en las células o cuando se encuentra mutada, se ven afectados procesos esenciales, poniendo en peligro la supervivencia celular [25–27–32–78–191]. Muchos de estos procesos son críticos en fases tempranas del desarrollo del sistema nervioso. De hecho, se ha observado en modelo de *Drosophila* que VRK1 controla la capacidad proliferativa de las células madre neuronales durante el desarrollo, previniendo su diferenciación y evitando de esta forma un desarrollo anómalo del cerebro [203]. Por ese motivo, el estudio de la actividad quinasa de las variantes sobre diversas dianas es una propiedad esencial que estudiar. Con la finalidad de englobar las principales respuestas en las que la quinasa se encuentra involucrada, diferenciamos cuatro grupos de sustratos. Estudiamos la fosforilación del residuo treonina 3 de la histona H3, asociada a la compactación de la cromatina y a la progresión celular en G2/M; la fosforilación de BAF, involucrada en la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear durante la división celular; proteínas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN (p53, H2A.X y 53BP1) y la

- DISCUSIÓN -

fosforilación de la coilina, esencial para formación de cuerpos de Cajal en las células. Observamos que la actividad de las variantes de VRK1 es independiente del grupo de sustrato que estudiamos. En todos los casos se observa que las variantes R219I y R387H, y en menor medida T228M y W375X presentan una actividad quinasa similar a la de VRK1 *wt*. Teniendo en cuenta la actividad catalítica de las 20 variantes estudiadas, podemos diferenciar tres grupos: uno con actividad quinasa igual o mayor a VRK1 *wt*, que incluye las variantes R89Q, L195V, R219I y R387H; un segundo con actividad quinasa ligeramente menor a la proteína *wt* que comprende, T228M y W375X, y un tercero con actividad quinasa residual o muy reducida, que engloba a la mayoría de ellas (P79L, H119R, R133C, G135R, Y213H, V236M, R241C, W254L, T256I, G257S, D263G, D267G, R321C y R358X) (tabla 13).

Por otra parte, también pudimos observar la autofosforilación de las variantes, en los ensayos en los que utilizamos ATP radiomarcado con <sup>32</sup>P. La quinasa VRK1 se regula por su autofosforilación en el residuo Thr355 de su cola carboxilo terminal [29]. Este dominio se encuentra plegado hacia el sitio catalítico, lo que es esencial tanto para la actividad de la quinasa como para su estabilidad [24]. De esta forma, vimos que las variantes que fosforilaban a los sustratos en igual o mayor medida que la quinasa *wt*, también presentaban una autofosforilación mayor o similar, mientras que las que fosforilaban en menor medida, mostraban una bajada significativa en su autofosforilación.

Se puede prever que las mutaciones que generan proteínas truncadas, que afectan al extremo carboxilo terminal, como son R358X y W375X, poseen una actividad quinasa menor a la proteína *wt*. En estos casos, se debe a la desregulación de la quinasa debido a un mal plegamiento. Observamos que la variante R358X es más inestable y tiene un nivel residual de fosforilación del sustrato, mientras que la quinasa generada con la mutación W375X es más estable y la fosforilación solo disminuye ligeramente respecto a la proteína *wt* [24]. Por otra parte, las mutaciones R321C y R387H también se encuentran en la cola carboxilo terminal (clúster 3). Se ha descrito que el cambio de arginina a cisteína en el residuo 321 provoca alteraciones en las interacciones entre las cadenas laterales de los



residuos colindantes, por lo que además de generar una proteína más inestable, la actividad catalítica también se vería modificada [107]. Por otra parte, no se puede predecir la actividad de la variante R387H ya que no se dispone de la información estructural de esta zona de la quinasa debido a su alta flexibilidad. Sin embargo, hemos visto que dicha variante es capaz de fosforilar a los sustratos de forma similar a la quinasa *wt*, dado que se encuentra prácticamente al final de proteína.

Centrándonos en las mutaciones que afectan al dominio catalítico (clúster 1), encontramos que la mutación P79L genera una proteína que dificulta la flexibilidad del extremo carboxilo terminal y, por tanto, la actividad catalítica de la quinasa. Al contrario, la proteína que se genera cuando se presenta la mutación H119R tiene una organización más flexible, lo que podría afectar a las interacciones y accesibilidad del ATP o a proteínas reguladoras justificando la pérdida de actividad. Por su parte, los residuos Arg133 y Gly135 interactúan con el ATP, por lo que un cambio en ellos imposibilita dicha interacción, comportándose como variantes sin actividad quinasa. Por último, el cambio de arginina a glutamina en el residuo 89, parece que confiere estabilidad a la proteína, lo que podría explicar la alta actividad catalítica de la variante [103].

Estudiando las mutaciones que afectan al clúster 2, nos centramos en los residuos Tyr213 y Asp263, caracterizadas recientemente en nuestro laboratorio. El cambio de tirosina a histidina en el residuo 213 provoca alteraciones en la interacción con la cola carboxilo terminal [101], y por tanto en su autofosforilación y actividad quinasa. El cambio de ácido aspártico a glicina en el aminoácido 263 genera alteraciones en interacciones necesarias para el plegamiento correcto de la región amino terminal que dificultan el acceso del ATP al sitio catalítico, generando una variante catalíticamente inactiva [104]. En cuanto a la variante L195V, el cambio de un aminoácido grande (leucina) por otro más pequeño (valina) podría favorecer la entrada del ATP al sitio catalítico, ya que se conoce que este residuo es necesario para la interacción con el ATP [24–104]. Esto podría explicar por qué esta variante tiene unos niveles de autofosforilación y fosforilación de los sustratos mucho mayores a los de la quinasa *wt*. Por otra parte, el cambio de arginina a isoleucina en el residuo 219 y de treonina a metionina en el 228 no

parece que estructuralmente afecte a la actividad catalítica de la quinasa. Sin embargo, hemos visto que la variante T228M tiene una actividad quinasa significativamente menor a la proteína *wt*. Por último, no está claro el efecto del cambio de valina a metionina en el residuo 236, dado que en la estructura no parece que esta mutación genere cambios, pero se comporta como inactiva catalíticamente.

Por lo tanto, la mayoría de las variantes descritas de VRK1 asociadas a síndromes neuromotores, tienen una actividad quinasa residual o muy reducida con respecto a la *wt*, por lo que los procesos en los que está implicada esta proteína se verán gravemente afectados en las células que presentan estas variantes.

#### **4. Generación de líneas estables *HeLa* y *A549* portadoras de las variantes patogénicas de VRK1 murino**

Con el objetivo de estudiar el efecto de las variantes de VRK1 en las células, generamos líneas estables *HeLa* y *A549* que expresan estas proteínas. Las líneas se infectaron con el gen *VRK1 murino* dado que la quinasa murina es capaz de rescatar el fenotipo cuando la humana no se expresa [7–201]. De hecho, al comprobar la actividad catalítica de las variantes murinas con los de las humanas en las líneas *A549*, se observa que la proteína murina es más activa que la humana en todos los casos [7]. Aún se están generando todas las líneas con las variantes hasta ahora descritas. Sin embargo, en algunos de los experimentos hemos sobreexpresado la quinasa humana con la mutación correspondiente para trabajar con ella cuando queríamos ver como se comportaría en determinados casos.

Una vez generadas las líneas, lo primero que hicimos fue estudiar si se veía afectada su morfología, así como su capacidad de movimiento y migración. En cuanto a la morfología, no se aprecian diferencias significativas entre las líneas debidas a las variantes que expresan. VRK1 participa no solo en la progresión celular, sino que tiene también un papel muy importante en la diferenciación y migración neuronal durante el desarrollo embrionario, independiente de su actividad quinasa [81–200]. Regula la ruta de la Reelina

- DISCUSIÓN -

a través de la proteína precursora amiloide (APP), observándose en ratones que presentan la mutación R358X, unos niveles reducidos de APP a nivel de ARNm y proteína. APP es una proteína esencial para la migración de las células precursoras neuronales a la corteza cerebral [205]. Realizando ensayos de cierre de herida estudiamos la migración en las líneas, obteniendo que las que presentan las variantes mP79L, mR89Q, mH119R, mG135R, mL195V, mY213H, mV236M y mD267G tienen reducida la migración celular. Hemos observado también que la motilidad de las células que poseen mH119R, mL195V y mV236M se ve reducida con respecto a las células que presenta la proteína *wt*. Todas las variantes que muestran defectos en migración celular tienen en común que aparecen en pacientes con microcefalia o atrofia generalizada del cerebro, presentando además algunos de ellos (pacientes R89Q/V236M), un patrón giral simplificado de la vermis cerebelosa. Se ha relacionado en este sentido la microcefalia observada en los pacientes, con el papel de VRK1 en la proliferación celular. De hecho, se ha visto en un modelo de *Drosophila* que no expresa la quinasa, una reducción muy significativa del número de neuroblastos, que deriva en un desarrollo reducido del cerebro de las larvas [203]. Además, en embriones de ratones que no presentan VRK1, se ha observado que la baja proliferación celular conduce a un desarrollo anómalo del cerebro [81]. Por otra parte, se relaciona el patrón giral simplificado (número reducido de circunvoluciones cerebrales y surcos poco profundos) de los pacientes con el papel que tiene VRK1 en la ruta de la Reelina. Esta señalización es necesaria para la migración y posición adecuada de las neuronas en la corteza cerebral [206] y médula espinal [207]. Así, el defecto en la migración en las células portadoras de algunas de las variantes de la quinasa podría ser debido a la bajada de la expresión de APP en ellas a nivel proteico y/o de ARNm. Sería muy interesante estudiar esta hipótesis puesto que, de ser así, esto podría dar una posible explicación del fenotipo que muestran los pacientes, teniendo como nexo común la quinasa VRK1.

## **5. Estudio de la reparación del daño en el ADN en las líneas estables A549 portadoras de las variantes patogénicas de VRK1**

Las neuronas son muy sensibles al estrés oxidativo producido por las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), debido a su alta actividad metabólica. Las bases nitrogenadas heterocíclicas del ADN y ARN son propensas a sufrir daño oxidativo. Particularmente, la guanina es muy susceptible al ataque por ROS, formándose 8-oxoguanina (8-oxo-G). Existen distintas enzimas que responden ante dichas alteraciones, reparando la molécula, como la oxoguanina glucosidasa (OGG1, del inglés *Oxoguanine glucosidase 1*). Sin embargo, cuando no se consiguen reparar, se producen roturas en el ADN que conducen a la muerte neuronal. Se ha observado que las células de pacientes con distintas enfermedades neurodegenerativas, como esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, Alzheimer y enfermedad de Huntington acumulan más daño por estrés oxidativo en su ADN [197–208–209].

Estudiamos inicialmente la acumulación de daño oxidativo, reflejado en la presencia de 8-oxo-G, en células que poseen las variantes mY213H, mD263G y mR89Q observando un aumento significativo de esta modificación, al igual que ocurre cuando la quinasa (ni humana ni murina) no se expresa en las células. Las variantes R89Q humana y murina se autofosforilan y fosforilan distintos sustratos, al contrario que Y213H y D263G. Estos resultados indican que VRK1 juega un papel en la regulación de la acumulación de daño oxidativo en el ADN. No obstante, no podemos saber si este mecanismo es independiente de la actividad catalítica de la quinasa o si esta acumulación de la base modificada se debe a que se ven alteradas modificaciones postraduccionales, interacciones de las variantes patogénicas con otras proteínas o enzimas esenciales para la reparación de la molécula. Se ha descrito que la actividad de OGG1 se regula mayoritariamente por interacción con otras proteínas y por modificaciones postraduccionales. La acetilación de esta enzima por acetiltransferasas de histonas, como por el complejo CBP/p300 (del inglés *CREB binding protein*), aumenta su actividad, al igual que su fosforilación por la quinasa Cdk4 [210]. Así, VRK1 podría estar regulando a OGG1 activándola y ayudando, de esta forma, en la reparación de las bases nitrogenadas modificadas. De esta forma, la presencia de

- DISCUSIÓN -

mutaciones en la quinasa podría conducir a la generación de roturas en la molécula que pueden llegar a provocar la muerte celular, y favorecer en los pacientes el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos. Se deberían de realizar otro tipo de experimentos para confirmar estos resultados, como analizar las modificaciones de otras bases nitrogenadas, los cambios en los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en todas las líneas estables o la actividad de las enzimas OGG1 o superóxido dismutasa (SOD, del inglés *Superoxide dismutase*).

Cada vez hay más evidencias de que la inestabilidad genómica es una marca distintiva de las enfermedades neurodegenerativas. Durante el desarrollo del individuo, los progenitores neurales son especialmente sensibles a alteraciones en la estabilidad del genoma, pudiendo llegar a causar microcefalia junto con esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Nijmegen u otros desórdenes neurológicos. Fallos en el reconocimiento del daño génico o en la ruta de reparación del daño causan inestabilidad genómica, al verse alterados procesos fundamentales en las células como la replicación del ADN, la citocinesis o la segregación cromosómica en la meiosis [196]. Durante el desarrollo del sistema nervioso, la eficiencia de estos procesos es esencial. Además, también se ha visto que las neuronas maduras son muy dependientes de la reparación del daño génico. Con la edad, aumenta el daño en el ADN de las células, y fallos en la respuesta de reparación la molécula conlleva la acumulación de inestabilidad genómica y pérdida neuronal. En pacientes con esclerosis lateral amiotrófica se ha observado altos niveles de daño génico sobrepasando la capacidad celular de respuesta y reparación [208]. VRK1 tiene un papel fundamental en el proceso de reparación del ADN, fosforilando y activando distintos sustratos claves en la ruta. Dado que hemos observado que, en la mayoría de los casos, tanto la actividad catalítica de las variantes patogénicas de VRK1 como su estabilidad en las células es distinta a la de la quinasa *wt*, podría verse alterada su función en el proceso de reparación del daño génico. Además, también observamos fallos en la migración de las células portadoras de algunas de las variantes, que es importante durante el desarrollo del sistema nervioso.

Normalmente, cuando se producen roturas de doble cadena en el ADN (DSBs), las células que se encuentran en fase S o G2, como los progenitores neurales, preferentemente activan la reparación por extremos homólogos (HR) que requiere más tiempo para finalizarse que la vía de reparación por extremos no homólogos (NHEJ). Sin embargo, las neuronas post-mitóticas se encuentran en fase G0, y utilizan la vía NHEJ, que, al no requerir una secuencia homóloga para la reparación, puede ser más eficiente que la vía HR [196–208]. Con el objetivo de sincronizar las células en G0 y estudiar la reparación de las DSBs por la vía NHEJ, que funciona tanto en células que no se están dividiendo como en las que sí que lo hacen, se eliminó el suero del medio al realizar los experimentos. Observamos que en las líneas estables A549, ninguna de las 17 variantes estudiadas es capaz de rescatar la formación de focos de 53BP1 ni de  $\gamma$ H2A.X, ni la relajación inicial de la cromatina en los sitios de daño mediante la acetilación de la Lys16 de la histona H4. Sabemos que esta acetilación está mediada por la acetiltransferasa TIP-60, que es fosforilada al menos por VRK1, activándola [49]. Además, la actividad de TIP-60 es necesaria para la acetilación y activación por autofosforilación de ATM en respuesta a daño en el ADN. También es esencial para la acetilación de la lisina 5 de la histona H2A.X, necesaria para la acumulación de NBS1 en los sitios dañados, así como para que 53BP1 reconozca la marca epigenética H4K20me2 en dichos sitios [211]. Observamos que la fosforilación de TIP-60 disminuye significativamente en las células que portan las variantes de VRK1, aunque mR89Q, mL195V y mR219I sean capaces de fosforilarlo *in vitro*. Esto indica que para que sea posible la fosforilación de TIP-60 *in vivo*, la variante de VRK1 no solo tiene que ser capaz de fosforilar a este sustrato. Actualmente, en nuestro laboratorio hemos descrito que la fosforilación de la treonina 158 de TIP-60 por VRK1, es previa a la de la serina 199 por la quinasa DNA-PK, y ambas son necesarias para su actividad acetiltransferasa (pendiente de publicación). Sería interesante estudiar en el caso de las variantes catalíticamente activas, el motivo por el cual se ve alterada la fosforilación y por tanto la actividad de TIP-60. Se debería analizar la interacción de estas variantes con TIP-60, y con otras proteínas con las que forma complejos (complejo NuA4/TIP-60) puesto que podrían verse afectadas y, de ahí, verse alterada la ruta de reparación del daño. También sería importante estudiar la relación de la quinasa DNA-PK con VRK1, puesto que podría verse modificada en las líneas portadoras de

las variantes de VRK1, para dilucidar la base de las alteraciones en la ruta de reparación al daño génico en estas células.

Estos resultados analizados en conjunto sugieren que las células de los pacientes que poseen las variantes de VRK1 estudiadas tienen la ruta de reparación al daño alterada desde su inicio, lo cual conllevará, en última instancia, a la muerte celular y el desarrollo de síndromes neurodegenerativos.

## **6. El patrón epigenético de la histona H3 se ve alterado en las líneas estables A549 portadoras de las variantes patogénicas de VRK1**

Se ha observado que distintos mecanismos de regulación epigenética (metilación del ADN, remodelación de la cromatina y modificaciones postraduccionales de las histonas) están involucrados en el correcto funcionamiento y desarrollo de las neuronas. Centrándonos en las modificaciones postraduccionales de las histonas, se han descrito cambios en los patrones de acetilación y metilación de distintos residuos de histonas en desórdenes neurológicos, como Alzheimer, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica [70]. Se ha descrito un aumento de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (aumento de la H3K27ac y H3K4me3 en promotores de distintos genes) y una represión de genes involucrados en la sinapsis en modelos de ratón con Alzheimer [212]. Además, en células de pacientes jóvenes que presentan la enfermedad de Huntington, se ha visto una disminución de la marca epigenética H3K27ac cerca de genes involucrados en la sinapsis y diferenciación neuronal [70].

Actualmente, se está estudiando en nuestro laboratorio la relación de VRK1 con distintas enzimas modificadoras de histonas. Se han observado cambios en el patrón de acetilación y metilación de H3K9 y H3K27 cuando VRK1 no se expresa en las células. En células de *Drosophila*, se ha visto que la depleción de VRK1 resulta en una reducción global de H3K27ac, que se correlaciona con la represión génica generalizada. La proteína CBP actúa junto con la quinasa VRK1 uniéndose a promotores de genes y activando su

transcripción mediada por H3K27ac durante el desarrollo del organismo [213].

Al conocer las alteraciones que se producen en los patrones epigenéticos de las histonas en distintas enfermedades neurodegenerativas y la importancia que tienen en el desarrollo y mantenimiento neuronal, nos centramos en el estudio de los patrones de acetilación y trimetilación de los residuos lisina 9 y 27 de la histona H3, al expresarse las variantes patogénicas descritas de VRK1 en las líneas estables. Observamos que en las células que poseen las tres variantes analizadas (mR89Q, mY213H y mD263G), los niveles de H3K9ac y H3K27ac nucleares disminuyen significativamente, viéndose aumentados los de H3K9me3 y H3K27me3. De modo general, y sin estudiar ningún gen en concreto, estos resultados parecen indicar que la pérdida de VRK1 favorece un estado general de represión transcripcional en las células que expresan las variantes de la quinasa, sean activas o inactivas catalíticamente. Sería interesante estudiar en qué regiones de la cromatina se encuentran alteradas estas modificaciones (promotores, *enhancers*), así como identificar y analizar los genes que se encuentran reprimidos por medio de CHIP-seq (Secuenciación de Inmunoprecipitación de la Cromatina). De esta forma, se podrían estudiar genes desregulados compartidos en los distintos desórdenes neurodegenerativos con los que cursan estas variantes e intentar esclarecer el mecanismo común subyacente.

Se han descrito numerosas enzimas acetilasas, deacetilasas, metilasas y demetilasas que median la remodelación de la cromatina. HDAC1 y 4 (del inglés *Histone deacetylase*), SETDB1 (del inglés *SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1*), KDM3A (del inglés *Lysine Demethylase 3A*), JMJD2a (del inglés *Jumonji C domain-containing lysine demethylase*) o EZH2 son algunas de ellas. Se ha visto que muchas de ellas se regulan por fosforilación. Así, HDAC1 (media la deacetilación de H3K9 y H3K27) se fosforila por la Ser/Thr quinasa NLK (del inglés *Nemo-like kinase*) inhibiendo su actividad y favoreciendo la diferenciación neuronal. La fosforilación en distintas posiciones de EZH2 (media la mono, di y trimetilación de H3K9 y 27) regula su actividad (fosforilación de Ser21 por AKT) y estabilidad (fosforilación de Ser220 por MELK, Thr261 por CDK5), favoreciendo o previniendo la diferenciación neural durante el desarrollo del organismo



[214–215]. De esta forma, VRK1 podría estar regulando a estas enzimas directamente mediante fosforilación, o indirectamente por interacción con las mismas.

Por otra parte, los pacientes que portan las variantes R89Q y Y213H padecen la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT o HMNS), mientras que D263G se ha descrito en pacientes con paraplejia espástica hereditaria (HSP) [101–104]. Actualmente se están desarrollando inhibidores contra distintas enzimas deacetilasas y demetilasas para tratar diversas enfermedades neurodegenerativas. La deacetilasa HDAC6, por ejemplo, se ha visto que es una buena diana para tratar pacientes con CMT. Regula la acetilación de distintas proteínas, pero no de histonas. La acetilación de la  $\alpha$ -tubulina es esencial para el transporte axonal de mitocondrias y vesículas hacia el final de la estructura. En la actualidad, tres inhibidores de HDAC6 se encuentran en evaluación preclínica y en ensayos clínicos, para tratar esta enfermedad, ya que se ha visto que se logra mejorar el transporte axonal mitocondrial y la conducción nerviosa [216].

## **7. La formación de los cuerpos de Cajal se ve alterada en las células que expresan la mayoría de las variantes patogénicas de VRK1**

Los cuerpos de Cajal (CBs) son suborgánulos nucleares dinámicos que juegan un papel importante en el procesamiento de ARNs mensajeros, ensamblaje y maduración de las RNPs pequeñas nucleares y biogénesis del RNA de la telomerasa. La proteína coilina es la principal constituyente de los CBs. Esta proteína interacciona con otras iguales para formar los CBs, pero no se conoce cómo se regula dicha agregación. Se han identificado dos quinasas capaces de fosforilarla *in vitro*: Cdk2 y VRK1 [114–120–199]. En nuestro laboratorio, hemos observado que la quinasa VRK1, pero no otros miembros de la familia VRKs, tiene un papel esencial en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Esta quinasa fosforila a la coilina al menos en el residuo serina 184 y, a su vez, esta fosforilación la protege de su degradación vía proteasoma en el citosol. Esta fosforilación ocurre antes del ensamblaje de los CBs, durante la mitosis, y no es necesaria para el posterior mantenimiento de estas estructuras [117]. Además, la hiperfosforilación de

## - DISCUSIÓN -

la proteína durante la mitosis impide que se oligomericen y se ensamblen los cuerpos de Cajal durante esta fase [114–217].

Se ha descrito que, en las células de tejidos fetales, el número de CBs es más elevado que en los adultos. De hecho, el mayor número de CBs aparece en células del corazón, pulmones y piel durante el desarrollo fetal, mientras que en las células de los tejidos adultos no se muestran estas estructuras. Esto está relacionado con la evidencia de que el número de CBs es más alto en células que se están dividiendo y en las que son metabólicamente muy activas. Únicamente se ha observado que, en las motoneuronas, los CBs son más numerosos en estado adulto que en fetal [218]. En pacientes con SMA, que poseen bajos niveles de SMN, las motoneuronas no presentan CBS. En estos casos, la coilina se encuentra deslocalizada en la región perinucleolar libre de snRNPs y de SMN. De esta forma, la maquinaria de síntesis proteica se ve alterada en estas células, comprometiendo su supervivencia [219]. La integridad de estas estructuras es esencial para el buen funcionamiento neuronal y del organismo. Así, quisimos estudiar la capacidad de formación de los CBs en las células que poseen las variantes patogénicas de VRK1 y poder elucidar si el desarrollo de las enfermedades se podía relacionar con alteraciones en su ensamblaje.

Las motoneuronas son células post-mitóticas (G0), en las que la variación de la organización de los CBs no está asociada al ciclo celular, sino que parece que está relacionada con su requerimiento de actividad transcripcional global [109–220]. No obstante, en 2019, se describió una pérdida significativa del número de los cuerpos de Cajal formados y la promoción de la degradación de la coilina vía proteasoma en motoneuronas de pacientes que expresaban las variantes R219I y W254L de VRK1 [98]. De esta forma, parece que VRK1 juega un papel esencial en el ensamblaje de los CBs en las motoneuronas post-mitóticas, aunque el mecanismo molecular exacto aún no se conoce.

La depleción de VRK1 en las células provoca una pérdida de los cuerpos de Cajal [117]. Además, vimos que la mayoría de las células que expresaban las variantes de la quinasa tenían alterada esta formación. Solamente las células que poseían mR89Q y mR219I no mostraban diferencias significativas en cuanto al número de CBs formados ni al tamaño de estos.

