

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**SEÑALIZACIÓN PARA LA QUINASA  
VRK1 EN BIOLOGÍA HUMANA**

**VRK1 KINASE SIGNALING IN HUMAN  
BIOLOGY**



**Abel Jesús Martel Martel**

**Grado en Biología**

**Julio 2016**

<b>SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016</b>	<b>ENTRADA</b>  Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

**Datos Personales**

Nº DNI o pasaporte: 54105873-Y	Nombre y Apellidos: ABEL JESÚS MARTEL MARTEL
Teléfono: 627783486	Dirección de correo electrónico: abelmartelmartel@gmail.com

**SOLICITA** la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

SEÑALIZACIÓN PARA LA QUINASA VRK1 EN BIOLOGÍA HUMANA
--

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

<b>D. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena</b>	
Profesor/a del Departamento de Medicina e Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca	
y D./Dña. <i>Jose Antonio Perez Perez</i>	
Profesor/a del Departamento de <i>Biología Celular y Genética (ULL)</i> .	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: PEDRO A. LAZO-ZBIKOWSKI	Fdo.: JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ

La Laguna, a 22 de Junio de 20 16

Firma del interesado/a

Abel J. Martel Martel

**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Documentación a adjuntar:**

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

## Tabla de contenidos

INTRODUCCIÓN .....	5
1. Señalización celular .....	5
1.1. Ruta de señalización activada por receptores ErbB. Ruta ERK .....	5
1.2. Señalización celular por la vía de Ras/MAPK-ERK .....	8
1.3. Receptores ErbBs y cáncer .....	9
2. Las proteínas quinasa .....	9
2.1. La familia de quinasas VRK .....	10
2.2. Estructura de las quinasas VRK .....	11
2.3. La quinasa humana VRK1 .....	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3. Técnicas de manipulación del ADN .....	15
3.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico de <i>E. Coli</i> .....	15
3.2. Cuantificación del ADN plasmídico .....	16
3.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa .....	16
4. Cultivo de líneas celulares .....	17
5. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo monocapa .....	17
5.1. Transfección con <i>JetPEI</i> .....	17
6. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo .....	18
6.1. Cuantificación de proteínas .....	18
7. Determinación de la actividad transcripcional con genes reporteros de luciferasa .....	18
8. Electroforesis en geles SDS-PAGE .....	20
9. Transferencia húmeda y <i>Western blot</i> de extractos proteicos .....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
10. Activación de VRK1 por el oncogén ErbB2 .....	22
11. Activación de VRK1 por el oncogén Ras .....	23
12. Activación de VRK1 por el oncogén Raf .....	24
CONCLUSION .....	26
REFERENCIAS .....	26

## ABSTRACT

The family of protein kinases is characterized by carrying out phosphorylation reactions making post-translational modifications that regulate some cellular processes such as differentiation and proliferation. In this family is the human kinase VRK1 which is present mainly in the nucleus and regulates different transcription factors or modulates p53 levels. It is located in tissues with high proliferative rate, including tumor tissues. Given their involvement in these processes, we studied the activation of this kinase by oncogenes belonging to the MAPKs signaling pathway (ErbB2, Ras and Raf), which is related to: processes of phosphorylation of membrane proteins or transcription factors at the level of ERK1/2, favoring the same processes as VRK1 sending signals to the nucleus. In this sense, VRK1 is activated under the expression of Raf oncogene with a dose-dependent effect. This could involve VRK1 on the MAPKs route but it is necessary to show that it could also be inhibited under the inactivation of Raf, acting with MEK inhibitors.

## RESUMEN

La familia de las proteínas quinasas se caracteriza por llevar a cabo reacciones de fosforilación ejerciendo modificaciones postraduccionales que regulan varios procesos celulares como la diferenciación y proliferación celular. Dentro de esta familia se encuentra la quinasa humana VRK1, presente mayoritariamente en el núcleo, que regula diferentes factores de transcripción o modula los niveles de p53. Está localizada en tejidos con alta tasa proliferativa, entre ellos los tejidos tumorales. Dada su implicación en estos procesos, se ha estudiado la activación de esta quinasa por oncogenes pertenecientes a la ruta de señalización de las MAPKs (ErbB2, Ras y Raf), la cual está relacionada con procesos de fosforilación de proteínas de membrana o factores de transcripción a nivel de Erk1/2 que favorecen los mismos procesos que VRK1 enviando señales al núcleo. En este sentido, VRK1 es activada bajo la expresión del oncogén Raf con un efecto dosis-dependiente. Este hecho podría implicar a VRK1 en la ruta de las MAPKs aunque es necesario demostrar que también podría ser inhibida bajo la inactivación de Raf actuando con inhibidores de MEK.

Palabras clave: Proliferación celular, Raf, señalización, VRK1.

Keywords: Cellular proliferation, Raf, signaling, VRK1.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Señalización celular.

Para el correcto funcionamiento de cada tipo celular en un organismo es necesario un control estricto de todos los procesos que ocurren en las células. Este control se lleva a cabo gracias a las diferentes rutas de señalización existentes en la célula, que son las encargadas de convertir los estímulos extra o intracelulares en cambios en la actividad, localización, conformación y expresión de las proteínas celulares. En este sentido, los factores de transcripción tienen un papel clave ya que son las dianas finales de las rutas de señalización y se encargan de regular la expresión génica. Por tanto, la regulación de estos factores es esencial para la expresión génica correcta durante el desarrollo y para el mantenimiento y función específica de las células ya diferenciadas.

La regulación de los factores de transcripción tiene lugar principalmente a dos niveles: a nivel de su concentración y a nivel de su actividad (Hill et al., 1995) <sup>[1]</sup>. La concentración de un factor de transcripción se regula a nivel de ARN mensajero y a nivel de síntesis o degradación de proteína. Su actividad, es decir, su unión al ADN, dimerización, interacción con otras proteínas y su transactivación, se regula por modificaciones postraduccionales. Dentro de estas modificaciones, la fosforilación y desfosforilación son algunos de los mecanismos principales en la regulación de la actividad transcripcional (Karin et al., 1995) <sup>[2]</sup>. De este modo, los diferentes patrones de fosforilación/desfosforilación que sufre un factor de transcripción según el tipo de estímulo o de ambiente determinan la interacción con otras proteínas y la especificidad transcripcional, lo que explica la diferente actividad de un mismo factor de transcripción en distintos tipos celulares o bajo diferentes estímulos.

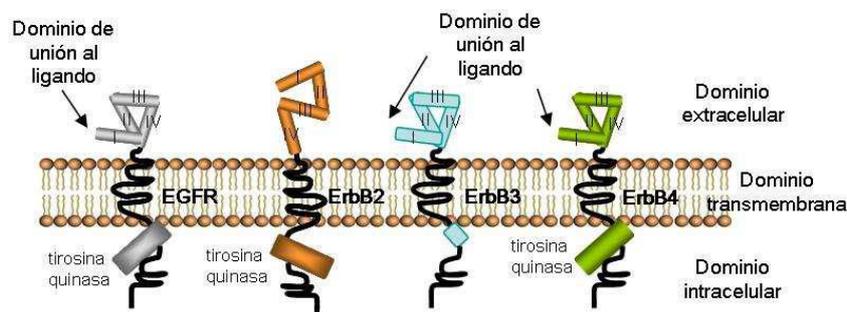
### 1.1. Ruta de señalización activada por receptores ErbB. Ruta ERK.

Los receptores ErbBs/HER que pertenecen al subgrupo de la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs), se localizan en la membrana celular y una vez activos, son capaces de regular las vías de señalización implicadas en proliferación, diferenciación, movilidad y supervivencia celular. Son cuatro miembros los que conforman esta familia:

EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2 (HER2/neu), ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4. De todos ellos, solo ErbB2 carece de ligando conocido y ErbB3 no tiene actividad tirosina quinasa.

