



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

IMPLICACIÓN DE LA QUINASA HUMANA VRK1 EN LA FORMACIÓN DE LOS CUERPOS DE CAJAL Y SUS IMPLICACIONES PATOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL
Lara Cantarero Abad

Salamanca, España
2015



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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“IMPLICACIÓN DE LA QUINASA HUMANA VRK1 EN LA FORMACIÓN DE LOS CUERPOS DE CAJAL Y SUS IMPLICACIONES PATOLÓGICAS”** presentada por la licenciada en biología **Lara Cantarero Abad**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 25 de septiembre de 2015.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena

Esta memoria ha sido realizada siendo **LARA CANTARERO ABAD** beneficiaria de una beca pre-doctoral JAE-Fondo Social Europeo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para la realización de la tesis doctoral (2011-2015).

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

Ministerio de Educación y Ciencia, CONSOLIDER-INGENIO2010 (CSD- 007-0017)

Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-14935)

Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI006A11-2)

CSIC-Hebrew University of Jerusalem, Shaare-Zedek Medical Center, Israel (Ref: PA1003032)

Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-44810R)

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

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

A mis padres y a Irene.

A Diego.

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

Santiago Ramón y Cajal

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las proteínas quinasa	3
1.1. La familia de quinasa VRK.....	4
1.2. Estructura de las quinasa VRK	5
1.3. La quinasa humana VRK1	7
1.3.1. Implicación de VRK1 en proliferación y progresión del ciclo celular	8
1.3.2. Regulación de factores de transcripción por VRK1	9
1.3.3. Fosforilación de la histona H3 por VRK1 y su implicación en la condensación de la cromatina.....	11
1.3.4. VRK1 en la dinámica de ensamblaje de la envoltura nuclear	11
1.3.5. VRK1 como mediadora de la fragmentación del aparato de Golgi.....	12
1.3.6. Implicación de VRK1 en la respuesta a daño en el ADN	13
1.4. La quinasa humana VRK2.....	13
1.4.1. Implicación de VRK2 en la respuesta a estrés celular	15
1.4.2. VRK2 como modulador negativo de la ruta de señalización de Erk1/2 ..	15
1.4.3. Regulación de NFAT y COX-2 por VRK2.....	15
1.4.4. VRK2 y su implicación en apoptosis	16
1.5. La pseudoquinasa VRK3	17
1.6. Regulación de las quinasa VRK.....	17
1.7. Ratones <i>knock-out</i> de VRK1 y VRK2	19
1.8. Las quinasa VRK en neurodegeneración.....	19
2. Los cuerpos de Cajal	23
2.1. Funciones de los cuerpos de Cajal.....	24
2.2. Componentes de los cuerpos de Cajal	26
2.2.1. p80-Coilina	26
2.2.1.1. Estructura de la coilina	27
2.2.1.2. Modificaciones postraduccionales de la coilina	28
2.2.1.2.1. Metilación de la coilina	28
2.2.1.2.2. Fosforilación de la coilina	29
2.2.1.2.3. Ubiquitinación de la coilina.....	32
2.2.1.2.4. Sumoilación de la coilina.....	33
2.2.1.3. Ratones <i>knock-out</i> de coilina.....	34
2.2.2. SMN (<i>Survival Motor Neuron</i>)	35
2.2.2.1. Estructura de SMN	36
2.2.2.2. Funciones de SMN: el complejo SMN	37
3. SMN, Coilina, VRK1 y su implicación en neurodegeneración	41
OBJETIVOS	45
RESULTADOS.....	47
1. Implicación de la quinasa humana VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal	49
1.1. La quinasa VRK1 interacciona con la coilina	49
1.2. La interacción entre VRK1 y coilina se produce a través de la región amino terminal de la quinasa.....	50
1.3. VRK1 no se encuentra en los cuerpos de Cajal	51
1.4. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal 55	

1.5. El silenciamiento de la quinasa humana VRK2 no afecta a la formación de los cuerpos de Cajal	62
1.6. La actividad quinasa de VRK1 es necesaria para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal.....	63
1.7. La fosforilación del residuo serina 184 de la coilina está asociada a la actividad de VRK1 en células en proliferación.....	68
1.8. La fosforilación de la coilina en el residuo serina 184 se produce antes del ensamblaje de los cuerpos de Cajal	71
2. Degradación de la coilina en el proteasoma	75
2.1. El silenciamiento de VRK1 reduce los niveles proteicos de coilina	75
2.2. El silenciamiento de VRK1 no afecta a la expresión de la coilina.....	77
2.3. Los inhibidores del proteasoma revierten el efecto producido por el silenciamiento de VRK1.....	80
2.4. La coilina se ubiquitina.....	86
2.5. Mdm2 es una ubiquitina ligasa de la coilina e interaccionan	88
2.6. El silenciamiento de VRK1 no afecta a la interacción entre la coilina y la ubiquitina ligasa Mdm2.....	91
2.7. La coilina se ubiquitina a través de cadenas de lisina 48	92
2.8. El mutante de coilina Ser184Ala es más sensible a la degradación inducida por Mdm2 y tiene una mayor ubiquitinación	94
2.9. La inhibición del exporte nuclear impide la degradación de la coilina en el proteasoma citosólico	97
3. Efecto del silenciamiento de la quinasa humana VRK1 en la proteína causante de la atrofia muscular espinal SMN	102
3.1. La quinasa humana VRK1 interacciona con SMN	102
3.2. SMN interacciona con la quinasa humana VRK1 a través de su región amino terminal	104
3.3. VRK1 no fosforila a SMN.....	106
3.4. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce la deslocalización de la proteína SMN.....	107
3.5. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce el mismo efecto en la localización de SMN que el silenciamiento de la coilina	112
3.6. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 no afecta a la estabilidad de SMN.....	113
3.7. Efecto del silenciamiento o sobreexpresión de la quinasa humana VRK1 en los niveles de expresión de SMN.....	114
3.8. La interacción entre SMN y el factor de transcripción p53 no se ve afectada al silenciar a la quinasa VRK1	116
4. Estudio de las interacciones entre las proteínas VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular.....	118
5. Caracterización de las mutaciones en VRK1 (R89Q, R133C, V236M, R358X) causantes de patologías neurodegenerativas	126
5.1. Estudio de la estabilidad de los diferentes mutantes de VRK1	126
5.2. Estudio de la actividad de los mutantes de VRK1	127
5.3. Interacción y colocalización entre los mutantes de VRK1 y las proteínas coilina y SMN.....	129
DISCUSIÓN.....	133
1. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal	135
2. Degradación de la coilina en el proteasoma.....	139
3. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la proteína causante de la atrofia muscular espinal SMN.....	147
4. Interacción entre VRK1, coilina y SMN.....	153

5. Caracterización de las mutaciones en VRK1 (R89Q, R133C, V236M, R358X).....	155
CONCLUSIONES.....	159
MATERIALES Y MÉTODOS	163
1. Técnicas de manipulación del ADN	165
1.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico de <i>E. Coli</i>	165
1.2 Cuantificación de ADN plasmídico.....	165
1.3 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa	165
1.4 Generación de vectores de ADN recombinante.....	165
1.5 Transformación de plásmidos en <i>E. Coli</i>	166
1.6 Mutagénesis dirigida	166
2. Técnicas de manipulación de proteínas.....	167
2.1 Purificación de proteínas de fusión con GST.....	167
2.2 Electroforesis en geles SDS-PAGE	168
2.3 Tinción con azul de <i>Coomassie</i>	169
2.4 Transferencia húmeda y <i>Western blot</i> de extractos proteicos	169
2.5 Tinción con rojo <i>Ponceau</i>	170
3. Cultivo de líneas celulares.....	170
4. Transfecciones transitorias de ADN en células eucariotas en cultivo monocapa.....	170
4.1 Transfección con <i>JetPEI</i>	171
4.2 Transfección con <i>Lipofectamine</i>	171
5. Infección celular para el silenciamiento o sobreexpresión de la quinasa VRK1	172
6. Obtención de extractos proteicos de células en cultivo	172
7. Fraccionamiento citosol-núcleo de extractos proteicos	173
8. Ensayos de interacción entre proteínas.....	173
8.1 Ensayos de coinmunoprecipitación	173
8.2 Ensayos de <i>Pull-Down</i>	174
9. Cromatografía líquida de exclusión molecular HPLC (<i>High-performance liquid chromatography</i>)	174
10. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)	175
11. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	176
12. Ensayos de actividad quinasa	177
13. Aislamiento de núcleos en células HeLa.....	178
14. Aislamiento de cuerpos de Cajal a partir de núcleos aislados de células HeLa	178
15. Reactivos y estimulaciones	180
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193
AGRADECIMIENTOS.....	211

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados. Secuencias de cada oligonucleótido y su uso en este trabajo.	182
Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados con su correspondiente dilución para <i>Western blot</i> (WB) e inmunofluorescencia (IF).	184
Tabla 3. Información de las líneas celulares utilizadas.	185
Tabla 4. Información de los vectores recombinantes utilizados. Se indican los plásmidos utilizados con su inserto correspondiente.	187
Tabla 5. Aminoácidos y bases nitrogenadas con sus abreviaturas correspondientes.	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del quinoma humano.	3
Figura 2: Representación esquemática de la estructura de las quinasas VRK.....	6
Figura 3: Alineamiento del sitio de unión al ATP y dominio quinasa de la familia VRK	7
Figura 4: Localización subcelular de VRK1..	8
Figura 5: Esquema con las principales dianas de fosforilación de VRK1, detallando los residuos fosforilados en cada caso.	10
Figura 6: Localización subcelular de VRK2A y VRK2B.....	14
Figura 7: Esquema de los principales sustratos de la quinasa VRK2.	15
Figura 8: Funciones de la quinasa VRK2A en las rutas de señalización de MAPK... .	16
Figura 9: Esquema representativo de la inhibición de VRK1 por la PKC δ	18
Figura 10: Esquema representativo de la quinasa VRK1 (R358X)..	21
Figura 11: Esquema de las mutaciones en VRK1 causantes de atrofas musculares espinales.....	22
Figura 12: Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal, 1903.....	23
Figura 13: Esquema de los cuerpos de Cajal durante las distintas fases del ciclo celular.	23
Figura 14: Esquema con algunas de las funciones descritas de los cuerpos de Cajal	25
Figura 15: Representación de los principales componentes de los cuerpos de Cajal, algunos de ellos compartidos con otros cuerpos nucleares tales como las Geminas, los PMLs, los HLBs o el nucléolo.	26
Figura 16: Esquema de la coilina donde se detallan sus dominios más importantes.	28
Figura 17: Esquema representativo de la metilación de argininas.....	29
Figura 18: Residuos de fosforilación identificados en la coilina.	30
Figura 19: Representación de la unión de Sm y el complejo SMN con la coilina..	31
Figura 20: Esquema del proceso de ubiquitinación donde se detallan los tres pasos más importantes llevados a cabo por las enzimas E1, E2 y E3.....	32
Figura 21: Representación de las diferentes cadenas de ubiquitina que se pueden formar en una proteína, y sus múltiples destinos, dependiendo de la lisina utilizada.....	33
Figura 22: Representación de la diferencia entre <i>SMN1</i> y <i>SMN2</i>	36
Figura 23: Esquema de la estructura de la proteína SMN donde se detallan sus dominios más importantes.	37

Figura 24: Representación de la biogénesis de RNPs donde participa el complejo SMN.....	38
Figura 25: Representación de las diferentes vías de la apoptosis donde actúa SMN ya sea a través de interacciones, inhibiciones o mediante regulación.....	41
Figura 26: VRK1 y coilina interaccionan	49
Figura 27: La coilina interacciona con la región amino terminal de VRK1..	51
Figura 28: Marcaje de los cuerpos de Cajal en distintas líneas celulares.....	52
Figura 29: La quinasa VRK1 no se encuentra en los cuerpos de Cajal..	54
Figura 30: El silenciamiento de VRK1 desplaza a la coilina a complejos de peso molecular medio	57
Figura 31: Silenciamiento de VRK1 en un panel de líneas celulares.....	57
Figura 32: El silenciamiento de VRK1 produce la pérdida de los cuerpos de Cajal... 61	
Figura 33: El silenciamiento de VRK1 mediante infección con vectores retrovirales afecta a la formación de los cuerpos de Cajal	61
Figura 34: El silenciamiento de VRK2 en las líneas HeLa y MCF-7 no afecta a la formación de los cuerpos de Cajal.....	63
Figura 35: Rescate de fenotipo en la línea celular HeLa	65
Figura 36: La quinasa VRK1 murina fosforila el residuo serina 184 de la coilina <i>in vitro</i>	66
Figura 37: Rescate de fenotipo con la quinasa VRK1 murina.....	67
Figura 38: La fosforilación de la coilina en el residuo serina 184 está asociada a la actividad de VRK1 en células en proliferación.....	70
Figura 39: Fosforilación del residuo serina 184 de la coilina por la quinasa VRK1 en células privadas de suero..	71
Figura 40: Colocalización de coilina total o fosforilada en el residuo serina 184 y VRK1	72
Figura 41: Esquema del protocolo de sincronización de células HeLa con timidina-nocodazol..	73
Figura 42: Coilina total y fosforilada en el residuo serina 184 durante el ciclo celular	75
Figura 43: El silenciamiento de VRK1 durante 5 días produce una reducción de los niveles proteicos de coilina..	76
Figura 44: El silenciamiento de VRK1 durante 5 días produce una reducción de los niveles proteicos de coilina..	77
Figura 45: El silenciamiento de VRK1 no afecta a los niveles de ARNm de la coilina	78
Figura 46: El silenciamiento de VRK1 no afecta a los niveles de ARNm de la coilina a los 5 días de silenciamiento o en células privadas de suero	79

Figura 47: El silenciamiento de VRK1 produce la reducción de los niveles de coilina transfectada.....	80
Figura 48: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 o por su inactividad en células paradas se recupera con los inhibidores del proteasoma.....	82
Figura 49: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 no se recupera con el inhibidor del proteasoma MG132 a los 5 días de silenciamiento.....	84
Figura 50: Los inhibidores del proteasoma revierten el efecto del silenciamiento de VRK1 formándose nuevamente cuerpos de Cajal funcionales.....	85
Figura 51: Secuencia aminoacídica de la coilina donde se destacan en rojo (alta puntuación), naranja (puntuación media) y verde (baja puntuación) las lisinas predichas por el programa como posibles candidatas a ubiquitinarse.....	86
Figura 52: Ubiquitinación de la coilina	87
Figura 53: Colocalización de coilina endógena y ubiquitina-His.	88
Figura 54: Mdm2, y no RNF8, induce la degradación de la coilina.....	89
Figura 55: La coilina interacciona con la ubiquitina ligasa Mdm2, pero no con RNF8	90
Figura 56: Colocalización entre coilina y Mdm2 endógenas	91
Figura 57: El silenciamiento de VRK1 no afecta a la interacción entre la coilina y Mdm2.....	92
Figura 58: La coilina se ubiquitina a través de cadenas de lisina 48	93
Figura 59: Ubiquitinación de la coilina a través de cadenas de lisina 48.	94
Figura 60: Sensibilidad de los mutantes de la coilina a la degradación por Mdm2....	95
Figura 61: Ubiquitinación de los mutantes de coilina	96
Figura 62: Existe una posible señal de exporte nuclear en la secuencia de la coilina	98
Figura 63: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 es recuperada con el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B.....	99
Figura 64: La coilina se ubiquitina en el núcleo antes de su exporte al citosol..	100
Figura 65: El inhibidor del exporte nuclear, leptomicina B, recupera los niveles de coilina en el núcleo después del silenciamiento de la quinasa VRK1.....	101
Figura 66: VRK1 interacciona con SMN.	103
Figura 67: SMN y VRK1 interaccionan independientemente de coilina	104
Figura 68: SMN se une a la región amino terminal de VRK1.....	105
Figura 69: VRK1 no fosforila a SMN <i>in vitro</i>	106
Figura 70: VRK1 no fosforila a la proteína SMN en ninguna fase del ciclo celular. .	107
Figura 71: El silenciamiento de VRK1 produce la salida de SMN al citosol.....	108