Sabemos que la actividad catalítica de la quinasa es esencial para la correcta formación de estas estructuras. La mayoría de las variantes estudiadas no son capaces de fosforilar a la coilina *in vitro*. Sin embargo, estas dos variantes que rescatan la formación de los CBs tienen actividad catalítica y, comprobamos *in vivo*, que este sustrato se encuentra fosforilado en Ser184 en presencia de estas dos variantes. Además de las anteriores, se observó que L195V también es capaz de fosforilar a la coilina, y T228M y R387H, aunque en menor medida, también lo eran, corroborándose en células que las expresaban, la fosforilación de la proteína en Ser184. Dicha fosforilación parece que protege a la coilina de su degradación, dado que esta proteína se encuentra presente y fosforilada en las células que expresan estas 5 variantes murinas a los 5 días de silenciamiento de la quinasa humana, cuando la coilina desaparece de la célula al degradarse vía proteasoma citosólico [117]. Sin embargo, en las células que expresan las variantes mL195V, mT228M y mR387H se pierde, en gran parte de ellas, el correcto ensamblaje de los CBs. Se han identificado otros 16 residuos fosforilables de la coilina, aparte de la Ser184. La fosforilación en la serina 489 está implicada en la interacción de esta proteína con el ARN [221] y se piensa que puede contribuir al desensamblaje de los CBs [222]. Además, se sabe que la metilación, sumoilación y ubiquitinación son otras modificaciones postraduccionales que puede sufrir esta proteína. Algunos autores sugieren que la sumoilación de la coilina y SMN está implicada en el ensamblaje de los CBs durante la diferenciación neuronal y en respuesta a estrés osmótico [223] y que la reducción de la metilación de la coilina provoca el desensamblaje de los CBs y disminuye su interacción con SMN [199–219]. De esta forma, podría ser que la coilina de las células que portan las variantes T228M, L195V y R387H, además de encontrarse fosforilada en Ser184, posea otras fosforilaciones o modificaciones que dificulten la formación de los CBs.

Por otra parte, el efecto de la quinasa no se reduce solamente a la fosforilación del sustrato, sino de su presencia en la célula al interactuar con otras proteínas, regulando su función. En este caso, observamos que la fosforilación de la Ser184 de la coilina por parte de VRK1 es esencial para la formación de los CBs; no obstante, la interacción entre las dos proteínas también se tiene que llevar a cabo. Se ha observado en nuestro laboratorio

- DISCUSIÓN -

que coilina interacciona con el extremo amino terminal de la quinasa VRK1 (1-267 aa) (datos no publicados). Sin embargo, desconocemos qué aminoácidos de la quinasa están involucrados en dicha interacción. Viendo que la mayoría de las variantes patogénicas descritas poseen mutaciones en esa región, quisimos analizar si se producían alteraciones en su interacción con la coilina. Observamos que se produce una pérdida de la interacción con las variantes G135R, L195V, Y213H, T228M, V236M, R214C, W254L, T256I y G257S. Podría ser que estos residuos estén involucrados en dicha interacción o, que, al mutarse la quinasa en dichas regiones, la estructura terciaria se viese modificada y por ese motivo no interaccionase como debiera con coilina. En el caso de las variantes G135R, L195V, Y213H, R241C, W254L y T256I son mucho más inestables en la célula que la quinasa *wt*. Ese podría ser otro motivo que explicase la disminución de la interacción con coilina, así como con otras proteínas.

Las variantes R89Q y R219I son capaces de recuperar la formación correcta de los CBs en las células. Tienen en común que son muy estables en las células y son catalíticamente activas, siendo capaces de fosforilar a la coilina en Ser184. Además, hemos observado que las dos variantes interaccionan con coilina de forma similar a la quinasa *wt*. En el estudio en el que se han descrito las variantes R219I y W254L de VRK1, se observó una pérdida significativa del número de los cuerpos de Cajal en motoneuronas, así como de los niveles de la quinasa [98]. En nuestros experimentos hemos visto que la variante R219I es estable en la célula y catalíticamente más activa que la quinasa *wt*, mientras que W254L es inestable y no es activa. No obstante, no hemos estudiado cómo se comportan las dos juntas en las células. Podría existir una regulación entre las dos variantes.

En presencia de las variantes T228M y R387H, se forman menos CBs en las células de los presentan con la quinasa *wt*. Sin embargo, un gran número de células los siguen rescatando correctamente. Estas dos variantes son muy estables en las células, pero tanto su interacción con la coilina como su fosforilación es mucho menor que en presencia de la quinasa VRK1 *wt*, pudiendo ser este el motivo por el que el ensamblaje de los CBs se vea alterado en estas células. Por su parte, la mayoría de las células que expresan L195V tampoco rescatan la formación correcta de estas estructuras. La corta

vida media de esta variante en las células y la pérdida de interacción con coilina pueden estar favoreciendo que los CBs no se formen como debiesen.

De esta forma, si los cuerpos de Cajal no se llegan a formar, o si su ensamblaje es defectuoso, la coilina y todos los componentes que se agrupan en estos suborgánulos ya no se encontrarán acumulados en ellos. Por tanto, sería importante estudiar el destino de estas proteínas, como SMN1, ataxina-1, en ausencia de VRK1, ya que nos podría dar pistas de su papel en la patogénesis del complejo fenotipo neurológico asociado a mutaciones en esta quinasa. VRK1 podría ser un nexo común de estos fenotipos asociados a las motoneuronas. Todo esto se desarrollará en el siguiente apartado de la discusión.

## **8. Efecto de VRK1 en SMN y VCP**

VRK1 interacciona y forma complejos con distintas proteínas en las células. Se ha descrito que interacciona directamente y fosforila a las proteínas involucradas en daño génico TIP-60, a la histona H2A.X, 53BP1, NBS1 o p53 [38–49–191]. No obstante, VRK1 también interacciona con otras proteínas, como con coilina, formando complejos proteicos. En el laboratorio, se analizó por espectrometría de masas posibles proteínas que interaccionarían con VRK1, identificándose, entre otras, SMN y VCP. Se ha visto que estas dos proteínas tienen mucha importancia en enfermedades neurodegenerativas. Los pacientes que expresan las variantes de VRK1 padecen desórdenes neuronales muy heterogéneos en cuanto al cuadro clínico que presentan y a las diversas mutaciones en genes descritas asociadas a ellas. De esta forma, quisimos estudiar la relación de la quinasa con SMN, VCP y coilina en las células. Vimos que las cuatro proteínas interaccionaban entre sí en el núcleo, observándose también en el citosol la interacción VCP-SMN. La ATPasa VCP es una proteína muy abundante y ubicua que se localiza tanto en el núcleo como en el citosol, mientras que SMN se encuentra mayoritariamente en el citosol y, en el núcleo, en las geminas y cuerpos de Cajal, donde interacciona con coilina a través de su dominio Tudor [121]. VRK1, a su vez, también es una proteína nuclear, por lo que cabría esperar que la interacción entre todas estas proteínas se llevase a

cabo en el núcleo, mientras que VCP y SMN también podrían interactuar en el citosol.

Se ha observado que la coilina es inestable cuando VRK1 no se expresa en la célula y la fosforilación de su residuo Ser184 no se lleva a cabo, degradándose vía proteasoma citosólico [117]. Por ello, analizamos el efecto del silenciamiento de la quinasa humana en la estabilidad de SMN y de VCP. Observamos que el silenciamiento de VRK1 no afecta a la estabilidad de VCP. Previamente, habíamos visto en el laboratorio que, durante la mitosis, la depleción de VRK1 de las células hace que se disminuyan los niveles de fosforilación de VCP durante esta fase [224]. Sin embargo, no conocemos si esta fosforilación es directa o si existen otras quinasas que fosforilan a VCP cuya actividad dependen de VRK1. Se han descrito varios residuos en el extremo carboxilo terminal de la ATPasa fosforilables por las quinasas ATM, ATR, DNA-PK ante daño génico [225]. La actividad de ATM está en parte regulada por VRK1 y, además, VRK1 es una proteína que se activa ante daño génico. Así, la fosforilación de VCP en esta situación dependería de VRK1. Dado que VCP es muy abundante en la célula (constituye un 1% de la proteína total celular) y participa en numerosos procesos, se encuentra altamente regulada. Parece que tanto la fosforilación como la acetilación y sumoilación de distintos residuos juegan un papel importante en ello, por lo que la estabilidad de esta ATPasa no parece depender solo de su fosforilación por VRK1 u otras quinasas. Se han descrito distintos residuos de fosforilación en su extremo carboxilo terminal importantes en la regulación de las interacciones con distintas proteínas adaptadoras. Además, se ha visto que la acetilación del residuo Lys696, aumenta la actividad ATPasa de la proteína [226].

Por otra parte, en estudios previos se ha visto que SMN no es sustrato de VRK1 [199]. Se ha descrito que mayoritariamente, la estabilidad de SMN viene determinada por su capacidad de oligomerización. Mutaciones en los dominios de interacción con las geminas o de su interacción con otras moléculas de SMN, hace que la vida media de la proteína disminuya [227]. Observamos que el silenciamiento de la quinasa no estaba afectando a su estabilidad, lo que podría indicarnos que su capacidad de oligomerización no se vería afectada. También se ha descrito que esta estabilidad de SMN está

- DISCUSIÓN -

controlada, en parte, por PKA, cuya actividad depende de la concentración de AMPc. De hecho, la sobreexpresión de esta quinasa y de AMPc, provoca la subida de los niveles proteicos de SMN al promover la interacción de SMN con las geminas.

Observamos, por medio de RT-PCR cuantitativa, que al silenciar VRK1 los niveles de ARN mensajero de VCP no se afectaban, mientras que los de SMN aumentaban significativamente. Se ha observado el aumento de los niveles de expresión de VCP ante situaciones de estrés celular, como hipoxia [226]. Al participar tanto VCP como VRK1 en la reparación del daño génico, podría ser que en estos casos sí que hubiese cambios en los niveles de expresión de VCP y que con la depleción de la quinasa se viesan alterados. Por otra parte, se han descrito dos dominios CRE (del inglés *cAMP response elements*) en el promotor de SMN. VRK1, al igual que PKA, fosforila a CREB1 en la serina 133, lo que facilita su unión a los dominios del promotor de SMN, promoviendo la transcripción génica de la proteína [27]. No obstante, observamos que, por el contrario, el silenciamiento de la quinasa conlleva un aumento del ARNm *SMN*. Se piensa que, por el contrario, la fosforilación de la serina 142 de CREB1 bloquea la transcripción de genes ya que no se forma el complejo CREB-CBP (co-activador) [228]. Podría ser que VRK1 fosforilase a la proteína en este residuo, lo que explicaría la activación del promotor de SMN ante el silenciamiento de la quinasa. Esto se podría demostrar mutando los sitios CRE del promotor, para observar si la quinasa tiene efecto en el promotor o si la transcripción de SMN es independiente de la fosforilación de CREB1.

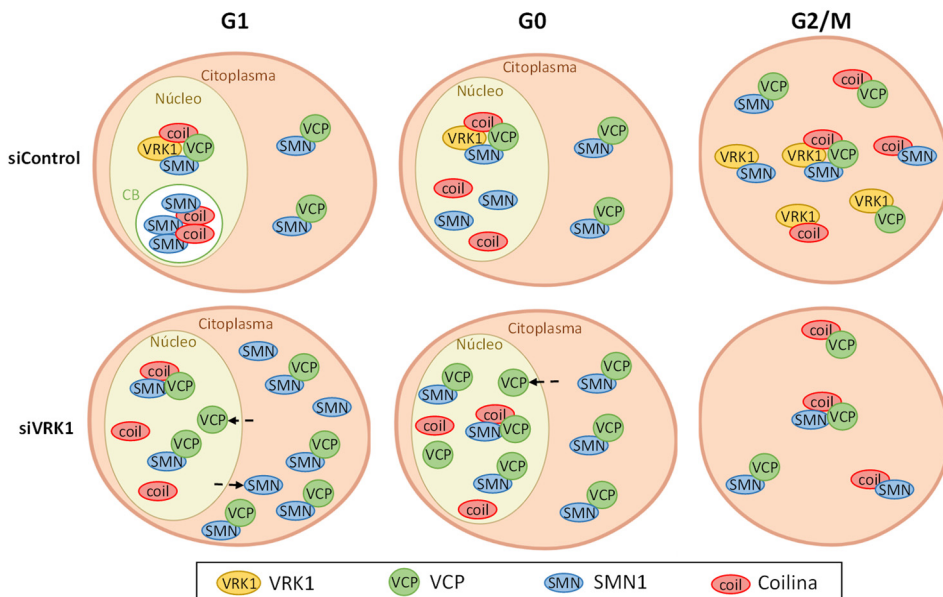
También estudiamos la localización de las proteínas VCP y SMN cuando se silenciaba VRK1. SMN se encuentra difuso por el citosol y aparece en los cuerpos de Cajal y geminas, donde realiza su función. Sin embargo, al silenciar la quinasa, los niveles de fluorescencia en el citosol aumentan significativamente y disminuyen el número de puntos localizados en el núcleo. Esto parece indicar que SMN se desplaza de los cuerpos de Cajal, que no se llegan a ensamblar, al citosol en las células que no presentan VRK1. VCP, en cambio, aparece sobre todo difuso en el citosol en las células. No obstante, cuando se silencia el gen *VRK1*, aumenta significativamente su nivel de fluorescencia en el núcleo. Sin embargo, esto no se observa en los ensayos de fraccionamiento núcleo/citosol. VCP, al ser una proteína muy

abundante y estable en las células, puede que estén ocurriendo ligeras fluctuaciones que sean indetectables mediante *Western blot*. El cambio de la localización de esta proteína podría deberse a que las células que no expresan VRK1 acumulan más daño en el ADN. VCP se podría estar desplazando al núcleo y así actuar en reparación de esta molécula. Se ha descrito que la fosforilación del residuo Ser784 de VCP por las quinasas ATM, ATR y DNA-PK se lleva a cabo ante daño en el ADN, haciendo que la proteína sea más eficiente ayudando a eliminar sustratos poliubiquitinados, como L3MBTL1, más rápidamente [225]. De esta forma, al producir daño génico en las células con doxorubicina, observamos un aumento significativo de VCP en el núcleo. El daño producido lo observamos por medio de un ensayo TUNEL, viendo que las células a las que se ha deplecionado la quinasa, pero no se han tratado con el compuesto, presentan mayor daño génico, y un aumento de fluorescencia de VCP en el núcleo, no tan elevado como cuando se tratan las células con doxorubicina. Así, podríamos concluir que el aumento de VCP en el núcleo podría ser debido a que las células que no expresan la quinasa VRK1 presentan más roturas en el ADN, y esta proteína se desplaza al núcleo para ayudar en la reparación de dicha molécula. Sin embargo, no podemos descartar que VRK1 tenga otras funciones o que haya otras causas por las que VCP se desplaza cuando no se expresa la quinasa. Se ha descrito que la sumoilación de VCP ante situaciones de estrés promueve su traslocación al núcleo y a los gránulos de estrés, aumentando el ensamblaje de los hexámeros, alterando las interacciones con distintos cofactores y facilitando la degradación proteica asociada al retículo endoplasmático [229]. Además, las quinasas ULK1/2 (del inglés *Unc-51 like autophagy activating kinase*) se encuentran en dichos gránulos de estrés y son capaces de fosforilar a VCP en los residuos Ser13, Ser282 y Thr761, aumentando su actividad ATPasa, favoreciendo la recuperación de la célula a un estado normal [230].

Por último, nos propusimos estudiar si la relación de SMN y VCP se veía modificada cuando se silenciaba VRK1, con el objetivo de intentar explicar el efecto de la depleción de VRK1 sobre complejos proteicos importantes en enfermedades neurodegenerativas. Vimos que la interacción entre estas dos proteínas aumentaba, sobre todo en el citosol. Cuando no está presente la quinasa, la mayor parte de la proteína SMN se encuentra en el citosol, donde



puede interactuar con VCP. Hemos observado, que cuando VRK1 se encuentra presente en la célula, pero apenas tiene actividad catalítica (células paradas en G0), la interacción VCP-SMN se mantiene igual que en la condición control. En esta fase, tampoco hay cuerpos de Cajal, pero la cantidad de SMN en el citosol permanece sin alteraciones (datos no mostrados). Parece que VRK1 sigue interactuando con VCP y SMN en el nucleoplasma, evitando la salida de SMN al citosol, por lo que quedaría menos proteína SMN y VCP libre para interactuar entre ellas comparado con cuando no se encuentra la quinasa en la célula. De hecho, cuando se silencia VRK1 y se analizan las interacciones de las proteínas durante el ciclo celular, vemos que la interacción SMN-VCP es máxima cuando las células se encuentran en fase G2/M, así como cuando están paradas en G0 y la quinasa se encuentra silenciada.



**Figura 71. Modelo de la interacción VCP-SMN durante el ciclo celular cuando la quinasa VRK1 está presente o ausente.** Cuando las células no están en división, existen cuerpos de Cajal y VRK1, SMN, VCP y coilina interactúan en el núcleo y SMN y VCP también lo harán en el citosol. Cuando se silencia la quinasa, los CBs desaparecen, desplazándose SMN al citosol y VCP al núcleo. Al existir más SMN y VCP libre en la célula sin formar complejos con VRK1, la interacción SMN-VCP será mayor. En fase G0, las células (no neuronales) no poseen CBs y VRK1 no tiene apenas actividad quinasa. La interacción SMN-VCP se mantiene igual que en fase G1. Al

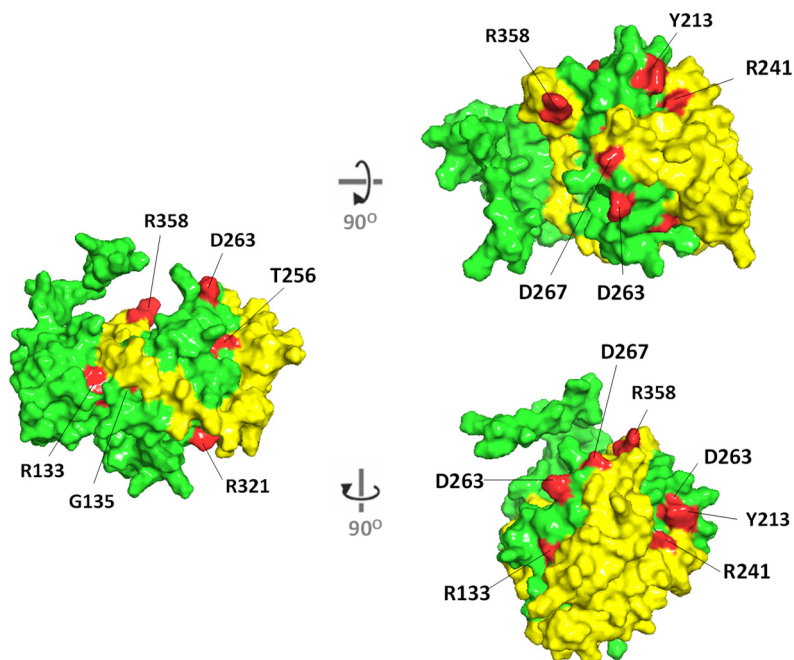
## - DISCUSIÓN -

silenciar la quinasa VRK1 durante esta fase, la interacción SMN-VCP aumenta, dado que existe más proteína libre en la célula que puede interaccionar. Durante G2/M, todas las proteínas se encontrarán en el mismo compartimento celular interaccionando. Cuando no se expresa VRK1, el resto de proteínas seguirán interaccionando.

Dado que hemos observado cambios tanto en la interacción de las proteínas como en la localización subcelular y niveles de expresión génica cuando se silencia VRK1, analizamos qué ocurría en presencia de las variantes patogénicas de la quinasa, e intentamos de este modo explicar algunas de las alteraciones que se producen en las células de los pacientes descritos.

Así pues, observamos que todas las variantes tanto humanas como murinas interaccionaban con SMN, mientras que parecía que se perdía la interacción de VCP con alguna de ellas, tanto en células asincrónicas como cuando se encuentran en mitosis, cuando la interacción es máxima entre estas proteínas. Conocemos que SMN interacciona con VRK1 por su extremo amino terminal (1-267 aa) al igual que la coilina, mientras que VCP lo hace por el carboxilo terminal (267-396 aa) [199–224]. Sin embargo, parece que los residuos involucrados en la interacción con SMN no son los que aparecen mutados. Viendo la posición de todas las mutaciones de VRK1 en su estructura tridimensional, observamos que Gly135, Arg241, Thr256, Asp267, Arg321 y Arg358 se encuentran dispuestos en la superficie con la que VCP interaccionaría (Figura 72). Esto podría explicar la pérdida de interacción de VCP con dichas variantes.

- DISCUSIÓN -



**Figura 72. Estructura tridimensional de VRK1 en la que se muestran algunos de los residuos que se encuentran dispuestos hacia la superficie.** Se representa en color amarillo la región de interacción con VCP (267-396 aa) y en rojo los residuos mutados en los distintos pacientes. Figura realizada con *Pymol* (Schrödinger, LLC, Portland, OR).

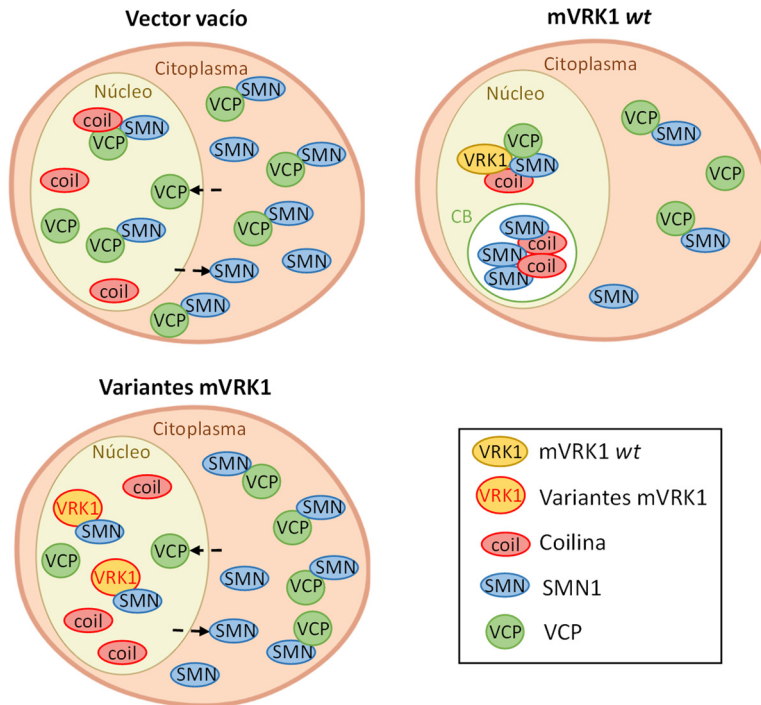
Por otra parte, observamos que en presencia de la mayoría de las variantes de VRK1, SMN aumenta ligeramente en el citosol a excepción de mR219I, donde aparece en los cuerpos de Cajal y en el citosol en niveles parecidos a la quinasa *wt*. SMN y VRK1 interactúan en el nucleoplasma, donde se encuentra VRK1, pero no la mayor parte de SMN. En presencia de las variantes de la quinasa ocurriría de igual forma. No se forman los cuerpos de Cajal y SMN se desplaza hacia el citosol. Sin embargo, el SMN que quedase libre en el nucleoplasma interactuaría con las variantes. En el caso de las células que portan mR219I, los CBs se ensamblan y en ellos se encontrará SMN al igual que en las geminas. Sin embargo, debería de ser la proteína que se encuentre libre en el nucleoplasma la que sigue interactuando con esta variante de la quinasa.

- DISCUSIÓN -

En relación con los cambios de los niveles de expresión de ARNm de SMN en las líneas estables que expresan las variantes de la quinasa, no obtuvimos resultados concluyentes. No se observan diferencias significativas en dichos niveles de expresión. Puede ser que el aumento significativo de la transcripción de SMN ante el silenciamiento de la quinasa no fuese debido a la pérdida de fosforilación de CREB1 por VRK1, sino porque sea necesaria la quinasa independientemente de su actividad catalítica, para interactuar directa o indirectamente con otros factores de transcripción desconocidos.

Con respecto a la ATPasa VCP, observamos mediante inmunofluorescencia, que, en presencia de las variantes de VRK1, los niveles de esta proteína aumentan ligeramente en el núcleo. Sin embargo, este aumento no es significativo en las líneas que portan mH119R, mL195V, mR219I y la quinasa inactiva mK179E. Esto indicaría que no está relacionado con la actividad catalítica de las variantes. Como se ha mencionado anteriormente, VCP actúa indirectamente en la reparación del daño en el ADN participando en la unión del 53BP1 a su marca epigenética H4K20me2, y activando de esta forma el mecanismo de reparación [179]. Por ello, comprobamos que al silenciar el gen *VRK1 humano* de las células de las líneas estables, se acumula más daño en el ADN, independientemente de la actividad catalítica que poseyeran las variantes. No obstante, se observó que las células que poseían *VRK1 murina wt*, mH119R, mR219I, mL195V no acumulaban casi daño, pudiendo ser ésta una explicación de por qué VCP no se acumula en el núcleo. Por tanto, parece que el aumento de esta ATPasa en el núcleo cuando no se expresa VRK1 puede estar relacionado con el daño génico acumulado.