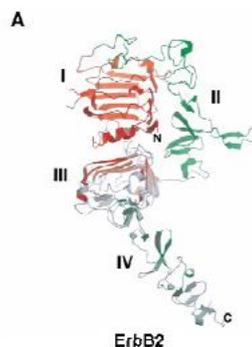
### 1.1.1. Estructura y activación de los receptores.

Los cuatro receptores ErbBs (Figura 1) tienen una estructura similar formada por un dominio extracelular que une el ligando (a excepción de ErbB2), un dominio transmembrana y una porción intracelular que tiene el dominio tirosina quinasa altamente conservado (a excepción de ErbB3). Hay que destacar que los subdominios del dominio extracelular permiten además de la unión al ligando, la dimerización entre los propios receptores (Guy et al., 1994) [3].



**Figura 1: Estructura de los receptores ErbBs.** En la figura se muestran los cuatro miembros de la familia ErbBs y sus tres dominios. El dominio extracelular está dividido en 4 subdominios (I, II, III, IV).

Si bien los receptores ErbBs experimentan un cambio conformacional cuando se unen al ligando, ErbB2 no lo hace de esa manera ya que siempre se encuentra en una conformación de dimerización. Estudios cristalográficos han demostrado que el dominio extracelular de ErbB2 (Figura 2) mimetiza a la conformación de EGFR unido a EGF, presentando una conformación abierta.



**Figura 2: Modelo molecular basado en la estructura cristalizada del dominio extracelular de ErbB2.**

### **1.1.2. Mecanismos que regulan a los receptores ErbBs.**

La localización en la superficie celular de los receptores ErbBs permite la unión al ligando y la activación de vías de señalización celular, por lo que la endocitosis y la degradación de los receptores son procesos importantes para su regulación. Otros mecanismos que permiten el control de la cantidad de receptores ErbBs son la transcripción y la síntesis proteica. Especial atención merece ErbB2, que al formar heterodímeros con EGFR modifica su endocitosis y degradación. La formación de estos heterodímeros EGFR-ErbB2 provoca la permanencia del complejo receptor-ligando en la membrana celular cuando EGFR es activado por EGF (Lenferink et al., 1998) <sup>[4]</sup>. Se sostiene que ErbB2 junto a EGFR se internaliza y se recicla rápidamente. Sin embargo, en algunos casos, ErbB2 previene la internalización de EGFR (Offterdinger et al., 2008) <sup>[5]</sup>. Es posible que en presencia de altas concentraciones de ErbB2, los heterodímeros ErbB2-EGFR sean retenidos en la membrana por mecanismos que implican la asociación de ErbB2 con otras proteínas (Sorkin et al., 1993)<sup>[6]</sup>.

### **1.1.3. Regulación de la síntesis de ErbB2.**

En muchos tipos de tumores, el aumento de ErbB2 en la superficie celular es el resultado de la amplificación del gen ErbB2/neu situado en el cromosoma 17q. También se ha descrito que mutaciones en esta región aumentan la expresión de ErbB2 en diversos tumores como el cáncer de mama (Coene et al., 1997) <sup>[7]</sup>.

El aumento de la actividad transcripcional del gen ErbB2/neu puede ser debida a la mayor actividad de su promotor, el cual está controlado por distintos factores de transcripción que aumentan o disminuyen la expresión del gen.

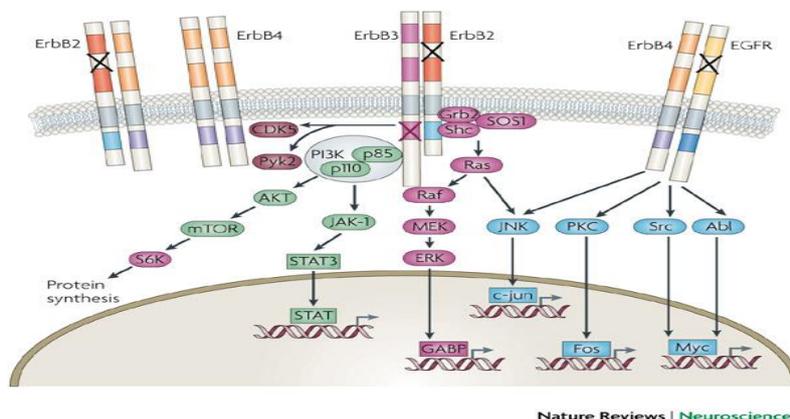
### **1.1.4. Vías de transducción de señales.**

La unión de un ligando a un receptor ErbB induce la formación de dímeros que provoca la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca y fosforilación de residuos de tirosina situados en el dominio intracelular. Estas tirosinas fosforiladas son puntos de unión para moléculas de señalización lo que permite que se activen distintas rutas de transducción de señales (Olayioye et al., 1998) <sup>[8]</sup>. Las vías de señalización activadas por el dímero ErbB2-EGFR que mejor se han caracterizado son: la vía de Ras/MAPK-ERK, la vía de la PI3k/PKB (AKT), la vía de la PLC-PKC y los factores de transcripción STATS que son directamente fosforilados por EGFR.

## 1.2. Señalización celular por la vía de Ras/MAPK-ERK.

Todos los receptores ErbBs tienen la capacidad de activar la vía de Ras/MAPK-ERK, directamente a través del dominio SH2 de la proteína Grb2 o indirectamente a través del dominio PTB mediante un adaptador Shc (Figura 3). Grb2 se asocia a Sos (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que activa a la proteína GTPasa pequeña Ras, favoreciendo el intercambio de GDP por GTP. La activación de Ras provoca la unión y activación de la serina/treonina-quinasa RAF (MAPKKK). RAF en su estado inactivo se encuentra en el citoplasma, al unirse a Ras-GTP se sitúa en la membrana celular, adoptando una conformación intermedia con activación parcial. Otras quinasas (PAK-3, Src, entre otras) catalizan la fosforilación de RAF en múltiples sitios, lo que deja a RAF en un estado activo estable, situándose en el citoplasma. RAF activo une y fosforila a la quinasa de especificidad dual MEK1/2 (MAPKK), la cual fosforila y activa a la quinasa regulada por señales extracelulares Erk1/2. La amplificación de la cascada es de tal magnitud, que se estima que solo el 5% de Ras activado es suficiente para activar todas las moléculas de Erk1/2. Una vez ocurre esta activación, Erk1/2 es distribuida por toda la célula en dos fases: a los 2 minutos de la estimulación mitogénica hay una rápida localización nuclear por difusión pasiva a través del nucleoporo; transcurridas de 3 a 6 horas de la estimulación mitogénica, la acumulación de la proteína activa (también pueden ser desfosforiladas) en el núcleo es total de manera que se agota en el compartimento citoplasmático.

La activación de Erk1/2 provoca la fosforilación de múltiples sustratos, incluyendo varias proteínas de membrana (CD120a), factores de transcripción (SRC-1, c-Myc, c-Fos, entre otros), proteínas del citoesqueleto y todas las proteínas quinasas activadas por MAPKs (MAPKs) (Frödin et al., 1999) [9]. Estas últimas están estrechamente relacionadas con la regulación transcripcional, el control del ciclo celular, la supervivencia y diferenciación celular.



**Figura 3: Vía de las Ras/MAPK-Erk1/2.** La unión de Grb2 a los receptores ErbBs induce su asociación con Sos permitiendo la forma Ras-GTP activa. Ras se une a RAF permitiendo su localización en la membrana y su activación por fosforilaciones. RAF activa a MEK y ésta activa a Erk (vía clásica). Erk tiene muchos sustratos pero se destacan las MSK, RSK y MNK en el citosol y muchos factores de transcripción en el núcleo celular.