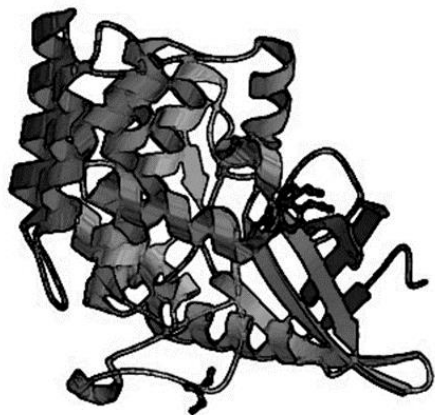
Figura 72: El silenciamiento de VRK1 provoca la salida al citosol de SMN.	109
Figura 73: Efecto del silenciamiento de la quinasa VRK1 en SMN, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y	110
Figura 74: El inhibidor de exporte nuclear leptomicina B, reduce la salida de SMN al citosol como consecuencia del silenciamiento de VRK1.....	111
Figura 75: El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce el mismo efecto en la localización de SMN que el silenciamiento de la coilina	112
Figura 76: El silenciamiento de VRK1 no afecta a la estabilidad de la proteína SMN	114
Figura 77: El silenciamiento de VRK1 produce un aumento significativo de los niveles de ARN mensajero de SMN.....	115
Figura 78: La sobreexpresión de VRK1 reduce significativamente los niveles de ARNm de SMN	116
Figura 79: La interacción entre SMN y el factor de transcripción p53 no se ve afectada por el silenciamiento de la quinasa VRK1.....	117
Figura 80: Lisado y extractos nucleares de células tratadas con timidina y nocodazol.	119
Figura 81: Extractos nucleares al 10% de suero o con timidina y nocodazol tratados con fosfatasa.....	120
Figura 82: Interacción entre VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular.	121
Figura 83: Colocalización de las proteínas coilina, SMN y VRK1 durante el ciclo celular	125
Figura 84: Ensayo de estabilidad de los mutantes de VRK1.	127
Figura 85: Fosforilación de p53 por los mutantes de VRK1.....	128
Figura 86: Fosforilación de la treonina 18 de p53 por los mutantes de VRK1.	128
Figura 87: Colocalización e interacción entre la coilina y los mutantes de VRK1. ...	130
Figura 88: Colocalización e interacción entre SMN y los mutantes de VRK1	132
Figura 89: Esquema representativo de la fosforilación del residuo serina 184 de la coilina por la quinasa humana VRK1	138
Figura 90: Aumento de proteínas en el nucléolo bajo condiciones de estrés celular	142
Figura 91: Predicción de los posibles residuos de fosforilación en la coilina por la familia de quinasa humanas CK1/VRK utilizando el programa GPS 2.0	143
Figura 92: Esquema del modelo que planteamos en este trabajo acerca de la fosforilación de la coilina por VRK1 y de su degradación en el proteasoma.....	146
Figura 93: Esquema de la salida al citosol de SMN por el silenciamiento de VRK1.	149
Figura 94: Hipótesis de por qué VRK1 afecta a la expresión del gen <i>SMN1</i>	151

Figura 95: Modelo propuesto para las interacciones entre VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular o al silenciar a la quinasa VRK1	155
Figura 96: Mapa de las interacciones entre VRK1 y las proteínas más importantes en este trabajo.	157

INTRODUCCIÓN

*“La ciencia tiene una característica maravillosa,
y es que aprende de sus errores; utiliza sus
equivocaciones para reexaminar los problemas y
volver a intentar resolverlos por nuevos caminos.”*

Ruy Pérez Tamay



1. Las proteínas quinasa

Las proteínas quinasa son las 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 and Hunter, 1995). La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional reversible que regula varios procesos celulares como el metabolismo, la diferenciación, el crecimiento, la proliferación o el transporte membranar (Ubersax and Ferrell, 2007). Esta modificación es reversible debido a la existencia de las proteínas fosfatasa, encargadas de la eliminación del grupo fosfato añadido previamente por las quinasas.

En el año 2002, Manning y colaboradores ampliaron el trabajo realizado en 1995 por Hanks y Hunter (Hanks and Hunter, 1995), en el cual se clasificaron filogenéticamente todas las quinasas humanas en lo que se denominó el “Quinoma humano” (Figura 1); apoyándose en las bases de datos genómicas disponibles, los ADN codificantes y las EST (*expressed sequence tag*) introducidas en el *GenBank* (Manning et al., 2002a; Manning et al., 2002b). Se identificaron un total de 518 quinasas potenciales y 106 pseudogenes de quinasas (copias no funcionales de quinasas). En esta clasificación se incorporaron cuatro nuevos grupos, entre ellos, el de las caseín quinasa de tipo 1 (CK1), dentro del cual se encuentra la familia de quinasas VRK (*Vaccinia-related kinases*), objeto de estudio en este trabajo.

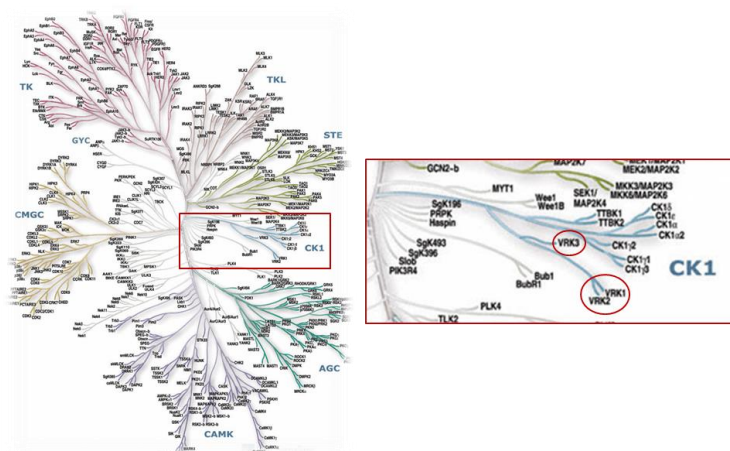


Figura 1: Representación esquemática del quinoma humano. Se muestra en detalle el grupo de las caseín quinasa 1 (CK1), dentro del cual se encuentra la familia de quinasas VRK. Modificado de Manning et al., 2002b.

1.1. La familia de quinasas VRK

La familia de quinasas VRK consta de 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 and Traktman, 2004a). VRK1 fue la primera quinasa del grupo en ser descrita; Nezu y colaboradores la identificaron mediante una librería de ADNc enriquecida en genes fetales de hígado diseñada para la búsqueda de genes que se expresaran en tejidos altamente proliferativos (Nezu et al., 1997). La secuencia completa de este gen se utilizó, a través de bases de datos EST, para identificar a otro gen, VRK2, con un 62% de homología (Nezu et al., 1997). 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). VRK1 presenta un 40% de homología con la quinasa B1R, mientras que VRK2 tiene un 34% (Nichols and Traktman, 2004a). Además, tanto la quinasa humana VRK1 como la murina, son capaces de rescatar la síntesis de ADN en virus carentes de B1R sensibles a temperatura (Traktman and Boyle, 2004). Posteriormente se identificó la tercera quinasa de la familia, VRK3, mediante búsqueda en bases de datos de librerías de ADN (Vega et al., 2003).

Se ha estudiado la existencia de ortólogos de las VRKs en otros organismos. Se postula que un único gen ancestral se duplicó dos veces cuando la rama de los vertebrados evolucionó, dejando así un solo gen de VRK en los invertebrados y tres en los vertebrados (Klerkx et al., 2009). En levaduras no existen ortólogos; sin embargo, el gen *Hrr25* de *Saccharomyces cerevisiae* y su ortólogo *hhp1* de *Schizosaccharomyces pombe*, por su homología con las secuencia de las VRK, podrían ser los ancestros en estos organismos. Además, se conoce que las proteínas expresadas por estos genes, participan en la respuesta al daño en el ADN (Ho et al., 1997; Hoekstra et al., 1991). Existe un solo ortólogo de VRK1 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) codificado por el gen *F28B12.3*. Este gen, al ser silenciado por un ARN de interferencia específico, produce en el embrión un fenotipo letal con defectos en la división celular y en la formación del huso mitótico (Gorjanacz et al., 2007; Kamath et al., 2003). Esta proteína VRK-1 de *C. elegans* es necesaria para la proliferación de las células germinales, regulando la actividad de CEP-1 (ortólogo de p53) (Waters et al., 2010); además se ha estudiado cómo VRK-1 fosforila a BAF (*barrier to autointegration factor*), regulando su localización y participación en la formación de la envoltura nuclear (Gorjanacz et al., 2007). El ortólogo de las proteínas VRK en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se llama NHK-1, descrito por su

capacidad de fosforilar a la histona H2A en mitosis (Aihara et al., 2004). Además, igual que el ortólogo en *C.elegans*, NHK-1 también fosforila a BAF. Esta fosforilación reduce la afinidad de este factor por el ADN y las proteínas de la envoltura nuclear, liberando a los cromosomas para la formación del cariosoma durante la meiosis (Lancaster et al., 2007). En el ratón, *Mus musculus*, existen tres ortólogos al igual que en los humanos. Inicialmente, la proteína ortóloga fue descrita como 51PK, quinasa nuclear con altos niveles de autofosforilación en residuos de serina (Zelko et al., 1998). Las tres quinasas 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 (Vega et al., 2003; Zelko et al., 1998). Además, existen ortólogos en otros organismos como el pez cebra *Dario rerio*, el anfibio *Xenopus laevis*, la rata *Rattus norvegicus* o el chimpancé *Pan troglodytes*.

1.2. Estructura de las quinasas VRK

La quinasa humana VRK1 es una proteína de 396 aminoácidos cuyo gen se localiza en la región cromosómica 14q32. En su extremo amino terminal, el cual presenta bastante homología con el de la caseína quinasa de tipo 1 (Lopez-Borges and Lazo, 2000), contiene un sitio activo de unión al ATP (residuos 43-71) y un dominio serina-treonina quinasa activo (residuos 173-185). En la región carboxilo terminal se encuentra una señal de localización nuclear (NLS) (residuos 356-360) y un dominio básico-ácido-básico llamado BAB (residuos 356-396) (Aihara et al., 2004). Esta región de VRK1 no presenta homología con el resto de ortólogos y, se cree que pueda ser el dominio regulador de la proteína (Lopez-Borges and Lazo, 2000; Nichols and Traktman, 2004a). Las tres quinasas de la familia difieren mucho en su región reguladora, pero no en su dominio catalítico, lo que sugiere que puedan compartir sustratos, si bien su regulación y localización subcelular sea diferente (Blanco et al., 2006b; Lopez-Borges and Lazo, 2000). Así, tanto VRK1 como VRK2 son serina/treonina quinasas activas, con una intensa autofosforilación, aunque VRK2 tiene una capacidad menor de autofosforilarse que VRK1. A diferencia de la caseína quinasa de tipo 1, pueden fosforilar tanto proteínas ácidas como básicas (Barcia et al., 2002; Lopez-Borges and Lazo, 2000; Nichols and Traktman, 2004a).

El gen VRK2, localizado en la región cromosómica 2p16, codifica para las dos isoformas de VRK2: VRK2A y VRK2B. Estas isoformas son generadas por un procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) (Blanco et al., 2006b). VRK2A, proteína de 508 aminoácidos, presenta en su extremo amino terminal un dominio

quinasa activo (residuos 162-174) y un sitio de unión al ATP (residuos 35-61). El extremo carboxilo presenta una región hidrofóbica (residuos 492-508) que constituye una región transmembrana (RT), junto con dos motivos BAB solapados (Blanco et al., 2006b; Nichols and Traktman, 2004a). VRK2B, proteína de 397 aminoácidos, es idéntica a VRK2A hasta el aminoácido 394, a partir del cual se introduce un codón de terminación, reemplazando los aminoácidos 395-508 por tres residuos (VEA) (Blanco et al., 2006b). Así, esta isoforma no presenta la región hidrofóbica y el motivo BAB aparece truncado.

Finalmente, VRK3, es la pseudoquinasa de la familia. El gen que la codifica se localiza en la región cromosómica 19q13, dando lugar a una proteína de 474 aminoácidos y con poca homología con VRK1 y VRK2. En su región amino terminal presenta una señal de localización nuclear (NLS) y en su región carboxilo terminal un dominio quinasa degenerado debido a sustituciones en aminoácidos clave, careciendo así de actividad quinasa (Figura 2) (Nichols and Traktman, 2004a; Scheeff et al., 2009).

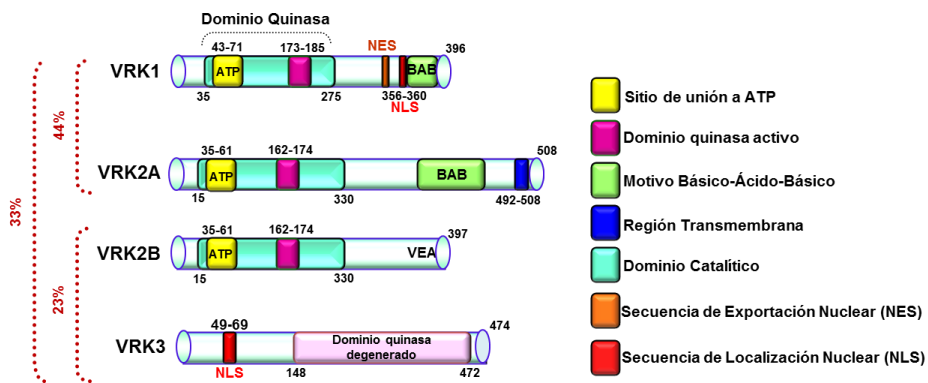


Figura 2: Representación esquemática de la estructura de las quinases VRK. Se representan los motivos y dominios más importantes. Los porcentajes indican la homología entre los diferentes miembros de la familia.

Recientemente, se ha descrito la estructura tridimensional de los dominios catalíticos de VRK2 (residuos 15-330) y VRK3 (residuos 148-472). En la mayoría de quinases, la regulación de su actividad viene determinada por la fosforilación de residuos específicos en el *loop* de activación, una región de entre 20 y 40 aminoácidos situada dentro del dominio catalítico. Existen quinases, sin embargo, que carecen de este sitio conservado de fosforilación dentro del *loop* de activación, siendo la quinasa igualmente activa. Este es el caso de la familia de quinases VRK, las cuales poseen una hélice adicional (α C4) en el segmento de activación, haciéndolas constitutivamente activas (Scheeff et al., 2009).

En el caso de la pseudoquinasa VRK3 (Figura 3), tiene sustituciones importantes en el *loop* G (GXGXFG), el *loop* catalítico, también llamado RD *pocket* (hRDxkxxN), y el motivo DYG (dominio de unión a magnesio). La función del *loop* G es la de situar al ATP de manera correcta, siendo las glicinas (G) esenciales en el proceso. En VRK3 estas glicinas han sido reemplazadas por aminoácidos de mayor tamaño. Además, también han sido reemplazados los dos aminoácidos valina (V) que preceden a una lisina en $\beta 3$ (VVK), por una serina y una leucina (SLK) (Nichols and Traktman, 2004b), y el aminoácido aspartato (D) del *loop* catalítico (responsable de orientar el grupo hidroxilo del sustrato), es sustituido por asparragina (N). Finalmente, el aspartato del motivo DYG, que es necesario para la transferencia del fosfato del ATP, ha sido sustituido por una glicina (GYG). Así, la sustitución de los aminoácidos clave para la correcta colocación del ATP, la orientación del sustrato y la transferencia del fosfato del ATP hacen que VRK3 carezca de actividad quinasa (Boudeau et al., 2006; Scheeff et al., 2009).

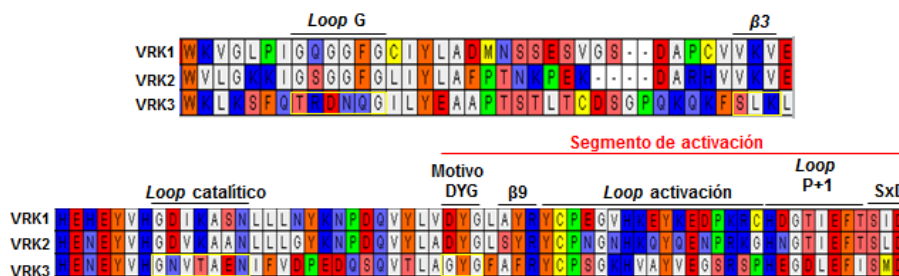


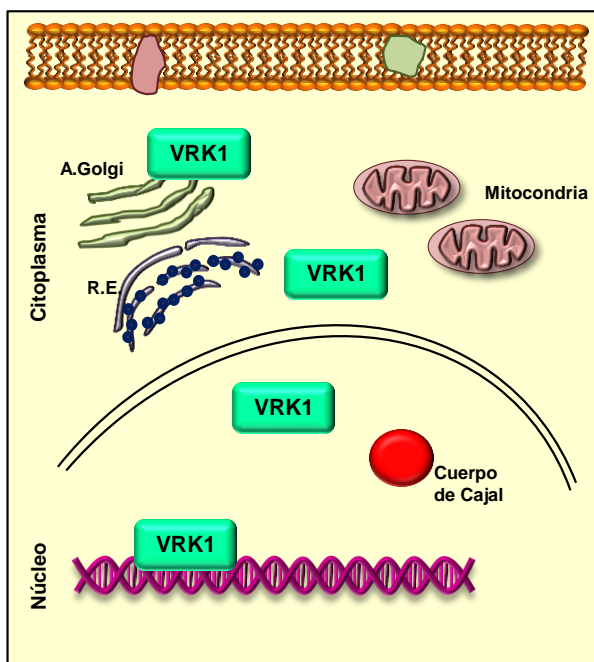
Figura 3: Alineamiento del sitio de unión al ATP y dominio quinasa de la familia VRK. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de las proteínas VRK1, VRK2 y VRK3, mediante el programa *Accelrys DS Gene 1.5*. Se destacan los motivos más importantes donde se localizan las mutaciones que hacen a VRK3 una quinasa inactiva.