Por último, analizamos la interacción entre VCP y SMN en presencia de las variantes de la quinasa. Se vio que la interacción entre estas proteínas es alta, al igual que cuando no existe la quinasa en las células (línea vacío), mientras que en presencia de *VRK1 murino wt*, la interacción VCP-SMN es menor. Habíamos visto que la interacción SMN-VCP aumentaba significativamente cuando se silenciaba a quinasa. En el caso de las variantes, SMN sigue interactuando con todas ellas. Sin embargo, el aumento de los niveles de esta proteína en el citosol puede ser que sea la causa de que la interacción con VCP sea mayor en estas células.



**Figura 73. Modelo de hipótesis de la interacción VCP-SMN en las células que presentan las variantes patogénicas de VRK1.** Cuando las células expresan mVRK1 wt se recuperan los cuerpos de Cajal y la quinasa, SMN, VCP y coilina interactúan en el núcleo, y SMN y VCP también lo hacen en el citosol. En la línea vacío, al silenciar la quinasa humana, los CB desaparecen, desplazándose SMN al citosol y VCP al núcleo. Al existir más SMN y VCP libre en la célula sin formar complejos con VRK1, la interacción SMN-VCP será mayor. Al expresarse en la célula las variantes de mVRK1, no se llegan a formar los cuerpos de Cajal en presencia de la mayoría de ellas. Todas estas variantes son capaces de interactuar con SMN, pero la mayoría no lo hacen con VCP ni con coilina. Así mismo, los niveles de SMN aumentan en el citoplasma, interactuando con VCP.

Si unimos todos los resultados obtenidos, observamos una serie de procesos celulares alterados en los que la quinasa VRK1 es esencial. La alteración de todos los mecanismos estudiados está implicado en el desarrollo de patologías neurodegenerativas. Durante el desarrollo neural, es esencial que tanto los progenitores neurales como las neuronas post-mitóticas migren su lugar específico del organismo, así como que se lleve correctamente la reparación de las roturas que se produzcan en el ADN y la regulación exhaustiva de las marcas epigenéticas como la acetilación y

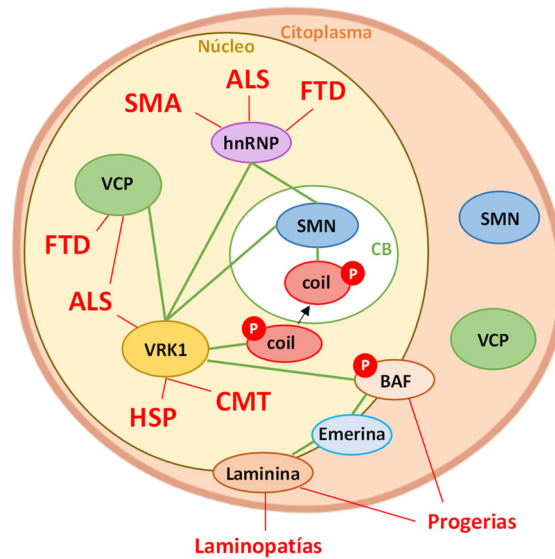
- DISCUSIÓN -

trimetilación de la lisina 9 y 27 de la histona H3. Así, hemos observado que las células que portan las distintas variantes patogénicas de VRK1 descritas en pacientes, acumulan más daño génico que en condiciones normales y tienen alterada de algún modo la ruta de reparación de las roturas de la molécula. Además, hemos visto alteraciones en el patrón epigenético de la histona H3, que conlleva una represión de la transcripción génica general, que podría estar afectando a genes importantes durante la migración, desarrollo y diferenciación neural (tabla 13).

Por otra parte, vimos que las células que poseen la mayoría de las variantes de la quinasa no son capaces de formar eficientemente los cuerpos de Cajal, lugar donde se encuentra SMN junto a otras proteínas. Así, la biogénesis y maduración de las RNPs se verá alterada, y, por tanto, el metabolismo de los ARNm y la formación de los telómeros. La regulación de la traducción de los ARNm en los botones sinápticos, así como el transporte de estas moléculas a lo largo del citoesqueleto del axón de las neuronas motoras y nervios periféricos es muy exhaustiva, dado que los axones de estas células pueden llegar a medir un metro de longitud. Las ribonucleoproteínas hnRNPs y el complejo SMN son esenciales en estos procesos, y fallos en ellos conlleva al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como ALS, SMA, FTD o Alzheimer [231–232]. Además, en pacientes con ALS y FTD también se han descrito diversas mutaciones en la ATPasa VCP, que forma complejos con VRK1 y otras proteínas. Estos dos desórdenes tienen en común la desregulación del procesamiento de los ARNs y, por tanto, de la homeostasis de las proteínas.

Por último, cabe destacar que también hemos visto que la mayoría de las variantes patogénicas de VRK1 no rescatan la fosforilación de la proteína BAF, necesaria para el desensamblaje de la membrana nuclear durante la división celular. Esta proteína interacciona con laminina y emerina, y se han descrito mutaciones en ellas en progerias y laminopatías. Así, la relación de estas proteínas con la quinasa VRK1 abriría un nuevo campo de investigación.

- DISCUSIÓN -

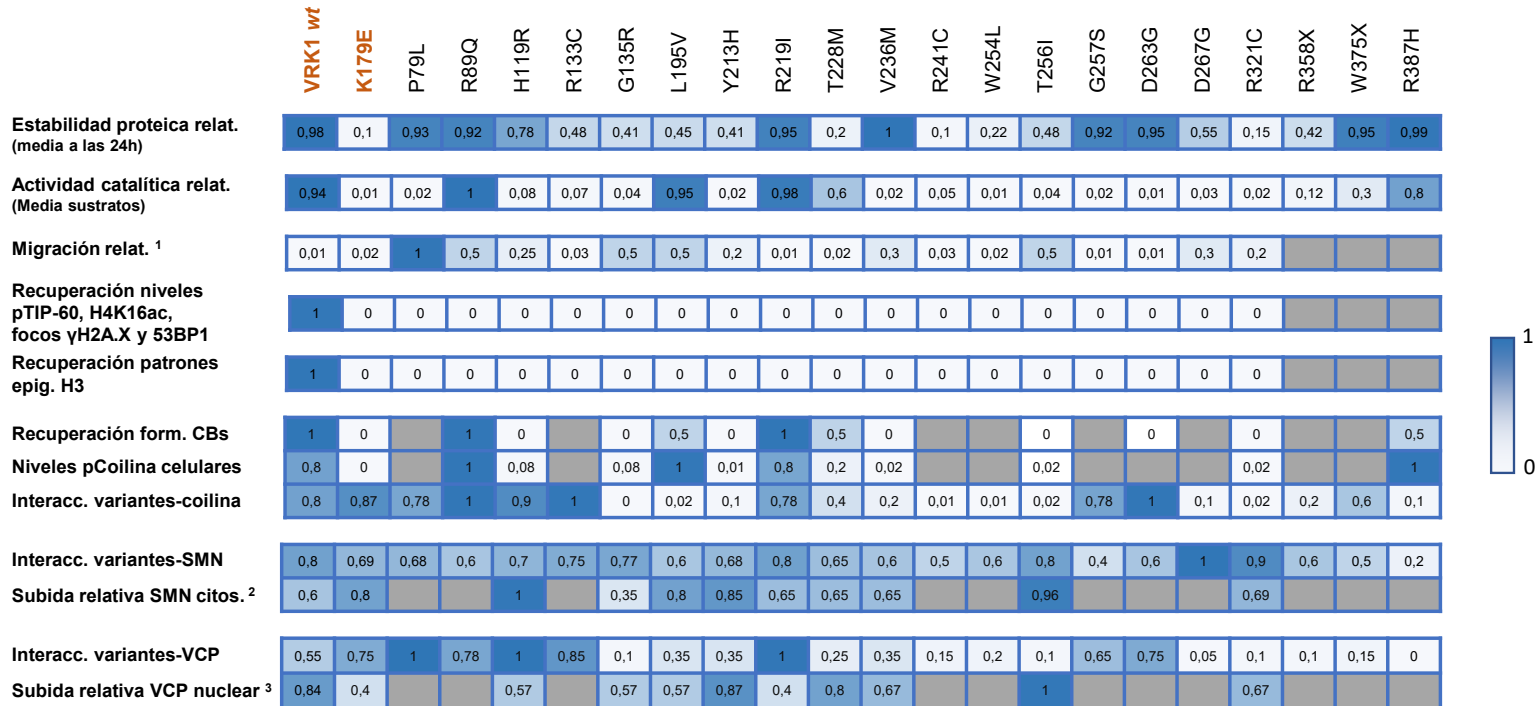


**Figura 74. Esquema donde se representan las enfermedades neurodegenerativas asociadas a las proteínas estudiadas.** Se representa en líneas verdes las interacciones entre las proteínas y en rojo las enfermedades asociadas. CB: cuerpo de Cajal; hnRNP: ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares; coil: coilina; SMA: atrofia muscular espinal; ALS, esclerosis lateral amiotrófica; FTD: demencia frontotemporal; HSP: paraplejia espástica hereditaria; CMT: Charcot Marie-Tooth o neuropatía sensitivomotora hereditaria.

Por tanto, tenemos distintas interacciones y fosforilaciones de proteínas que se deberían de continuar estudiando para conocer el mecanismo molecular de un conjunto de enfermedades neurodegenerativas y poder buscar dianas terapéuticas que nos ayuden a encontrar nuevos tratamientos y evitar la muerte en edades tan tempranas.

**Tabla 13. Tabla resumen de los resultados obtenidos en este trabajo.** Se muestran los valores relativos de los experimentos tomando como 1 el valor más alto y 0 el más bajo. Se representa en color gris los ensayos no realizados.

- DISCUSIÓN -



<sup>1</sup> Migración: Área herida inicial-final a las 24h (media 2 líneas). Se toma el valor más alto de diferencia como 1 y se relativizan los valores respecto a él.

<sup>2</sup> Subida relativa de los niveles de SMN en el citosol de las líneas. Se representa la diferencia de los niveles SMN citos./A en las líneas que expresan VRK1 - niveles SMN citos./A en las líneas que no expresan VRK1. Se toma el valor más alto de diferencia como 1 y se relativizan los valores respecto a él.

<sup>3</sup> Subida relativa de los niveles de VCP en el núcleo de las líneas. Se representa la diferencia de los niveles VCP nuclear/A en las líneas que expresan VRK1 - niveles VCP nuclear/A en las líneas que no expresan VRK1. Se toma el valor más alto de diferencia como 1 y se relativizan los valores respecto a él.



## CONCLUSIONES



- CONCLUSIONES -

1. Las variantes de VRK1 presentan distinta estabilidad proteica, pudiendo clasificarlas en tres grupos: variantes estables (P79L, R219I, T228M, G257S, D263G, W375X y R387H), ligeramente inestables (Y213H, T256I y D267G) e inestables (W254L y R241C). La inestabilidad es debida a la alteración del plegamiento correcto de la quinasa.
2. Las variantes R89Q, L195V, R219I y R387H, y en menor medida T228M y W375X, presentan actividad quinasa, autofosforilándose y fosforilando a distintos sustratos. El resto de las variantes estudiadas (P79L, Y213H, R241C, W254L, T256I, G257S, D263G y D267G) muestran una actividad catalítica residual.
3. La capacidad de migración celular se ve reducida en las líneas celulares estables que presentan las variantes de la quinasa VRK1 murina mP79L, mR89Q, mH119R, mG135R, mL195V, mY213H, mV236M, mS256I, mD267G y mR321C.
4. Las células que presentan las variantes VRK1 murina mR89Q, mY213H y mD263G acumulan más daño oxidativo en el ADN, reflejado en la presencia de 8-oxo-G, que cuando expresan la quinasa *wt*.
5. Ninguna de las líneas celulares estables que presentan las 20 variantes de VRK1 murina estudiadas recuperan la reparación del daño en el ADN generado con doxorubicina. mR89Q, mL195V y mR219I presentan actividad quinasa *in vitro*, fosforilando los sustratos TIP-60, H2A.X y 53BP1 ante daño génico. Sin embargo, en presencia de dichas variantes, no se recupera la fosforilación de TIP-60 *in vivo*, encontrándose de esta forma alterada la respuesta de reparación.
6. Los patrones de acetilación y trimetilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 se ven alterados en las líneas celulares estables que portan las variantes murinas R89Q, Y213H y D263G, favoreciendo un estado de represión transcripcional global en dichas células.
7. Solo las células que presentan mR89Q y mR219I logran rescatar eficientemente el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Las células que expresan mR89Q, mL195V, mR219I, mT228M y mR387H presentan fosforilada la coilina en el residuo serina 184 durante fase G2/M, lo que la protege de su degradación. Sin embargo, se mantiene la interacción de las variantes R89Q y R219I con coilina, mientras que se pierde con L195V, T228M y R387H.

- CONCLUSIONES -

8. VRK1, SMN, VCP y coilina interaccionan en el núcleo. Además, SMN y VCP también lo hacen en el citosol.
9. El silenciamiento de la quinasa VRK1 promueve la translocación de SMN al citosol y VCP se recluta al núcleo. El incremento de los niveles nucleares de VCP podrían deberse al papel que tiene esta proteína en la respuesta de reparación del daño en el ADN.
10. El incremento de los niveles de SMN citosólicos se presenta en la mayoría de las líneas celulares estables que expresan las variantes de VRK1 murina.
11. En las células que expresan las variantes de la quinasa, al igual que cuando se depleciona VRK1, la interacción SMN y VCP es mayor que cuando se presenta VRK1 *wt*.

## BIBLIOGRAFÍA



- BIBLIOGRAFÍA -

1. S. K. Hanks & T. Hunter, The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *The FASEB Journal*, **9** (1995) 576–596. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768349>.
2. J. A. Ubersax & J. E. Ferrell, Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8** (2007) 530–541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>.
3. I. Shchemelinin, L. Šefc, & E. Nečas, Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biologica*, **52** (2006) 81–101.
4. T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80** (1995) 225–236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90405-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90405-0).
5. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, & S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298** (2002) 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
6. G. Manning, G. D. Plowman, T. Hunter, & S. Sudarsanam, Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*, **27** (2000) 514–20. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02179-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02179-5).
7. R. J. Nichols & P. Traktman, Characterization of Three Paralogous Members of the Mammalian Vaccinia Related Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (2004) 7934–7946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310813200>.
8. J. I. Nezu, A. Oku, M. H. Jones, & M. Shimane, Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, **45** (1997) 327–331. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4938>.
9. K. A. Boyle & P. Traktman, Members of a novel Family of mammalian protein kinases complement the DNA-negative phenotype of a Vaccinia virus ts mutant defective in the B1 kinase. *Journal of Virology*, **78** (2004) 1992–2005. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1992-2005.2004>.
10. F. M. Vega, P. Gonzalo, M. L. Gaspar, & P. A. Lazo, Expression of the VRK (Vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Letters*, **544** (2003) 176–180. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00501-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00501-5).
11. E. P. F. Klerkx, P. A. Lazo, & P. Askjaer, Emerging biological functions of the Vaccinia-related Kinase (VRK) family. *Histology and Histopathology*, **24** (2009) 749–759. <https://doi.org/10.14670/HH-24.749>.
12. Y. Ho, S. Mason, R. Kobayashi, M. Hoekstra, & B. Andrews, 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 of the United States of America*, **94** (1997) 581–586. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.581>.
13. N. Dhillon & M. F. Hoekstra, Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO Journal*, **13** (1994) 2777–2788. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06571.x>.
14. M. Gorjánác, E. P. F. Klerkx, V. Galy, R. Santarella, C. López-Iglesias, P. Askjaer, & I. W. Mattaj, *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO Journal*, **26** (2007) 132–143. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601470>.
15. K. Waters, A. Z. Yang, & V. Reinke, Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C. elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53. *Developmental Biology*, **344** (2010) 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ydev.2006.05.022>.

- BIBLIOGRAFÍA -

16. H. Aihara, T. Nakagawa, K. Yasui, T. Ohta, S. Hirose, N. Dhomae, K. Takio, M. Kaneko, Y. Takeshima, M. Muramatsu, & T. Ito, Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes and Development*, **18** (2004) 877–888. <https://doi.org/10.1101/gad.1184604>.
17. O. M. Lancaster, C. F. Cullen, & H. Ohkura, NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. *Journal of Cell Biology*, **179** (2007) 817–824. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706067>.
18. I. Zelko, R. Kobayashi, P. Honkakoski, & M. Negishi, Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **352** (1998) 31–36. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0582>.
19. F. M. Vega, P. Gonzalo, M. L. Gaspar, & P. A. Lazo, Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Letters*, **544** (2003) 176–180. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00501-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00501-5).
20. S. Lopez-Borges & P. A. Lazo, The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the MDM-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*, **19** (2000) 3656–3664. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203709>.
21. S. Blanco, L. Klimcakova, F. M. Vega, & P. A. Lazo, The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS Journal*, **273** (2006) 2487–2504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05256.x>.
22. E. D. Scheeff, J. Eswaran, G. Bunkoczi, S. Knapp, & G. Manning, Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure*, **17** (2009) 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.018>.
23. C. H. Park, H. G. Ryu, S. H. Kim, D. Lee, H. Song, & K. T. Kim, Presumed pseudokinase VRK3 functions as a BAF kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1853** (2015) 1738–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.007>.
24. J. Shin, G. Chakraborty, N. Bharatham, C. B. Kang, N. Tochio, S. Koshiba, T. Kigawa, W. Kim, K. T. Kim, & H. S. Yoon, 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** (2011) 22131–22138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200162>.
25. A. Valbuena, I. López-Sánchez, & P. A. Lazo, Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PLoS ONE*, **3** (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001642>.
26. C. R. Santos, M. Rodríguez-Pinilla, F. M. Vega, J. L. Rodríguez-Peralto, S. Blanco, A. Sevilla, A. Valbuena, T. Hernández, A. J. Van Wijnen, F. Li, E. De Alava, M. Sánchez-Céspedes, & P. A. Lazo, VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer Research*, **4** (2006) 177–185. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0212>.
27. T. H. Kang, D. Y. Park, W. Kim, & K. T. Kim, VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *Journal of Cell Science*, **121** (2008) 3035–3041. <https://doi.org/10.1242/jcs.026757>.
28. N. Riggi, B. Knoechel, S. M. Gillespie, E. Rheinbay, G. Boulay, M. L. Suvà, N. E. Rossetti, W. E. Boonseng, O. Oksuz, E. B. Cook, A. Formey, A. Patel, M. Gymrek, V. Thapar, V. Deshpande, D. T. Ting, F. J. Hornicek, G. P. Nielsen, I. Stamenkovic, M. J. Aryee, B. E. Bernstein, & M. N. Rivera, EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma The aberrant transcription factor EWS-FLI1 drives Ewing sarcoma yet its molecular



- BIBLIOGRAFÍA -

- function is incompletely understood. We find t. *Cancer Cell*, **26** (2014) 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.004.EWS-FLI1>.
29. R. Barcia, S. López-Borges, F. M. Vega, & P. A. Lazo, Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human Vaccinia-related kinase 1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **399** (2002) 1–5. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2746>.
  30. C. H. Park, B. H. Choi, M. W. Jeong, S. Kim, W. Kim, Y. S. Song, & K. T. Kim, Protein kinase C $\delta$  regulates Vaccinia-related kinase 1 in DNA damage-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, **22** (2011) 1398–1408. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0717>.
  31. M. Sanz-García, D. M. Monsalve, A. Sevilla, & P. A. Lazo, 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** (2012) 23757–23768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353102>.
  32. A. Valbuena, M. Sanz-García, I. López-Sánchez, F. M. Vega, & P. A. Lazo, Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cellular Signalling*, **23** (2011) 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.002>.
  33. M. Sanz-García, I. López-Sánchez, & P. A. Lazo, Proteomics identification of nuclear Ran GTPase as an inhibitor of human VRK1 and VRK2 (Vaccinia-related kinase) activities. *Molecular and Cellular Proteomics*, **7** (2008) 2199–2214. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700586-MCP200>.
  34. W. Kim, G. Chakraborty, S. Kim, J. Shin, C. H. Park, M. W. Jeong, N. Bharatham, H. S. Yoon, & K. T. Kim, Macro histone H2A1.2 (MacroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (2012) 5278–5289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281709>.
  35. I. Barcia-Sanjurjo, M. Vázquez-Cedeira, R. Barcia, & P. A. Lazo, Sensitivity of the kinase activity of human vaccinia-related kinase proteins to toxic metals. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **18** (2013) 473–482. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-0992-6>.
  36. Y. S. Kim, S. H. Kim, J. Shin, A. Harikishore, J. K. Lim, Y. Jung, H. N. Lyu, N. I. Baek, K. Y. Choi, H. S. Yoon, & K. T. Kim, Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting Vaccinia-related kinase 1. *PLoS ONE*, **9** (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109655>.
  37. A. Valbuena, I. López-Sánchez, F. M. Vega, A. Sevilla, M. Sanz-García, S. Blanco, & P. A. Lazo, Identification of a dominant epitope in human Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **465** (2007) 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.abi.2007.06.005>.
  38. M. Salzano, M. Sanz-García, D. M. Monsalve, D. S. Moura, & P. A. Lazo, VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics*, **10** (2015) 373–383. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1028708>.
  39. I. López-Sánchez, M. Sanz-García, & P. A. Lazo, Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser 342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Molecular and Cellular Biology*, **29** (2009) 1189–1201. <https://doi.org/10.1128/mcb.01341-08>.
  40. R. J. Nichols, M. S. Wiebe, & P. Traktman, The Vaccinia-related kinases phosphorylate the Nt Terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Molecular Biology of the Cell*, **17** (2006) 2451–2464. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-12-1179>.