### 1.3. Receptores ErbBs y cáncer.

Los receptores ErbBs están implicados en el desarrollo de tumores malignos mediante la regulación de diversos procesos celulares (proliferación, adhesión, diferenciación celular, apoptosis), tanto al inicio como en la progresión tumoral. En este sentido, las proteínas encargadas de regular estos procesos y que interactúan con factores de transcripción como es el caso de Vrk1 podrían estar implicadas en el desarrollo de tumores. De la misma manera, pueden ser una diana imprescindible para el control y desarrollo de terapia anti-tumoral.

#### 1.3.1. Alteraciones de ErbB2 y cáncer.

La principal alteración en tumores asociados a ErbB2 se debe al aumento de los niveles de dicho receptor. Se ha detectado fundamentalmente en cáncer de mama, próstata y ovario. En el primer caso, el 90% de los tumores se deben a una sobreexpresión de ErbB2 por amplificación del gen. Esto justifica la importancia de la mayor o menor llegada de los factores de transcripción a los genes que se sobre-expresan, así como la activación o inhibición que producen sobre otras proteínas, como pudiera ser Vrk1. La mayor o menor activación de Vrk1 por sobre-expresión de ErbB2 u otro mediador de la ruta de las MAPKs (Ras, Raf) actuaría directamente sobre los factores que regulan la proliferación celular y que pueden asociarse a los procesos tumorales.

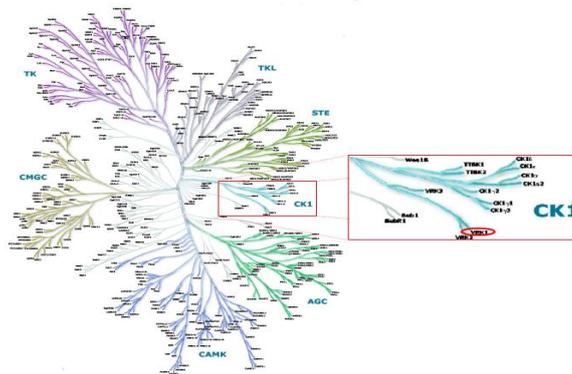
El efecto oncogénico de ErbB2 puede deberse a la activación de su dominio tirosina quinasa en ausencia de ligando. En tejidos en cultivo, con altos niveles de expresión de ErbB2, se observa homodimerización constitutiva y, como consecuencia, una transformación tumoral.

## 2. Las proteínas quinasa.

Las proteínas quinasa son enzimas responsables de la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina de las proteínas diana, reacción conocida como fosforilación. Estas enzimas se caracterizan por tener una alta homología en el dominio quinasa o dominio catalítico, formado por una secuencia de 250-300 aminoácidos (Hanks et

al., 1995) <sup>[10]</sup>. La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional reversible que regula varios procesos celulares como el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación, la proliferación o el transporte de membrana (Ubersax et al., 2007) <sup>[11]</sup>. Esta modificación es reversible debido a la existencia de las proteínas fosfatasa, encargadas de la eliminación del grupo fosfato añadido previamente por las quinasas.

La clasificación de las proteínas quinasa en el quinoma humano (Figura 4) hecha por Manning y colaboradores en el año 2002 incluye el grupo de la caseína quinasas tipo 1 (CK1), dentro del cual se encuentra la familia de serina/treonina quinasas VRK (del inglés *Vaccinia-Related Kinases*), objeto de estudio en este trabajo.



**Figura 4: Representación esquemática del quinoma humano.** Se muestra en detalle el grupo de las caseína quinasa 1 (CK1), dentro del cual se encuentra la familia de quinasas VRK. Modificado de Manning et al., 2002b.

### 2.1. La familia de quinasas VRK.

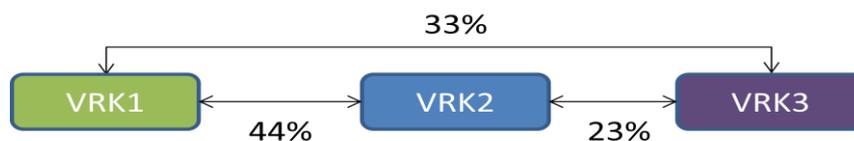
La familia de quinasas VRK está compuesta por tres miembros en el ser humano: VRK1 y VRK2, catalíticamente activas, y VRK3, una pseudoquinasa sin actividad debido a la sustitución de aminoácidos clave en su dominio quinasa (Nichols et al., 2004) <sup>[12]</sup>. VRK1 fue la primera quinasa del grupo en ser descrita por Nezu y colaboradores en genes fetales de hígado, un tejido altamente proliferativo. La secuencia completa de este gen se utilizó para identificar a otro gen, VRK2, con un 62% de homología. Este grupo de quinasas recibe el nombre de *Vaccinia-related Kinases* debido a que presentan una alta homología con la quinasa B1R del virus *Vaccinia*, quinasa esencial para la replicación del ADN viral (Nezu et al., 1997) <sup>[13]</sup>. VRK1 presenta un 40% de homología con la quinasa B1R, mientras que VRK2 tiene un 34%. Posteriormente se identificó la tercera quinasa de la familia, VRK3, mediante búsqueda en bases de datos de librerías de ADN.

Se ha estudiado la existencia de ortólogos de las VRKs en otros organismos. Frente a la dificultad para encontrarlos en organismos como las levaduras, en el ratón (*Mus musculus*) se han podido identificar tres ortólogos al igual que en los humanos. En un principio, la proteína

ortóloga fue descrita como 51PK, quinasa nuclear con altos niveles de autofosforilación en residuos de serina. Las tres quinastas murinas se expresan durante todo el desarrollo embrionario, siendo los niveles de expresión más elevados en tejidos con alta tasa proliferativa como el hígado, el bazo o el timo. En los ratones adultos, la expresión de las VRK varía según el tejido.

## 2.2. Estructura de las quinastas VRK.

Los miembros funcionalmente activos de la familia VRK son VRK1 y VRK2 caracterizados por su actividad serina/treonina quinasa con gran capacidad de autofosforilación. VRK1 es una proteína de 396 aminoácidos cuyo gen se localiza en la región cromosómica 14q32. El gen de VRK2 se localiza en la región cromosómica 2p16 y codifica para dos isoformas: VRK2A, de 508 aminoácidos, y VRK2B, de 397 aminoácidos. En cuanto a la proteína VRK3, es el miembro más divergente de la familia, con un 33% de homología con VRK1 y un 23% con VRK2. Consta de 474 aminoácidos y presenta una señal de localización nuclear bipartita en su extremo amino terminal. Entre VRK1 y VRK2 existe una homología del 44%. (Figura 5).



**Figura 5: Homología entre las 3 quinastas VRK humanas.**

El dominio catalítico de VRK1 y VRK2 se encuentra en su región amino terminal, con un sitio de unión a ATP típico y un sitio serina/treonina quinasa activo. Esta región amino presenta homología con la de caseína quinasa de tipo I (CK1), aunque VRK1 difiere de CK1 en los sustratos de fosforilación. La región carboxilo terminal presenta más divergencia entre VRK1 y VRK2 y se cree que tiene un papel en la regulación de estas quinastas y en sus interacciones específicas. De hecho, el extremo carboxilo de VRK1 tiene una secuencia única, sin homología con otras proteínas conocidas (Lopez-Borges et al., 2000) <sup>[14]</sup>. El extremo carboxilo de VRK1 presenta una señal de localización nuclear (NLS) típica (Figura 6). Esta secuencia se localiza dentro de un motivo básico-ácido-básico o BAB (aa 356-396), que constituye una región de aminoácidos ácidos flanqueada por dos regiones de aminoácidos básicos. Este motivo es característico y está conservado en varias quinastas VRK de diferentes organismos.