1.3. La quinasa humana VRK1

VRK1 es la quinasa de la familia mejor caracterizada. Se expresa en todos los tejidos estudiados, aunque se detecta su ARN mensajero con mayor medida en tejidos con alta tasa proliferativa como el hígado, el timo, los testículos fetales y las líneas celulares tumorales. Debido a su señal de localización nuclear, esta quinasa se encuentra mayoritariamente en el núcleo, tanto libre en el nucleoplasma como asociada a la cromatina (Kang et al., 2007; Lopez-Borges and Lazo, 2000; Valbuena et al., 2007a; Vega et al., 2004); pudiendo ser secuestrada al nucléolo en determinadas circunstancias (Figura 4) (Andersen et al., 2005). Se ha estudiado cómo VRK1 está presente en complejos de la maquinaria de iniciación transcripcional, junto con factores de ensamblaje e histonas (Guermah et al., 2006). 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 (Lopez-Sanchez et al., 2009a; Valbuena et al., 2007a).

Figura 4: Localización subcelular de VRK1. La quinasa VRK1 se localiza en núcleo, tanto libre en nucleoplasma como asociada a la cromatina. Además, se encuentra una subpoblación libre en el citoplasma y 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. Más recientemente se ha situado a VRK1 como una quinasa esencial en la respuesta a daño en el ADN y en neurodegeneración. A continuación se detallan los procesos más importantes en los que VRK1 participa.

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

Desde su caracterización por Nezu y colaboradores, ya se postulaba a VRK1 como una quinasa importante en el control de la proliferación celular (Nezu et al., 1997). Así, en epitelios escamosos normales humanos, VRK1 se expresa cerca de la capa basal, donde se produce una mayor proliferación, y su expresión va disminuyendo conforme las células epiteliales se van diferenciando, correlacionándose con el marcador proliferativo Ki67 (Santos et al., 2006). En epitelios escamosos de faringe, VRK1 correlaciona con el marcador de proliferación y células madre p63 (Valbuena et al., 2008; Valbuena et al., 2011b). 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, Ki67 o Survivina; y negativamente con inhibidores del ciclo como p27 o p16 (Santos et al., 2006; Valbuena et al., 2007c).

Por otro lado, la supresión de VRK1 mediante un ARN de interferencia específico, produce una disminución en los niveles de Ciclina D1, Ciclina A, PCNA y otros marcadores de proliferación, provocando una parada de ciclo en G0/G1 (Valbuena et al., 2008; Valbuena et al., 2011b). De esta manera, se confirma que VRK1 es una quinasa indispensable para la correcta iniciación y progresión del ciclo celular, expresándose en mayor medida en tejidos con alta tasa proliferativa. Es por este motivo que la expresión de esta quinasa se encuentra alterada en algunos tipos tumorales. De este modo, 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 (Valbuena et al., 2007c). Se ha descrito también cómo VRK1 está sobreexpresada en sarcoma de tejidos blandos (Nishijo et al., 2009). A través de estudios de conformación de cromatina, se ha visto que existe interacción entre un lugar de unión de la proteína oncogénica causante del sarcoma, EWS-FLI1, y el promotor de VRK1; el silenciamiento de esta proteína con un ARN de interferencia produce una disminución en los niveles de VRK1, mientras que su sobreexpresión genera la sobre-regulación de la quinasa. Además, se ha visto en las líneas de sarcoma de Ewing, que el silenciamiento de VRK1 produce una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis respecto a las células control (Riggi et al., 2014). Finalmente, se ha descrito a VRK1 como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, de tal forma que tumores de mama con bajos niveles de VRK1 y bajos niveles de genes relacionados con mitosis podrían tener mejor pronóstico (Fournier et al., 2006). Paralelamente se ha visto como una alta expresión de 16 quinastas relacionadas con ciclo celular, entre ellas VRK1, correlaciona con mal pronóstico en este tipo de cáncer (Finetti et al., 2008).

1.3.2. Regulación de factores de transcripción por VRK1

Muchas de las proteínas fosforiladas por VRK1 son factores de transcripción (Figura 5). 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. Este factor de transcripción se degrada, a través de su unión a la ubiquitina ligasa Mdm2, por la vía del proteasoma y, por el contrario, se estabiliza al

unirse al cofactor p300. VRK1 fosforila a p53 en la treonina 18, residuo situado en la región de unión a Mdm2, evitando así su degradación y favoreciendo, además, la unión del cofactor p300. Así, VRK1 estabiliza a p53 evitando su degradación, y también mediante otros mecanismos como la acetilación de las lisinas 373 y 382 de p53, por parte de p300 (Barcia et al., 2002; Vega et al., 2004). Por otro lado, existe un *loop* de regulación entre VRK1 y p53 (Valbuena et al., 2006), ya que la activación de p53 induce la expresión de DRAM (*damage-regulated autophagy modulator*) promoviendo la degradación de VRK1 por la vía endocítica-lisosomal (Valbuena et al., 2011a). Finalmente, se ha visto que el complejo VRK1-p53 podría ser un buen marcador temprano en respuesta a daño en el ADN inducido por luz ultravioleta (Lopez-Sanchez et al., 2014).

Otros factores de transcripción fosforilados por VRK1 son ATF-2 (*activating transcription factor 2*) y c-Jun. VRK1 fosforila los residuos serina 62 y treonina 73 de ATF-2, induciendo su acumulación y activación transcripcional. Las quinasas PKA (*protein kinase A*) y CAMK-IV (quinasa dependiente de calmodulina IV) también fosforilan estos residuos (Sevilla et al., 2004b). En el caso de c-Jun, VRK1 fosforila las serinas 63 y 73, promoviendo su estabilización y activación. Estos mismos residuos son fosforilados por JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), sugiriéndose que pueda existir un efecto cooperativo entre ambas quinasas (Sevilla et al., 2004a). De hecho, ambos factores de transcripción se unen a sitios AP1 (*activator protein 1*) para regular la expresión génica.

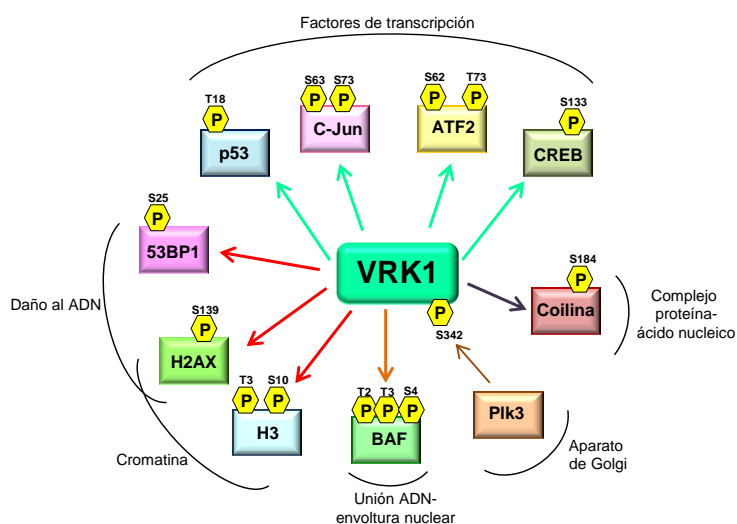


Figura 5: Esquema con las principales dianas de fosforilación de VRK1, detallando los residuos fosforilados en cada caso.

VRK1 fosforila también al factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding*) en la serina 133 e interacciona con él, activándolo (Kang et al., 2008a). 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, hecho necesario para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular. Finalmente, también el factor de transcripción Myc promueve la expresión de VRK1, induciendo la expresión de Ciclina D1 (Kang et al., 2008a).

1.3.3. Fosforilación de la histona H3 por VRK1 y su implicación en la condensación de la cromatina

Las histonas (H2A, H2B, H3, H4) sufren numerosas modificaciones postraduccionales, principalmente en sus extremos amino y carboxilo terminales. Las más importantes son la acetilación, la fosforilación, la metilación, la ubiquitinación y la sumoilación (Berger, 2007). Estas modificaciones controlan procesos celulares muy importantes como la transcripción o la condensación de la cromatina durante la mitosis.

VRK1 es una quinasa que se encuentra en la cromatina y fosforila *in vitro* e *in vivo* a la histona H3 en la serina 10 (cooperando con la quinasa Aurora B) y en la treonina 3 (residuo fosforilado también por la quinasa Haspin) (Kang et al., 2007; Salzano et al., 2015); relacionándose la fosforilación de la serina 10 con relajación de cromatina y expresión génica a la vez que en células mitóticas se asocia con condensación de cromatina (Figura 5) (Prigent and Dimitrov, 2003). Además, la expresión de una forma constitutivamente activa de VRK1 produce la condensación de la cromatina en células interfásicas. VRK1 también puede fosforilar, en menor medida, a las histonas H2A, H2B y H4. De este modo, VRK1 podría tener un papel esencial en la condensación de la cromatina durante la transición G2/M a través de la fosforilación de las histonas (Kang et al., 2007).

1.3.4. VRK1 en la dinámica de ensamblaje de la envoltura nuclear

Una de las características del núcleo es que durante la mitosis se desensambla y vuelve a reorganizarse para una correcta segregación de los cromosomas a las células nacientes. Así, al inicio de la mitosis, los cromosomas se condensan y la envoltura nuclear se desintegra, de tal forma que todo el contenido nuclear pasa a formar parte del citosol. Una vez los cromosomas han migrado a los polos opuestos, se vuelve a formar la envoltura nuclear dando lugar a dos células hijas idénticas. En todo este proceso intervienen varias proteínas, entre ellas BAF (*Barrier To*

Autointegration Factor), esencial en el mantenimiento de la arquitectura nuclear. BAF es una proteína de 10kDa que forma homodímeros capaces de unirse al ADN de forma independiente de secuencia, así como también a proteínas de la membrana interna nuclear que contienen dominios LEM (*lamin-interacting proteins*) (Haraguchi et al., 2001; Margalit et al., 2007; Nichols et al., 2006). La localización de BAF varía durante el ciclo celular. Durante la interfase, permanece en la membrana interna nuclear anclando así la cromatina a la envoltura nuclear. Una vez se inicia la mitosis, BAF adquiere una distribución difusa, permitiendo la condensación de la cromatina y el desensamblaje de la envoltura nuclear. Sin embargo, en anafase tardía y telofase, BAF colocaliza con los telómeros, reclutando a otras proteínas de la membrana nuclear, siendo en este punto de la mitosis esencial para su correcto ensamblaje (Haraguchi et al., 2001; Nichols et al., 2006).

VRK1 fosforila a la proteína BAF en su extremo amino terminal, en los residuos serina 4 y treoninas 2 y 3 (Figura 5). Se ha visto que estas fosforilaciones tienen un leve efecto en la unión de BAF a proteínas con motivos LEM, pero sí reducen de manera drástica su unión al ADN, afectando también a su localización subcelular (Nichols et al., 2006). De esta forma, la fosforilación de BAF por parte de la quinasa humana VRK1 permite la condensación de la cromatina y el desensamblaje de la envoltura nuclear, siendo una quinasa importante en la arquitectura nuclear. Recientemente se ha descrito a VRK1 como una quinasa importante también para la interacción de BAF con los cromosomas durante la mitosis (Molitor and Traktman, 2014).

1.3.5. VRK1 como mediadora de la fragmentación del aparato de Golgi

Los orgánulos citoplasmáticos tienen que distribuirse a las células hijas durante la mitosis, como es el caso del aparato de Golgi, el cual tiene que fragmentarse en pequeñas vesículas para ser redistribuido de igual manera a las dos nuevas células durante la fase G2/M. En este proceso tiene un papel fundamental la fosforilación reversible de proteínas y, concretamente en el caso del aparato de Golgi, es importante resaltar la participación de las quinasas MEK1 (*mitogen-activated protein kinase 1*) y Plk3 (*Polo-like kinase 3*) (Acharya et al., 1998; Ruan et al., 2004), las cuales promueven la correcta fragmentación de dicho orgánulo.

La quinasa VRK1 es fosforilada en la serina 342 por la quinasa Plk3 (Figura 5), interaccionando y colocalizando en el aparato de Golgi. El silenciamiento de VRK1 con un ARN de interferencia específico bloquea parcialmente la fragmentación del aparato de Golgi inducida tanto por MEK1 como por Plk3, mismo efecto que se

observa al sobreexpresar un mutante inactivo de VRK1 o el mutante no fosforilable en serina 342 (Lopez-Sanchez et al., 2009b). Estos datos sugieren que la quinasa humana VRK1 se sitúa al final de la ruta de señalización formada por MEK1-PIK3-VRK1, siendo necesaria para la correcta fragmentación del aparato de Golgi en la transición G2/M.

1.3.6. Implicación de VRK1 en la respuesta a daño en el ADN

Se ha descrito a VRK1 como una quinasa de activación temprana en respuesta a daño en el ADN por agentes exógenos como la luz ultravioleta (UV), la radiación ionizante o sustancias químicas utilizadas en quimioterapia como son el etopósido o la camptotecina. VRK1 forma un complejo estable con p53 en células sin daño, de tal forma que una vez se produce la rotura en el ADN por luz ultravioleta, VRK1 fosforila de forma inmediata a p53 en el residuo treonina 18. Esta acción precede a su posterior acumulación, indicando que este complejo basal formado por VRK1 y p53 es un participante muy temprano en la respuesta a roturas de doble cadena en el ADN (Lopez-Sanchez et al., 2014).

Además, se ha descrito a VRK1 como una quinasa esencial para la correcta formación de los focos de reparación de 53BP1 y de γ H2AX, en respuesta a roturas de doble cadena, situándola de nuevo como una quinasa de respuesta muy temprana en la ruta de señalización. Este efecto también se ha visto en células deficientes de ATM, postulándose así como una vía alternativa a dicha quinasa. Esto se confirma estudiando los focos de una proteína dependiente de ATM como es MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*), los cuales no se afectan al silenciar a VRK1 (Salzano et al., 2014; Sanz-Garcia et al., 2012). Se sabe además, que cuando se produce un daño en el ADN, la cromatina se relaja para poder reparar la rotura. Para esta relajación es necesaria la acetilación de algunas histonas. Un estudio reciente demuestra que el silenciamiento de VRK1 produce una pérdida de acetilación de las histonas H3 y H4, dato que vuelve a situar a esta quinasa como esencial en la respuesta a daño en el ADN (Salzano et al., 2015). Finalmente, se ha descrito que VRK1 confiere resistencia a agentes quimioterapéuticos en tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos, debido a la alta expresión de VRK1 en este tipo de tumores, dándose de este modo una peor prognosis (Salzano et al., 2014).

1.4. La quinasa humana VRK2

Existe menos información acerca de las funciones de la quinasa VRK2. Es, al igual que VRK1, una quinasa de expresión ubicua. Se expresa en mayor medida en

músculo esquelético, corazón, leucocitos de sangre periférica, páncreas y testículos, y, en menor medida, en riñón y cerebro (Nezu et al., 1997).

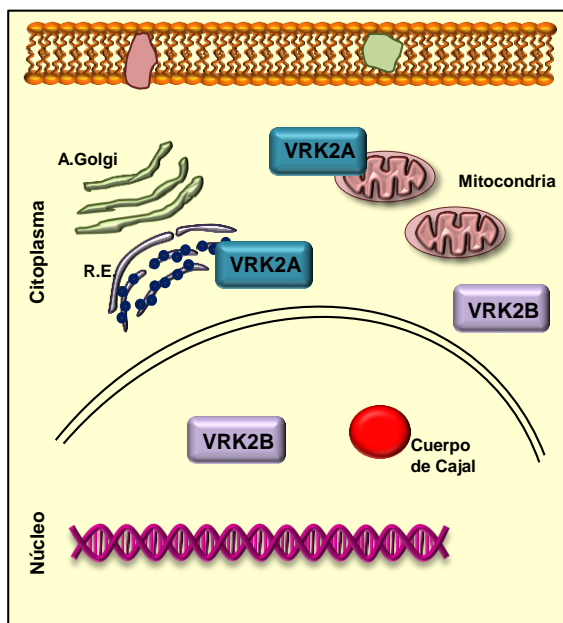


Figura 6: Localización subcelular de VRK2A y VRK2B. Mientras que VRK2A se encuentra anclada a membranas, VRK2B se localiza libre, predominantemente en el núcleo aunque, a veces, en el citosol.