- BIBLIOGRAFÍA -

41. F. M. Vega, A. Sevilla, & P. A. Lazo, p53 Stabilization and Accumulation Induced by Human Vaccinia-related kinase 1. *Society*, **24** (2004) 10366–10380. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10366>.
42. I. López-Sánchez, A. Valbuena, M. Vázquez-Cedeira, J. Khadake, M. Sanz-García, A. Carrillo-Jiménez, & P. A. Lazo, VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage. *FEBS Letters*, **588** (2014) 692–700. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.040>.
43. A. Sevilla, C. R. Santos, F. M. Vega, & P. A. Lazo, Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (2004) 27458–27465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401009200>.
44. A. Sevilla, C. R. Santos, R. Barcia, F. M. Vega, & P. A. Lazo, c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene*, **23** (2004) 8950–8958. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208015>.
45. S. L. Berger, The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447** (2007) 407–412. <https://doi.org/10.1038/nature05915>.
46. T. Kouzarides, Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, **128** (2007) 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
47. T.-H. Kang, D.-Y. Park, Y. H. Choi, K.-J. Kim, H. S. Yoon, & K.-T. Kim, Mitotic histone H3 phosphorylation by Vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, **27** (2007) 8533–8546. <https://doi.org/10.1128/mcb.00018-07>.
48. C. Prigent & S. Dimitrov, Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science*, **116** (2003) 3677–3685. <https://doi.org/10.1242/jcs.00735>.
49. R. García-González, P. Morejón-García, I. Campillo-Marcos, M. Salzano, & P. A. Lazo, Vrk1 phosphorylates TIP60/KAT5 and is required for H4K16 acetylation in response to DNA damage. *Cancers*, **12** (2020) 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12102986>.
50. U. Acharya, A. Mallababarrena, J. K. Acharya, & V. Malhotra, Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell*, **92** (1998) 183–192. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80913-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80913-7).
51. Q. Ruan, Q. Wang, S. Xie, Y. Fang, Z. Darzynkiewicz, K. Guan, M. Jhanwar-Uniyal, & W. Dai, Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle. *Experimental Cell Research*, **294** (2004) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.10.022>.
52. T. Haraguchi, T. Koujin, M. Segura-Totten, K. K. Lee, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, K. L. Wilson, & Y. Hiraoka, BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *Journal of Cell Science*, **114** (2001) 4575–4585. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4575>.
53. A. Margalit, A. Brachner, J. Gotzmann, R. Foisner, & Y. Gruenbaum, Barrier-to-autointegration factor - a BAFfling little protein. *Trends in Cell Biology*, **17** (2007) 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.02.004>.
54. M. Sanz-García, D. M. Monsalve, A. Sevilla, & P. A. Lazo, 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** (2012) 23757–23768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353102>.
55. A. K. Deem, X. Li, & J. K. Tyler, Epigenetic regulation of genomic integrity. *Chromosoma*, **121** (2012) 131–151. <https://doi.org/10.1007/s00412-011-0358-1>. Epigenetic.
56. S. v. Kozlov, M. E. Graham, B. Jakob, F. Tobias, A. W. Kijas, M. Tanuji, P. Chen, P. J. Robinson, G. Taucher-Scholz, K. Suzuki, S. So, D. Chen, & M. F. Lavin,

- BIBLIOGRAFÍA -

- Autophosphorylation and ATM activation: Additional sites add to the complexity. *Journal of Biological Chemistry*, **286** (2011) 9107–9119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204065>.
57. B. J. Lamarche, N. I. Orazio, & M. D. Weitzman, The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters*, **584** (2010) 3682–3695. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.029>.
58. J. Yuan & J. Chen, MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *Journal of Biological Chemistry*, **285** (2010) 1097–1104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078436>.
59. D. Rossetto, A. W. Truman, S. J. Kron, & J. Cote, Epigenetic modifications in Double Strand Break DNA Damage signaling and repair. *Clinical cancer research*, **16** (2010) 4543–4552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0513>. Epigenetic.
60. V. Ginjala, K. Nacerddine, A. Kulkarni, J. Oza, S. J. Hill, M. Yao, E. Citterio, M. van Lohuizen, & S. Ganesan, BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA Damage-Induced H2A ubiquitination and repair. *Molecular and Cellular Biology*, **31** (2011) 1972–1982. <https://doi.org/10.1128/mcb.00981-10>.
61. I. M. Ward, K. Minn, K. G. Jorda, & J. Chen, Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (2003) 19579–19582. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300117200>.
62. Y. Eliezer, L. Argaman, A. Rhie, A. J. Doherty, & M. Goldberg, The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. *Journal of Biological Chemistry*, **284** (2009) 426–435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807375200>.
63. T. P. Wakeman, Q. Wang, J. Feng, & X. F. Wang, Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases. *EMBO Journal*, **31** (2012) 2169–2181. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.50>.
64. H. Pei, L. Zhang, K. Luo, Y. Qin, M. Chesi, F. Fei, L. Bergsagel, L. Wang, Z. You, & Z. Lou, MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, **470** (2011) 124–128. <https://doi.org/10.1038/nature09658>. MMSET.
65. S. Dulev, J. Tkach, S. Lin, & N. N. Batada, SET 8 methyltransferase activity during the DNA double-strand break response is required for recruitment of 53BP1. *EMBO reports*, **15** (2014) 1163–1174. <https://doi.org/10.15252/embr.201439434>.
66. J. R. Chapman, P. Barral, J. B. Vannier, V. Borel, M. Steger, A. Tomas-Loba, A. A. Sartori, I. R. Adams, F. D. Batista, & S. J. Boulton, RIF1 is essential for 53BP1-dependent Nonhomologous End Joining and suppression of DNA Double-Strand Break resection. *Molecular Cell*, **49** (2013) 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>.
67. A. K. Deem, X. Li, & J. K. Tyler, Epigenetic regulation of genomic integrity. *Chromosoma*, **121** (2012) 131–151. <https://doi.org/10.1007/s00412-011-0358-1>.
68. E. Palomer, A. Martín-Segura, S. Baliyan, T. Ahmed, D. Balschun, C. Venero, M. G. Martin, & C. G. Dotti, Aging triggers a repressive chromatin state at Bdnf promoters in hippocampal neurons. *Cell Reports*, **16** (2016) 2889–2900. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.028>.
69. N. Sugeno, S. Jäckel, A. Voigt, Z. Wassouf, J. Schulze-Hentrich, & P. J. Kahle,  $\alpha$ -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses. *Scientific Reports*, **6** (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36328>.

- BIBLIOGRAFÍA -

70. A. Berson, R. Nativio, S. L. Berger, & N. M. Bonini, Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, **41** (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.05.005>.
71. M. von Schimmelmann, P. A. Feinberg, J. M. Sullivan, S. M. Ku, A. Badimon, M. K. Duff, Z. Wang, A. Lachmann, S. Dewell, A. Ma'ayan, M.-H. Han, A. Tarakhovsky, & A. Schaefer, Polycomb repressive complex 2 (PRC2) silences genes responsible for neurodegeneration. *Nature neuroscience*, **19** (2016) 1321–1330. <https://doi.org/10.1038/nn.4360.Polycomb>.
72. J. L. Ronan, W. Wu, & G. R. Crabtree, From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nature reviews. Genetics.*, **14** (2013) 347–359. <https://doi.org/10.1038/nrg3413.From>.
73. S. Blanco, C. Santos, & P. A. Lazo, Vaccinia-Related Kinase 2 Modulates the Stress Response to Hypoxia Mediated by TAK1. *Molecular and Cellular Biology*, **27** (2007) 7273–7283. <https://doi.org/10.1128/mcb.00025-07>.
74. I. F. Fernández, S. Blanco, J. Lozano, & P. A. Lazo, VRK2 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Inversely Correlates with ErbB2 in Human Breast Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, **30** (2010) 4687–4697. <https://doi.org/10.1128/mcb.01581-09>.
75. M. Vázquez-Cedeira & P. A. Lazo, Human VRK2 (vaccinia-related kinase 2) modulates tumor cell invasion by hyperactivation of NFAT1 and expression of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (2012) 42739–42750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404285>.
76. D. M. Monsalve, T. Merced, I. F. Fernández, S. Blanco, M. Vázquez-Cedeira, & P. A. Lazo, Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. *Cell Death and Disease*, **4** (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.40>.
77. T. H. Kang & K. T. Kim, VRK3-mediated inactivation of ERK signaling in adult and embryonic rodent tissues. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1783** (2008) 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.011>.
78. C. S. Schober, F. Aydiner, C. J. Booth, E. Seli, & V. Reinke, The kinase VRK1 is required for normal meiotic progression in mammalian oogenesis. *Mechanisms of Development*, **128** (2011) 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2011.01.004>.
79. Y. H. Choi, C. H. Park, W. Kim, H. Ling, A. Kang, M. W. Chang, S. K. Im, H. W. Jeong, Y. Y. Kong, & K. T. Kim, Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells. *PLoS ONE*, **5** (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015254>.
80. M. S. Wiebe, R. J. Nichols, T. P. Molitor, J. K. Lindgren, & P. Traktman, Mice deficient in the serine/threonine protein kinase VRK1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia. *Biology of Reproduction*, **82** (2010) 182–193. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079095>.
81. H. Vinograd-Byk, T. Sapir, L. Cantarero, P. A. Lazo, S. Zeligson, D. Lev, T. Lerman-Sagie, P. Renbaum, O. Reiner, & E. Levy-Lahad, The spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia gene VRK1 regulates neuronal migration through an Amyloid- $\beta$  precursor protein-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, **35** (2015) 936–942. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1998-14.2015>.
82. S. Steinberg, S. de Jong, O. A. Andreassen, T. Werge, A. D. Børglum, O. Mors, P. B. Mortensen, O. Gustafsson, J. Costas, O. P. H. Pietiläinen, D. Demontis, S. Papiol, J. Huttenlocher, M. Mattheisen, R. Breuer, E. Vassos, I. Giegling, G. Fraser, N. Walker, A. Tuulio-Henriksson, J. Suvisaari, J. Lönqvist, T. Paunio, I. Agartz, I. Melle, S. Djurovic, E. Strengman, G. Jürgens, B. Glenthøj, L. Terenius, D. M. Hougaard, T. Ørntoft, C.

- BIBLIOGRAFÍA -

- Wiuif, M. Didriksen, M. V. Hollegaard, M. Nordentoft, R. van Winkel, G. Kenis, L. Abramova, V. Kaleda, M. Arrojo, J. Sanjuán, C. Arango, S. Sperling, M. Rossner, M. Ribolsi, V. Magni, A. Siracusano, C. Christiansen, L. A. Kiemeny, J. Veldink, L. van den Berg, A. Ingason, P. Muglia, R. Murray, M. M. Nöthen, E. Sigurdsson, H. Petursson, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, I. A. Rubino, M. de Hert, J. M. Réthelyi, I. Bitter, E. G. Jönsson, V. Golimbet, A. Carracedo, H. Ehrenreich, N. Craddock, M. J. Owen, M. C. O'Donovan, M. Ruggieri, S. Tosato, L. Peltonen, R. A. Ophoff, D. A. Collier, D. St Clair, M. Rietschel, S. Cichon, H. Stefansson, D. Rujescu, & K. Stefansson, Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, **20** (2011) 4076–4081. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr325>.
83. H. Sohn, B. Kim, K. H. Kim, M. K. Kim, T. K. Choi, & S. H. Lee, Effects of VRK2 (rs2312147) on white matter connectivity in patients with schizophrenia. *PLoS ONE*, **9** (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103519>.
84. B. Kerner, A. R. Rao, B. Christensen, S. Dandekar, M. Yourshaw, & S. F. Nelson, Rare genomic variants link bipolar disorder with anxiety disorders to CREB-regulated intracellular signaling pathways. *Frontiers in Psychiatry*, **4** (2013) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00154>.
85. S. Kim, D.-Y. Park, D. Lee, W. Kim, Y.-H. Jeong, J. Lee, S.-K. Chung, H. Ha, B.-H. Choi, & K.-T. Kim, Vaccinia-related kinase 2 mediates accumulation of polyglutamine aggregates via negative regulation of the chaperonin TRiC. *Molecular and Cellular Biology*, **34** (2014) 643–652. <https://doi.org/10.1128/mcb.00756-13>.
86. P. Renbaum, E. Kellerman, R. Jaron, D. Geiger, R. Segel, M. Lee, M. C. King, & E. Levy-Lahad, Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *American Journal of Human Genetics*, **85** (2009) 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.07.006>.
87. B. Wirth, An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation*, **15** (2000) 228–237. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200003\)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200003)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9).
88. H. Najmabadi, H. Hu, M. Garshasbi, T. Zemojtel, S. S. Abedini, W. Chen, M. Hosseini, F. Behjati, S. Haas, P. Jamali, A. Zecha, M. Mohseni, L. Püttmann, L. N. Vahid, C. Jensen, L. A. Moheb, M. Bienek, F. Larti, I. Mueller, R. Weissmann, H. Darvish, K. Wrogemann, V. Hadavi, B. Lipkowitz, S. Esmaeeli-Nieh, D. Wiczorek, R. Kariminejad, S. G. Firouzabadi, M. Cohen, Z. Fattahi, I. Rost, F. Mojahedi, C. Hertzberg, A. Dehghan, A. Rajab, M. J. S. Banavandi, J. Hoffer, M. Falah, L. Musante, V. Kalscheuer, R. Ullmann, A. W. Kuss, A. Tzschach, K. Kahrizi, & H. H. Ropers, Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*, **478** (2011) 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature10423>.
89. K. Peeters, T. Chamova, & A. Jordanova, Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain*, **137** (2014) 2879–2896. <https://doi.org/10.1093/brain/awu169>.
90. C. Gonzaga-jauregui, T. Lotze, L. Jamal, S. Penney, I. M. Campbell, D. Pehlivan, J. V. Hunter, L. Suzanne, G. Raymond, A. M. Adesina, N. Shalini, R. Lupski, R. A. Gibbs, & W. Wiszniewski, Mutations in VRK1 Associated With Complex Motor and Sensory Axonal Neuropathy Plus Microcephaly Claudia. *JAMA Neurology*, **70** (2014) 1491–1498. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4598>.
91. M. Sedghi, A. R. Moslemi, M. Olive, M. Etemadifar, B. Ansari, J. Nasiri, L. Emrahi, H. R. Mianesaz, N. G. Laing, & H. Tajsharghi, Motor neuron diseases caused by a novel VRK1 variant – A genotype/phenotype study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **6** (2019) 2197–2204. <https://doi.org/10.1002/acn3.50912>.

- BIBLIOGRAFÍA -

92. T. P. Nguyen, S. Biliciler, W. Wiszniewski, & K. Sheikh, Expanding phenotype of VRK1 mutations in motor neuron disease. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*, **17** (2015) 69–71. <https://doi.org/10.1097/CND.000000000000096>.
93. M. Stoll, H. Teoh, J. Lee, S. Reddel, Y. Zhu, M. Buckley, H. Sampaio, T. Roscioli, M. Farrar, & G. Nicholson, Novel motor phenotypes in patients with VRK1 mutations without pontocerebellar hypoplasia. *Neurology*, **87** (2016) 65–70. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002813>.
94. P. J. Tomaselli, A. M. Rossoll, A. Horga, M. Laura, H. Houlden, & M. M. Reilly, A compound heterozygous mutation in the Vaccinia related-kinase 1 gene is cause of hereditary motor neuropathy with upper motor neuron signs. *Journal of the Peripheral Nervous System*, **21** (2016) 305–306. <https://doi.org/10.1111/jns.12181>.
95. N. Li, L. Wang, X. Sun, Z. Lu, X. Suo, J. Li, J. Peng, & R. Peng, A novel mutation in VRK1 associated with distal spinal muscular atrophy. *Journal of Human Genetics*, **64** (2019) 215–219. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0553-5>.
96. S. Y. Feng, L. Y. Li, S. M. Feng, & Z. Y. Zou, A novel VRK1 mutation associated with recessive distal hereditary motor neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **6** (2019) 401–405. <https://doi.org/10.1002/acn3.701>.
97. R. Shaheen, S. Maddirevula, N. Ewida, S. Alsahli, G. M. H. Abdel-salam, M. S. Zaki, S. al Tala, A. Softah, M. Al-owain, A. M. Alazami, B. Abadel, N. Patel, T. Al-sheddi, R. Alomar, E. Alobeid, N. Ibrahim, M. Hashem, F. Abdulwahab, M. Hamad, B. Tabarki, A. H. Alwadei, F. A. Bashiri, A. Kentab, B. Fregeau, S. Sogati, S. A. M. Alshahwan, S. Alkhalifi, Z. Alhumaidi, S. Temtamy, G. Otaify, K. M. Girisha, M. Tulbah, M. Z. Seidahmed, M. A. Salih, M. Abouelhoda, A. A. Momin, M. al Saffar, J. N. Partlow, S. T. Arold, E. Faqeih, C. Walsh, F. S. Alkuraya, K. Faisal, S. Hospital, G. Unit, A. Forces, H. Southern, P. Sultan, M. Medical, F. Armed, F. Hospital, K. Faisal, S. Hospital, K. Fahad, & M. City, Genomic and phenotypic delineation of congenital microcephaly. *Genetic Medicine*, **21** (2020) 545–552. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0140-3>. Genomic.
98. L. El-Bazzal, K. Rihan, N. Bernard-Marissal, C. Castro, E. Chouery-Khoury, J. P. Desvignes, A. Atkinson, K. Bertaux, S. Koussa, N. Lévy, M. Bartoli, A. Mégarbané, R. Jabbour, & V. Delague, Loss of Cajal bodies in motor neurons from patients with novel mutations in VRK1. *Human Molecular Genetics*, **28** (2019) 2378–2394. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz060>.
99. G. Yamaura, Y. Higashiyama, K. Kusama, M. Kunii, K. Tanaka, S. Koyano, M. Nakashima, Y. Tsurusaki, N. Miyake, H. Saitsu, Y. Iwahashi, H. Joki, N. Matsumoto, H. Doi, & F. Tanaka, Novel VRK1 mutations in a patient with childhood-onset motor neuron disease. *Internal Medicine*, **58** (2019) 2715–2719. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2126-18>.
100. L. Greenbaum, O. Barel, V. Nikitin, A. Hersalis-Eldar, N. Kol, H. Reznik-Wolf, D. Dominissini, E. Pras, & A. Dori, Identification of a homozygous VRK1 mutation in two patients with adult-onset distal hereditary motor neuropathy. *Muscle and Nerve*, **61** (2020) 395–400. <https://doi.org/10.1002/mus.26779>.
101. A. T. Marcos, E. Martín-Doncel, P. Morejón-García, I. Marcos-Alcalde, P. Gómez-Puertas, M. Segura-Puimedon, L. Armengol, J. M. Navarro-Pando, & P. A. Lazo, VRK1 (Y213H) homozygous mutant impairs Cajal bodies in a hereditary case of distal motor neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **7** (2020) 808–818. <https://doi.org/10.1002/acn3.51050>.
102. A. K. Lawrence, M. T. Whitehead, P. Kruszka, L. Sanapo, S. Yano, P. Tanpaiboon, M. Muenke, J. L. Fraser, & A. J. du Plessis, Prenatal diagnosis of diencephalic-mesencephalic junction dysplasia: Fetal magnetic resonance imaging phenotypes,

- BIBLIOGRAFÍA -

- genetic diagnoses, and outcomes. *Prenatal Diagnosis*, **41** (2021) 778–790. <https://doi.org/10.1002/pd.5909>.
103. D. P. Silva, M. Soeiro E Sá, F. Silveira, S. Pinto, M. Gromicho, A. B. Sousa, M. Leão, & M. De Carvalho, VRK1 variants in two Portuguese unrelated patients with childhood-onset motor neuron disease. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, **21** (2020) 291–295. <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1746343>.
104. P. Morejon-Garcia, B. Keren, I. Marcos-Alcalde, P. Gomez-Puertas, F. Mochel, & Pedro. A. Lazo, Dysfunctional homozygous VRK1-D263G variant impairs the assembly of Cajal Bodies and DNA Damage Response in hereditary spastic paraplegia. *Neurology Genetics*, **7** (2021) e624. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000624>.
105. A. Sung, P. Moretti, & A. Shaibani, Adult-Onset Spinal Muscular Atrophy due to Mutations in the VRK1 Gene. *Neurology Genetics*, **7** (2021) e599. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000599>.
106. M. Frasquet, R. Rojas-García, H. Argente-Escrig, J. F. Vázquez-Costa, N. Muelas, J. J. Vílchez, R. Sivera, E. Millet, M. Barreiro, J. Díaz-Manera, J. Turon-Sans, E. Cortés-Vicente, L. Querol, L. Ramírez-Jiménez, D. Martínez-Rubio, A. Sánchez-Monteagudo, C. Espinós, T. Sevilla, & V. Lupo, Distal hereditary motor neuropathies: Mutation spectrum and genotype–phenotype correlation. *European Journal of Neurology*, **28** (2021) 1334–1343. <https://doi.org/10.1111/ene.14700>.
107. E. Martín-Doncel, A. M. Rojas, L. Cantarero, & P. A. Lazo, VRK1 functional insufficiency due to alterations in protein stability or kinase activity of human VRK1 pathogenic variants implicated in neuromotor syndromes. *Scientific Reports*, **9** (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49821-7>.
108. L. E. C. Andrade, E. M. Tan, & E. K. L. Chan, Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90** (1993) 1947–1951. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1947>.
109. M. Cioce & A. I. Lamond, Cajal bodies: A long history of discovery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21** (2005) 105–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103738>.
110. M. Machyna, P. Heyn, & K. M. Neugebauer, Cajal bodies: Where form meets function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **4** (2013) 17–34. <https://doi.org/10.1002/wrna.1139>.
111. J. L. Liu, C. Murphy, M. Buszczak, S. Clatterbuck, R. Goodman, & J. G. Gall, The *Drosophila melanogaster* Cajal body. *Journal of Cell Biology*, **172** (2006) 875–884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511038>.
112. A. A. Whittom, H. Xu, & M. D. Hebert, Coilin levels and modifications influence artificial reporter splicing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65** (2008) 1256–1271. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7587-3>.
113. E. K.L.Chan, S. Takano, L. E.C.Andrade, J. C. Hamel, & A. G. Matera, Structure, expression, and chromosomal localization of human p80-coilin gene. *Nucleic Acids Research*, **22** (1994) 4462–4469. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4873>.
114. M. D. Hebert & A. G. Matera, Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Molecular Biology of the Cell*, **11** (2000) 4159–4171. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4159>.
115. K. B. Shpargel, J. K. Ospina, K. E. Tucker, G. G. Matera, & M. D. Hebert, Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of Cell Science*, **116** (2003) 303–312. <https://doi.org/10.1242/jcs.00211>.
116. M. Sanz-García, M. Vázquez-Cedeira, E. Kellerman, P. Renbaum, E. Levy-Lahad, & P. A. Lazo, Substrate profiling of human Vaccinia-related kinases identifies coilin, a Cajal

- BIBLIOGRAFÍA -

- body nuclear protein, as a phosphorylation target with neurological implications. *Journal of Proteomics*, **75** (2011) 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.08.019>.
117. L. Cantarero, M. Sanz-García, H. Vinograd-Byk, P. Renbaum, E. Levy-Lahad, & P. A. Lazo, VRK1 regulates Cajal body dynamics and protects coilin from proteasomal degradation in cell cycle. *Scientific Reports*, **5** (2015) 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep10543>.
118. M. Machyna, K. M. Neugebauer, & D. Stan, Coilin : The first 25 years. (2015) 590–596.
119. R. Geiss-Friedlander & F. Melchior, Concepts in sumoylation: A decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8** (2007) 947–956. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>.
120. Q. Liu & G. Dreyfuss, A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO Journal*, **15** (1996) 3555–3565. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00725.x>.
121. M. D. Hebert, P. W. Szymczyk, K. B. Shpargel, & A. Gregory Matera, Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes and Development*, **15** (2001) 2720–2729. <https://doi.org/10.1101/gad.908401>.
122. J. Wang & G. Dreyfuss, A cell system with targeted disruption of the SMN gene: Functional conservation of the SMN protein and dependence of Gemin2 on SMN. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (2001) 9599–9605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009162200>.
123. S. Lefebvre, L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Bulet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, D. Le Paslier, J. Frézal, D. Cohen, J. Weissenbach, A. Munnich, & J. Melki, Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80** (1995) 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3).
124. D. D. Covert, T. T. Le, P. E. McAndrew, J. Strasswimmer, T. O. Crawford, J. R. Mendell, S. E. Coulson, E. J. Androphy, T. W. Prior, & A. H. M. Burghes, The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, **6** (1997) 1205–1214. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1205>.
125. C. L. Lorson, E. Hahnen, E. J. Androphy, & B. Wirth, A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (1999) 6307–6311. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>.
126. U. R. Monani, C. L. Lorson, D. W. Parsons, T. W. Prior, E. J. Androphy, A. H. M. Burghes, & J. D. McPherson, A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human Molecular Genetics*, **8** (1999) 1177–1183. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>.
127. H. C. Chang, W. C. Hung, Y. J. Chuang, & Y. J. Jong, Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochemistry International*, **45** (2004) 1107–1112. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.04.005>.
128. C. Rouzier, A. Chaussenot, & V. Paquis-Flucklinger, Molecular diagnosis and genetic counseling for spinal muscular atrophy (SMA). *Archives de Pédiatrie*, **27** (2020) 7S9-7S14. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(20\)30270-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(20)30270-0).
129. P. E. McAndrew, D. W. Parsons, L. R. Simard, C. Rochette, P. N. Ray, J. R. Mendell, T. W. Prior, & A. H. M. Burghes, Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN(T) and SMN(C) gene copy number. *American Journal of Human Genetics*, **60** (1997) 1411–1422. <https://doi.org/10.1086/515465>.
130. M. A. Farrar, S. B. Park, S. Vucic, K. A. Carey, B. J. Turner, T. H. Gillingwater, K. J. Swoboda, & M. C. Kiernan, Emerging therapies and challenges in spinal muscular



- BIBLIOGRAFÍA -

- atrophy. *Annals of Neurology*, **81** (2017) 355–368. <https://doi.org/10.1002/ana.24864>.
131. C. O. Seng, C. Magee, P. J. Young, C. L. Lorson, & J. P. Allen, The SMN structure reveals its crucial role in snRNP assembly. *Human Molecular Genetics*, **24** (2015) 2138–2146. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu734>.
132. T. Giesemann, S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J. W. Bartsch, S. Buchmeier, B. M. Jockusch, & H. Jockusch, A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with SMN in nuclear gems. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (1999) 37908–37914. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37908>.
133. K. Talbot, C. P. Porting, A. M. Theodosiou, N. R. Rodrigues, R. Surtees, R. Mountford, & K. E. Davies, Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Human Molecular Genetics*, **6** (1997) 497–500.
134. R. N. Singh, M. D. Howell, E. W. Ottesen, & N. N. Singh, Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, **1860** (2017) 299–315. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.12.008>.
135. H. Zhang, L. Xing, R. H. Singer, & G. J. Bassell, QNQKE Targeting Motif for the SMN-Gemin Multiprotein Complex in Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **3253** (2007) 3244–3253. <https://doi.org/10.1002/jnr>.
136. D. J. Battle, M. Kasim, J. Yong, F. Lotti, C. K. Lau, J. Mouaikel, Z. Zhang, K. Han, L. Wan, & G. Dreyfuss, The SMN complex: An assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **71** (2006) 313–320. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.001>.
137. C. Carissimi, J. Baccon, M. Straccia, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber, & L. Pellizzoni, Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Letters*, **579** (2005) 2348–2354. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.034>.
138. S. M. Berget, C. Moore, & P. A. Sharp, Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74** (1977) 3171–3175. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3171>.
139. L. T. Chow, R. E. Gelinas, T. R. Broker, & R. J. Roberts, An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, **12** (1977) 1–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90180-5).
140. T. Carvalho, F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M. T. Berciano, & M. Carmo-Fonseca, The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *Journal of Cell Biology*, **147** (1999) 715–727. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.4.715>.
141. U. Narayanan, T. Achsel, R. Lührmann, & A. G. Matera, Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Molecular Cell*, **16** (2004) 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.024>.
142. S. Paushkin, A. K. Gubitza, S. Massenet, & G. Dreyfuss, The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **14** (2002) 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00332-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00332-0).
143. L. Pellizzoni, B. Charroux, & G. Dreyfuss, SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96** (1999) 11167–11172. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11167>.