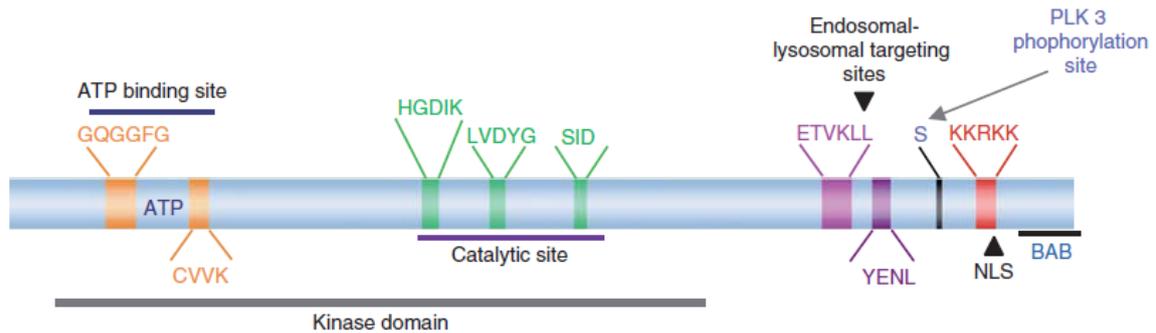
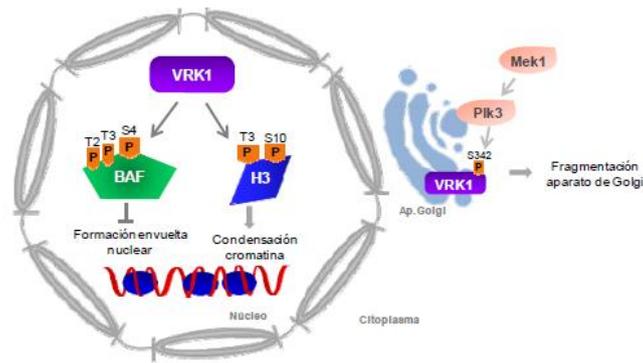


Figura 6: Dominios y estructura de la quinasa VRK1 humana <sup>[14]</sup>.

### 2.3. La quinasa humana VRK1.

VRK1 es la quinasa de la familia mejor caracterizada. Su ARN mensajero se localiza principalmente en tejidos con alta tasa proliferativa como el hígado, el timo, los testículos fetales y las líneas celulares tumorales. Sin embargo, VRK1 se expresa en todos los tejidos, encontrándose mayoritariamente en el núcleo ya sea libre en el nucleoplasma o asociada a la cromatina. Esto se debe a su señal de localización nuclear, estando presente en complejos de la maquinaria de iniciación transcripcional, junto con factores de ensamblaje e histonas. Asimismo, la localización subcelular de VRK1 varía según el tipo de línea celular y las condiciones de crecimiento, detectándose también una subpoblación libre en el citoplasma y otra en el aparato de Golgi.

Se han descrito múltiples procesos en los que participa la quinasa humana VRK1, tales como la correcta progresión del ciclo celular a través de la regulación de diferentes factores de transcripción, la modulación de los niveles de p53, el control del ensamblaje de la envoltura nuclear, la fosforilación de histonas o la correcta fragmentación del aparato de Golgi (Figura 7). Recientemente se ha situado a VRK1 como una quinasa fundamental en la respuesta a daño en el ADN y en neurodegeneración. A continuación se presentan los procesos más importantes en los que participa VRK1 y que se relacionan con las modificaciones que introducen en su funcionamiento los componentes de la ruta de las MAPKs.



**Figura 7: Funciones de VRK1 en la dinámica de la envuelta nuclear, fragmentación del aparato de Golgi y condensación de la cromatina.** VRK1 fosforila a la proteína BAF inhibiendo la formación de la envuelta nuclear. La fosforilación en treonina 3 y serina 10 de la histona H3 está implicada en la condensación de la cromatina. Además, VRK1 participa en la fragmentación del aparato de Golgi inducida por Mek1 y Plk3.

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

VRK1 se expresa cerca de la capa basal de los epitelios escamosos normales, donde se produce una mayor proliferación del tejido de modo que su expresión va disminuyendo a medida que las células epiteliales se van diferenciando. En epitelios escamosos de faringe, VRK1 correlaciona con el marcador de proliferación y células madre p63 (Valbuena et al., 2011) <sup>[15]</sup>. Además, en tumores de cabeza y cuello de célula escamosa, VRK1 correlaciona positivamente con marcadores de progresión de ciclo celular como CDK2, CDK6, Ciclina A o Ki67.

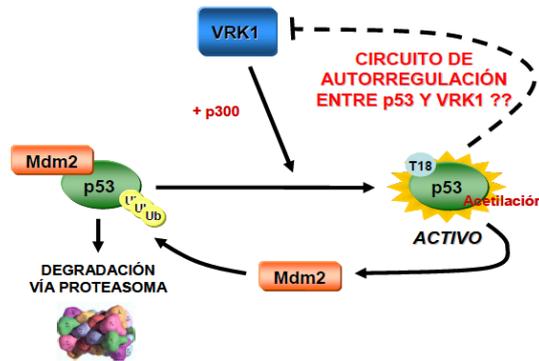
Por otra parte, la supresión de VRK1 mediante un ARN de interferencia específico, produce la disminución en los niveles de Ciclina D1, Ciclina A, PCNA y otros marcadores de proliferación, provocando una parada de ciclo en G0/G1 <sup>[15]</sup>. De esta manera, se confirma que VRK1 es una quinasa indispensable para la correcta progresión del ciclo celular, expresándose en mayor medida en tejidos con alta tasa proliferativa. En este sentido se relaciona directamente con la alteración de su expresión en algunos tipos tumorales. Se ha encontrado que en carcinoma de pulmón la expresión de VRK1 varía dependiendo del tipo de tumor, existiendo en carcinoma de célula escamosa una correlación entre los niveles de VRK1 y el estado mutacional de p53. Finalmente, se ha descrito a VRK1 como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, de tal forma que tumores de este tipo con bajos niveles de VRK1 y bajos niveles de genes relacionados con mitosis podrían tener mejor pronóstico.

### 2.3.2. Regulación de factores de transcripción por VRK1.

Entre las dianas de fosforilación de VRK1 existen varios factores de transcripción con importantes papeles en la señalización celular (Figura 9): ATF2, c-Jun, CREB y p53 (Sanz-García et al., 2010) <sup>[16]</sup>.

#### 2.3.2.1. VRK1 y p53.

Uno de los más importantes y mejor caracterizados es el supresor tumoral p53, también conocido como “el guardián del genoma”, ya que previene la acumulación de alteraciones genéticas a través de la inducción de la parada del ciclo celular o de la entrada en apoptosis. VRK1 fosforila a p53 en la treonina 18, residuo situado en la región de unión a Mdm2, evitando así su degradación y favoreciendo su estabilización al unirse al cofactor p300 (Figura 8).



**Figura 8: Hipótesis de autorregulación entre p53 y VRK1.** VRK1, mediante la fosforilación de p53 en treonina-18, participa en la activación de p53. Una vez p53 ha sido activado y ha inducido la respuesta celular apropiada, hace transitoria su propia activación mediante la activación de reguladores negativos como Mdm2.

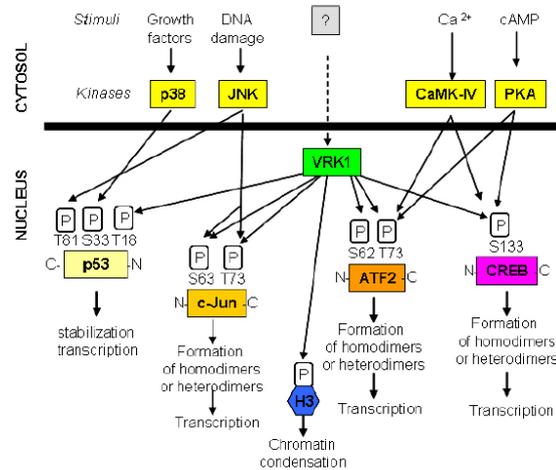
#### 2.3.2.2. VRK1 y los factores de transcripción ATF-2 y c-Jun.