Como se ha mencionado anteriormente, existen dos isoformas de VRK2 debido a un procesamiento alternativo del ARN mensajero (Blanco et al., 2006b). La isoforma VRK2A, debido a su región hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal, se encuentra anclada a membranas del retículo endoplasmático, mitocondrias y envoltura nuclear, mientras que la isoforma VRK2B, al carecer de dicha región, se localiza libre predominantemente en el núcleo (Figura 6) (Blanco et al., 2006b; Nichols and Traktman, 2004a).

Tanto VRK2A como VRK2B son serina/treonina quinasas con capacidad de autofosforilarse, y son capaces de fosforilar *in vitro* a sustratos como la caseína, las histonas H2B y H3, la proteína básica de mielina (MBP), el factor BAF o p53 (Figura 7) (Blanco et al., 2006b; Nichols and Traktman, 2004a; Sanz-Garcia et al., 2008).

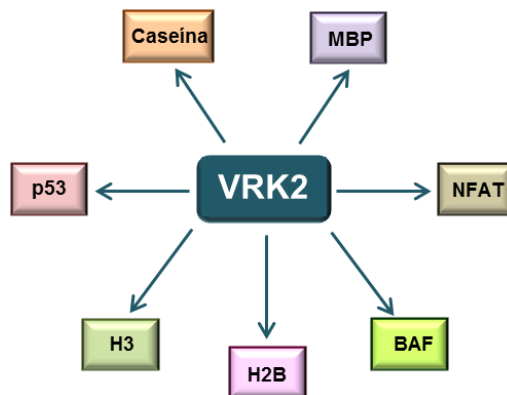


Figura 7: Esquema de los principales sustratos de la quinasa VRK2.

1.4.1. Implicación de VRK2 en la respuesta a estrés celular

Es la función mejor estudiada de VRK2. En respuesta a hipoxia, la proteína JNK se activa e induce la transcripción de genes con sitio AP1. En esta respuesta participa la proteína de andamiaje JIP-1 (*JNK-interacting protein*) y la quinasa TAK1 (*TGF- β activated kinase*), formándose un complejo oligomérico que incluye además a miembros de la familia de las MAPK como MKK7. VRK2A y VRK2B interaccionan con TAK1 y MKK7, inhibiendo la asociación de JNK al complejo y, por lo tanto, disminuyendo su actividad (Figura 8, izquierda) (Blanco et al., 2007). Además, se ha visto cómo VRK2A y VRK2B regulan negativamente la respuesta a interleuquina 1 β , la cual se transmite vía TAK1-JNK (Blanco et al., 2008).

1.4.2. VRK2 como modulador negativo de la ruta de señalización de Erk1/2

VRK2A actúa como modulador negativo de la ruta de señalización de Erk1/2 en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es una modulación independiente de su actividad quinasa, ya que se produce mediante su interacción con la proteína de anclaje KSR1 y MEK1 (Figura 8, derecha). De esta manera, VRK2A retiene a estas dos proteínas en complejos multiproteicos, inhibiendo la señalización mediada por Erk1/2 (Fernandez et al., 2010).

1.4.3. Regulación de NFAT y COX-2 por VRK2

Es la primera función descrita de VRK2 dependiente de su actividad quinasa. VRK2A y VRK2B fosforilan al factor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) en el residuo serina 32, tras la estimulación con PMA más ionomicina. Esta fosforilación hace que

aumente la transcripción del promotor de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), fenómeno que promueve la invasión tumoral. Así, se ha visto como el silenciamiento de la quinasa VRK2 con un ARN de interferencia específico reduce los niveles de ARN mensajero y proteicos de la ciclooxigenasa-2 y la invasión de células tumorales, sin afectar a los niveles de NFAT (Vazquez-Cedeira and Lazo, 2012).

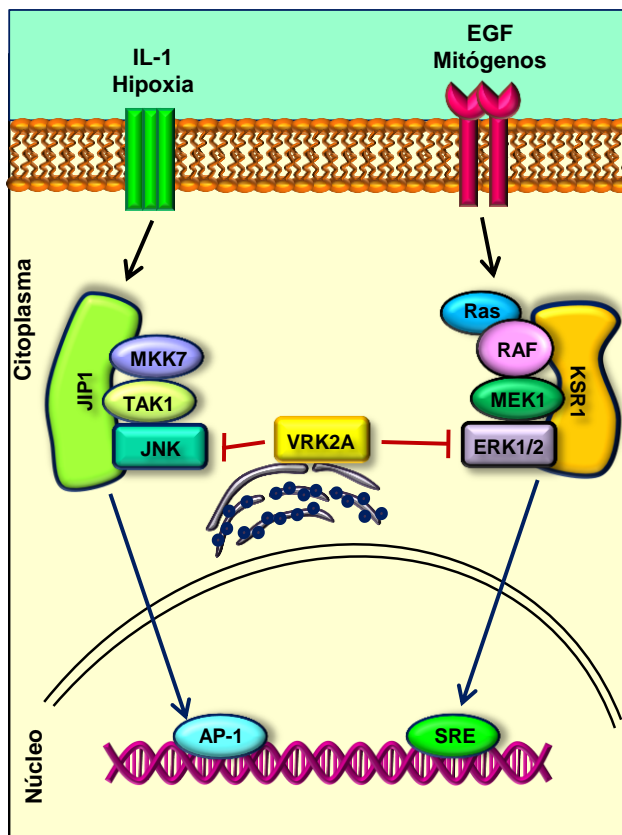


Figura 8: Funciones de la quinasa VRK2A en las rutas de señalización de MAPK. Se muestra el mecanismo de modulación en la respuesta a IL-1 e hipoxia (izquierda). VRK2A inhibe la activación transcripcional de AP-1 a través de JNK. A la derecha se muestra la modulación negativa de la ruta de Erk1/2 por VRK2A en respuesta a EFG o factores de crecimiento.

1.4.4. VRK2 y su implicación en apoptosis

Se ha demostrado que la quinasa VRK2A actúa de dos formas en la modulación de la respuesta celular de la apoptosis: la primera es a través de su interacción directa con la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, además de que puede formar un complejo con Bax, reduciendo así la apoptosis; y la segunda, es a través de la regulación transcripcional de Bax. Se ha visto que el silenciamiento de VRK2 aumenta la expresión del gen *BAX*, comportándose como un modulador negativo. Además, este silenciamiento de

VRK2 produce un aumento en la mitocondria de la proteína Bax, favoreciendo la liberación del citocromo c y la activación de caspasas, detectándose por el aumento en el clivaje de PARP. Así, la pérdida de VRK2A aumenta la muerte celular e incrementa la sensibilidad de las células a agentes quimioterapéuticos como la camptotecina o la doxorubicina. Se muestra así a VRK2 como un nuevo modulador de la apoptosis por vía intrínseca (Monsalve et al., 2013).

1.5. La pseudoquinasa VRK3

Como se ha mencionado anteriormente, VRK3 es una pseudoquinasa carente de actividad. Tiene una expresión ubicua en los tejidos estudiados, y se expresa en mayor medida en testículos, riñón e hígado. Debido a la señal de localización nuclear en su región amino terminal, se localiza principalmente en núcleo (Kang and Kim, 2008; Nichols and Traktman, 2004a; Vega et al., 2003). Se ha visto que puede actuar como proteína de andamiaje para la formación de complejos proteicos (Scheeff et al., 2009) o como un modulador negativo de la ruta de señalización de Erk1/2 (Kang and Kim, 2006).

1.6. Regulación de las quinasa VRK

A pesar de la gran cantidad de datos acerca de las funciones biológicas que desempeña la quinasa VRK1, poco se conoce sobre su regulación. Sin embargo, deben existir diferentes tipos de regulación que la lleven a realizar determinadas funciones en respuesta a diferentes estímulos.

A nivel transcripcional se sabe que la presencia de mitógenos y factores de crecimiento activan a VRK1, ya que en células privadas de suero los niveles de esta quinasa disminuyen y son recuperados al añadir suero de nuevo al medio de cultivo (Valbuena et al., 2008). También se ha descrito que los factores de transcripción E2F y Myc pueden activar la expresión de VRK1 a través de su unión al promotor (Kang et al., 2008a; Santos et al., 2006). Recientemente se ha descrito cómo el factor de transcripción aberrante EWS-FLI1, propio del sarcoma de Ewing, activa el promotor de VRK1, favoreciendo la supervivencia del tumor (Riggi et al., 2014).

La regulación postraduccional de proteínas también es muy importante para controlar tanto su localización como su actividad. Tanto VRK1 como VRK2 son quinasa con una alta actividad de autofosforilación (Lopez-Borges and Lazo, 2000), proceso que ayuda a la estabilidad de la proteína, siendo la quinasa inactiva mucho más inestable (Valbuena et al., 2008).

Además, se ha identificado la región carboxilo terminal de VRK1 como una región reguladora de la quinasa, debido al residuo de autofosforilación treonina 355 (Barcia et al., 2002). Este mismo residuo es fosforilado también por la quinasa PKC δ (Figura 9), la cual regula negativamente la actividad quinasa de VRK1 (Park et al., 2011). Así, se propone un modelo en el cual VRK1 fosforilaría a factores como CREB, la histona H3 o BAF en condiciones de proliferación, mientras que en respuesta a daño VRK1 sería fosforilada por la PKC δ , inhibiéndola, provocando la parada del ciclo celular y la apoptosis a través de p53 (Park et al., 2011).

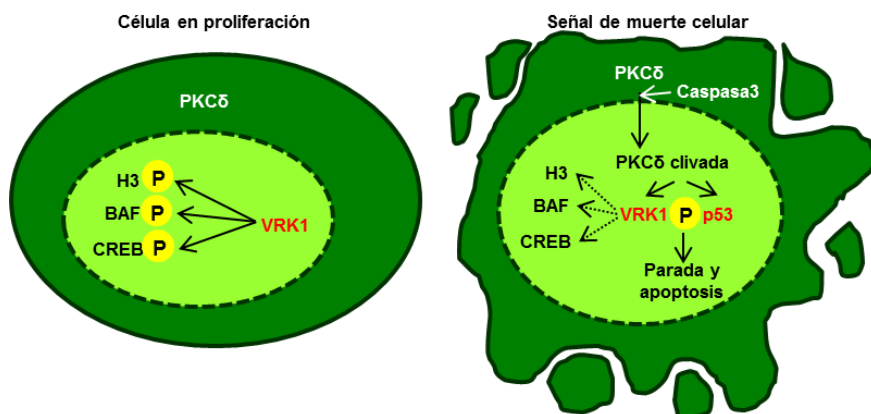


Figura 9: Esquema representativo de la inhibición de VRK1 por la PKC δ . Modificado de Park et al., 2011.

Además, se sabe que tras la exposición a radiación ionizante, luz UV o drogas como la doxorubicina o el etopósido, se incrementa la actividad de VRK1, asociándola a la respuesta a daño en el ADN (Sanz-García et al., 2012; Valbuena et al., 2011a).

La actividad de una quinasa también puede deberse a interacciones directas con otras proteínas. Mediante técnicas proteómicas se identificó la interacción entre VRK1, VRK2A y VRK2B con la GTPasa Ran (*Ras-related nuclear*). Las quinasas VRK son activas cuando están unidas a Ran-GTP, mientras que la unión a Ran-GDP las hace inactivas (Sanz-García et al., 2008). Como se ha mencionado anteriormente, VRK1 fosforila a la histona H3 durante la mitosis. En este proceso se ha descrito a la macroH2A1 como una proteína que, durante la interfase, interacciona con VRK1 impidiendo la fosforilación de la histona H3 y BAF (Kim et al., 2012b).

Finalmente, se ha estudiado también la posibilidad de inhibir a las quinasas VRK con algunos inhibidores específicos de otras quinasas o metales (Barcia-Sanjurjo et al., 2013). Tanto VRK1 como VRK2 son muy poco sensibles a los inhibidores de otras quinasas. Además, muestran un patrón de sensibilidad muy diferente entre ellas,

sugiriendo que podrían desarrollarse inhibidores específicos para cada miembro de la familia (Vazquez-Cedeira et al., 2011). Recientemente, se ha descrito la luteolina como un nuevo inhibidor de VRK1, que reduce la fosforilación de la histona H3 o BAF, regulando así el ciclo celular (Kim et al., 2014b).

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

Se han realizado estudios en ratones hipomórficos para VRK1, los cuales expresan solamente un 15% de la proteína respecto a ratones silvestres, debido a una inserción en el gen que la codifica. Estos ratones, tanto machos como hembras, son viables pero estériles. Esta esterilidad, en los machos, es debida a un defecto progresivo en la capacidad proliferativa de las células espermatogónicas, conduciendo a una ausencia total de mitosis y meiosis en el testículo adulto del ratón (Choi et al., 2010; Wiebe et al., 2010). En el caso de las hembras, se produce una esterilidad total y defectos en el desarrollo de los oocitos (Schober et al., 2011). Además, se han descrito alteraciones en la foliculogénesis en ovarios deficientes de VRK1 (Kim et al., 2012a). No se observaron defectos en otros tejidos, sugiriendo una menor importancia de VRK1 en otras partes del animal o una redundancia por parte de los otros miembros de la familia.

Anteriormente, se había estudiado el efecto de la alteración del gen murino de VRK2. Se compararon los ratones *gcd*, que presentan una mutación recesiva que altera los genes de *Vrk2* y *Pog* (genes que se transcriben en direcciones opuestas), con ratones *Pog*(-/-), y se observó que los ratones *Vrk2*(-/-)/*Pog*(-/-) presentaban una esterilidad más severa que los ratones *Pog*(-/-) (Lu and Bishop, 2003). Esto sugiere que al igual que VRK1, VRK2 puede estar desempeñando un papel importante durante la espermatogénesis.

1.8. Las quinasas VRK en neurodegeneración

VRK2 fue la primera quinasa de la familia asociada a patologías neurodegenerativas. Se ha descrito la asociación significativa del gen de *VRK2* al riesgo de sufrir esquizofrenia (Irish Schizophrenia Genomics and the Wellcome Trust Case Control, 2012; Steinberg et al., 2011); más concretamente una nueva variante en la región 2p15.1, situada a unas 50kb de *VRK2*. Esta variante, rs2312147, ha sido estudiada en distintas poblaciones donde se ha visto que está asociada a una correcta estructura cerebral y al volumen de materia blanca; existiendo una sobre-regulación del gen de *VRK2* en pacientes con esquizofrenia. (Li et al., 2012). Recientemente, se ha

realizado un estudio donde se ha visto que los pacientes con esta variante de *VRK2* muestran defectos en la conectividad de la materia blanca en distintas áreas cerebrales, confirmándose la asociación de *VRK2* con esta enfermedad neurodegenerativa (Sohn et al., 2014).

No solamente existen estudios donde se relaciona a la quinasa humana *VRK2* con esquizofrenia. Parece existir una asociación significativa de este gen con algunas modalidades de epilepsia, una enfermedad neurodegenerativa con alto componente hereditario (Consortium et al., 2012; Helbig and Lowenstein, 2013; International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Electronic address, 2014). Se ha descrito también, entre otras, una variante de *VRK2* asociada a trastorno bipolar (Kerner et al., 2013).

Una de las causas de muchas patologías neurodegenerativas consiste en la acumulación de agregados proteicos debidos a repeticiones de glutaminas (poliQ). Recientemente se ha demostrado que *VRK2*, a través de la regulación negativa de la chaperonina TRiC, favorece el agregado de un fragmento de la huntingtina, proteína causante de la enfermedad de Huntington (Kim et al., 2014a). Finalmente, se ha descrito a *VRK2* como un marcador de buen pronóstico en un subgrupo de astrocitomas, debido a una menor tasa de crecimiento celular (Rodríguez-Hernandez et al., 2013).

Este trabajo de tesis doctoral, sin embargo, se centrará en la asociación de la quinasa más conocida de la familia, la quinasa *VRK1*, a patologías neurodegenerativas. A modo de introducción, se sabe que las atrofas musculares espinales (SMAs, del inglés *Spinal muscular atrophies*) son un conjunto de trastornos genética y clínicamente heterogéneos que causan la degeneración y pérdida de las células del asta anterior de la médula espinal (neuronas motoras), provocando debilidad muscular y atrofia. En el 80-90% de los casos diagnosticados, se trata de una atrofia muscular espinal proximal causada por la alteración (ausencia o mutación) del gen de supervivencia de las motoneuronas *SMN1* (*survival motor neuron 1*), del cual se hablará más adelante en este trabajo. Existen, sin embargo, otros tipos de SMA no asociados al gen *SMN1*, los cuales manifiestan características adicionales como pueden ser dificultad respiratoria, artrogriposis (contracturas congénitas), fracturas óseas o hipoplasia pontocerebelosa, este último caso llamado atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelosa o hipoplasia pontocerebelosa de tipo 1 (SMA-PCH o PCH de tipo 1) (Peeters et al., 2014; Renbaum et al., 2009b; Wee et al., 2010).