- BIBLIOGRAFÍA -

144. T. H. Coady & C. L. Lorson, SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **2** (2011) 546–564. <https://doi.org/10.1002/wrna.76>.
145. L. Pellizzoni, Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Reports*, **8** (2007) 340–345. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400941>.
146. E. W. Ottesen, M. D. Howell, N. N. Singh, J. Seo, E. M. Whitley, & R. N. Singh, Severe impairment of male reproductive organ development in a low SMN expressing mouse model of spinal muscular atrophy. *Scientific Reports*, **6** (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep20193>.
147. S. Fayzullina & L. J. Martin, Skeletal muscle DNA damage precedes spinal motor neuron DNA damage in a mouse model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *PLoS ONE*, **9** (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093329>.
148. S. Tisdale, F. Lotti, L. Saieva, J. P. VanMeerbeke, T. O. Crawford, C. J. Sumner, G. Z. Mentis, & L. Pellizzoni, SMN is essential for the biogenesis of U7 Small nuclear ribonucleoprotein and 3'-end formation of Histone mRNAs. *Cell Reports*, **5** (2013) 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.012>.
149. M. Sabra, P. Texier, J. El Maalouf, & P. Lomonte, The Tudor protein survival motor neuron (SMN) is a chromatin-binding protein that interacts with methylated lysine 79 of histone H3. *Journal of Cell Science*, **126** (2013) 3664–3677. <https://doi.org/10.1242/jcs.126003>.
150. F. Gabanella, C. Carissimi, A. Usiello, & L. Pellizzoni, The activity of the spinal muscle atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Human Molecular Genetics*, **14** (2005) 3629–3642. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi390>.
151. Q. Wu & A. R. Krainer, AT-AC Pre-mRNA Splicing Mechanisms and Conservation of Minor Introns in Voltage-Gated Ion Channel Genes. *Molecular and Cellular Biology*, **19** (1999) 3225–3236. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.5.3225>.
152. K. L. Boon, S. Xiao, M. L. McWhorter, T. Donn, E. Wolf-Saxon, M. T. Bohnsack, C. B. Moens, & C. E. Beattie, Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Human Molecular Genetics*, **18** (2009) 3615–3625. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp310>.
153. W. Rossoll, S. Jablonka, C. Andreassi, A. K. Kröning, K. Karle, U. R. Monani, & M. Sendtner, Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *Journal of Cell Biology*, **163** (2003) 801–812. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304128>.
154. G. E. Oprea, S. Krober, M. L. McWhorter, W. Rossoll, K. Muller M., G. J. Bassell, C. E. Beattie, & B. Wirth, Plastin 3 Is a Protective Modifier of Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy. *Science*, **320** (2008) 524–527. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1155085>. Plastin.
155. S. Hong, S. Ka, S. Kim, Y. Park, & S. Kang, p80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **1638** (2003) 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(03\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(03)00038-3).
156. A. Kakizuka, Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochemical Society Transactions*, **36** (2008) 105–108. <https://doi.org/10.1042/BST0360105>.
157. V. E. Kimonis, M. J. Kovach, B. Waggoner, S. Leal, A. Salam, L. Rimer, K. Davis, R. Khardori, & D. Gelber, Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone. *Genetics in Medicine*, **2** (2000) 232–241. <https://doi.org/10.1097/00125817-200007000-00006>.

- BIBLIOGRAFÍA -

158. M. A. Gonzalez, S. M. Feely, F. Speziani, A. V. Strickland, M. Danzi, C. Bacon, Y. Lee, T. F. Chou, S. H. Blanton, C. C. Weihl, S. Zuchner, & M. E. Shy, A novel mutation in VCP causes Charcot-Marie-Tooth Type 2 disease. *Brain*, **137** (2014) 2897–2902. <https://doi.org/10.1093/brain/awu224>.
159. J. O. Johnson, J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y. D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chiò, & B. J. Traynor, Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, **68** (2010) 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.036>.
160. W. K. Tang & D. Xia, Mutations in the human AAA+ chaperone p97 and related diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **3** (2016) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00079>.
161. D. Moir, S. E. Stewart, B. C. Osmond, & D. Botstein, Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics*, **100** (1982) 547–563. <https://doi.org/10.1093/genetics/100.4.547>.
162. J. M. Peters, M. J. Walsh, & W. W. Franke, An abundant and ubiquitous homooligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO Journal*, **9** (1990) 1757–1767. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08300.x>.
163. K. U. Frohlich, H. W. Fries, M. Rudiger, R. Erdmann, D. Botstein, & D. Mecke, Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *Journal of Cell Biology*, **114** (1991) 443–453. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.3.443>.
164. I. Dreveny, H. Kondo, K. Uchiyama, A. Shaw, X. Zhang, & P. S. Freemont, Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *EMBO Journal*, **23** (2004) 1030–1039. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600139>.
165. K. Shiozawa, N. Goda, T. Shimizu, K. Mizuguchi, N. Kondo, N. Shiozawa, M. Shirakawa, & H. Hiroaki, The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97. *FEBS Journal*, **273** (2006) 4959–4971. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05494.x>.
166. R. M. Dai & C. C. H. Li, Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nature Cell Biology*, **3** (2001) 740–744. <https://doi.org/10.1038/35087056>.
167. C. Song, Q. Wang, & C. C. H. Li, ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP): D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (2003) 3648–3655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208422200>.
168. D. Barthelme & R. T. Sauer, Origin and functional evolution of the Cdc48/p97/VCP AAA+ protein unfolding and remodeling machine. *J Mol Biol.*, **176** (2016) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.015.Origin>.
169. M. Livingstone, H. Ruan, J. Weiner, K. R. Clauser, P. Strack, S. Jin, A. Williams, H. Greulich, J. Gardner, M. Venere, T. A. Mochan, R. A. DiTullio, K. Moravcevic, V. G. Gorgoulis, A. Burkhardt, & T. D. Halazonetis, Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage. *Cancer Research*, **65** (2005) 7533–7540. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3729>.

- BIBLIOGRAFÍA -

170. F. Vandermoere, I. El Yazidi-Belkoura, C. Slomianny, Y. Demont, G. Bidaux, E. Adriaenssens, J. Lemoine, & H. Hondermarck, The Valosin-containing Protein (VCP) is a target of Akt signaling required for cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (2006) 14307–14313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510003200>.
171. H. Meyer, M. Bug, & S. Bremer, Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology*, **14** (2012) 117–123. <https://doi.org/10.1038/ncb2407>.
172. H. Zhang, Q. Wang, K. Kajino, & M. I. Greene, VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells. *DNA and Cell Biology*, **19** (2000) 253–263. <https://doi.org/10.1089/10445490050021168>.
173. S. Jentsch & S. Rumpf, Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, **32** (2007) 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.005>.
174. J. Schnell & L. Hicke, Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Biochemistry*, (2003).
175. Y. Ye, H. H. Meyer, & T. A. Rapoport, Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *Journal of Cell Biology*, **162** (2003) 71–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302169>.
176. M. Y. Sherman & A. L. Goldberg, Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, **29** (2001) 15–32. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00177-5).
177. J. J. Partidge, J. O. Lotreiato, M. Latterich, & F. E. Ingrig, DNA Damage Modulates Nucleolar Interaction of the Werner Protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Molecular Biology of the Cell*, **14** (2003) 4221–4229. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0111>.
178. J. Shao, Ser784 phosphorylation: a clinically relevant enhancer of VCP function in the DNA damage response. *Molecular and Cellular Oncology*, **7** (2020). <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1796179>.
179. K. Acs, M. S. Luijsterburg, L. Ackermann, F. A. Salomons, T. Hoppe, & N. P. Dantuma, The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nature Structural and Molecular Biology*, **18** (2011) 1345–1350. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2188>.
180. X. Shi, K. Zhu, Z. Ye, & J. Yue, VCP/p97 targets the nuclear export and degradation of p27Kip1 during G1 to S phase transition. *FASEB Journal*, **34** (2020) 5193–5207. <https://doi.org/10.1096/fj.201901506R>.
181. K. Ramadan, S. Halder, K. Wiseman, & B. Vaz, Strategic role of the ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in DNA replication. *Chromosoma*, **126** (2017) 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0587-4>.
182. H. Meyer, A. Drozdowska, & G. Dobrynin, A role for Cdc48/p97 and Aurora B in controlling chromatin condensation during exit from mitosis. *Biochemistry and Cell Biology*, **88** (2010) 23–28. <https://doi.org/10.1139/O09-119>.
183. K. Cao, R. Nakajima, H. H. Meyer, & Y. Zheng, The RanGTP gradient produced by condensed Hughes Medical Institute Baltimore. *Cell*, **115** (2003) 355–367.
184. A. Riemer, G. Dobrynin, A. Dressler, S. Bremer, A. Soni, G. Iliakis, & H. Meyer, The p97-Ufd1-Npl4 ATPase complex ensures robustness of the G2/M checkpoint by facilitating CDC25A degradation. *Cell Cycle*, **13** (2014) 919–927. <https://doi.org/10.4161/cc.27779>.

- BIBLIOGRAFÍA -

185. Y. T. Shih & Y. P. Hsueh, VCP and ATL1 regulate endoplasmic reticulum and protein synthesis for dendritic spine formation. *Nature Communications*, **7** (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms11020>.
186. X. Liu, X. Guo, L. Niu, X. Li, F. Sun, J. Hu, X. Wang, & K. Shen, Atlastin-1 regulates morphology and function of endoplasmic reticulum in dendrites. *Nature Communications*, **10** (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08478-6>.
187. A. E. Gonzalez & X. Wang, Drosophila VCP/p97 mediates dynein-dependent retrograde mitochondrial motility in axons. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8** (2020). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00256>.
188. C. E. Hall, Z. Yao, M. Choi, G. E. Tyzack, A. Serio, R. Luisier, J. Harley, E. Preza, C. Arber, S. J. Crisp, P. M. D. Watson, D. M. Kullmann, A. Y. Abramov, S. Wray, R. Burley, S. H. Y. Loh, L. M. Martins, M. M. Stevens, N. M. Luscombe, C. R. Sibley, A. Lakatos, J. Ule, S. Gandhi, & R. Patani, Progressive motor neuron pathology and the role of astrocytes in a human stem cell model of VCP-related ALS. *Cell Reports*, **19** (2017) 1739–1749. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.024>.
189. S. Rumpf, J. A. Bagley, K. L. Thompson-Peer, S. Zhu, D. Gorczyca, R. B. Beckstead, L. Y. Jan, & Y. N. Jan, Drosophila Valosin-Containing Protein is required for dendrite pruning through a regulatory role in mRNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111** (2014) 7331–7336. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406898111>.
190. H. Towbin, T. Staehelin, & J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76** (1979) 4350–43–54. <https://doi.org/10.1002/bies.950190612>.
191. T. C. Rowe, K. M. Tewey, & L. F. Liu, Identification of the breakage-reunion subunit of T4 DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, **259** (1984) 9177–9181. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)47281-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)47281-4).
192. Í. Marcos-Alcalde, J. I. Mendieta-Moreno, B. Puisac, M. C. Gil-Rodríguez, M. Hernández-Marcos, Di. Soler-Polo, F. J. Ramos, J. Ortega, J. Pié, J. Mendieta, & P. Gómez-Puertas, Two-step ATP-driven opening of cohesin head. *Scientific Reports*, **7** (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03118-9>.
193. W. Humphrey, A. Dalke, & K. Schulten, MD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **14** (1996) 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.07.012>.
194. D. M. Monsalve, I. Campillo-Marcos, M. Salzano, M. Sanz-García, L. Cantarero, & P. A. Lazo, VPK1 phosphorylates and protects NBS1 from ubiquitination and proteasomal degradation in response to DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1863** (2016) 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.005>.
195. S. Panier & S. J. Boulton, Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15** (2014) 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>.
196. F. T. Bianchi, G. E. Berto, & F. di Cunto, Impact of DNA repair and stability defects on cortical development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75** (2018) 3963–3976 <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2900-2>.
197. A. Kreppel, I. D. Blank, & C. Ochsenfeld, Base-Independent DNA Base-Excision Repair of 8-Oxoguanine. *Journal of the American Chemical Society*, **140** (2018) 4522–4526. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11254>.
198. C. G. Toyota, M. D. Davis, A. M. Cosman, & M. D. Hebert, Coilin phosphorylation mediates interaction with SMN and SmB'. *Chromosoma*, **119** (2010) 205–215. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0249-x>.

- BIBLIOGRAFÍA -

199. L. Cantarero Abad, Implicación De La Quinasa Humana Vrk1 En La Formación De Los Cuerpos De Cajal Y Sus Implicaciones Patológicas. (2015) [Doctoral dissertation, Salamanca University].
200. M. D. Hebert, P. W. Szymczyk, K. B. Shpargel, & A. Gregory Matera, Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes and Development*, **15** (2001) 2720–2729. <https://doi.org/10.1101/gad.908401>.
201. R. Ranganathan, S. Haque, K. Coley, S. Shephard, J. Cooper-Knock, & J. Kirby, Multifaceted Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Neuroscience*, **14** (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00684>.
202. H. Vinograd-Byk, P. Renbaum, & E. Levy-Lahad, Vrk1 partial Knockdown in Mice Results in Reduced Brain Weight and Mild Motor Dysfunction, and Indicates Neuronal VRK1 Target Pathways. *Scientific Reports*, **8** (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29215-x>.
203. T. Yakulov, U. Günesdogan, H. Jäckle, & A. Herzig, Bällchen participates in proliferation control and prevents the differentiation of drosophila melanogaster neuronal stem cells. *Biology Open*, **3** (2014) 881–886. <https://doi.org/10.1242/bio.20148631>.
204. D. S. Moura, I. Campillo-Marcos, M. Vázquez-Cedeira, & P. A. Lazo, 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** (2018) 2591–2611. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2746-7>.
205. P. F. Copenhagen & J. M. Ramaker, Neuronal migration during development and the amyloid precursor protein. *Current Opinion in Insect Science*, **18** (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.08.001>.
206. M. Frotscher, X. Chai, H. H. Bock, C. A. Haas, E. Förster, & S. Zhao, Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *Journal of Neural Transmission*, **116** (2009) 1451–1455. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0228-7>.
207. Y. P. Yip, N. Mehta, S. Magdaleno, T. Curran, & J. W. Yip, Ectopic expression of reelin alters migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, **515** (2009) 260–268. <https://doi.org/10.1002/cne.22044>.
208. Y. Sun, A. J. Curle, A. M. Haider, & G. Balmus, The role of DNA damage response in amyotrophic lateral sclerosis. *Essays in Biochemistry*, **61** (2020) 847–861. <https://doi.org/10.1042/EBC20200002>.
209. M. Peña-Sánchez, G. Riverón-Forment, T. Zaldívar-Vaillant, A. Soto-Lavastida, J. Borrero-Sánchez, G. Lara-Fernández, E. M. Esteban-Hernández, Z. Hernández-Díaz, A. González-Quevedo, I. Fernández-Almirall, C. Pérez-López, Y. Castillo-Casañas, O. Martínez-Bonne, A. Cabrera-Rivero, L. Valdés-Ramos, R. Guerra-Badía, R. Fernández-Carriera, M. C. Menéndez-Sainz, & S. González-García, Association of status redox with demographic, clinical and imaging parameters in patients with Huntington's disease. *Clinical Biochemistry*, **48** (2015) 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.014>.
210. X. Ba & Istvan Boldogh, 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biology*, **14** (2018) 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.008>.
211. M. Ikura, K. Furuya, S. Matsuda, R. Matsuda, H. Shima, J. Adachi, T. Matsuda, T. Shiraki, & T. Ikura, Acetylation of Histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex Is Essential for the Dynamic Binding of NBS1 to Damaged Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, **35** (2015) 4147–4157. <https://doi.org/10.1128/mcb.00757-15>.

- BIBLIOGRAFÍA -

212. E. Gjonneska, A. R. Pfenning, H. Mathys, G. Quon, A. Kundaje, L. H. Tsai, & M. Kellis, Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature*, **518** (2015) 365–369. <https://doi.org/10.1038/nature14252>.
213. A. Shaukat, M. H. F. Khan, H. Ahmad, Z. Umer, & M. Tariq, Interplay Between BALL and CREB Binding Protein Maintains H3K27 Acetylation on Active Genes in Drosophila. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9** (2021) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.740866>.
214. V. Nieto-Estevez, G. Changarathil, A. O. Adeyeye, M. O. Coppin, R. S. Kassim, J. Zhu, & J. Hsieh, HDAC1 Regulates Neuronal Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **14** (2022) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.815808>.
215. K. C. Masoumi, R. Daams, W. Sime, V. Siino, H. Ke, F. Levander, & R. Massoumi, NLK-mediated phosphorylation of HDAC1 negatively regulates Wnt signaling. *Molecular Biology of the Cell*, **28** (2017) 346–355. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-07-0547>.
216. M. Brindisi, A. P. Saraswati, S. Brogi, S. Gemma, S. Butini, & G. Campiani, Old but gold: Tracking the new guise of histone deacetylase 6 (HDAC6) enzyme as a biomarker and therapeutic target in rare diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63** (2020) 23–39. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00924>.
217. M. Carmo-Fonseca, J. Ferreira, & A. I. Lamond, Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis - Evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *Journal of Cell Biology*, **120** (1993) 841–852. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.4.841>.
218. P. J. Young, T. T. Le, M. Dunckley, N. Thi Man, A. H. M. Burghes, & G. E. Morris, Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: Nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Experimental Cell Research*, **265** (2001) 252–261. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5186>.
219. O. Tapia, J. O. Narcís, J. Riancho, O. Tarabal, L. Piedrafita, J. Calderó, M. T. Berciano, & M. Lafarga, Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiology of Disease*, **108** (2017) 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.08.004>.
220. M. Lafarga, O. Tapia, A. M. Romero, & M. T. Berciano, Cajal bodies in neurons. *RNA Biology*, **14** (2017) 712–725. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1231360>.
221. H. J. Broome, Z. I. Carrero, H. E. Douglas, & M. D. Hebert, Phosphorylation regulates coilin activity and RNA association. *Biology Open*, **2** (2013) 407–415. <https://doi.org/10.1242/bio.20133863>.
222. Z. I. Carrero, V. Velma, H. E. Douglas, & M. D. Hebert, Coilin phosphomutants disrupt Cajal body formation, reduce cell proliferation and produce a distinct coilin degradation product. *PLoS ONE*, **6** (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025743>.
223. J. Navascues, R. Bengoechea, O. Tapia, I. Casafont, M. T. Berciano, & M. Lafarga, SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *Journal of Structural Biology*, **163** (2008) 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.04.013>.
224. I. López Sánchez, Regulación de la quinasa VRK1 por Plk3 y su implicación en la dinámica del aparato de Golgi en división celular. (2010) [Doctoral dissertation, Salamanca University].
225. J. Shao, Ser784 phosphorylation: a clinically relevant enhancer of VCP function in the DNA damage response. *Molecular and Cellular Oncology*, **7** (2020) 4–6. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1796179>.

- BIBLIOGRAFÍA -

226. C. A. Ewens, P. Kloppsteck, A. Förster, X. Zhang, & P. S. Freemont, Structural and functional implications of phosphorylation and acetylation in the regulation of the AAA+ protein p97. *Biochemistry and Cell Biology*, **88** (2010) 41–48. <https://doi.org/10.1139/O09-128>.
227. B. G. Burnett, E. Muñoz, A. Tandon, D. Y. Kwon, C. J. Sumner, & K. H. Fischbeck, Regulation of SMN Protein Stability. *Molecular and Cellular Biology*, **29** (2009) 1107–1115. <https://doi.org/10.1128/mcb.01262-08>.
228. B. Mayr & M. Montminy, Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2** (2001) 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>.
229. T. Wang, W. Xu, M. Qin, Y. Yang, P. Bao, F. Shen, Z. Zhang, & J. Xu, Pathogenic mutations in the valosin-containing protein/p97(VCP) N-domain inhibit the SUMOylation of VCP and lead to impaired stress response. *Journal of Biological Chemistry*, **291** (2016) 14373–14384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.729343>.
230. B. Wang, B. A. Maxwell, J. H. Joo, Y. Gwon, J. Messing, A. Mishra, T. I. Shaw, A. L. Ward, H. Quan, S. M. Sakurada, S. M. Pruett-Miller, T. Bertorini, P. Vogel, H. J. Kim, J. Peng, J. P. Taylor, & M. Kundu, ULK1 and ULK2 regulate stress granule disassembly through phosphorylation and activation of VCP/p97. *Molecular Cell*, **74** (2019) 742–757.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.027>.
231. T. Geuens, D. Bouhy, & V. Timmerman, The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, **135** (2016) 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>.
232. Z. Mourelatos, L. Abel, J. Yong, N. Kataoka, & G. Dreyfuss, SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO Journal*, **20** (2001) 5443–5452. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5443>.



Artículos científicos en los que el doctorando ha participado:

**P. Morejón-García**, B. Keren, I. Marcos-Alcalde, P. Gomez-Puertas, F. Mochel, & Pedro. A. Lazo, Dysfunctional homozygous VRK1-D263G variant impairs the assembly of Cajal Bodies and DNA Damage Response in hereditary spastic paraplegia. *Neurology Genetics*, **7** (2021) e624. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000624>.

R. García-González, P. **Morejón-García**, I. Campillo-Marcos, M. Salzano, & P. A. Lazo, Vrk1 phosphorylates TIP60/KAT5 and is required for H4K16 acetylation in response to DNA damage. *Cancers*, **12** (2020) 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12102986>.

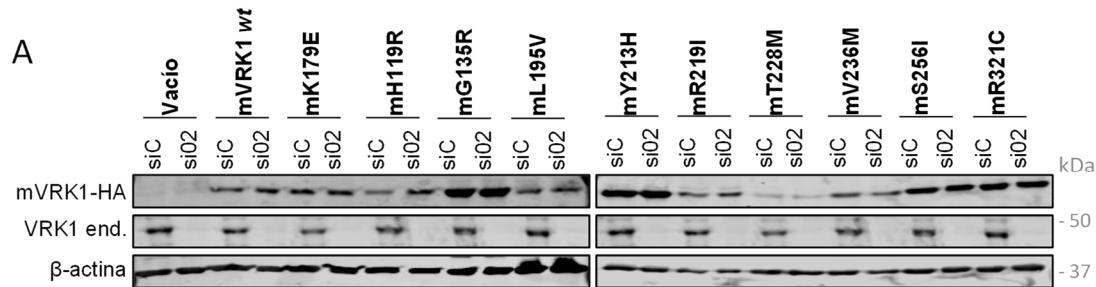
A. T. Marcos, E. Martín-Doncel, **P. Morejón-García**, I. Marcos-Alcalde, P. Gómez-Puertas, M. Segura-Puimedon, L. Armengol, J. M. Navarro-Pando, & P. A. Lazo, VRK1 (Y213H) homozygous mutant impairs Cajal bodies in a hereditary case of distal motor neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **7** (2020) 808–818. <https://doi.org/10.1002/acn3.51050>.