Otros factores de transcripción fosforilados por VRK1 son ATF-2 (*activating transcription factor 2*) y c-Jun. ATF-2 es fosforilado en sus residuos serina 62 y treonina 73 induciéndose su acumulación y activación transcripcional. En el caso de c-Jun, VRK1 fosforila las serinas 63 y 73, promoviendo su estabilización y activación.

#### 2.3.2.3. VRK1 y el factor de transcripción CREB.

VRK1 fosforila también el factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding*) en la serina 133 e interacciona con él, activándolo. A través de la activación de este factor y de ATF-2, VRK1 aumenta la unión de éstos al promotor de la Ciclina D1, induciéndose su expresión, necesaria para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. Por último, también

el factor de transcripción Myc promueve la expresión de VRK1, induciendo la expresión de la Ciclina D1.



**Figura 9: Regulación de la transcripción génica por VRK1.** Esquema de los factores de transcripción regulados por VRK1, a su vez regulados por una red de distintas quinasas que responden a diferentes estímulos extracelulares <sup>[16]</sup>.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La ruta de señalización de las MAPKs regula los niveles de expresión de la quinasa humana VRK1. En base a dicha hipótesis, se plantea el siguiente objetivo:

- Averiguar si la sobreexpresión de proteínas pertenecientes a la ruta de las MAPKs causa efecto sobre los niveles de expresión de VRK1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. Técnicas de manipulación del ADN.

#### 3.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico de *E. Coli*.

La obtención de ADN plasmídico a gran escala se realizó mediante el uso del sistema comercial *JETStar The Novel Plasmid Purification System* de *GENOMED* y, en segunda instancia, del sistema comercial *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* de Thermo Scientific. Ambas extracciones del ADN plasmídico fueron llevadas a cabo según las indicaciones de los fabricantes.

### 3.2. Cuantificación del ADN plasmídico.

La concentración final de ADN purificado obtenido por el primer método se determinó en un espectrofotómetro U-2001 UV/Visible (HITACHI) con la medición de la absorbancia a 260 nm y considerando la relación de absorbancias 260 nm/280 nm. Esta relación debe estar comprendida entre 1,8 y 2,0 en el caso de que la preparación de ADN sea homogénea y no esté contaminada con ningún otro cromóforo. Posteriormente, se confirmó la cuantificación de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa analizando la fluorescencia emitida y comparándola con la de una muestra control de concentración conocida.

La concentración final de ADN plasmídico obtenido por el segundo método fue determinada en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de *Thermo Scientific*<sup>TM</sup> con la medición de la absorbancia a 260 nm y considerando la misma relación de absorbancias que en el anterior caso.

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

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño y carga neta se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM), preparados a la concentración adecuada para el tamaño de los fragmentos a separar (1% m/v de agarosa). De esta forma se mantiene el pH cercano a 8 durante el corrido, lo cual es de gran importancia puesto que la migración del ADN depende de las cargas negativas de los fosfatos y de los iones cargados en el medio. Dado que los ácidos nucleicos tienen carga negativa migrarán hacia el polo positivo al ser sometidos a un campo eléctrico. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante, entre 50 y 70 Voltios. Se utilizó como marcador de peso molecular el *ADN Ladder 1Kb* de *Promega*. Para la visualización de las bandas de ADN en el gel se añadió bromuro de etidio (0,5µg/mL) al tampón de electroforesis, un agente que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y que, al ser expuesto a luz ultravioleta, emite fluorescencia. Las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN y los marcadores de peso molecular fueron captados por una cámara digital acoplada al analizador de imagen *Gel Doc*<sup>TM</sup> 2000 de Bio-Rad e impresas en papel térmico. Para determinar el tamaño de la banda se comparó su migración con respecto a los marcadores de peso molecular.

#### 4. Cultivo de líneas celulares.

Los niveles de expresión de VRK1 han sido medidos en la línea celular humana HEK-293T, embrionaria de riñón. Para su correcto crecimiento se ha añadido el medio de cultivo DMEM al 10% en FBS. Los cultivos crecieron en *flasks* (*BD Falcon*) en un incubador a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad relativa. El medio de cultivo DMEM fue suplementado con 10% de *FBS* (suero fetal bovino), 2mM de L-glutamina y con el antibiótico penicilina (50 unidades/mL). En algunos ensayos el medio de cultivo DMEM no fue suplementado (0% *FBS*). Para levantar las células de los *flasks* se utilizó el propio medio gracias a su escasa adherencia al material del propio *flask*. Los medios de cultivo fueron obtenidos de *SIGMA-ALDRICH* y el suero así como los suplementos fueron obtenidos de *GIBCO-life technologies*. Las líneas celulares se observaron con un microscopio óptico invertido *Zeiss Axiovert 25*.

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

Los experimentos de sobreexpresión de proteínas en células eucariotas se llevaron a cabo con la transfección transitoria de plásmidos de ADN codificante en células en cultivo. En este caso, 24 horas antes de la transfección, las células se sembraron en placas de poliestireno (*BD Falcon*) de 6 pocillos –p35- (150µL de células en 2mL de medio de cultivo DMEM) de modo que en el momento de la transfección llegasen a una confluencia del 50-70%. El ADN utilizado para las transfecciones se obtuvo según los sistemas comerciales especificados en el apartado 1.1, y las cantidades transfectadas se especifican en cada experimento. La concentración final de ADN se mantuvo constante en todos los puntos de un mismo ensayo mediante la adición de la cantidad necesaria del vector vacío en el que se ha clonado.

##### 5.1. Transfección con *JetPEI*.

Este tipo de transfecciones se realizaron con el reactivo comercial *JetPEI<sup>TM</sup> DNA transfection reagent* (Polyplus Transfection) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se trata de un polímero catiónico que compacta el ADN en el interior de partículas cargadas positivamente (formando complejos) que se adhieren a los proteoglicanos cargados negativamente de la superficie celular y son introducidos en la célula por endocitosis. El ADN se resuspendió en un volumen determinado de NaCl 150nM y a continuación se añadió un volumen de NaCl 150mM en el que se había resuspendido el reactivo *JetPEI* (2µL de reactivo por µg de ADN a

transfectar). Esta mezcla se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente y se añadió por goteo a las células sembradas en las placas de p-35.

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

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de células en cultivo, se lisaron las células (48 horas tras la transfección de ADN aproximadamente) con tampón de lisis suave (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1mM EDTA) al que se añadieron inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10µg/mL de aprotinina, 10µg/mL de leupeptina) y fosfatasas (1mM de ortovanadato de sodio y 1mM de NaF). El lisado se llevó a cabo tanto de las células en suspensión como las adheridas a la placa p-35 donde fueron sembradas. De esta manera se puede medir los niveles de expresión de proteínas en distintas fases celulares utilizando el total de la población celular. Después de incubar 20 minutos en hielo, los extractos fueron centrifugados a 13200rpm a 4°C durante 20 minutos. Se recuperó la fracción soluble y el pellet fue descartado. A continuación, se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por el método de *Bradford*. Para la detección de proteínas endógenas y sobre-expresadas se resolvió una cantidad igual de extracto proteico (25-50µg) para todos los puntos a comparar mediante electroforesis SDS-PAGE y posteriormente se realizó un *Western blot*.

### **6.1. Cuantificación de proteínas.**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de *Bradford*. Este método se basa en el empleo de un colorante, el azul brillante G-250 Coomassie, el cual se une a las proteínas produciendo un cambio de color pardo a rojo-azulado, cambiando así su máximo de absorción de 465 a 595 nm. Se utilizó el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)* y se realizó una curva patrón usando la proteína BSA (seroalbúmina bovina).