La hipoplasia pontocerebelosa de tipo 1 (PCH1) se caracteriza por una disfunción motora central y periférica severa, que conlleva a la muerte en edad temprana debido a insuficiencia respiratoria. Adicionalmente, se presenta retraso psicomotor, microcefalia, hipotonía severa y debilidad muscular (Peeters et al., 2014). Hasta ahora, se han detectado dos mutaciones en homocigosis en *VRK1* como causantes de la PCH1: R358X y R133C (Najmabadi et al., 2011; Renbaum et al., 2009b). La mutación R358X se detectó a través del estudio de una familia consanguínea de judíos *Ashkenazi* en la cual había tres niños afectados por la enfermedad, que se manifestó con microcefalia, retraso en el desarrollo, atrofia muscular, leve retraso mental y ataxia, lo que, finalmente, derivó en debilidad muscular severa y muerte en edad temprana (9-11 años).

Esta mutación en *VRK1* consiste en una transición C>T, en homocigosis, en el nucleótido 4 del exón 12 del gen, generando un codón de terminación (Figura 10) (Renbaum et al., 2009b). Esta mutación se encuentra específicamente en la señal de localización nuclear, generándose de esta manera una proteína truncada exclusivamente citosólica (Sanz-Garcia et al., 2011a). La mutación R133C fue descubierta en un estudio reciente para detectar posibles genes implicados en trastornos cognitivos recesivos (Najmabadi et al., 2011; Peeters et al., 2014).

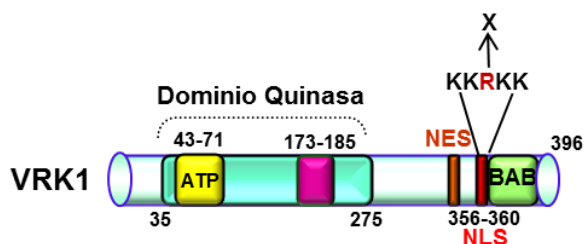


Figura 10: Esquema representativo de la quinasa *VRK1* (R358X). Se detalla la mutación que genera el codón de terminación en la señal de localización nuclear (NLS).

Además, en los últimos años, se han descrito dos nuevas mutaciones en *VRK1*, expresadas como heterocigotas compuestas, que causan neuropatía sensoriomotora hereditaria (HMSN) con microcefalia: R89Q y V236M; situadas en el dominio quinasa de la proteína (Eggens et al., 2014; Gonzaga-Jauregui et al., 2013; Peeters et al., 2014). En este mismo estudio se detectó en un paciente no perteneciente a la etnia *Ashkenazi*, la mutación R358X, asociada anteriormente a PCH1, revelándose a través de estudios de haplotipo un efecto fundador (Gonzaga-Jauregui et al., 2013). En estos pacientes, los cuales compartían características con los casos anteriores (microcefalia, atrofia muscular y neuropatía), no se manifestaba hipoplasia

pontocerebelosa y tenían una función cognitiva normal, mostrándose así la heterogeneidad de la patología (Figura 11).

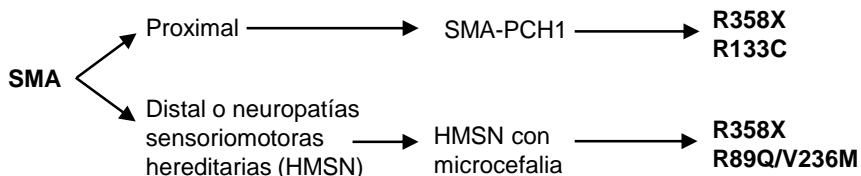


Figura 11: Esquema de las mutaciones en VRK1 causantes de atrofas musculares espinales.

Muy recientemente, se ha publicado un artículo en el que se ha estudiado más a fondo el papel de VRK1 en la hipoplasia pontocerebelosa de tipo 1 a través de un paciente con la mutación R358X (Vinograd-Byk et al., 2015). Se ha visto que VRK1 juega un papel esencial tanto en la proliferación de los precursores neuronales como en la migración neuronal. Además, la falta de VRK1 en estos pacientes produce la *down*-regulación de la proteína precursora amiloide (APP: *amyloid-precursor protein*), un gen muy importante involucrado en migración neuronal. Se sugiere así que VRK1 afecta a la migración neuronal a través de un mecanismo APP-dependiente (Vinograd-Byk et al., 2015).

Finalmente, y como tema principal de este trabajo, está descrito que la quinasa humana VRK1 fosforila a la proteína de ensamblaje de los cuerpos de Cajal (CBs), la coilina (Sanz-Garcia et al., 2011a). Esta fosforilación se produce, al menos, en el residuo serina 184. Además, ambas proteínas interaccionan y colocalizan en el núcleo. Por lo tanto, con todos estos datos, se postula a VRK1 como una quinasa importante en procesos de neurodegeneración que debe ser estudiada más a fondo.

2. Los cuerpos de Cajal

Los cuerpos de Cajal (CBs: *Cajal bodies*) fueron descritos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal en 1903 (Figura 12) quien los denominó como cuerpos accesorios del nucléolo debido a su frecuente asociación con éste en células neuronales (Cioce and Lamond, 2005).

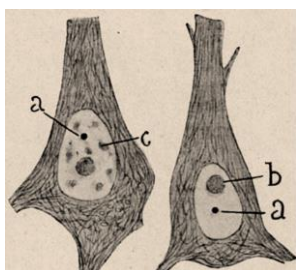


Figura 12: Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal, 1903. a: Cuerpo de Cajal, b: nucléolo; c: *speckles*

Los cuerpos de Cajal son orgánulos nucleares que varían en tamaño (0,2 - 2 μ m) y número (1-6) dependiendo del tipo celular o de la especie (existen en insectos, levaduras, anfibios, plantas y mamíferos), y se encuentran en células con una alta tasa de proliferación o transcripcionalmente muy activas, estando casi ausentes o siendo de menor tamaño en células quiescentes o en parada de ciclo por falta de suero en el medio de cultivo (Andrade et al., 1993; Tucker et al., 2001). De hecho, la inhibición de la transcripción con actinomicina D o α -amanitina desorganiza los CBs (Carmo-Fonseca et al., 1992). Además, se ha visto que son capaces de moverse durante la interfase a una velocidad de 1 μ m/min (Platani et al., 2000).

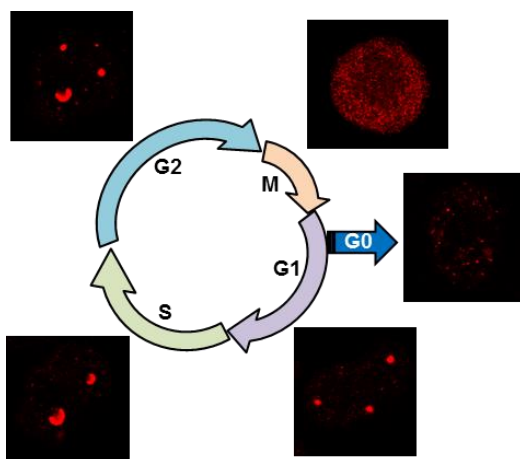


Figura 13: Esquema de los cuerpos de Cajal durante las distintas fases del ciclo celular.

Tanto el tamaño como el número de los CBs varían durante el ciclo celular (Figura 13), de tal forma que su mayor número lo encontramos a mitad de G1 y su mayor

tamaño se alcanza en fase S y G2 (se cree que estos CBs pudieran ser la fusión de los de G1), mientras que en mitosis se desensamblan y no vuelven a formarse hasta mitad de la fase G1 o G1 tardía (Andrade et al., 1993). Todos estos datos presentan al cuerpo de Cajal como una estructura dinámica a lo largo del ciclo celular.

2.1. Funciones de los cuerpos de Cajal

No hay un criterio particular, tanto morfológico como bioquímico, que defina a qué llamamos cuerpo de Cajal. Esto es debido, en parte, a que todos sus componentes, incluso los que se concentran dentro de él, también se encuentran libres en el nucleoplasma. Este dato sugiere que seguramente la función principal de los cuerpos de Cajal sea aumentar la eficiencia de procesos que ocurrirían a menor velocidad en el nucleoplasma. Así, los CBs representan un conjunto heterogéneo de estructuras que pueden diferir en su composición molecular y en sus posibles funciones biológicas (Cioce and Lamond, 2005; Gall, 2000).

Una de las funciones mejor caracterizadas de los cuerpos de Cajal es la biogénesis de ribonucleoproteínas (RNPs), concretamente aquellas asociadas a procesos de *splicing*, al procesamiento de ARNm de histonas y a la formación de los telómeros (Machyna et al., 2013). Los CBs son un lugar donde poder realizar estas funciones de manera muy eficiente, sobre todo en células con grandes requerimientos transcripcionales como las neuronas o las células tumorales. A pesar de que en los cuerpos de Cajal se maduren y acumulen estas RNPs, que son esenciales en el proceso de *splicing* de pre-ARNm, la ausencia de otros factores importantes en este proceso, como los ARN poli A, sugieren que el *splicing* no tiene lugar dentro del cuerpo de Cajal (Tucker et al., 2001). De hecho, componentes de las tres vías principales de procesamiento de ARN (ARNr, ARNm y ARNm de histonas), se encuentran en los CBs, postulándose un posible papel de éstos en el ensamblaje de complejos de transcripción y su localización a sus lugares de acción (Gall, 2000). Además, los CBs también participan en la maduración de RNPs nucleolares (RNPsno), las cuales una vez activas irán al nucléolo para procesar pre-ARNr (Machyna et al., 2013). Se postula además que el CB podría estar implicado también en el procesamiento de los ARNsn nacientes debido a la asociación de los CBs con algunos loci génicos de U ARNsn (Fernandez et al., 2002; Frey and Matera, 2001; Gall, 2001).

Actualmente está ganando importancia la relación entre CBs y telómeros. La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteínas que permite el alargamiento de los

telómeros en las células progenitoras de tejidos y células cancerosas. Está compuesta por tres subunidades principales: la transcriptasa reversa, el componente de ARN (TERC o hTR), y la disquerina. Por un lado, está descrito que hTR se acumula en los CBs y, por otro lado, se ha identificado una proteína, TCAB1 (*telomerase Cajal body protein 1*), notablemente enriquecida en los cuerpos de Cajal y asociada con la telomerasa activa y con los pequeños ARN del CB (ARNsca). El silenciamiento de TCAB1 impide la asociación de hTR con los cuerpos de Cajal, inhibiendo la unión telomerasa-telómeros, evitando así la síntesis de los mismos (Broome and Hebert, 2013; Chen et al., 2015; Stern et al., 2012; Yuan et al., 2014; Zhu et al., 2004). De este modo se piensa que los cuerpos de Cajal estarían facilitando el reclutamiento de la telomerasa a los telómeros en la fase S del ciclo celular.

Finalmente, otra de las funciones asociada a los cuerpos de Cajal es la regulación de la respuesta a estrés celular o daño en el ADN (Cioce et al., 2006; Gilder et al., 2011; Palanca et al., 2014; Velma et al., 2012). Así, una infección viral, la luz UV, la irradiación o el tratamiento con etopósido o cisplatino, produce la desintegración de los CBs por distintas vías (Cioce et al., 2006; Gilder et al., 2011; Hebert, 2010; Velma et al., 2012; Velma et al., 2010).

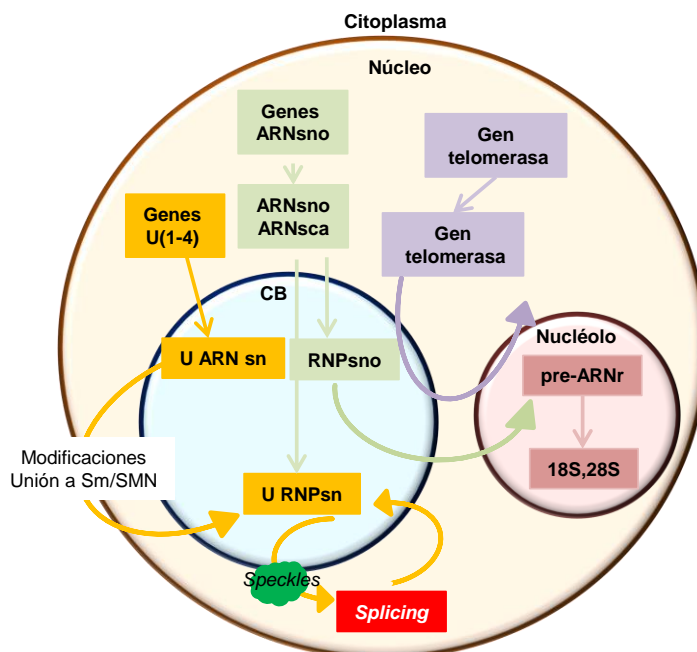


Figura 14: Esquema con algunas de las funciones descritas de los cuerpos de Cajal. Modificado de Machyna et al., 2013.

2.2. Componentes de los cuerpos de Cajal

Debido a la gran variedad de procesos que se realizan en este compartimento nuclear, podemos encontrar múltiples componentes que no siempre son exclusivos del CB; de hecho, algunos de ellos están presentes en otros cuerpos nucleares (Figura 15). Así, comparte elementos con los PMLs (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*) como la ubiquitina E3-ligasa PIASy o SUMO-1; con las *gems* o geminas; el complejo SMN, con los HLBs (*histone locus bodies*) las proteínas FLASH o NPAT o con el nucléolo, la Fibrilarina o Nopp140. Además, dentro del cuerpo de Cajal, encontramos quinasas como la Cdk2/ciclinaE, el factor de crecimiento FGF-2, el componente de ARN de la telomerasa hTR, ribonucleoproteínas (RNPs) y ARN específicos del CB (ARNsca), y su proteína marcadora, la coilina.

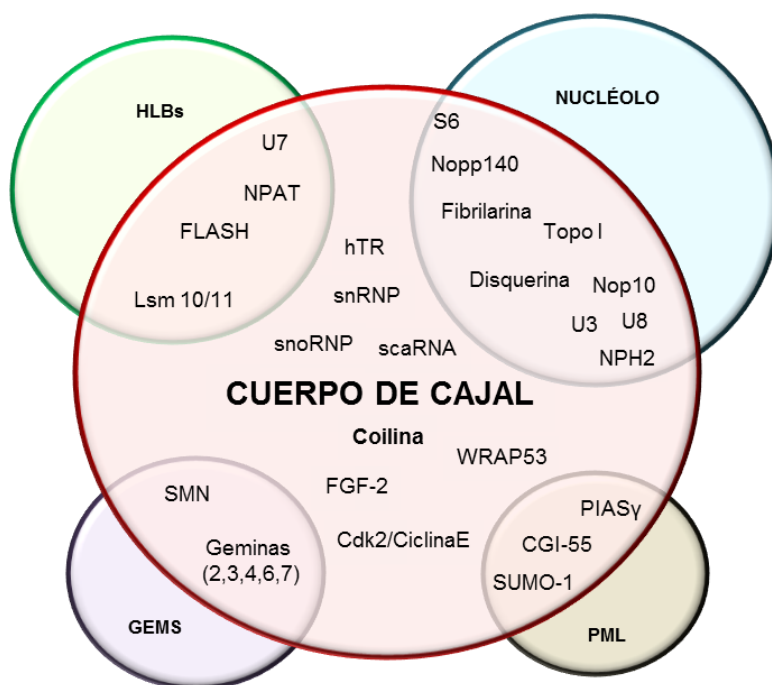


Figura 15: Representación de los principales componentes de los cuerpos de Cajal, algunos de ellos compartidos con otros cuerpos nucleares tales como las Geminas, los PMLs, los HLBs o el nucléolo.

2.2.1. p80-Coilina

La coilina es la proteína marcadora y de ensamblaje de los cuerpos de Cajal, donde actúa como proteína estructural o de andamiaje de todos los factores que son reclutados para desarrollar las diferentes funciones de este compartimento nuclear.

Sin embargo, solo un 30% de la coilina se encuentra dentro de estos cuerpos de Cajal, mientras que el 70% restante está libre en el nucleoplasma donde su función es desconocida (Whittom et al., 2008b). Fue identificada a partir del estudio de sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerodermia o el lupus eritematoso. Estos sueros reaccionaban contra un antígeno de 80kDa que marcaba específicamente los cuerpos de Cajal por inmunofluorescencia y al que se denominó p80-coilina (Andrade et al., 1991; Andrade et al., 1993). El gen que codifica para la coilina se localiza en el cromosoma 17, en la región q22.

2.2.1.1. Estructura de la coilina

La coilina es una fosfoproteína de 576 aminoácidos y tiene un peso molecular real de 62,6kDa (medido a través del programa *PEPTIDESORT*) (Chan et al., 1994); sin embargo, se le asigna un peso molecular de 80kDa debido a que en los geles de electroforesis se detecta a esta altura. Esto es debido a que tiene una lenta migración asociada a múltiples regiones con carga positiva en su secuencia (Chan et al., 1994).