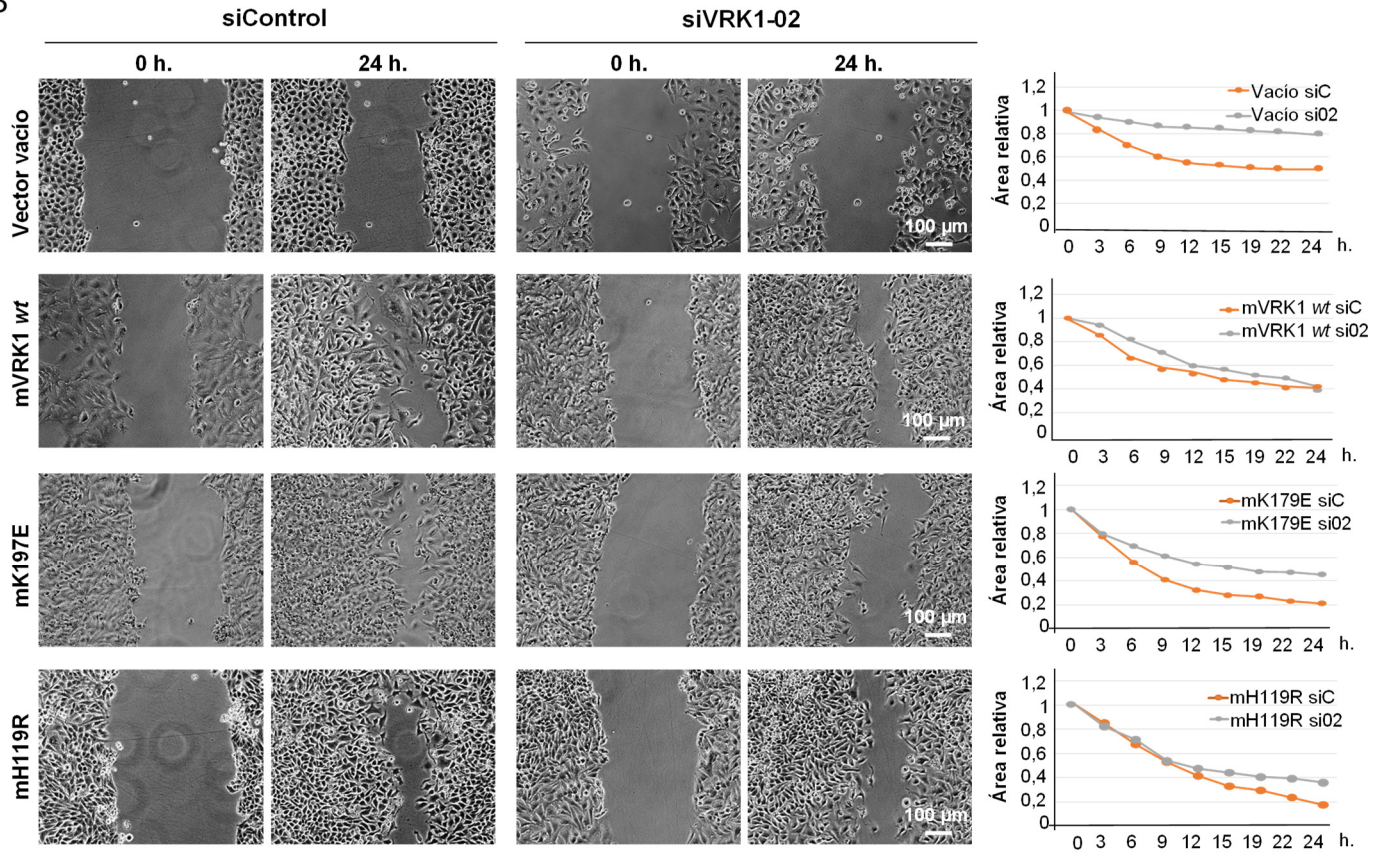
ANEXOS



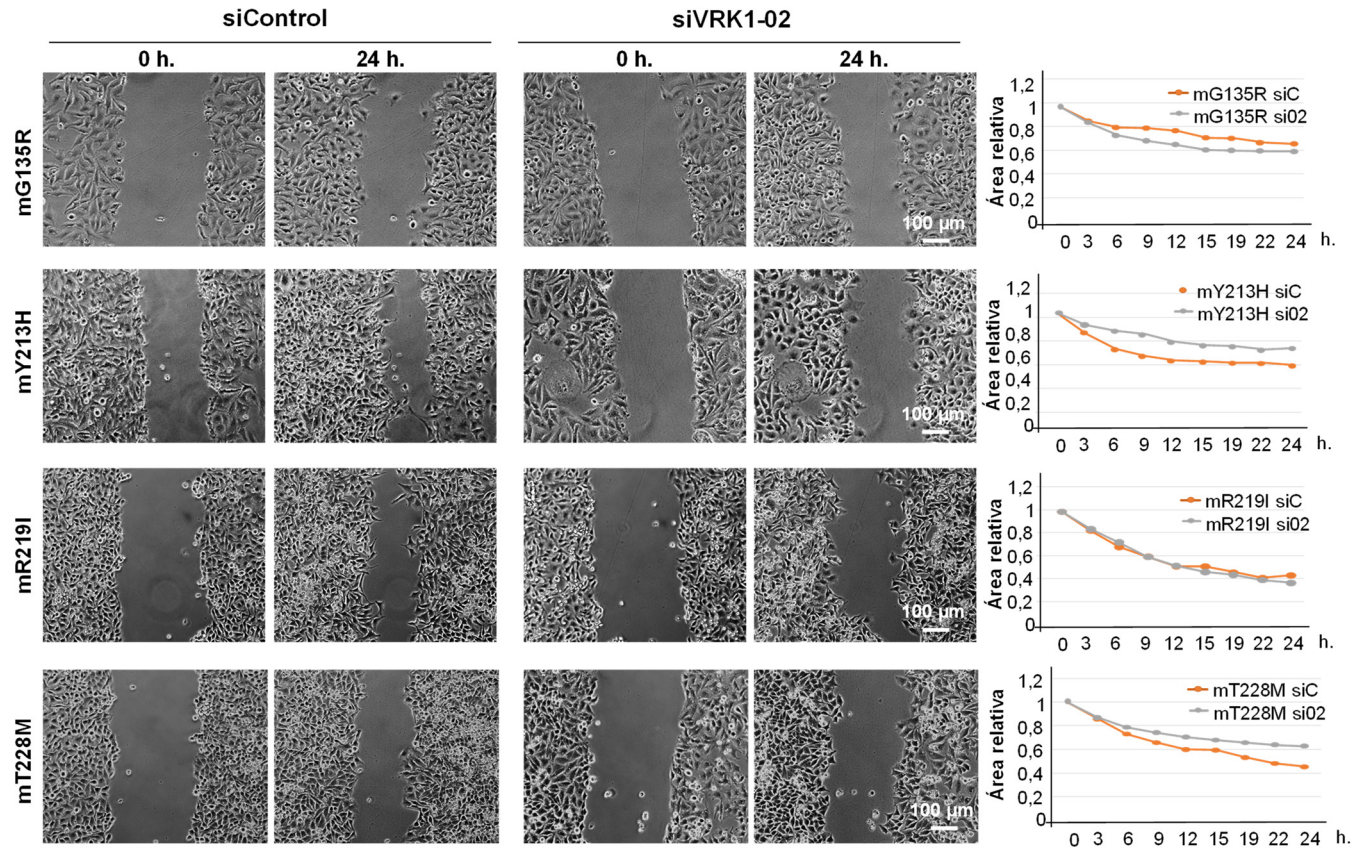
**Anexo 1. Ensayo de cierre de herida en las líneas celulares estables *HeLa*.** **A.** *Western blot* de las muestras, donde se observa el efectivo silenciamiento de VRK1 endógeno y la expresión de las variantes de mVRK1 en las líneas estables. **B.** Capturas de imagen de las heridas a las 0 y 24 h. Se sembraron células de las líneas *HeLa* en placas de 24 pocillos. Pasadas 24 h se silenció el gen *VRK1 humano* con siARN-02 específico del gen y un siControl. Pasadas 24 h se eliminó el suero del medio. A las 72 h, se realizaron las heridas y se tomaron fotos de campo claro cada 10 min durante 24 h. Se cuantificó el área de la herida utilizando el programa *ImageJ*. Se representa la foto tomada a las 0 y 24 horas, y la correspondiente gráfica donde se muestra el cierre de la herida en las líneas con VRK1 endógeno (control de migración de la línea con VRK1) y sin él (sólo se expresa la variante patogénica). El experimento se realizó dos veces, obteniendo resultados similares. Se representa una réplica.



B



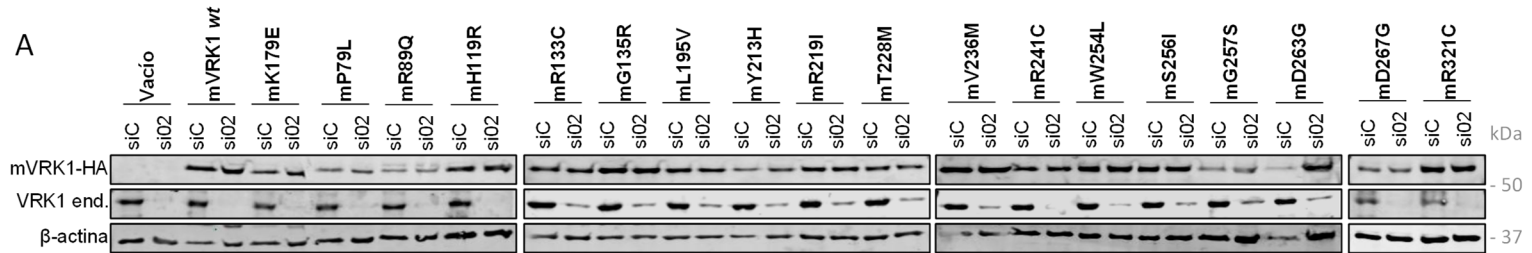
- ANEXO 1 -

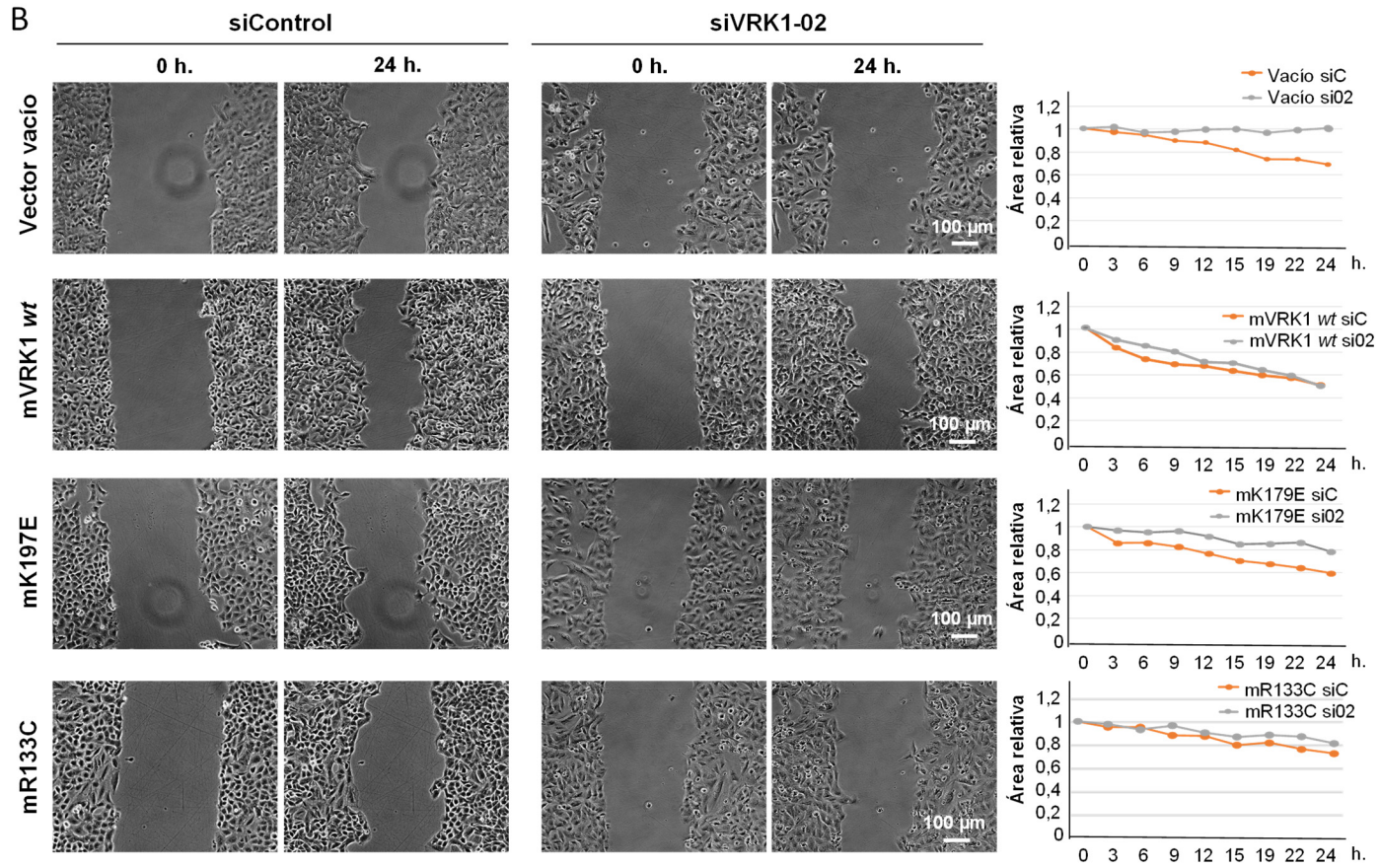


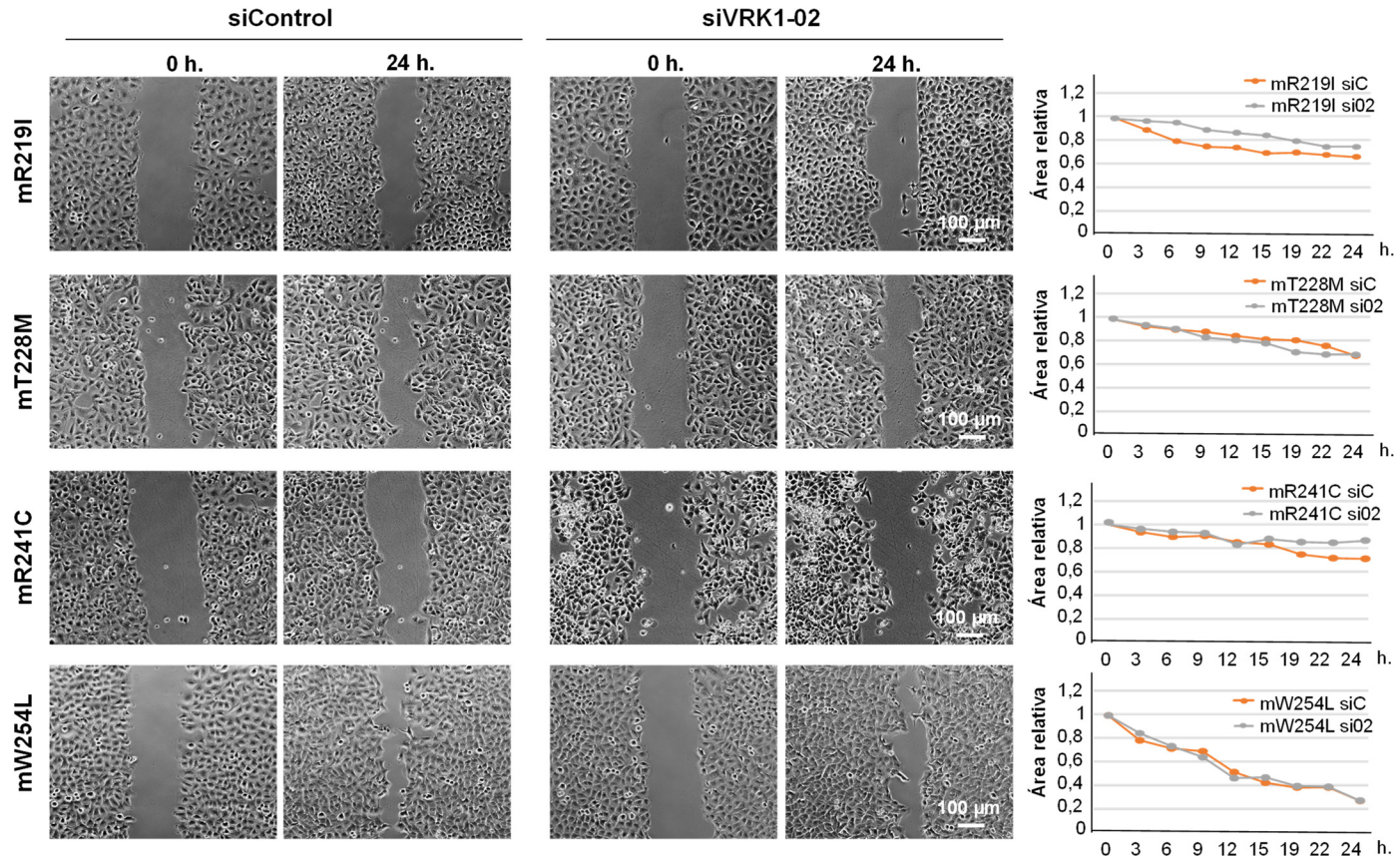


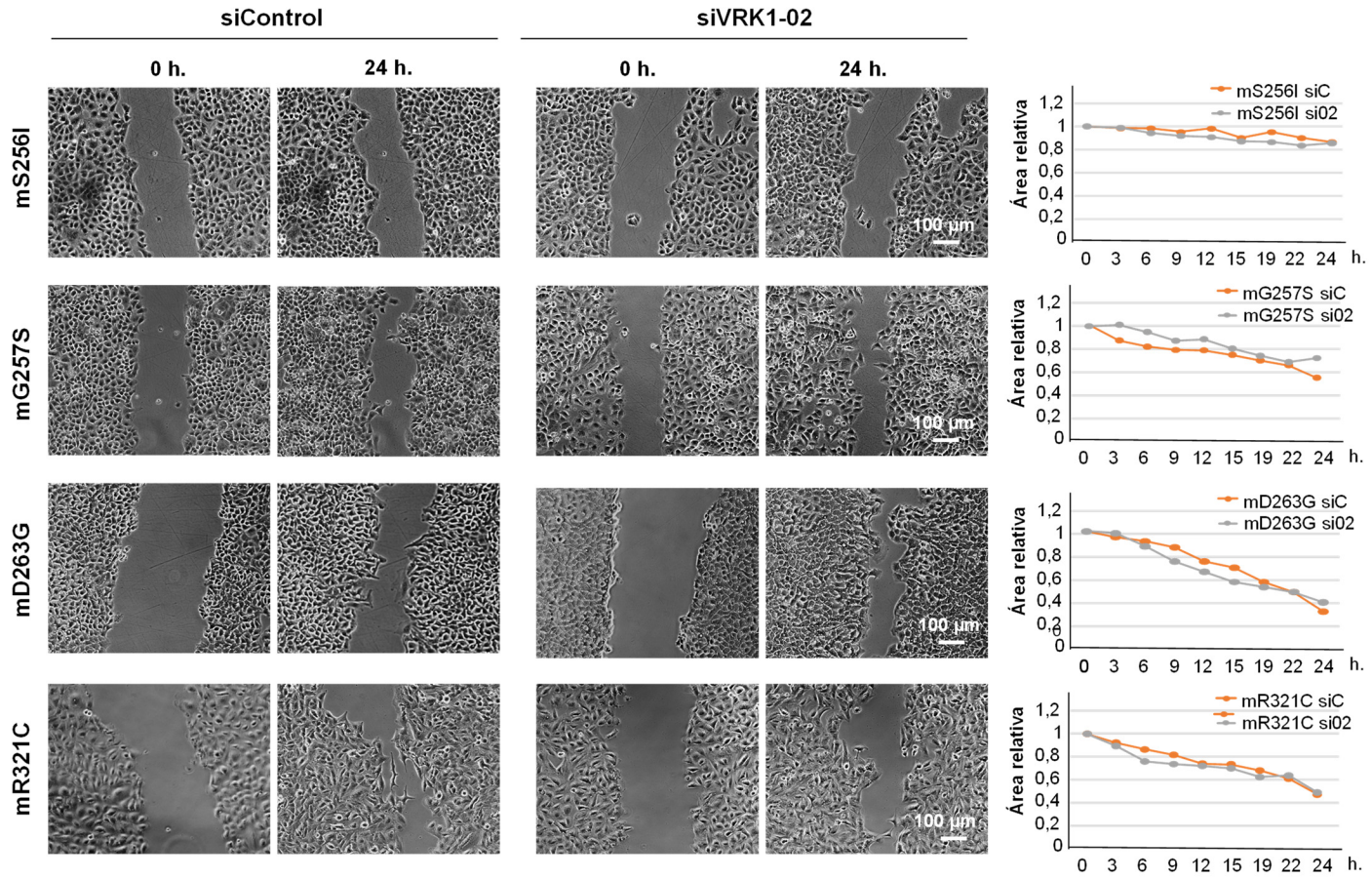


**Anexo 2. Ensayo de cierre de herida en las líneas celulares estables A549. A.** *Western blot* de las muestras, donde se observa el efectivo silenciamiento de VRK1 endógeno y la expresión de las variantes de mVRK1 en las líneas estables **B.** Capturas de imagen de las heridas a las 0 y 24 h. Se sembraron las células de las líneas A549 en placas de 24 pocillos. Pasadas 24 h se silenció el gen *VRK1 humano* con siARN-02 específico del gen o un siControl. Pasadas 24 horas se eliminó el suero del medio. A las 72 h, se realizaron las heridas y se tomaron fotos de campo claro cada 10 min durante 24 h. Se cuantificó el área de la herida utilizando el programa *ImageJ*. Se representa la foto tomada a las 0 y 24 horas, y la correspondiente gráfica donde se muestra el cierre de la herida en las líneas con VRK1 endógeno (control de migración de la línea con VRK1) y sin él (sólo se expresa la variante patológica). El experimento se realizó dos veces, obteniendo resultados similares. Se representa una réplica.