## **7. Determinación de la actividad transcripcional con genes reporteros de luciferasa.**

Este tipo de ensayos se emplea para estudiar la regulación de genes, situando el gen reportero de la luciferasa tras el promotor en estudio. El sistema de valoración de la actividad

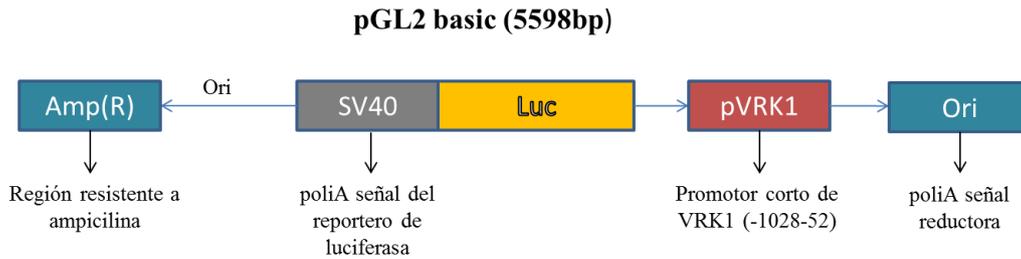
transcripcional de un factor de transcripción se basa en la transfección de células con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor en concreto (tabla 1). La unión de factores de transcripción adecuados a los sitios de unión en el promotor permitirá la transactivación del gen reportero de la luciferasa, con la consiguiente síntesis de la proteína luciferasa que cataliza la oxidación de la luciferina emitiéndose una señal luminosa. Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

- pGL2-basic: Es el vector vacío donde está clonado el promotor de VRK1 (Figura 10). Se corresponde con el nivel basal de luz que da el luminómetro cuando no hay emisión.
- pGL2-control: vector que contiene el promotor del virus SV40. El objetivo de este control es introducir en el ensayo un factor externo que activa al promotor de VRK1 siempre de la misma manera. Sirve como control de transfección.
- pGL2-pVRK1 (-1028+52): vector donde se ha clonado el promotor completo de VRK1.
- pCEFL-GSTØ: vector vacío que contiene el epítipo GST, usado para comprobar la correcta transfección en las células.

Aproximadamente 48 horas después de la transfección, se lisaron los extractos con tampón de lisis suave y se procedió a medir la actividad luciferasa. Esta emisión de luz a 556 nm fue cuantificada en un luminómetro *Lumat LB 9507* (Berthold Technologies). Los ensayos de luciferasa se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió un mínimo de 3 veces. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el uso del programa Excel.

Punto de transfección / Plásmido	pGLb2-basic	pGL2-control	pGL2-pVRK1	pCEFL-GSTØ	pCDNA3-ErbB2	pEFHA-KRasG12V	pEFHA-BRaf(V600E)
pGL2-basic	X						
pGL2-control		X					
pGL2-pVRK1			X		X	X	X
pCEFL-GSTØ	X	X	X	X	X	X	X
pCDNA3-ErbB2					X		
pEFHA-KRasG12V						X	
pEFHA-BRaf(V600E)							X

**Tabla 1: Construcciones para medir la actividad transcripcional con genes reporteros de luciferasa.** Se presentan los plásmidos transfectados a cada punto de transfección para ser medidos mediante el protocolo especificado.



**Figura 10: Representación esquemática del plásmido pGL2-basic donde se encuentra clonado el promotor en estudio.**

## 8. Electroforesis en geles SDS-PAGE.

La separación de proteínas, en función de su tamaño, se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes mediante electroforesis vertical en geles SDS-PAGE (del inglés: *Sodium Dodecylsulfate – polyacrilamide Gel Electrophoresis*). El SDS (dodecilsulfato sódico) es un detergente aniónico que desnaturaliza y se une a las proteínas confiriéndoles una carga negativa uniforme debido a sus grupos sulfato, de tal forma que la propia carga de la proteína queda enmascarada por las múltiples moléculas de SDS. Así, las proteínas tienen una relación carga/masa uniforme, de manera que migran hacia el polo positivo en función de su masa molecular. En función del tamaño de la proteína a analizar, se pueden utilizar diferentes concentraciones de acrilamida. En este caso, para proteínas entre 30-100kDa, se utilizaron geles del 10% de acrilamida. Para la preparación del gel separador (*resolving*) se utilizó acrilamida al 5-15% y bis-acrilamida al 0,13-0,4% en un tampón 0,375M Tris-HCl pH 8,8 y 3,5mM SDS. Encima de este gel separador se preparó el gel concentrador (*stacking*) con acrilamida al 4,8% y bis-acrilamida al 0,128% en un tampón 0,125M Tris-HCl pH 6,8 y 3,5mM SDS. Para la solidificación de los geles se añadió un agente iniciador de la polimerización como el persulfato de amonio y un catalizador de la formación de los radicales libres como el TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina).

Las muestras de proteínas se procesaron con tampón de carga (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2,3% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 5%  $\beta$ - mercaptoetanol) y se hirvieron durante 5 minutos. Posteriormente, se corrió el gel en condiciones desnaturizantes en tampón de carrera (25mM Tris-HCl, 200mM glicina y 1,7mM SDS). Como marcadores de peso molecular se utilizaron marcadores preteñidos *Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards Dual Color* (Bio-Rad).

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

Para la detección de las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE con anticuerpos específicos se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF *Immobilon-P* (Millipore) mediante transferencia húmeda según Towbin (Towbin et al, 1979) para su posterior detección mediante *western blot*. La transferencia húmeda se llevó a cabo en tampón 25mM Tris-HCl, 19,2mM glicina y 10-20% metanol. El porcentaje de metanol podría variar en función del peso molecular de las proteínas de interés; a mayor tamaño de la proteína, menor concentración de metanol. La transferencia se realizó durante 1-1,5 horas a 90V.

Para llevar a cabo el *Western blot*, la membrana de transferencia se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con leche en polvo desnatada al 5% en tampón TBS-T (25mM Tris-HCl pH 8, 50mM NaCl, 2,5mM KCl y 0,1% Tween-20). A continuación, la membrana se incubó en rotación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario necesario para detectar la proteína de interés (tabla 2, pág. 19), a la dilución recomendada (siguiendo las instrucciones de la casa comercial) en TBS-T. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos aproximadamente cada uno con TBS-T en agitación. El anticuerpo secundario *Goat Anti-Mouse IgG, DyLight<sup>TM</sup>* se incubó a la dilución adecuada (1:10000) durante 1 hora en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación. Después de 3 lavados con TBS-T, la membrana fue escaneada con *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* para detectar la fluorescencia emitida por los anticuerpos correspondientes a las proteínas de interés.

ANTICUERPOS					
Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Dilución de uso	MW: kDa	Procedencia
B-Actina	B-Actina (extremo N-terminal)	Monoclonal ratón	WB 1:5000	42	SIGMA-ALDRICH
Anti-GST (B-14)	Epítipo GST	Monoclonal ratón	WB 1:1000	25	Santa Cruz
Anti-ErbB2	ErbB2 (extremo C-terminal)	Monoclonal ratón	WB 1:1000	185	Cell Signaling

**Tabla 2. Anticuerpos.** Se detallan los anticuerpos primarios empleados, así como la dilución utilizada para ensayos de *Western blot* (WB) y su procedencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las técnicas detalladas anteriormente están destinadas a la medición del efecto dosis-dependiente que tiene sobre VRK1 los distintos oncogenes que conforman la ruta de señalización por la vía clásica de las MAPKs. Se han medido los niveles de expresión mediante ensayos luciferasa para cada oncogén. Asimismo, posterior al ensayo luciferasa, se ha realizado un *Western blot* para comprobar la expresión estable de  $\beta$ -actina y de GST en todos los puntos de transfección, relacionados ambos parámetros con el correcto estado de las células y la eficacia de transfección, respectivamente.