En su región amino terminal, contiene un dominio de auto-interacción (aminoácidos 1-94) necesario para su oligomerización, acción esencial para la formación de los cuerpos de Cajal (Hebert and Matera, 2000b). De hecho, el desensamblaje de los CBs durante la mitosis se debe a una reducción de su oligomerización por hiperfosforilación de la coilina (Hebert and Matera, 2000b). Esta proteína contiene dos señales de localización nuclear (NLS), una situada en los aminoácidos 107-112, y otra entre los residuos 181-198 (Bohmann et al., 1995; Chan et al., 1994). Entre estas dos NLS se encuentra una señal de localización nucleolar (NoLS) (residuos 160-168) la cual en condiciones fisiológicas se encuentra encriptada (Hebert and Matera, 2000b). En la coilina se encuentran también dos regiones ricas en serinas (aminoácidos 242-259 y 312-325) (Dundr et al., 2004), una región rica en argininas y glicinas llamada caja RG (aminoácidos 392-420) y, finalmente, en su extremo carboxilo terminal, un dominio Tudor atípico debido a la presencia de *loops* desestructurados (residuos 460-559) (Figura 16) (Shanbhag et al., 2010).

Esta región carboxilo terminal de la coilina ha sido identificada como la región reguladora del número de cuerpos de Cajal en la célula. A través de estudios de proteínas quiméricas han sido identificados los últimos 96 aminoácidos de la coilina como los responsables de la *down*-regulación de la formación de CBs y, más concretamente, la fosforilación en las serinas 567 y 568. Además, se piensa que esta región es la encargada de regular al extremo amino terminal de la coilina ya que, *in*

vivo, esta región C-terminal enmascara la región de auto-interacción (Shpargel et al., 2003).

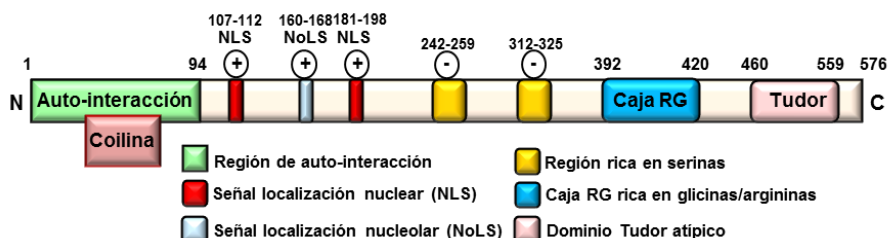


Figura 16: Esquema de la coilina donde se detallan sus dominios más importantes.

2.2.1.2. Modificaciones postraduccionales de la coilina

Las proteínas sufren diferentes modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación, la metilación, la ubiquitinación o la sumoilación, que suelen ser reversibles y no excluyentes. A través de estas modificaciones se generan nuevas interacciones que podrán dar lugar a múltiples funciones en la célula (Hebert et al., 2002b; Ubersax and Ferrell, 2007).

2.2.1.2.1. Metilación de la coilina

Dentro de una cadena polipeptídica, los nitrógenos de las argininas pueden ser modificados postraduccionalmente a través de la adición de grupos metilo, proceso conocido como metilación de argininas. Esta metilación de argininas puede ser de tres tipos: monometilación (MMA: *monomethylation*), dimetilación asimétrica (aDMA: *asymmetric dimethylation*) o dimetilación simétrica (sDMA: *symmetric dimethylation*) (Figura 17) (Bedford and Richard, 2005; Gary and Clarke, 1998). Las enzimas responsables de catalizar estas reacciones reciben el nombre de metiltransferasas de argininas o PRMTs (*protein arginine methyltransferases*). Se conocen 10 miembros que se clasifican en tipo I, tipo II o tipo III, según el tipo de metilaciones que producen. Son enzimas de expresión ubicua de las que no se conoce mucho acerca de su regulación, aunque se ha visto que ratones *knock-out* para PRMT1 o PRMT5 son inviábiles (Bedford, 2007; Bedford and Richard, 2005; Yang and Bedford, 2013).

Proteínas con dominios ricos en argininas y glicinas, como en el caso de la coilina, son muy a menudo sustratos de las PRMTs. Así, se ha visto que la coilina sufre una dimetilación simétrica de argininas en su caja RG, a través de la PRMT5 (Hebert et al., 2002b). Esta metilación es importante para su interacción con el dominio Tudor de SMN, proteína que se acumula en los cuerpos de Cajal y cuyo gen está mutado en el

95% de las atrofas musculares espinales. De este modo, la inhibición de la metilación de la coilina provoca una disminución de la interacción con SMN, el cual pasa a acumularse en otros compartimentos nucleares llamados *Gems* o Geminas, confirmándose de esta manera que la metilación de argininas afecta a la organización nuclear (Chen et al., 2011; Hebert et al., 2002b). Además, se ha visto que la reducción en la metilación de la coilina provoca la desintegración de los cuerpos de Cajal y la posterior redistribución de la coilina al nucleoplasma (formando microfocos) y al nucléolo. Esta coilina intranucleolar no está metilada y no está asociada a SMN ni a RNPs (Tapia et al., 2010). Estos datos sugieren que existe una dinámica entre CBs – nucleoplasma – nucléolo donde la metilación juega un papel fundamental.

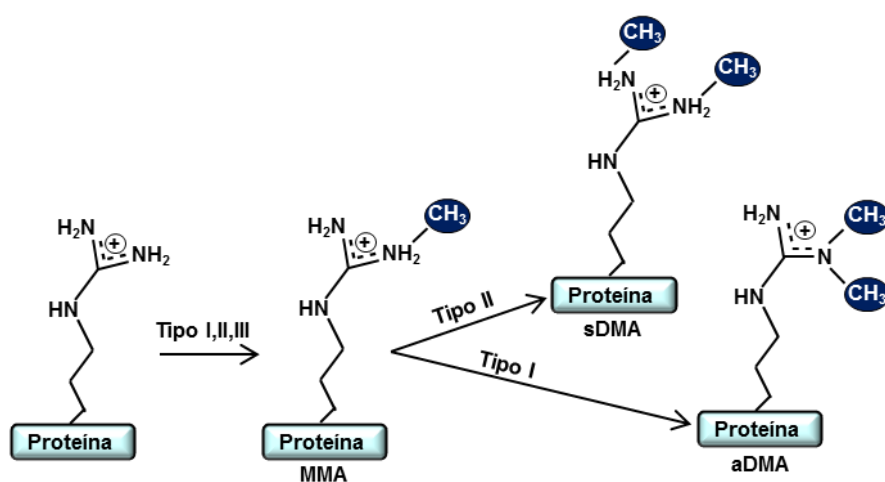


Figura 17: Esquema representativo de la metilación de argininas. Modificado de Yang et al., 2013.

2.2.1.2.2. Fosforilación de la coilina

La fosforilación de la coilina es la modificación postraduccional mejor estudiada y caracterizada. Se han descrito al menos 17 residuos de fosforilación en esta proteína (Figura 18) (Beausoleil et al., 2004; Dephoure et al., 2008; Hebert and Matera, 2000b; Lyon et al., 1997; Nousiainen et al., 2006; Olsen et al., 2006; Toyota et al., 2010).

La fosforilación de la coilina tiene múltiples efectos, desde la correcta formación de los cuerpos de Cajal hasta diferencias en la proliferación celular. Como se mencionó anteriormente, se sabe que la hiperfosforilación de la coilina durante la mitosis impide su oligomerización, produciendo el desensamblaje de los cuerpos de Cajal durante esta fase del ciclo celular (Carmo-Fonseca et al., 1993; Hebert and Matera, 2000b).

Sin embargo, los niveles de proteína total se mantienen constantes a lo largo del ciclo, confirmando así como la fosforilación de la coilina tiene un papel fundamental en la formación de los CBs (Andrade et al., 1993; Hearst et al., 2009b).

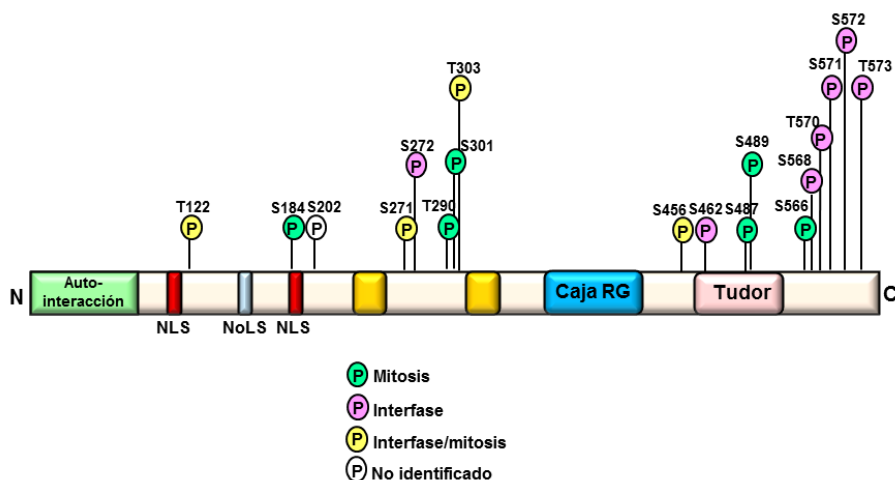


Figura 18: Residuos de fosforilación identificados en la coilina. Se distingue entre residuos fosforilados durante la mitosis (verde), en la interfase (rosa) o en ambas (amarillo); así como aquellos no identificados aún (blanco). Modificado de Toyota et al., 2010.

La sobreexpresión de la proteína SmB (*small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B*), la cual forma parte del proceso de formación del espliceosoma, induce la formación de cuerpos de Cajal en células que carecen normalmente de ellos. Este efecto se cree que es debido al aumento de la demanda en la maquinaria de biogénesis de ribonucleoproteínas, las cuales se modifican dentro del CB. Para esta formación de nuevos CBs, la fosforilación de la coilina debe ser modificada, de tal forma que se postula a la coilina como diana de alguna cascada de fosforilación aún desconocida que responda a un aumento en la demanda de procesos de *splicing* (Sleeman et al., 2001). Se sabe, además, que la coilina interactúa directamente con SmB, y que esta interacción compite con la unión del complejo SMN, el cual se describirá detalladamente más adelante en este trabajo. Así, se ha visto que SMN se une preferencialmente a la coilina desfosforilada, mientras que SmB se une a la coilina fosforilada (Figura 19), confirmándose nuevamente que el estado de fosforilación de la coilina tiene consecuencias a nivel de interacción con otras proteínas (Toyota et al., 2010).

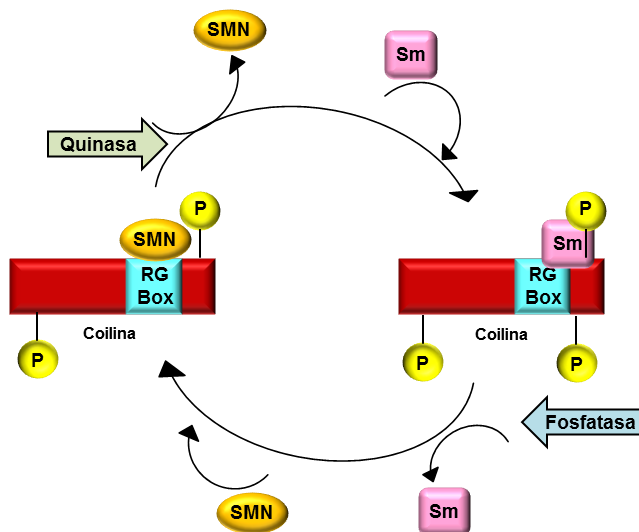


Figura 19: Representación de la unión de Sm y el complejo SMN con la coilina. Adaptado de Hebert 2010.

En esta interacción entre coilina y SMN juega un papel esencial la fosfatasa PPM1G (*Protein phosphatase 1G*), única fosfatasa conocida que modifica directamente a la coilina. El silenciamiento de PPM1G provoca la salida de SMN de los cuerpos de Cajal (disminuyendo la interacción con la coilina) los cuales se desensamblan (Hearst et al., 2009b). Así, la población de SMN nuclear se mantiene hipofosforilada respecto a la del citoplasma.

El hecho de que la fosforilación de la coilina juegue un papel esencial en diferentes procesos y afecte al correcto ensamblaje de los cuerpos de Cajal, hace que descifrar las quinastas que actúen sobre esta proteína sea fundamental. Hasta el momento, sólo se han descrito tres quinastas que tienen la capacidad de fosforilar a la coilina *in vitro*. En el año 2000, se describió cómo la caseína quinasa II (CKII) y la Cdk2/ciclina E fosforilaban a la coilina (Hebert and Matera, 2000b; Liu et al., 2000). Este complejo Cdk2/ciclina E se acumula en los cuerpos de Cajal durante la transición G1/S y la fase S temprana, siendo la translocación de Cdk2 al cuerpo de Cajal dependiente de la ciclina E (Liu et al., 2000). En este trabajo de Liu y colaboradores, se hipotetiza que el reclutamiento del complejo Cdk2/ciclina E pueda tener un papel esencial en el procesamiento de ARNm de histonas, debido a que los cuerpos de Cajal se encuentran muy próximos a los HLBS, los cuales acumulan al sustrato de la Cdk2 NPAT (*Nuclear Protein Of The Ataxia Telangiectasia Mutated Locus*), responsable de la activación de la transcripción de histonas y del correcto progreso a la fase S del ciclo celular (Liu et al., 2000; Nizami et al., 2010). Más recientemente, en nuestro

laboratorio, se identificó la fosforilación de la coilina por la quinasa humana VRK1, a través de un *array* peptídico con más de 1080 secuencias (Sanz-Garcia et al., 2011a). Se detectó la serina 184 como diana de VRK1, generándose una secuencia consenso de fosforilación de carácter básico (EAKRKSPKKKE) para las VRKs.

2.2.1.2.3. Ubiquitinación de la coilina

La ubiquitinación es una modificación covalente reversible que consiste en la unión de una o más ubiquitininas a la proteína diana. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada en eucariotas. El sistema de ubiquitinación fue descrito por el Dr. Ciechanover, logrando el premio Nobel. En un principio, se describió a la ubiquitinación como una marca para la degradación de proteínas en el proteasoma. Sin embargo, hoy en día se sabe que tiene muchas otras funciones, entre ellas, su participación en la regulación de diferentes vías de señalización involucradas en apoptosis, autofagia, ciclo celular o daño al ADN (Dikic et al., 2009; Hershko and Ciechanover, 1998).

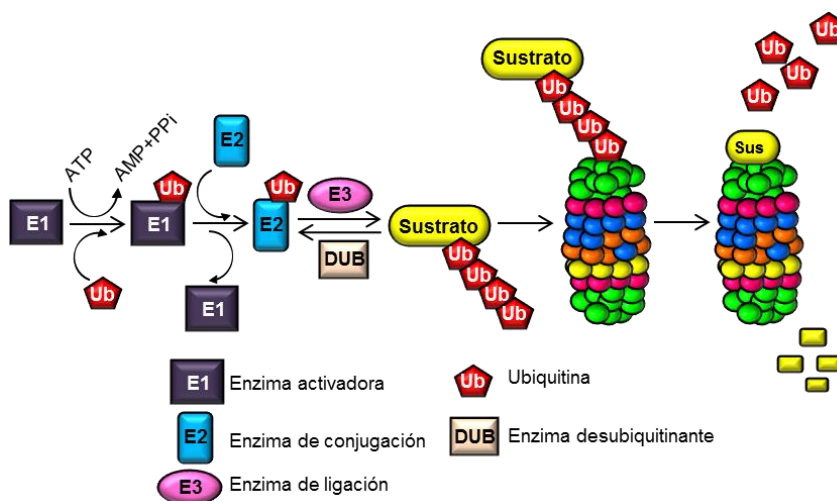


Figura 20: Esquema del proceso de ubiquitinación donde se detallan los tres pasos más importantes llevados a cabo por las enzimas E1, E2 y E3. Adaptado de Eldridge et. al., 2010.

El sistema de ubiquitinación está formado por 3 enzimas: enzima de activación o E1, enzima de conjugación o E2 y enzima de ligación o E3. En esta reacción, la glicina de la región carboxilo terminal de la ubiquitina forma un enlace amida con el nitrógeno de una lisina de la proteína diana. El ciclo completo de ubiquitinación genera un sustrato monoubiquitinado. Sin embargo, el proceso se puede repetir para obtener cadenas de ubiquitininas. Este proceso además es reversible, ya que existen en la célula alrededor de 85 enzimas desubiquitinantes (DUB) (Figura 20) (Komander, 2009).