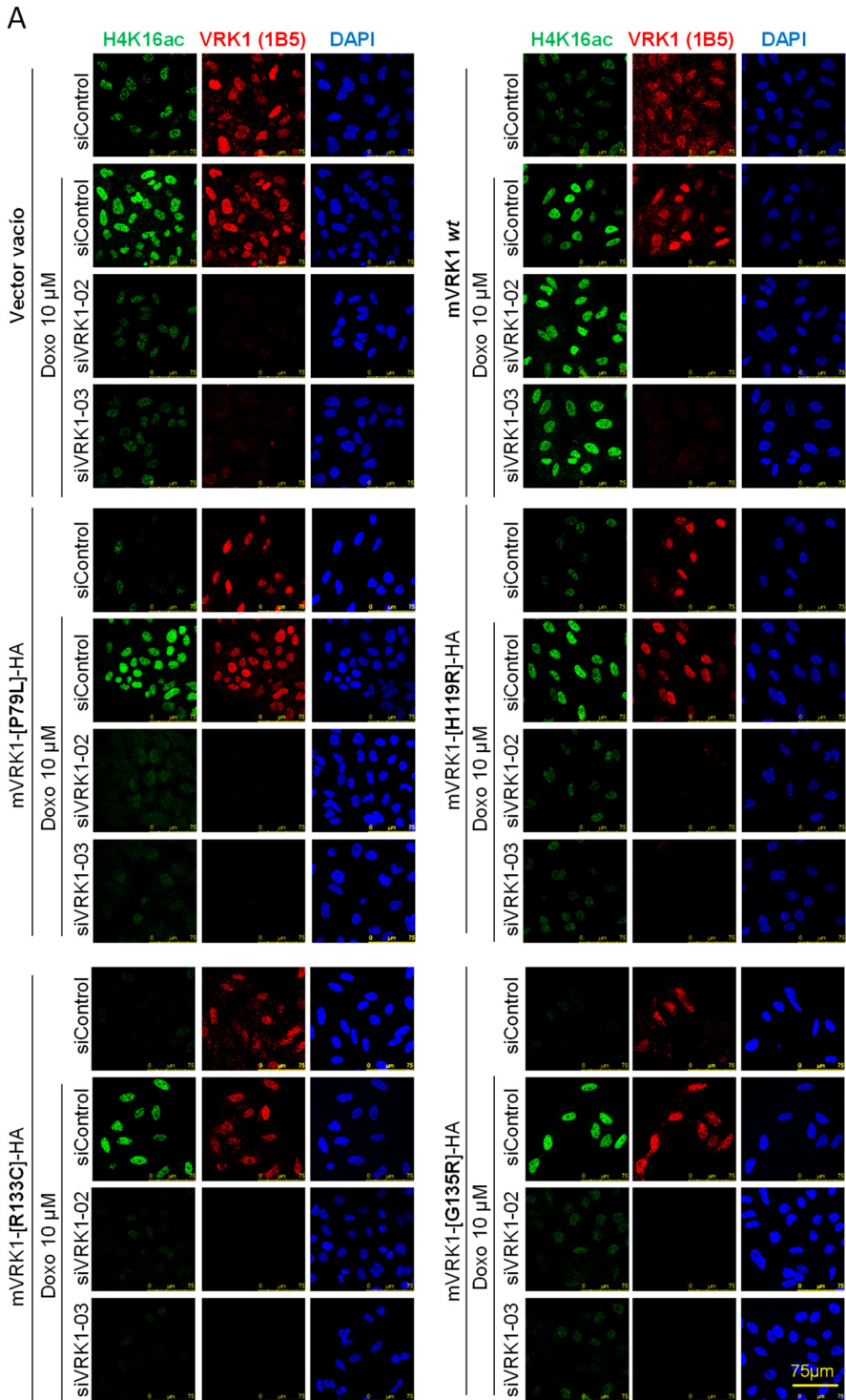


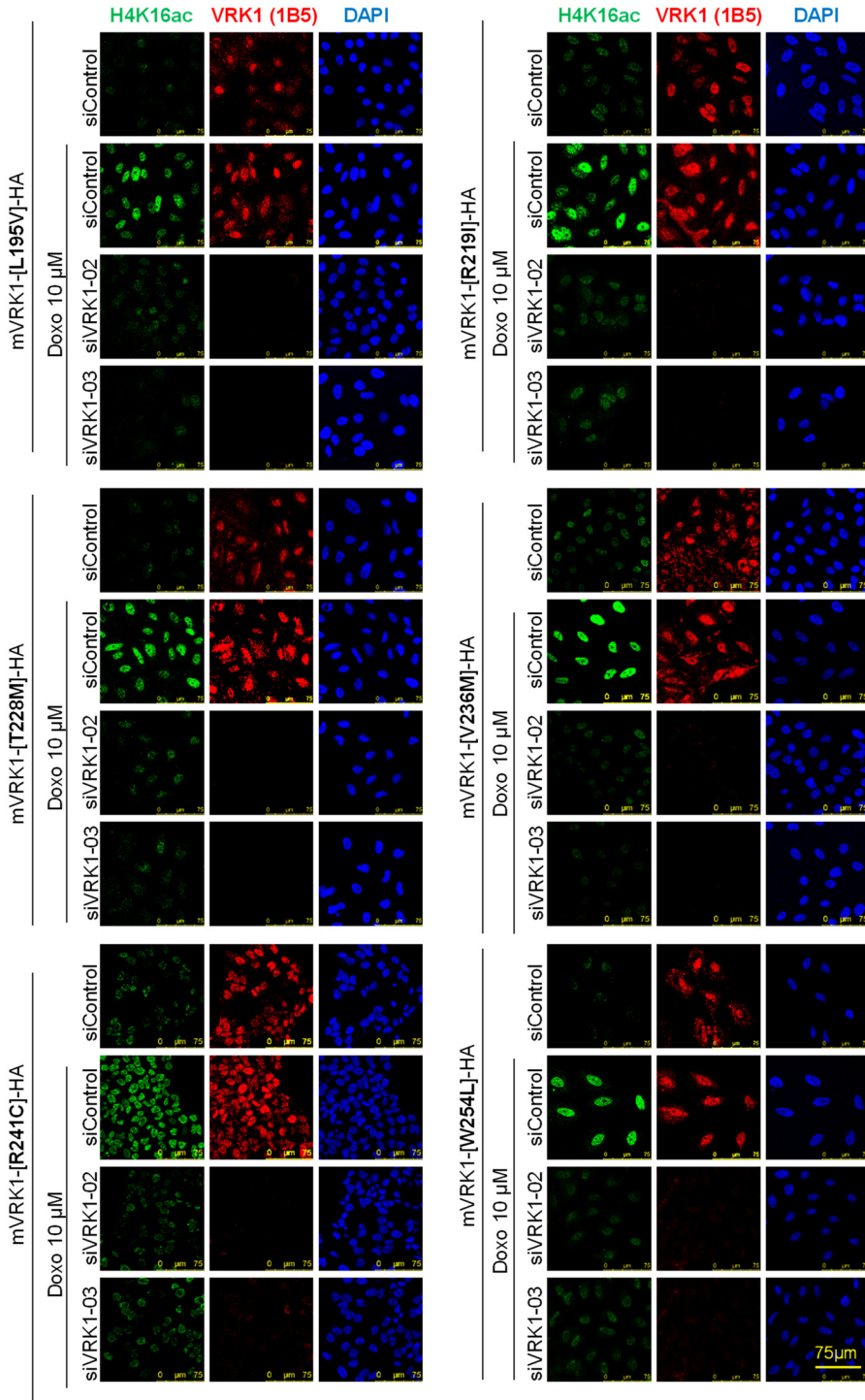


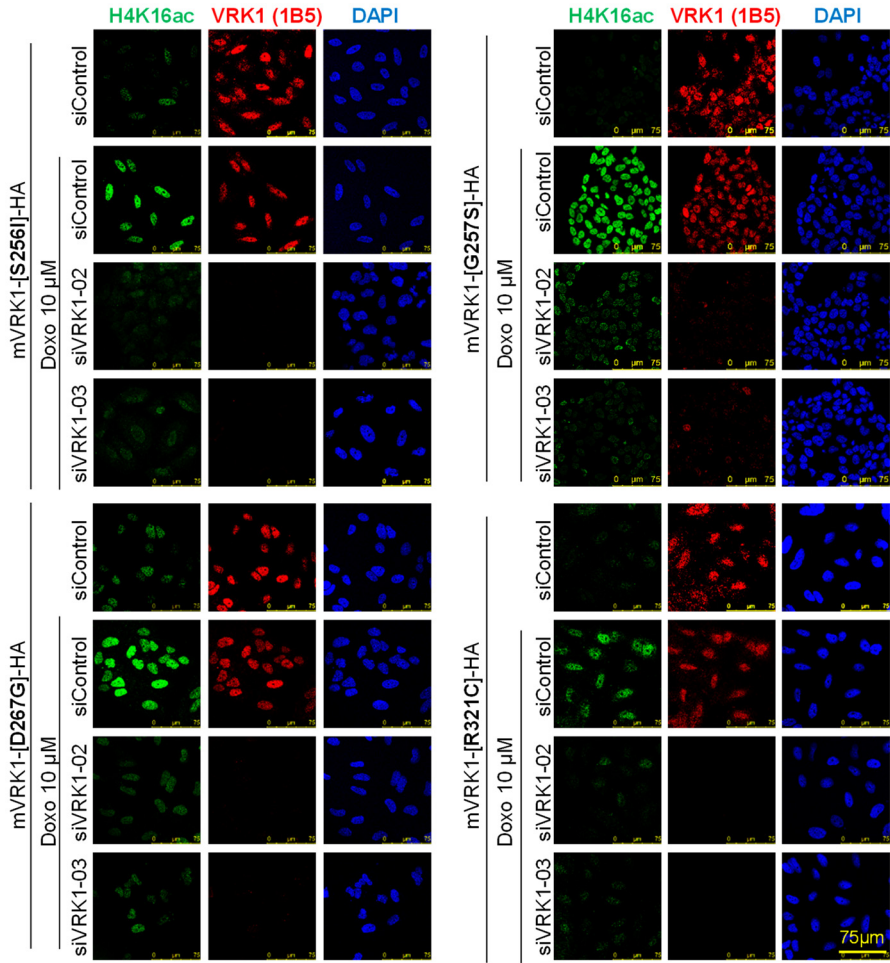




**Anexo 3. Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la acetilación de la H4K16 ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron a las 24 h con dos siARNs específicos del gen *VRK1 humano* y un siControl. A las 24 h se quitó el suero del medio. Tras 48 h, se añadió doxorrubicina 10  $\mu$ M durante 2 h y se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. **A.** Inmunofluorescencia donde se marca la H4K16ac con un anticuerpo específico y VRK1 endógeno con  $\alpha$ -1B5 (M). No se incluyen las variantes mR89Q, mY213H, mD263G. **B.** Cuantificación de la fluorescencia de H4K16ac por área celular de 100 células con el programa *ImageJ* y se analizaron los datos con *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

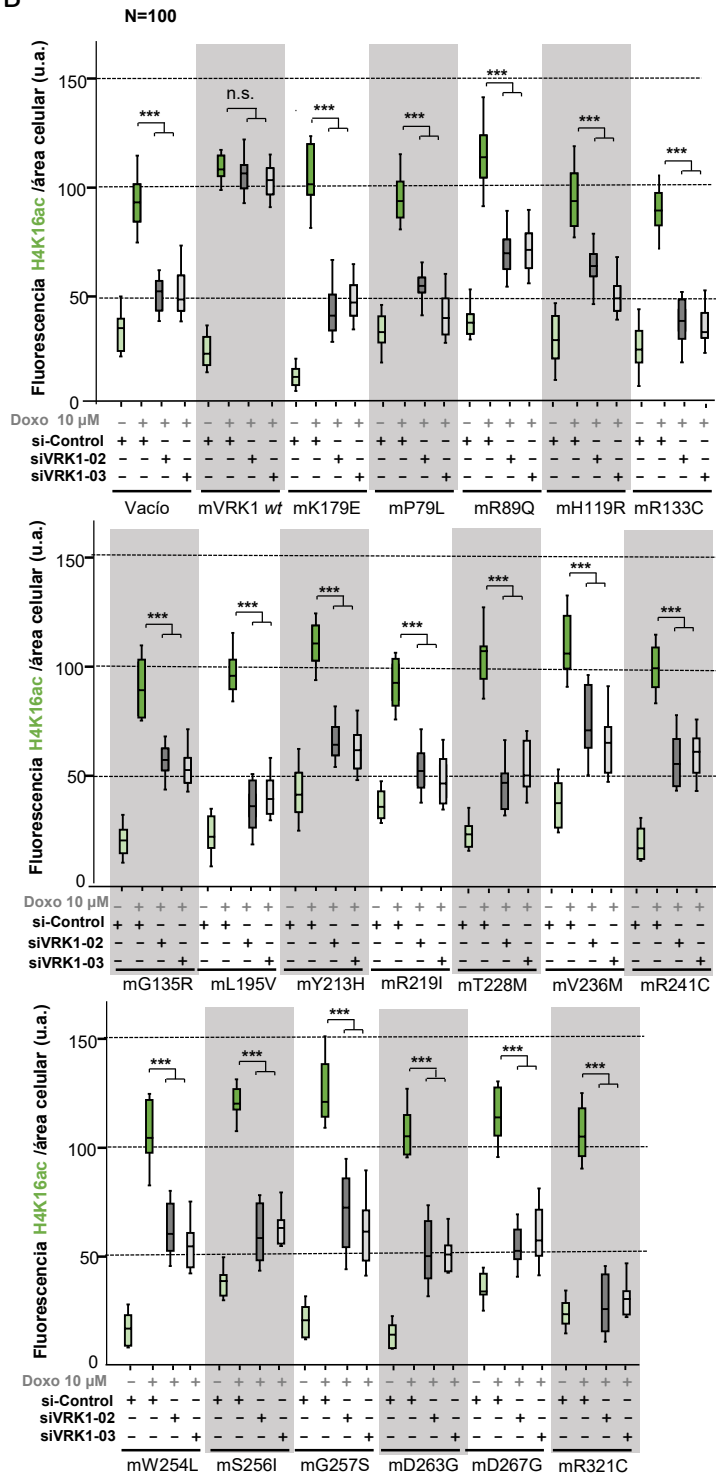








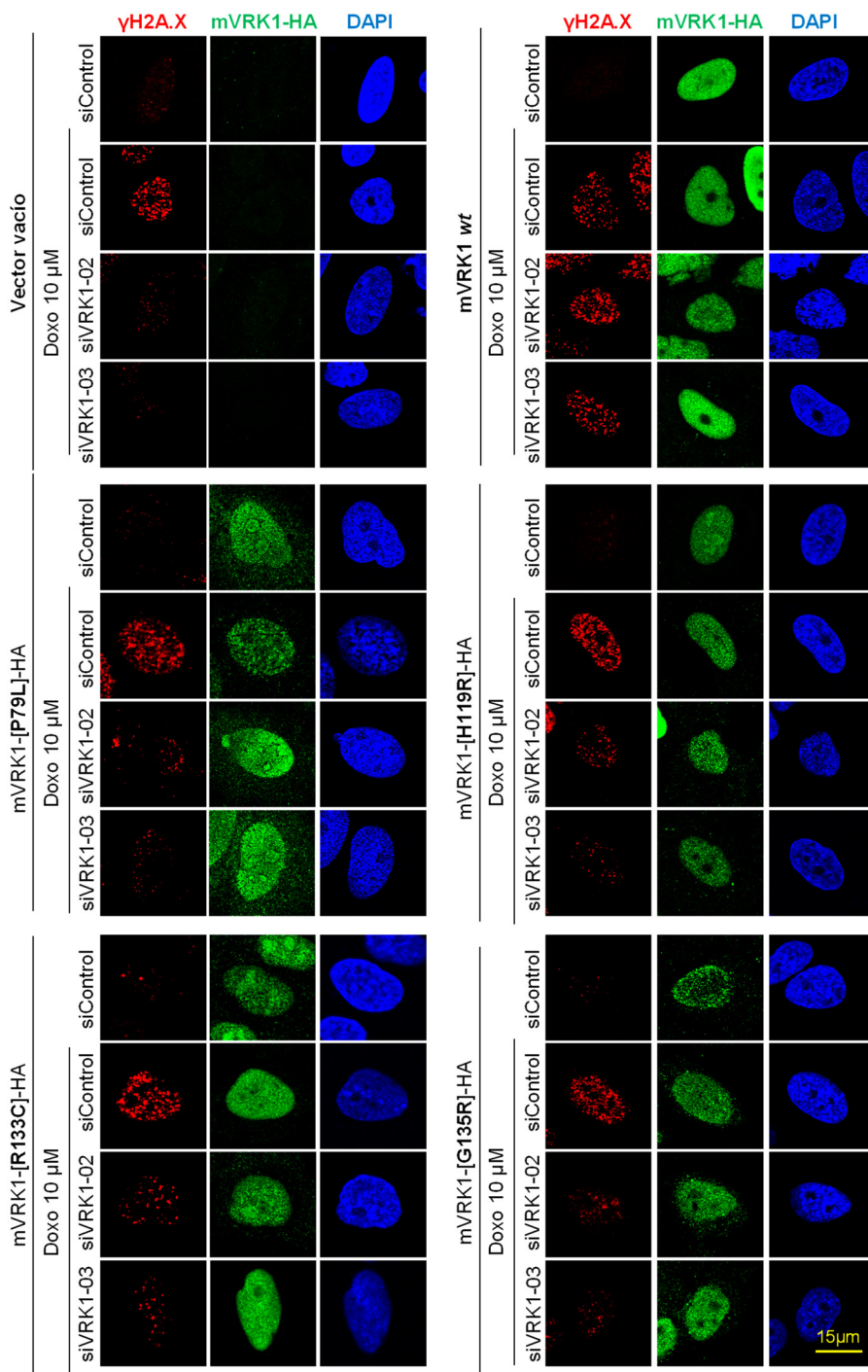
B

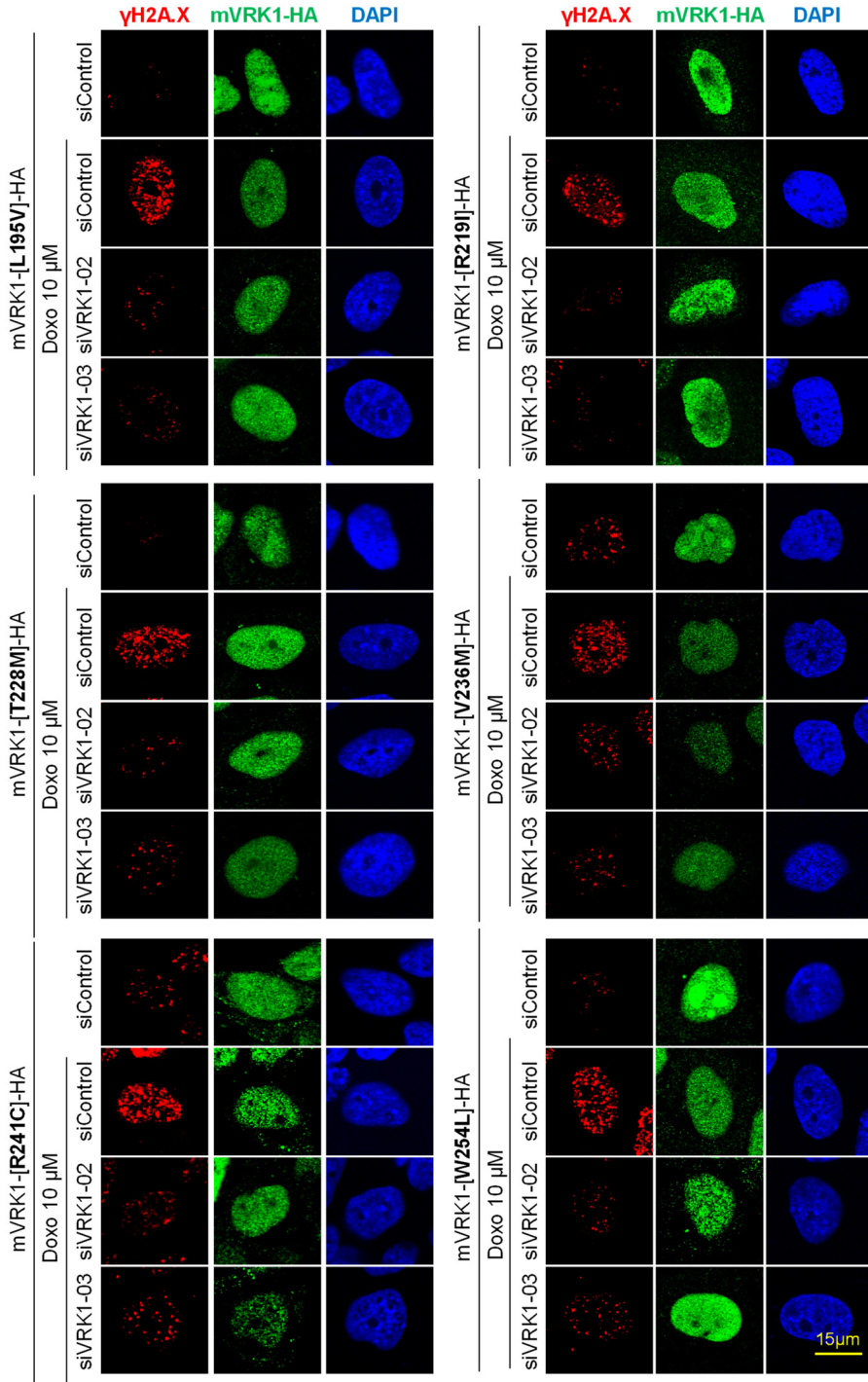


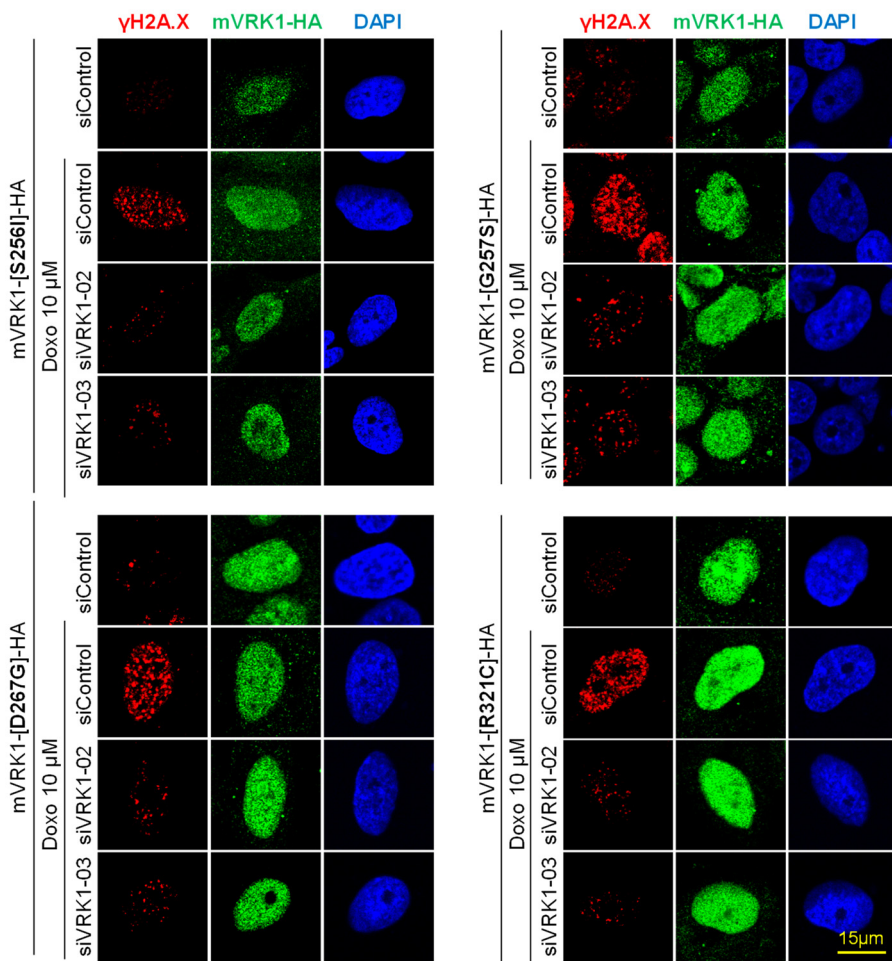


**Anexo 4. Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la formación de focos de  $\gamma$ H2A.X ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron con dos siARNs específicos del gen *VRK1 humano* y un siControl. A las 24 h se quitó el suero del medio. Tras 48 h, se añadió doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h y se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. **A.** Inmunofluorescencia donde se marcan los focos de  $\gamma$ H2A.X con un anticuerpo específico y las variantes de mVRK1 con  $\alpha$ -HA (R). No se incluyen las variantes mR89Q, mY213H, mD263G. **B.** Cuantificación de la fluorescencia de los focos de  $\gamma$ H2A.X por área celular de 100 células con el programa *ImageJ* y se analizaron los datos con *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