En primer lugar, se ha estudiado el efecto sobre el promotor de VRK1 (0,5 $\mu$ g en todos los casos) con distintas dosis de ErbB2 (0,1 $\mu$ g, 0,5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g y 2 $\mu$ g).

En segundo lugar, se ha procedido de la misma manera para evaluar el efecto de las distintas dosis de los oncogenes Ras (1  $\mu$ g y 2  $\mu$ g) y Raf (1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g y 4 $\mu$ g) sobre el promotor de VRK1 (0,5 $\mu$ g).

Los resultados obtenidos para los 3 ensayos, realizados por separado, se detallan a continuación:

### 10. Activación de VRK1 por el oncogén ErbB2.

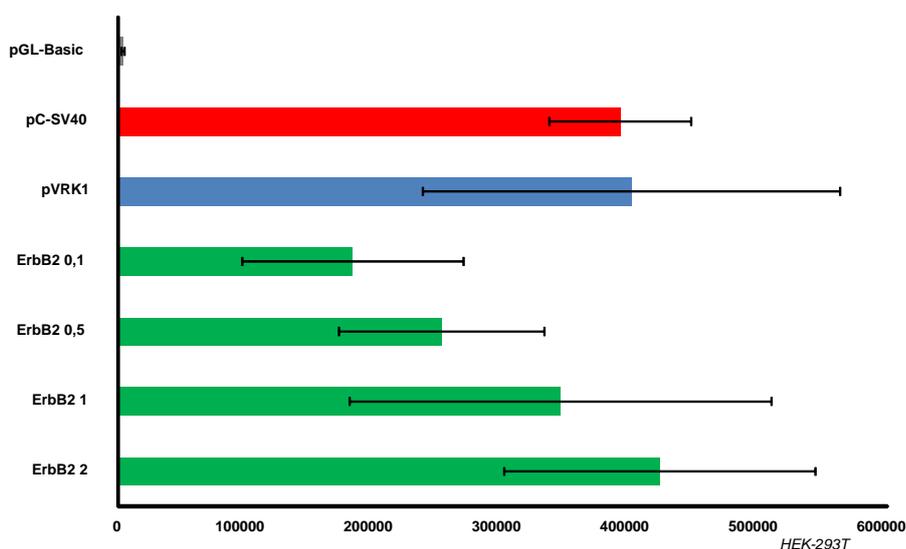
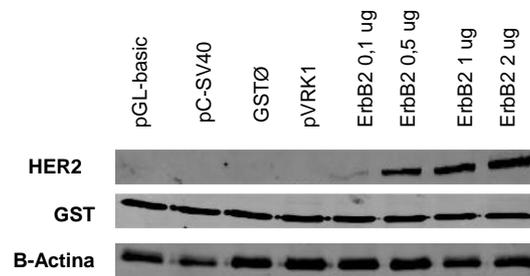


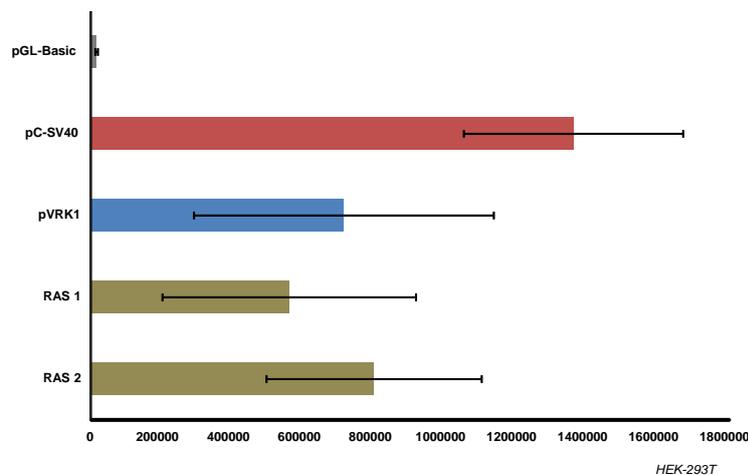
Figura 11: Niveles de expresión de VRK1 en presencia del oncogén ErbB2. Número de ensayos, n=3.

Se presentan los niveles de expresión de VRK1 en presencia del oncogén ErbB2, los cuales aumentan conforme las dosis de ErbB2 son mayores. Sin embargo, con estos resultados no se puede concluir que el promotor largo de VRK1 sea activado por dicho oncogén ya que no superan los valores basales de VRK1 en ausencia de ErbB2. Dado que la técnica no está puesta a punto, no podemos descartar que esté implicado en la ruta de las MAPKs por la vía clásica ya que podría activarse modificándose las concentraciones utilizadas de ErbB2 o el tiempo de espera para realizar la luciferasa desde el momento de la transfección. Además, el ensayo podría realizarse utilizando el promotor corto de VRK1 (contiene menos pares de bases) para averiguar si alguna región específica de un determinado promotor está vinculada a la activación por ErbB2.



Se ha comprobado mediante *Western blot* el buen estado de las células con la expresión de  $\beta$ -actina en todos los puntos de transfección, que además funciona como control de carga, así como la eficacia de la transfección con la presencia de GST en todos los puntos.

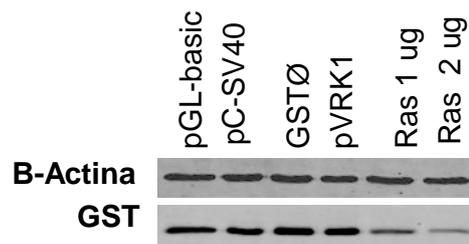
## 11. Activación de VRK1 por el oncogén Ras.



VRK1-Ras	pGL-Basic	pC-SV40	pVRK1	GSTØ	RAS 1	RAS 2
Media	16505,31	1360476,47	713304,98	0,00	559632,29	798574,62
Desv. Tip	3721,14	308803,60	422208,33	0,00	357165,07	303434,92

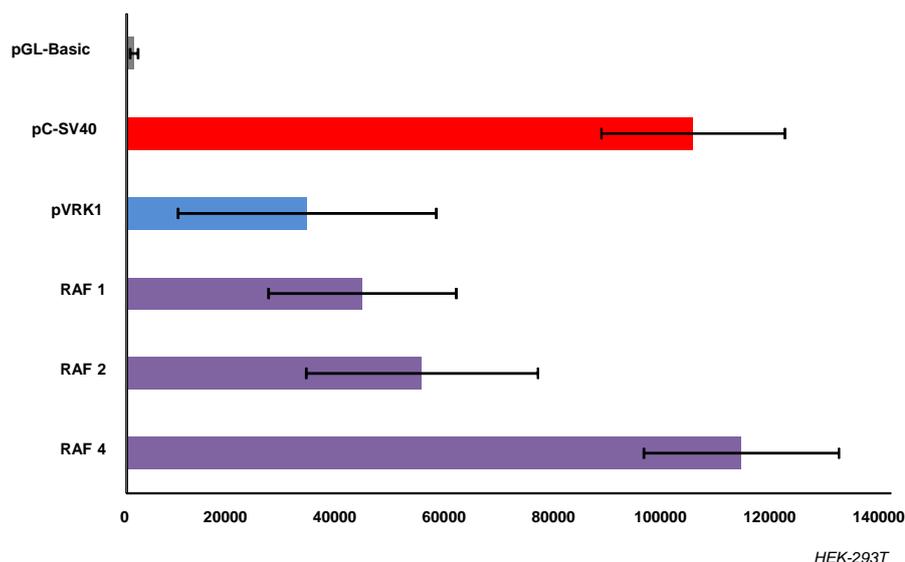
Figura 12: Niveles de expresión de VRK1 en presencia del oncogén Ras. Número de ensayos, n=3.