Existen 7 residuos de lisina en la ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) que permiten la formación de cadenas de varios tipos. De esta manera, las proteínas sustrato pueden modificarse de diferentes formas: monoubiquitinación, múltiple monoubiquitinación, y cadenas de ubiquitinas las cuales pueden diferir en longitud o en unión. Dependiendo de las lisinas que formen parte en la cadena, el destino de la proteína ubiquitinada será diferente (Figura 21). Así, como ejemplo, la cadena formada por la lisina 48, marca para la degradación en el proteasoma, mientras que la formada por unión de lisina 63 participa en cambios de localización y en respuesta a daño en el ADN (Pickart and Eddins, 2004).

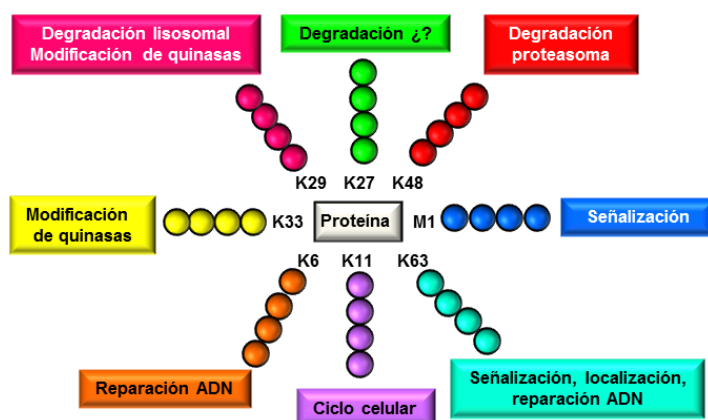


Figura 21: Representación de las diferentes cadenas de ubiquitina que se pueden formar en una proteína, y sus múltiples destinos, dependiendo de la lisina utilizada.

Poco se conoce acerca de la ubiquitinación de la coilina. Actualmente solo se han descrito dos residuos de ubiquitinación en esta proteína (K473 y K493) que han sido identificados por técnicas proteómicas, sin existir todavía ensayos *in vitro* o *in vivo* (Kim et al., 2011).

2.2.1.2.4. Sumoilación de la coilina

La sumoilación es otra de las modificaciones postraduccionales que más recientemente está siendo estudiada en la coilina. A modo de introducción, la sumoilación es la unión covalente de la proteína SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) a una lisina de una proteína diana. Esta modificación puede tener varias consecuencias, desde la pérdida de interacción con otras proteínas, hasta un cambio de localización subcelular (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Navascues et al., 2008; Sun et al., 2005). Existen actualmente 4 miembros de SUMO (SUMO 1 - SUMO 4), siendo el proceso de sumoilación muy similar al de ubiquitinación, en el cual se

requiere de enzimas de activación, de conjugación y de ligación. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo se regula todo este proceso debido a la poca información de muchos de sus componentes; por ejemplo, solo se conoce una enzima de conjugación de SUMO, llamada Ubc9 (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

Dentro de las enzimas de ligación, las cuales están mejor descritas, se encuentra PIASy. Es una SUMO E3 ligasa que se concentra en los cuerpos nucleares PML (*promyelocytic leukemia bodies*), los cuales tienen, entre otras funciones, regular procesos de transcripción. Se piensa que cuando un factor de transcripción se sumoila, queda retenido en estos PML para ser reprimido transcripcionalmente (Sun et al., 2005). Hace unos años se vio que la coilina y PIASy interactuaban, generando una asociación entre estos dos cuerpos nucleares (Sun et al., 2005). Años más tarde, se observó en neuronas no diferenciadas una subpoblación de cuerpos de Cajal que contenían SUMO-1 y la enzima de conjugación Ubc9 (Navascues et al., 2008). Además, se vio que en tejido nervioso adulto SUMO-1 se localizaba transitoriamente en CBs cuando se sometían las células a estrés, sugiriendo un posible papel de la sumoilación de la coilina en respuesta a estrés durante la diferenciación neuronal (Navascues et al., 2008).

2.2.1.3. Ratones *knock-out* de coilina

En el año 2001, Tucker y colaboradores crearon el primer ratón *knock-out* de coilina, con una delección del 85% de la secuencia codificante para la proteína. Los ratones homocigotos para la mutación son viables y fértiles, pero presentan una reducción de su viabilidad (Tucker et al., 2001). Tanto los ratones *knock-out* como los fibroblastos embrionarios derivados de éstos, carecen de cuerpos de Cajal, pero contienen unas estructuras similares en tamaño y componentes a las que se ha denominado como cuerpos de Cajal “residuales”, que contienen fibrilarina o Nopp140, pero no reclutan Sm, RNPs o al complejo SMN (Bauer and Gall, 1997; Tucker et al., 2001). Curiosamente, si se sobreexpresa coilina exógena, estos cuerpos residuales desaparecen y se forman nuevos cuerpos de Cajal (Tucker et al., 2001; Walker et al., 2009).

En el año 2009, Walker y colaboradores, realizaron más estudios para determinar el fenotipo de los ratones *coilina*^{-/-}, debido a que en los estudios previos solo se habían analizado los ratones durante una generación, y querían evitar las posibles influencias de los fondos genéticos, de tal forma que se estudiaron hasta 10 generaciones, siempre seleccionando la delección en el gen de la coilina. Se confirmó que la

mutación en homocigosis es semi-lethal, el número de ratones homocigotos era mucho menor que el de heterocigotos o los control (Walker et al., 2009). Además, las hembras homocigotas tenían un menor número de crías por camada, confirmando los efectos de la pérdida de la coilina en la fecundidad de los ratones. Se observó cómo los machos tenían un tamaño de testículos menor que los ratones control, no habiendo diferencias en los ovarios de las hembras (Walker et al., 2009). Con este estudio se demostró que los ratones *knock-out* de coilina tienen defectos en su viabilidad, y que su letalidad aparece en una etapa tardía de la gestación, siendo un suceso de penetrancia incompleta (hay ratones homocigotos para la mutación viables), demostrando que la coilina no es una proteína esencial para el ratón.

2.2.2. SMN (*Survival Motor Neuron*)

La proteína de supervivencia de las motoneuronas o SMN es el segundo componente más importante de los cuerpos de Cajal. Las mutaciones en el gen *SMN* son las causantes de la atrofia muscular espinal (SMA), una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva que produce la pérdida de neuronas motoras (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1995) y la muerte a edades muy tempranas, siendo la primera causa genética de muerte infantil (1 de cada 6000 nacimientos).

Este gen se localiza en la región cromosómica 5q13, la cual presenta una duplicación invertida de 500kb haciendo que existan dos copias del gen: una copia centromérica (*SMN2*) y una telomérica (*SMN1*). En la gran mayoría de los pacientes con SMA se ha detectado una delección en *SMN1*, de tal forma que solo se expresa la proteína a partir del gen *SMN2*, siendo así los niveles más bajos respecto a individuos sanos. Se ha visto, además, que dichos niveles de SMN están inversamente relacionados con la severidad de la enfermedad.

SMN1 y *SMN2* son 99,9% idénticos, tienen promotores equivalentes y expresan de forma ubicua su ARN y proteína. La diferencia entre ambos genes es un cambio C→T en el exón 7 de *SMN2*, que altera la cantidad de este exón incorporado al ARNm final, de tal forma que muchos de los ARNm provenientes del gen *SMN2* carecen de este exón (el 90% aproximadamente); produciendo una proteína incapaz de oligomerizar, provocando su rápida degradación vía ubiquitina-proteasoma (Figura 22) (Burghes and Beattie, 2009; Burnett et al., 2009; Chang et al., 2004; Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999). Así, el número de copias del gen *SMN2* es un determinante de la severidad de la patología. También se han descrito mutaciones puntuales en pacientes con SMA que conservan un alelo de *SMN1* (Alias et al., 2009; Parsons et

al., 1996). Sin embargo, el mecanismo por el cual una reducción de la proteína SMN causa una degeneración neuromotora es, a día de hoy, una incógnita (Wang and Dreyfuss, 2001).

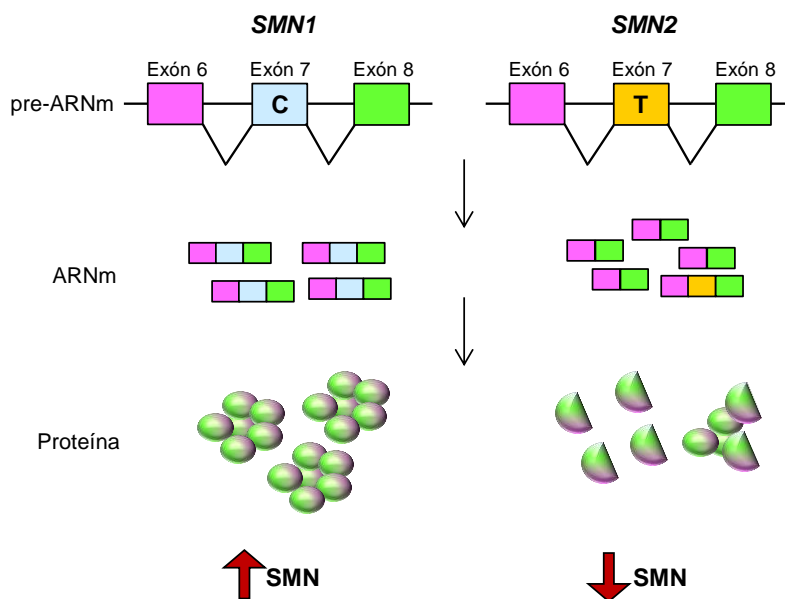


Figura 22: Representación de la diferencia entre *SMN1* y *SMN2*. A consecuencia de un cambio C→T en el gen *SMN2*, se produce un *splicing* alternativo que genera un ARNm sin exón 7, generándose una proteína más inestable y de rápida degradación.

2.2.2.1. Estructura de SMN

SMN es una proteína de 294 aminoácidos y 38kDa con múltiples dominios en su estructura y se localiza en el citoplasma y en el núcleo, dentro de los cuerpos de Cajal (Hebert et al., 2001b) o de las Geminas (Liu and Dreyfuss, 1996; Malatesta et al., 2004). Su expresión es ubicua, siendo mayor en cerebro, médula espinal, riñones e hígado; y su pérdida completa conlleva a la letalidad embrionaria (Monani et al., 2000).

En su región amino terminal posee una región de unión a Geminas (con las cuales forma el complejo funcional SMN) y a ácidos nucleicos, así como un dominio de autointeracción. Posee una región rica en lisinas (K^{++}) responsable de la unión a ARNs (*small nuclear RNAs*), y, entre los aminoácidos 91-151, un dominio Tudor importante para la unión con proteínas Sm, la fibrilarina y la coilina. Contiene además una región rica en prolina (P^{++}), responsable de la unión de la profilina, una proteína que últimamente gana importancia en las SMA (Bowerman et al., 2009; Nolle et al., 2011). Ya en su región carboxilo terminal presenta una caja YG conservada, esencial

para su oligomerización y la unión de Geminas (Figura 23) (Burghes and Beattie, 2009; Wang and Dreyfuss, 2001). Además, se ha visto que esta región carboxilo terminal (donde se localizan los exones 6 y 7) es responsable de la localización de SMN en el citoplasma (se ha propuesto un motivo de localización citoplasmática “QNQKE”) y de su funcionalidad (Coady and Lorson, 2011; Hua and Zhou, 2004; Wang and Dreyfuss, 2001).

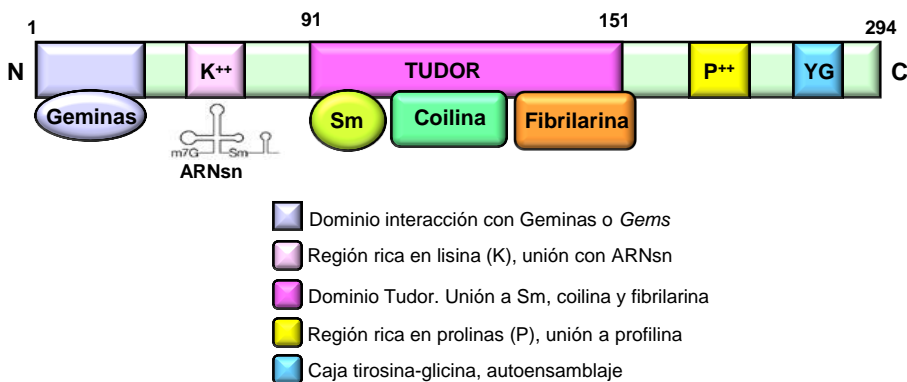


Figura 23: Esquema de la estructura de la proteína SMN donde se detallan sus dominios más importantes.

2.2.2.2. Funciones de SMN: el complejo SMN

SMN oligomeriza para formar, junto con las Geminas (Geminas 2 a 7), el complejo estable SMN, un complejo proteico de gran tamaño en el cual las Geminas 2, 3, 5 y 7 se unen directamente a SMN mientras que las Geminas 4 y 6 lo hacen de manera indirecta a través de las Geminas 3 y 7, respectivamente (Battle et al., 2006). Forma parte también de este complejo UNRIP (*UNR-interacting protein*), importante para la función de biogénesis de ribonucleoproteínas, función esencial y mejor estudiada del complejo SMN (Carissimi et al., 2005).

El proceso de *splicing* fue descubierto simultáneamente en 1977 por los grupos de Philip Sharp y Richard Roberts (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Permite un control temporal y espacial durante el desarrollo de la expresión de los genes de una célula eucariota, y tienen un papel fundamental las ribonucleoproteínas del espliceosoma o RNPs, responsables de la eliminación de los intrones. Se ha descrito cómo el complejo SMN interviene tanto en el procesamiento de los pre-ARNm como en la formación y biogénesis de las RNPs (Battle et al., 2006; Paushkin et al., 2002).

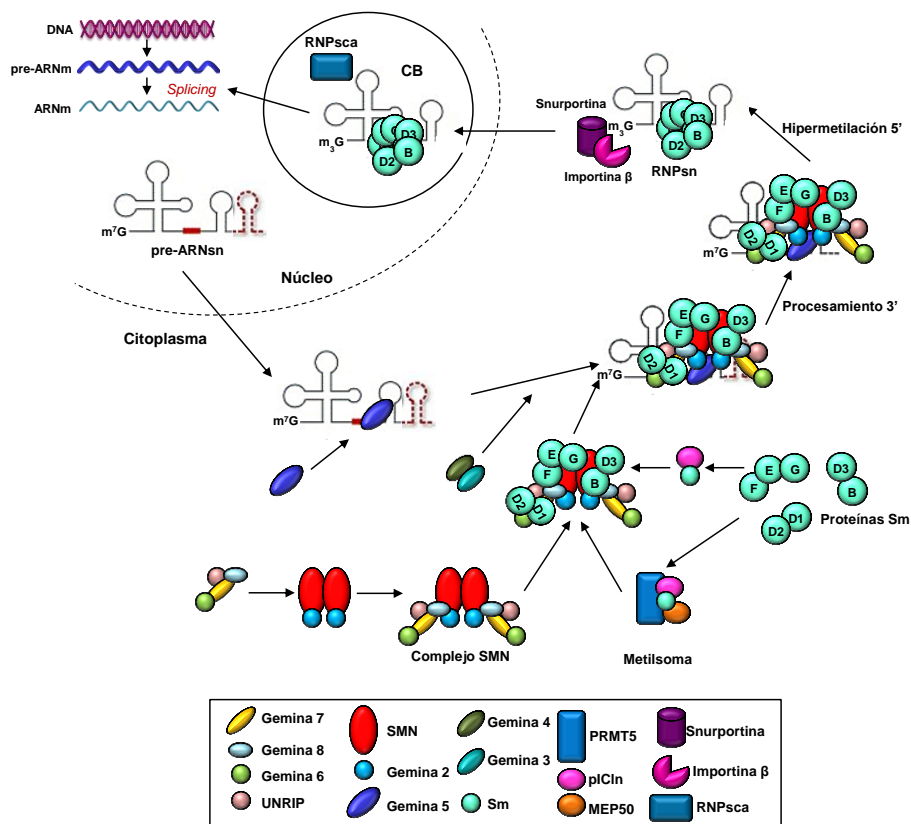


Figura 24: Representación de la biogénesis de RNPs donde participa el complejo SMN. Adaptado de (Battle et al., 2006; Burghes and Beattie, 2009).