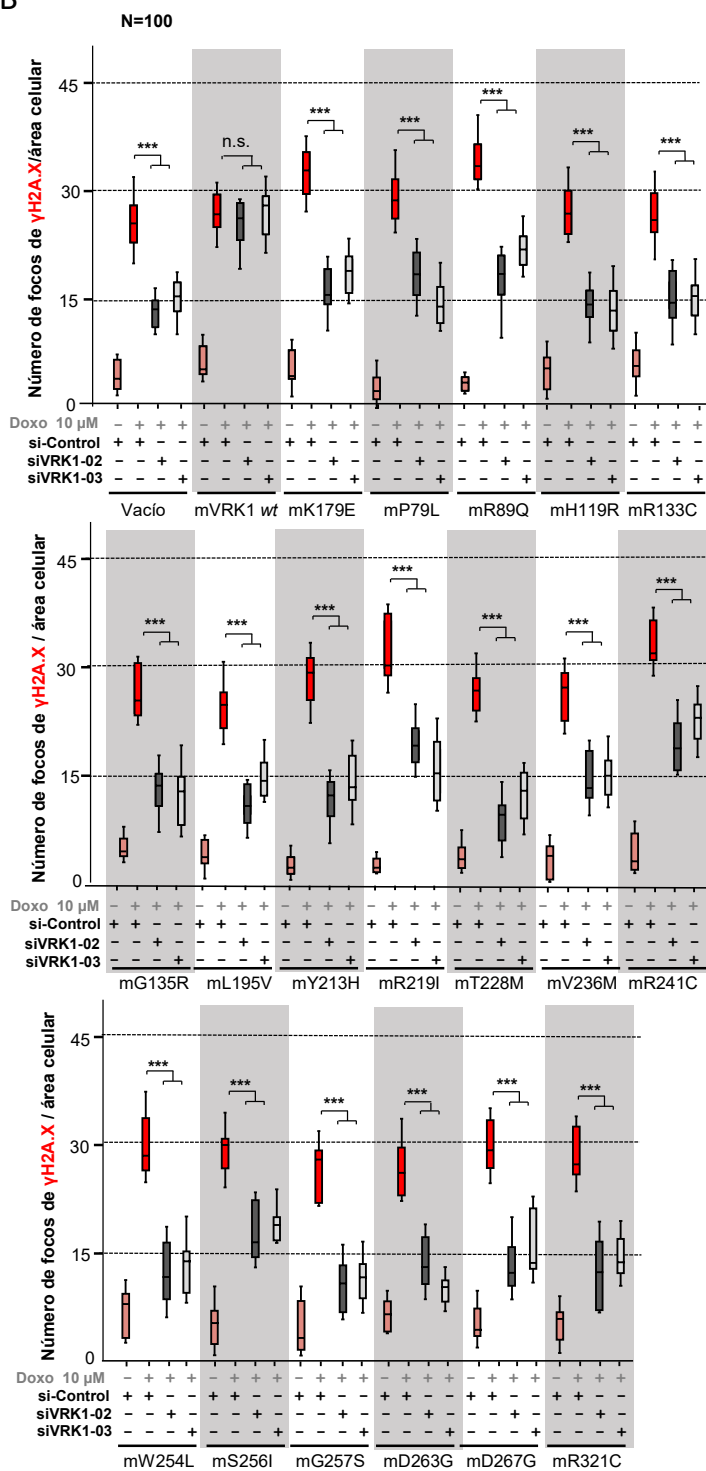
A







B

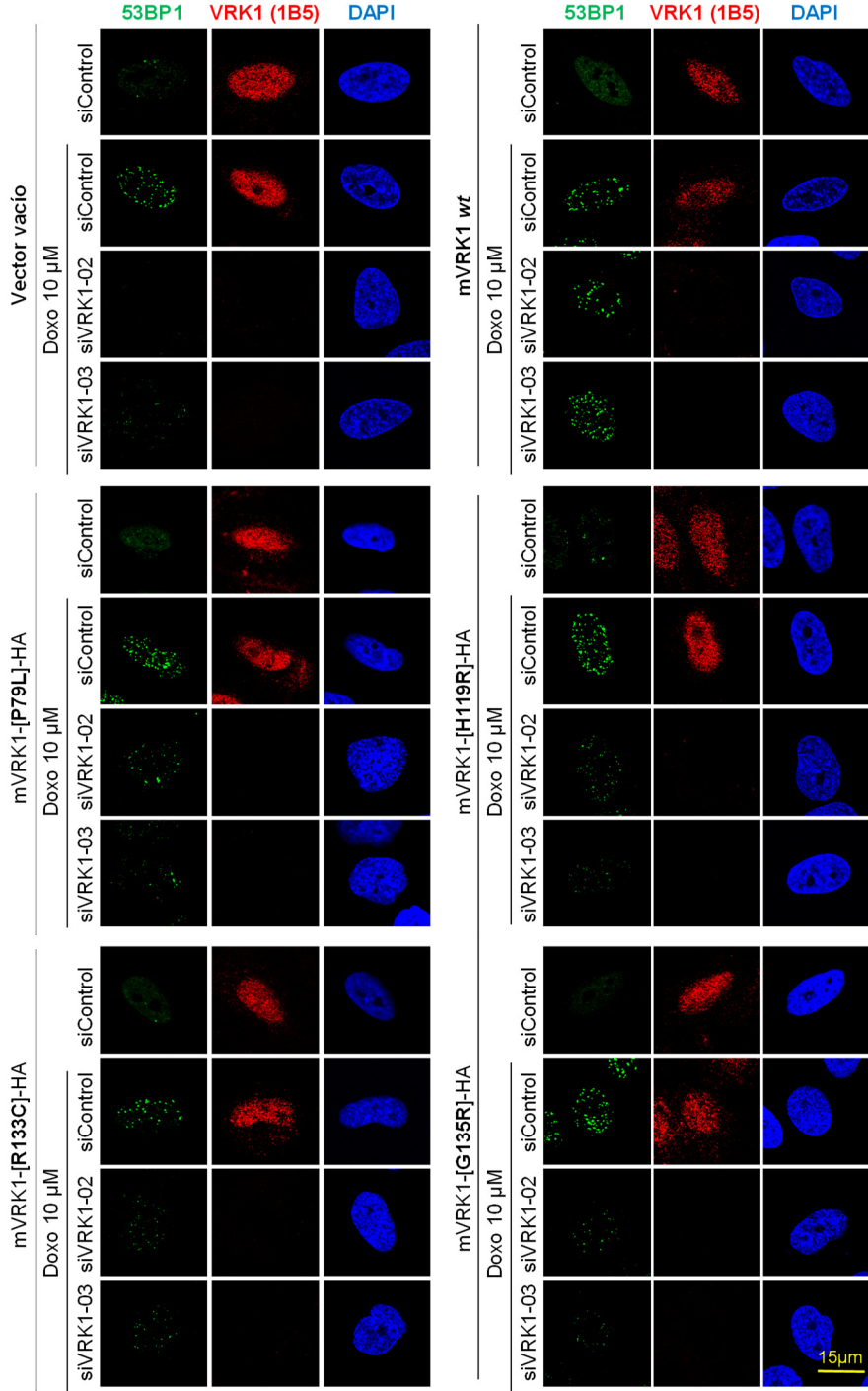


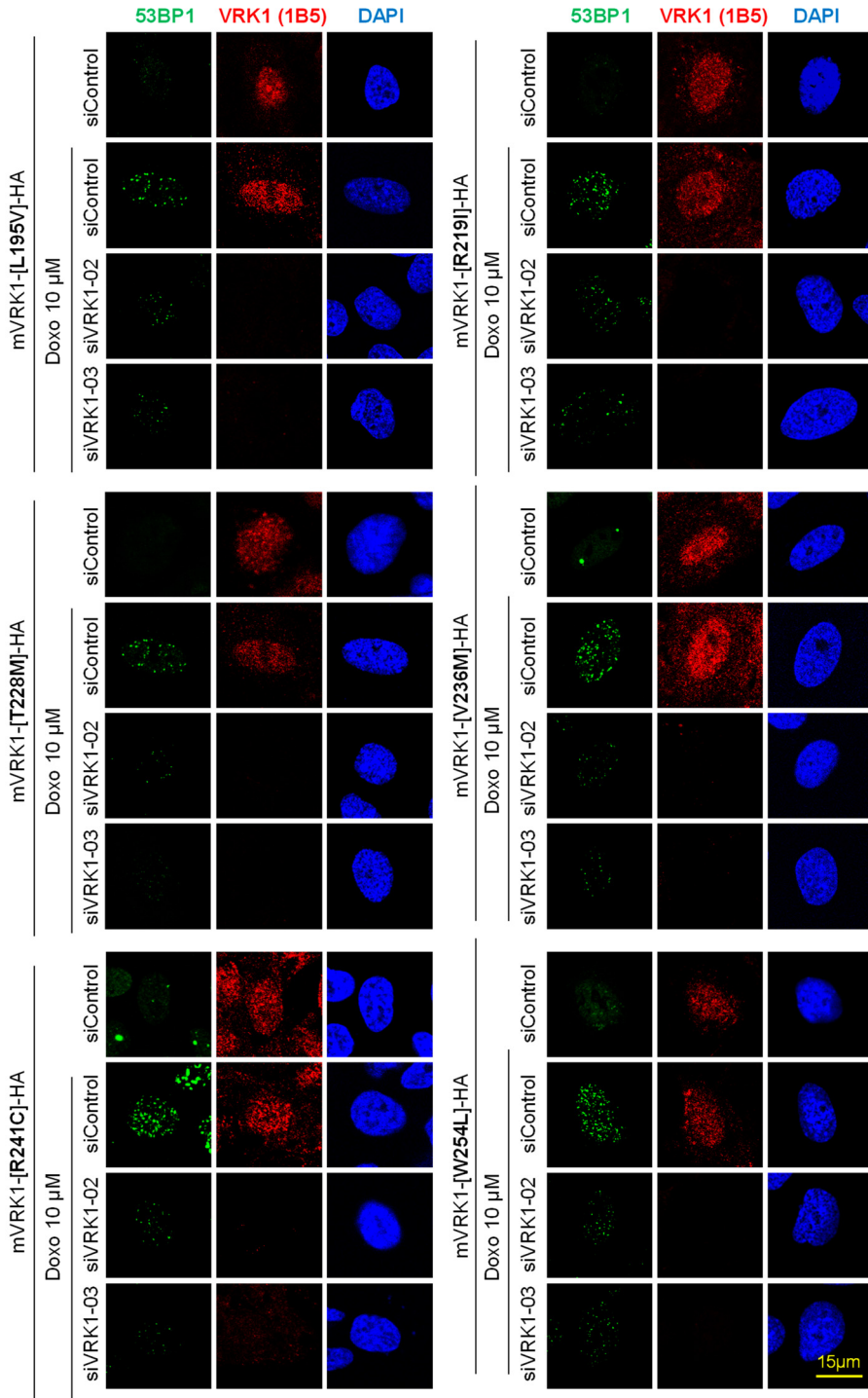


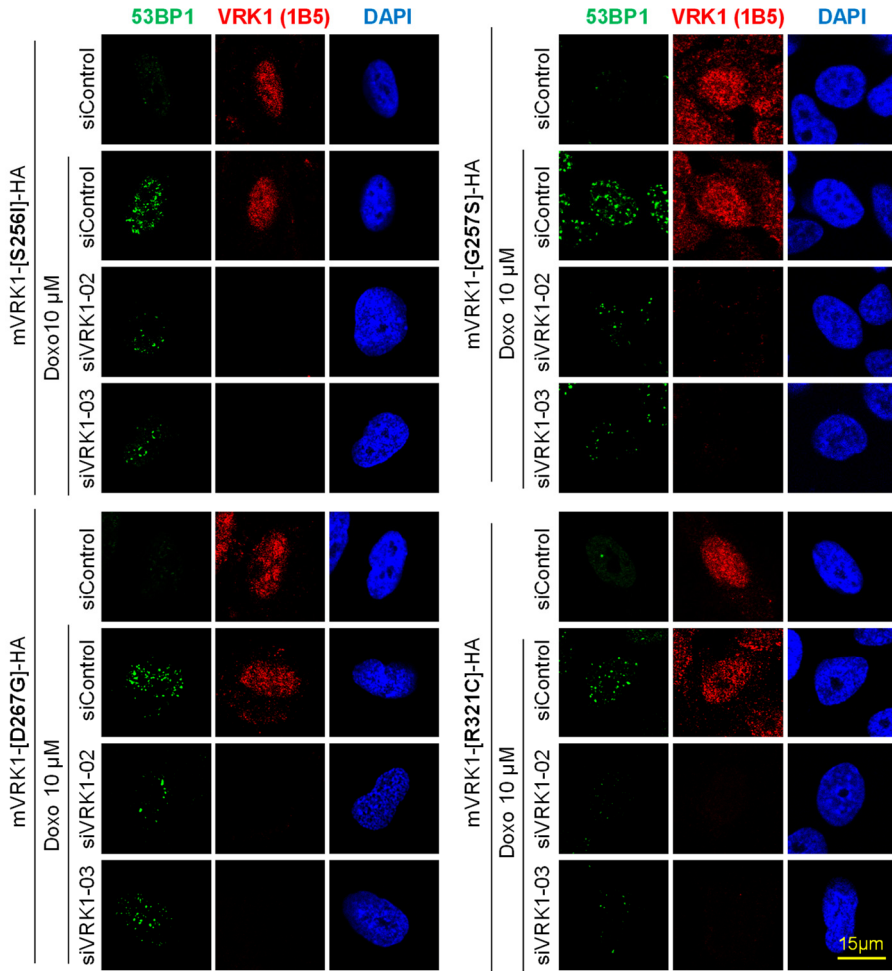


**Anexo 5. Las variantes patogénicas de VRK1 no son capaces de rescatar la formación de focos de 53BP1 ante daño en el ADN.** Se sembraron células de las líneas estables A549 y se trataron con dos siARNs específicos del gen *VRK1 humano* y un siControl. A las 24 h se quitó el suero del medio. Tras 48 h, se añadió doxorubicina 10  $\mu$ M durante 2 h y se trataron las células para analizarlas en el microscopio confocal. **A.** Inmunofluorescencia donde se marcan los focos de 53BP1 con un anticuerpo específico y VRK1 endógeno con  $\alpha$ -1B5 (M). No se incluyen las variantes mR89Q, mY213H, mD263G. **B.** Cuantificación de la fluorescencia de los focos de 53BP1 por área celular de 100 células con el programa *ImageJ* y se analizaron los datos con *IBM SPSS 25*. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post-hoc Bonferroni \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ . **C.** *Western blot* de las muestras en los que se observan los controles de los anexos 3, 4 y 5: el silenciamiento efectivo de VRK1 endógeno y la correcta expresión de mVRK1 de las líneas estables.

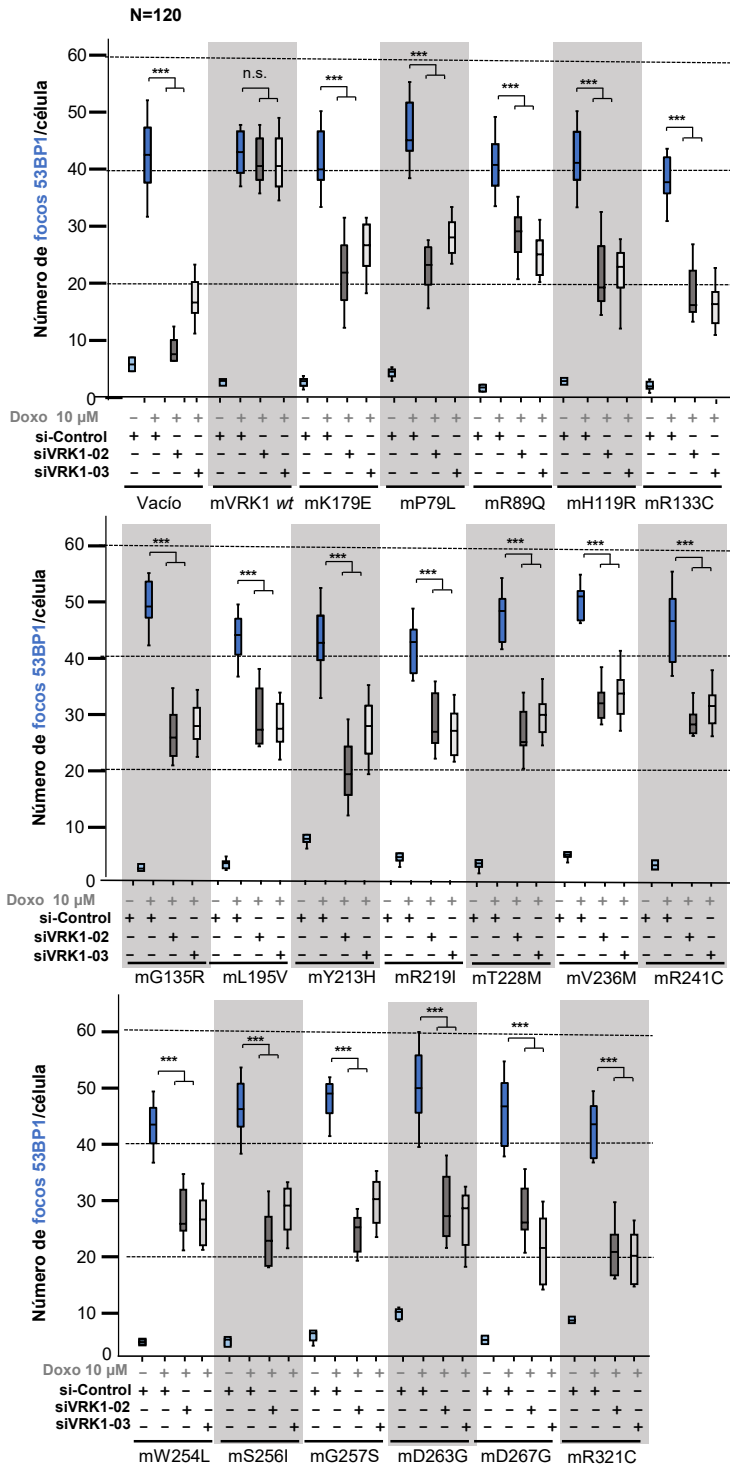
A



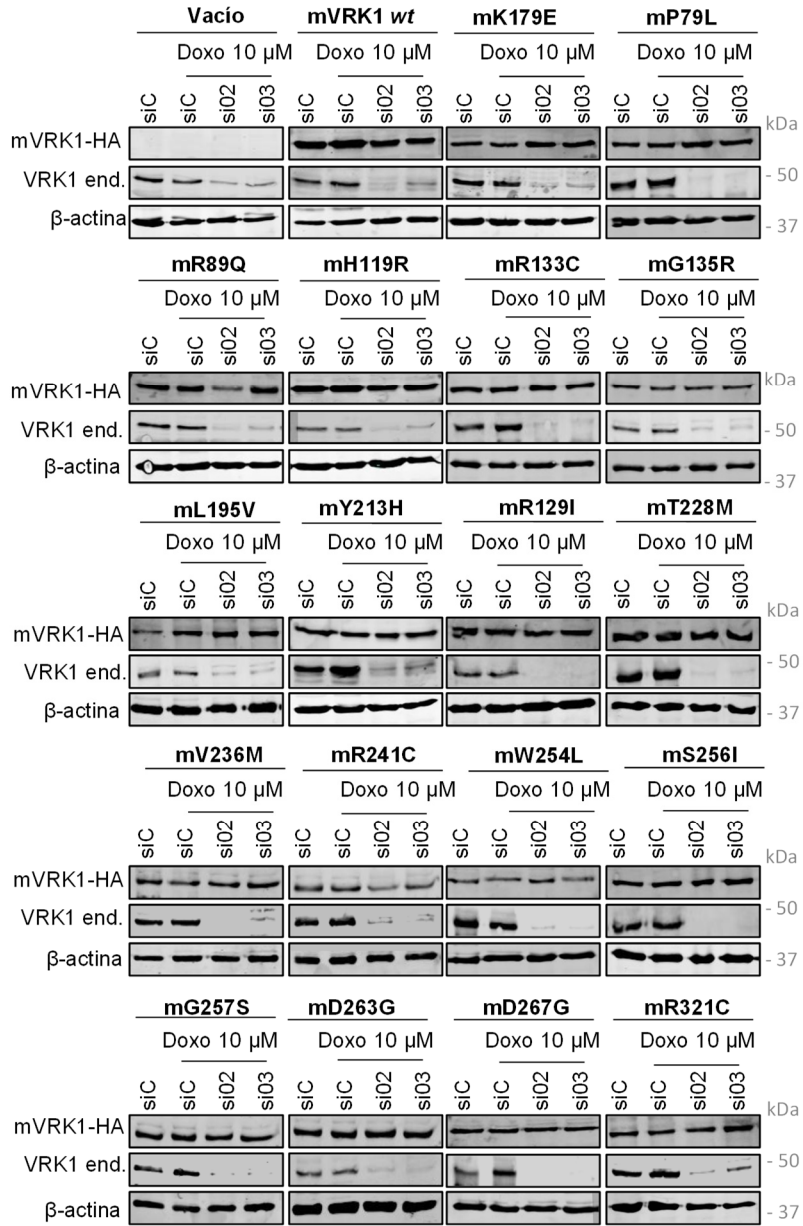




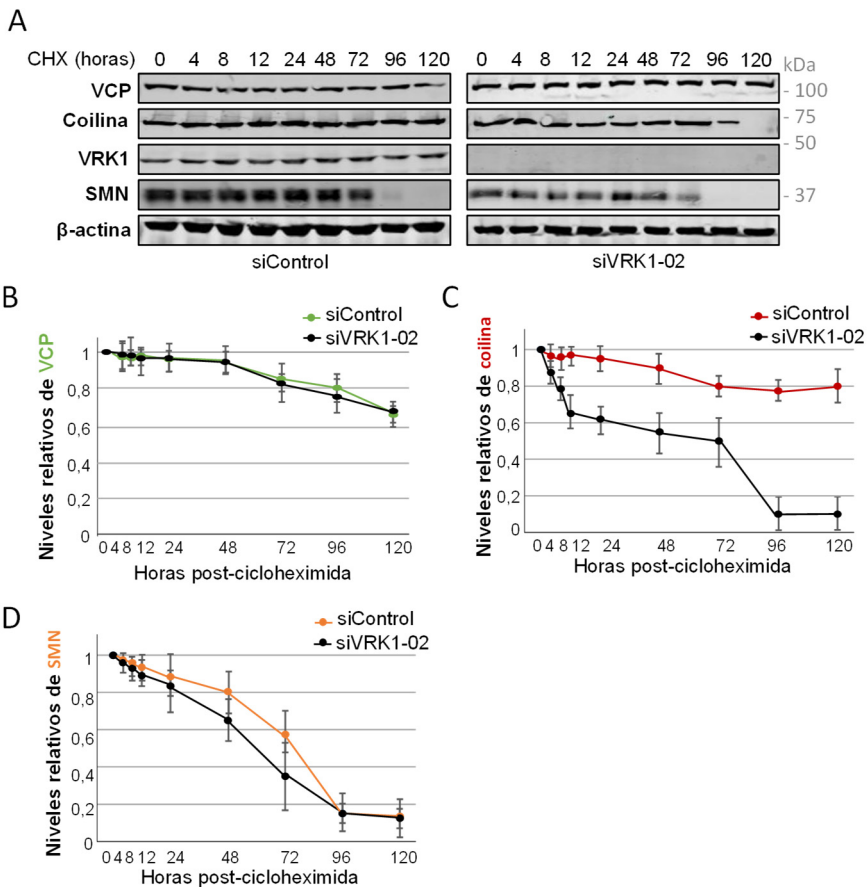
B



C



**Anexo 6. El silenciamiento de la quinasa no afecta a la estabilidad de VCP ni de SMN, mientras que la coilina es más inestable cuando VRK1 se encuentra ausente.** *Western blot* en el que se observa la estabilidad de VCP, coilina y SMN en presencia y ausencia de VRK1. Se sembraron células *HEK-293T* y pasadas 24 horas se silenció el gen *VRK1* con un siARN específico. Tras 48 horas, se trataron las células con cicloheximida 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se analizó la expresión de las proteínas a los tiempos marcados por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. Se realizaron 3 ensayos. Solo se muestra una réplica. **B.** Gráfica de la estabilidad de VCP. Se cuantificaron los niveles relativos de VCP usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos. **C.** Gráfica de la estabilidad de coilina. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos. **D.** Gráfica de la estabilidad de SMN. Se cuantificaron los niveles relativos de SMN usando la  $\beta$ -actina como control y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los ensayos.











## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi director de la tesis, Dr. Pedro Lazo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio y haber podido realizar este trabajo, ayudándome a crecer como científica. También quería agradecer a mi tutor académico, Alberto Fernández Medarde, por permitirme ayudarlo a dar las clases prácticas a tus alumnos de Odontología y Medicina. Gracias también a Paulino Gómez Puertas, David Ros Pardo e Iñigo Marcos Alcalde por la aportación a este trabajo de la simulación de los modelos estructurales de las variantes de VRK1.

Me gustaría agradecer a toda la gente del CIC que ha hecho posible que este trabajo haya llevado a cabo: Carlos, Sonia, Eugenia. Y especialmente muchísimas gracias a Ana, Sara, Ángel, David por vuestra profesionalidad y por haberme hecho tan amenas todas esas horas y horas que hemos pasado en confocal.

A todos los amigos que me llevo, que son muchos. A mi pequeña gran familia del laboratorio 4. Elena, mi margarita, mi profe, mi compi, mi amiga. Gracias por haberme acogido desde el principio en tu corazoncito y haberme enseñado todo lo que sé. Gracias por todos esos momentos de risa en el laboratorio y fuera de él, por toda esa confianza que pusiste en mí desde el principio, por tu naturalidad, por seguir estando a mi lado después de tanto tiempo. También, gracias a Raulito por todo el apoyo que me has dado y esos momentos de tranquilidad en el laboratorio y, al señor Ignacio, por lo contrario... Sé que te fue difícil tenerme de compi de pasillo, pero también sé que en el fondo me tienes mucho aprecio (y yo a ti también, aunque a veces no te lo parezca). Helena (con H o sin ella), mi hermanita de labo. Muchísimas gracias por ser tan buena persona, siempre dispuesta a aprender y a ayudar en todo. Gracias por tantas risas y conversaciones en los buenos y malos momentos. No dejes de perseguir todo lo que quieres porque vas a llegar muy pero que muy lejos. Confío en tí!. Mi pequeña Evita, siempre tan alegre y natural. Muchas gracias por ser tan única, tan mágica, por enseñarme que hay que tomarse la vida calmadamente y disfrutar de todo y, que pase lo que pase, hay que seguir siendo siempre una misma. Gracias Aurorita por haber sido tan buena alumna y por parecerte tanto a mí con nuestros eternos despistes y nuestras cero ganas de madrugar. Y por supuesto, muchísimas gracias a Paula, porque, aunque has llegado en mis últimos y depresivos momentos de tesis,

me has ayudado en todo lo que te he pedido, enseñándonos cosas nuevas y ayudándome en esta etapa. ¡Eternamente agradecida!

Muchas gracias a mis chicos de otros laboratorios por todos esos 'Pacos', casas rurales, intentos de esquíada, rutitas, fiestucos: a las patosillas Cris y Alba; los aventureros Elena, Nerea, Óscar y Enrique; los *crossFiteros* Óscar, Luis, Rocío y, por supuesto, el 'fuerte' Guillermito; y las nuevas (pero ya no tan nuevas) adquisiciones Gloria y Mauro. Me quedo con todos y con cada uno de vosotros.

También agradecer a mis compis de máster María (o Pani) y Anita por haberme aguantado todos estos años desde los inicios, en los buenos y malos momentos, y a mi Sara, que sigue estando conmigo cerquita, pero desde un poquito más lejos. Muchísimas gracias por esos momentazos en la Imprenta, Paquipa, Niebla, por esas lloreras y risas juntas. Echaré de menos esos chocolates en los sábados noche. Pero sé que nos seguiremos viendo sea en el norte o en el sur!

Muchísimas gracias al mejor compi de inglés que se puede tener, el gran Arturito; y al que mejor nos sabe alimentar, Sergio. Gracias chicos por seguir apoyándome y contando conmigo desde Copenhague y Palencia!

Y, por último, gracias Antonio por tu constante ayuda y paciencia, que no ha sido poca, especialmente en esta última etapa. Pero, sobre todo, por todo el ánimo y apoyo que me das cada día.

Finalmente, solo me falta dar las gracias a mi familia, a mis tíos M<sup>a</sup> Ángeles y Rafita, mis abuelos, mis padres y mi hermano. Sin vosotros no hubiese conseguido nada de esto. Gracias por apoyarme desde el principio de los principios, por haberme animado siempre a perseguir mis sueños por raros que os parecieran, por vuestras enseñanzas y consejos. Gracias por haberme enseñado a ser la persona que soy.