Del mismo modo que en el caso anterior, no podemos afirmar que VRK1 sea activado por el oncogén Ras ni tampoco descartar que esté implicado en la ruta de señalización de las MAPKs y sea activado por la vía clásica. En este caso, también podemos observar un aumento de la expresión VRK1 a medida que la dosis de Ras es mayor, a pesar de no superar los niveles basales de VRK1 en ausencia del oncogén.



El *Western blot* realizado confirma el buen estado de las células con la expresión de  $\beta$ -actina en todos los puntos de transfección de forma regular, así como la eficacia de la transfección con la presencia de GST en todos los puntos.

## 12. Activación de VRK1 por el oncogén Raf.



VRK1-Raf	pGL-Basic	pC-SV40	pVRK1	GSTØ	Raf 1	Raf 2	Raf 4
Media	1418,80	103783,33	33078,94	0,00	43217,61	54128,98	112601,16
Desv. Tip	714,62	16795,67	23650,09	0,00	17202,61	21211,49	17823,19

Figura 13: Niveles de expresión de VRK1 en presencia del oncogén Raf. Número de ensayos, n=3.

En este caso, el promotor largo de VRK1 si es activado por el oncogén Raf de forma creciente a medida que se aumenta la dosis. Si bien podemos afirmar que ha sido activado por la vía clásica de las MAPKs (supera los valores basales de VRK1 en ausencia de oncogén), no se puede concluir del todo ya que podrían utilizarse inhibidores de la ruta a nivel de MEK que podrían provocar la inactivación de su predecesor en la ruta, Raf. En este supuesto, si VRK1 está implicado en la ruta, se esperaría observar su inhibición cuando Raf estuviese inactivo por el efecto que ejercen los inhibidores de MEK.

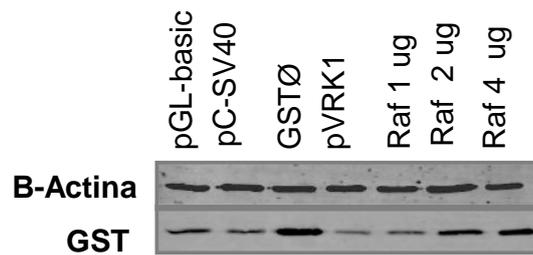
Cuando Raf está activado, actúa fosforilando la quinasa de especificidad dual MEK1/2 (perteneciente a la ruta de las MAPKs), la cual también fosforila y activa a la quinasa regulada por señales extracelulares Erk1/2. Este último provoca la fosforilación de múltiples sustratos, incluyendo varias proteínas de membrana (CD120a), factores de transcripción (SRC-1, c-Myc, c-Fos, entre otros), proteínas del citoesqueleto y todas las proteínas quinasas activadas por MAPKs. De ser así, VRK1 en el núcleo se activaría por la ruta de señalización de las MAPKs ejerciendo labores relacionadas con la regulación transcripcional, control del ciclo celular, la supervivencia y diferenciación celular, tal y como se detalla en el apartado 1.3 de la introducción.

Bajo otra perspectiva, como se comenta en apartados anteriores, VRK1 podría estar relacionada con los procesos tumorales desencadenados por la sobre-expresión de proteínas pertenecientes a la ruta de las MAPKs. Esto abriría un camino hacia el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra este tipo de tumores ya que se podría actuar a nivel de VRK1.

Por estos motivos, con el fin de confirmar si VRK1 se activa por esta vía de señalización, es necesario diseñar un estudio de inhibición de VRK1 actuando a nivel de MEK (Figura 11). De esta manera se lograría bloquear la acción de Raf y sus mediadores *up-stream* y esperaríamos observar inhibición en VRK1 y no activación para poder asociar esta proteína a la vía clásica de las MAPKs.



**Figura 14: Ruta de señalización por la vía clásica de las MAPKs. Posible implicación de VRK1.**



Tal y como se ha comentado anteriormente, se puede comprobar el correcto estado de las células transfectadas con la expresión regular de  $\beta$ -actina en todos los puntos. Además, se confirma la eficacia de la transfección con la presencia de GST en todos los puntos.

## CONCLUSION

Based on the proposed objective, we can say that there are indications that place VRK1 as a protein involved in the signaling pathway of MAPKs by the classical route. However, to conclude it definitively it's necessary to optimize the technique for ErbB2 and Ras oncogenes where it has not been detected VRK1 activation. Moreover, VRK1 has been activated by Raf oncogene allowing us to advance in this study by analyzing their expression under inhibition of the route. If we obtain the expected results, either inhibition or activation, we could include VRK1 as a protein involved in the signaling pathway to nuclear level. This justifies the functions described for kinase VRK1 that relate it to cell cycle control and that are also common in mediators that have been studied on the MAPKs route (ErbB2, Ras and Raf), offering an alternative to the study of tumor processes associated with over-expression of the same ones.

## REFERENCIAS

- [1] Hill, C. S., & Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80(2), 199-211.
- [2] Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology*, 5(7), 747-757.

- [3] Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(17):8132-8136.
- [4] Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *The EMBO Journal*. 1998;17(12):3385-3397. doi:10.1093/emboj/17.12.3385.
- [5] Offterdinger, M., & Bastiaens, P. I. (2008). Prolonged EGFR Signaling by ERBB2-Mediated Sequestration at the Plasma Membrane. *Traffic*, 9(1), 147-155.
- [6] Sorkin A, Di Fiore PP, Carpenter G. The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):3021-8.
- [7] Coene ED, Schelfhout V, Winkler RA, Schelfhout AM, Van Roy N, Grooteclaes M, Speleman F, De Potter CR. Amplification units and translocation at chromosome 17q and c-erbB-2 overexpression in the pathogenesis of breast cancer. *Virchows Arch*. 1997 May;430(5):365-72.
- [8] Olayioye, M. A., Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Rohrer, J., Gay, B., & Hynes, N. E. (1998). ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), 5042-5051.
- [9] Frödin, M., & Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 151(1), 65-77.
- [10] Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, 9(8), 576-596.
- [11] Ubersax, J. A., & Ferrell Jr, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 530-541.
- [12] Nichols, R. J., & Traktman, P. (2004). Characterization of three paralogous members of the mammalian vaccinia related kinase family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7934-7946.
- [13] Nezu, J. I., Oku, A., Jones, M. H., & Shimane, M. (1997). Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics*, 45(2), 327-331.
- [14] Lopez-Borges, S., & Lazo, P. A. (2000). The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumor suppressor protein. *Oncogene*, 19(32), 3656-3664.
- [15] Valbuena, A., Sanz-García, M., López-Sánchez, I., Vega, F. M., & Lazo, P. A. (2011). Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cellular signalling*, 23(8), 1267-1272.
- [16] Sanz-García, M., Valbuena González, A., López-Sánchez, I., Blanco, S., Fernández, I. F., Vázquez Cedeira, M., & Lazo, P. A. (2010). Vaccinia-related kinase (VRK) signalling.
- Valbuena González, A. 2008. *Regulación de la quinasa humana VRK1 por p53 y su implicación en la progresión del ciclo celular*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.
- Alicia Cortés, M. 2010. *Regulación del receptor ErbB2 y su relación con la diferenciación neuroendocrina en el cáncer de próstata*. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Universidad de Alcalá. España.
- Sanz García, M. 2009. *Regulación de la actividad de la quinasa humana VRK1 por la GTPasa Ran y su implicación en la respuesta al daño en el ADN*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.

Vázquez Cedeira, M. 2012. *Sensibilidad a inhibidores de la familia de quinasas VRK y regulación de NFAT y COX-2 por la quinasa humana VRK2A*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.

Cantarero Abad, L. 2015. *Implicación de la quinasa humana VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal y sus implicaciones patológicas*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.

Monsalve Carmona, D. 2014. *Implicación de las quinasas humanas VRK1 y VRK2 en las rutas de respuesta a daño génico y apoptosis*. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.