Así, se considera el punto de inicio de la biogénesis de estas RNPs la transcripción por la ARN polimerasa II de los ARNs llamados “ARN nuclear de pequeño tamaño” o ARNsn denominados como U1, U2, U4, U5 y U6. El ARNm sintetizado en el núcleo se modifica ampliamente y ha de ser exportado al citosol para ser traducido. Así, al transcrito naciente se le añade en el extremo 5’ la caperuza o cap de 7-metilguanosina, estabilizando al ARN. En el extremo 3’ se produce la poliadenilación, la cual señala la terminación de la transcripción. De este modo, una vez modificados los extremos 5’ y 3’ del transcrito, éste es exportado al citosol donde se le unirá un complejo heptamérico formado por las proteínas Sm (B/B’, D1, D2, D3, E, F y G), las cuales previamente se han unido a la proteína pICln (*chloride conductance regulatory protein*), que forma parte del metilsoma junto con PRMT5, una arginina metil transferasa. Así, la unión de las proteínas Sm y PRMT5, entre otras, aumenta la afinidad con el complejo SMN, formando un complejo SMN/Sm/Geminas. En este momento, se llevan a cabo nuevas modificaciones, y se produce el importe al núcleo a través de la importina β y la snurportina. Una vez en el núcleo, se liberan las RNPs

dirigiéndose a los cuerpos de Cajal donde se produce su maduración a través de varias modificaciones, en las cuales intervienen los ARNsca (ARNs propios de los CBs). Una vez las RNPs son activas, se dirigen a los sitios de transcripción donde se ensamblan con el espliceosoma; un destino alternativo es su acumulación en los “speckles nucleares” (Battle et al., 2006; Carvalho et al., 1999b; Casafont et al., 2009; Coady and Lorson, 2011; Fischer et al., 2011; Hebert et al., 2001b; Narayanan et al., 2002; Paushkin et al., 2002; Stanek and Neugebauer, 2006). Para esta localización de las RNPs en los CBs, es indispensable la unión directa de SMN con la región RG de la coilina (Hebert et al., 2001b).

Una segunda función de SMN fue descrita a través de la observación de que la deficiencia en SMN producía una reducción del crecimiento axonal de las motoneuronas (Rossoll et al., 2003). SMN se localiza en los axones de las motoneuronas, así como en los conos de crecimiento neural. Se sabe además que la Gemina 2, esencial en el proceso de biogénesis de RNPs explicado anteriormente, no colocaliza con SMN en estos axones, sugiriendo así una nueva función de SMN (Jablonka et al., 2001). Recientemente, se han descrito dos nuevas interacciones de SMN: son las proteínas de unión a ARN hnRNP R y hnRNP Q (ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas R y Q); las cuales sí colocalizan en los axones de las motoneuronas con SMN. Se ha demostrado que SMN y hnRNP R modulan el crecimiento axonal (Rossoll et al., 2003). Además, la deficiencia en SMN produce también una deslocalización de la beta-actina (tanto a nivel de ARNm como de proteína) en los axones y conos de crecimiento neural. Se sabe que hnRNP R interacciona con el ARNm de la beta-actina, más concretamente con el 3'UTR, importante para su transporte. En estos estudios se demostró que la unión entre SMN y hnRNP R era necesaria para la unión de éste a la beta-actina. Esta nueva función de SMN podría explicar por qué la atrofia muscular espinal afecta específicamente a las motoneuronas (Rossoll et al., 2003).

Finalmente, otra de las funciones de SMN que cabe destacar, es su papel como proteína anti-apoptótica (Figura 25). El silenciamiento de SMN produce la apoptosis en células neuronales, de manera dependiente de caspasas (Kerr et al., 2000; Trulzsch et al., 2007). El mecanismo mejor conocido de SMN en apoptosis es la inhibición de la activación de la caspasa 3 a través del bloqueo de su clivaje por la calpaína (Anderton et al., 2011). De hecho, motoneuronas derivadas de pacientes con SMA tienen mayores niveles de subunidades de caspasa y de caspasa 3 clivada (Sareen et al., 2012). Diferentes estudios han puesto de manifiesto las múltiples relaciones entre SMN y proteínas clave en procesos de supervivencia. Así, SMN

interacciona directamente con Bcl-2, un regulador negativo de la apoptosis (Sato et al., 2000); esta interacción juega un papel fundamental anti-apoptótico a través de su acción contra Bax o Fas, acción incapaz de realizar la proteína SMN proveniente de *SMN2*. Además, en modelos de ratón con SMA se ha visto cómo la expresión de *Bcl-2* está disminuida, hipotetizándose como un factor clave en la muerte de las motoneuronas (Anderton et al., 2013). Otro gen cuya expresión está reducida en pacientes con SMA es *ZPR1* (*zinc finger protein*). Al igual que SMN, su *knock-out* produce letalidad embrionaria, de hecho su deficiencia causa defectos en la formación de los cuerpos de Cajal, en el crecimiento embrionario o en el crecimiento axonal, además de provocar un aumento de la apoptosis. El silenciamiento de *ZPR1* induce la activación de la caspasa 3, sugiriendo un papel esencial en la muerte de las motoneuronas conjuntamente con SMN (Gangwani et al., 2005). Otra proteína importante en apoptosis y relacionada directamente con SMN es el guardián del genoma p53; de hecho, se ha detectado su colocalización en los cuerpos de Cajal. Se cree que altos niveles de SMN ayudan a localizar a p53 en el núcleo, y que el complejo SMN/p53 frenaría la apoptosis mediada por este factor de transcripción. Esta interacción no existe en pacientes con SMA debido a que el SMN mutante no puede interactuar con p53, el cual se redistribuye al nucléolo (Young et al., 2002). Finalmente, cabe destacar la relación entre SMN y la proteína Bcl-xL. Esta proteína bloquea la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9 a través de Apaf, inhibiendo así la apoptosis. La expresión de SMN y Bcl-xL está co-regulada a través de la proteína de unión a ARN Sam-68, sugiriendo un mecanismo común de regulación en el que bajos niveles de Sam-68 producen la acumulación de Bcl-xL y SMN. Además, la expresión de uno induce la expresión del otro, actuando de forma sinérgica en el bloqueo de la inhibición de la PI3-quinasa, actuando así como proteínas pro-supervivencia. Por lo tanto, se cree que la muerte causada por el defecto en SMN puede ser bloqueada por la sobreexpresión de Bcl-xL (Anderton et al., 2012; Garcera et al., 2011). Todos estos datos abren múltiples caminos de investigación para determinar el mecanismo exacto que lleva a la apoptosis de las motoneuronas en las atrofas musculares espinales.

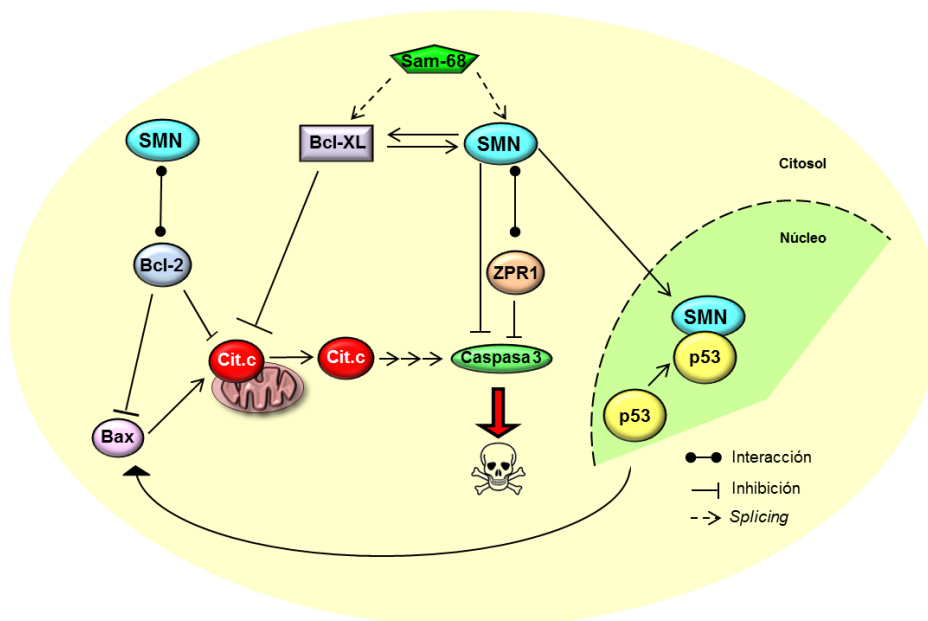


Figura 25: Representación de las diferentes vías de la apoptosis donde actúa SMN ya sea a través de interacciones, inhibiciones o mediante regulación.

3. SMN, Coilina, VRK1 y su implicación en neurodegeneración

La razón del por qué bajos niveles de SMN genera atrofia muscular espinal o SMA aún sigue siendo una incógnita. Se postulan dos hipótesis principalmente: la primera sugiere que el defecto en la formación de las RNPs afecte al *splicing* de un grupo de genes importantes para los circuitos de las motoneuronas. La segunda se centra en el papel de SMN en los axones de las neuronas; e incluso una mezcla de ambas, es decir, el defecto en el ensamblaje de las RNPs podría afectar al *splicing* de genes importantes en los axones.

La biogénesis de RNPs es un proceso esencial para la supervivencia de todas las células, pero, ¿cómo este proceso puede afectar de forma específica al sistema neuro-motor? La actividad en la médula espinal de SMN es máxima durante la fase embrionaria y durante el desarrollo post-natal temprano, y luego disminuye para mantener un nivel de actividad constante, dato que sugiere una alta demanda de síntesis de RNPs durante el desarrollo neuronal (Gabanella et al., 2005). La hipótesis con mayor relevancia actualmente es la que hace referencia al espliceosoma menor. Existen dos tipos de espliceosoma (mayor y menor) según el tipo de RNPs que lo formen y los tipos de intrones que detecten. La mayoría de intrones génicos son eliminados por el espliceosoma mayor o U2-dependiente. En este complejo, U1, U2,

U4/6 y U5 median la detección y escisión de las secuencias intrónicas. Sin embargo, en aproximadamente 600-700 genes (<1% del total de intrones) actúa el espliceosoma menor o U12-dependiente. Este complejo consta de las RNPs U11, U12, U4atac/U6atac y U5, única RNP común en ambas vías. Mientras que la vía U2-dependiente reconoce la secuencia intrónica canónica GT/AG, la vía U12 reconoce un lugar 5'AT y un lugar 3'AC (Hall and Padgett, 1994; Sharp and Burge, 1997; Will and Luhrmann, 2005; Will et al., 2001). Se ha visto que en modelos animales de SMA, cuando se analizaban extractos de cerebro y médula espinal, había una reducción, como era de esperar, de RNPs, siendo mucho más drástica para las RNPs U11 y U12 (Gabanella et al., 2007). Además, cuando se analizaron los genes que tenían este tipo de intrones AT/AC, se vio que había un gran número de genes relacionados con canales iónicos dependientes de voltaje, asociados a transporte axonal y muchas veces mutados en patologías neurodegenerativas, postulándose así un posible mecanismo de cómo el defecto en el *splicing* causado por SMN podría generar esta atrofia muscular espinal (Wu and Krainer, 1999).

Como se explicó anteriormente, una función de SMN no asociada a proteínas Sm o a la Gemina 2, es el correcto transporte de ARNm a los axones y conos de crecimiento neural para la traducción eficiente de algunos genes, como la beta-actina. En esta función se basa la segunda hipótesis acerca de cómo bajos niveles de SMN pueden generar SMA. En motoneuronas derivadas de modelos de ratón con atrofia muscular espinal, se detectaron niveles reducidos de beta-actina, tanto de su ARNm como de proteína, defecto que provoca un menor crecimiento del cono neural y un acortamiento de los axones. Adicionalmente, el *knock-down* de SMN en un modelo de pez cebra genera defectos pre-sinápticos en las uniones neuromusculares o NMJ (*neuromuscular junction*), un efecto que en modelos de ratón no se ha visto alterado (Boon et al., 2009; Coady and Lorson, 2011). Una evidencia más en relación a la función axonal de SMN es la identificación en pacientes con SMA de una alteración en el gen de la plastina 3 (gen *PLS3*) involucrado en la dinámica de la beta-actina, ya que estabiliza sus filamentos (Oprea et al., 2008). Se ha detectado una reducción drástica de los niveles proteicos de plastina 3 en peces cebra *smn*^{-/-}, en los cuales se ha visto que SMN afecta a su producción proteica (Hao et al., 2012). De hecho, la sobreexpresión de plastina 3 disminuye la severidad de la patología en ratones con SMA o en motoneuronas derivadas del pez cebra con *knock-down* de SMN. Estos trabajos ponen de manifiesto el papel importantísimo que tiene el transporte y la dinámica de la beta-actina en el desarrollo de la atrofia muscular espinal.

Como se mencionó al explicar la biogénesis de RNPs, una vez entran al núcleo se acumulan en los cuerpos de Cajal para su maduración y posterior localización en los lugares de *splicing*. Se ha visto que en fibroblastos derivados de pacientes con atrofia muscular espinal no se acumulan RNPs en los cuerpos de Cajal (Renvoise et al., 2006), sugiriendo que posiblemente existan otros componentes de este suborgánulo nuclear que también estén ausentes. Investigando esta posibilidad, se detectó en estos fibroblastos derivados de pacientes la ausencia de la chaperona de RNPsno (ribonucleoproteínas nucleolares) Nopp140; de hecho, su silenciamiento produce una deslocalización de SMN fuera de los CBs, y por el contrario, la sobreexpresión de SMN favorece la localización de Nopp140 en éstos, revelando así que la localización de Nopp140 en los cuerpos de Cajal correlaciona con la expresión fenotípica de la SMA (Renvoise et al., 2009). Además, si se marca a Nopp140 y a coilina en células derivadas de paciente con SMA de tipo I, II y III (menos a más severidad), aparece una correlación inversa entre la cantidad de Nopp140 en los CBs y la severidad de la patología, postulándose como un buen marcador de la misma (Renvoise et al., 2009).

VRK1 fosforila a la coilina en múltiples residuos, uno de ellos la serina 184 (Sanz-García et al., 2011a), un proceso que puede tener consecuencias a nivel de interacción con otras proteínas. Entre las proteínas que están descritas que interaccionan con la coilina encontramos, además de a SMN, a la ataxina-1 (Hong et al., 2003). Mutaciones en la ataxina-1 generan ataxia y distrofia muscular espinal. Estas patologías están causadas por la repetición del triplete CAG generando un tracto de poli-glutaminas o poliQ, y reciben el nombre de “enfermedades de poli-glutaminas”. Este tipo de agregados se ha observado en varias patologías neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o enfermedades priónicas (Kakizuka, 2008). Interesantemente, se ha descrito una proteína que colocaliza y se une a estos agregados de poliQ, la proteína VCP (*valosin containing protein*), perteneciente a la familia de AAA ATPasas, que controlan la calidad de las proteínas (Kakizuka, 2008). Además, VCP interacciona y es fosforilada por VRK1 (dato aún sin publicar). También se ha detectado a VCP en los cuerpos nucleares llamados agrosomas, los cuales contienen acúmulos de proteínas ubiquitinadas y que se generan al inhibir el proteasoma (Kitami et al., 2006).

El hecho de que SMN se encuentre en el núcleo acumulada en los cuerpos de Cajal, hace que estos suborgánulos nucleares sean un foco constante de estudios como posibles implicados en la patología, ya sea a través de interacciones o de modificaciones como fosforilaciones o ubiquitinaciones, entre otras. Además, juntando estos datos con el hecho de que la quinasa humana VRK1 fosforila a la

coilina y que existen mutaciones en esta quinasa que generan patologías neurodegenerativas, hace plantearse la posibilidad de que exista alguna relación entre ellas y la causa de estas atrofas musculares. Gracias a esta información consideramos la necesidad de estudiar la implicación de VRK1 en este tipo de patologías, convirtiéndose en el objetivo principal de este trabajo.

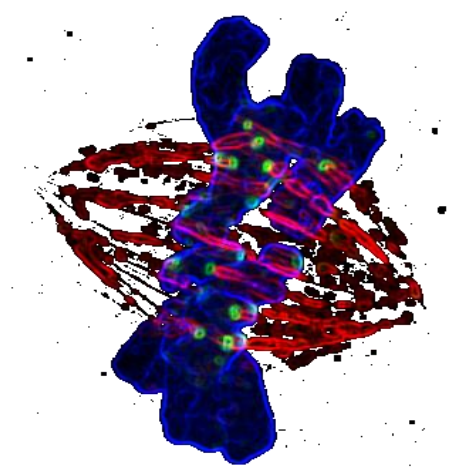
OBJETIVOS

- Estudiar el efecto de la fosforilación de la coilina por la quinasa humana VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal y en la degradación de la coilina, así como caracterizar el residuo de fosforilación serina 184.
- Analizar el efecto del silenciamiento de la quinasa VRK1 en la proteína SMN, asociando a la quinasa con patologías neurodegenerativas.
- Estudiar la interacción entre VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular.
- Caracterizar las mutaciones en VRK1 R89Q, R133C, V236M y R358X, analizando su localización, actividad y estabilidad.

RESULTADOS

“Los imposibles de hoy serán posibles mañana.”

Konstantin Tsiolkovsky



1. Implicación de la quinasa humana VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal

1.1. La quinasa VRK1 interacciona con la coilina

Teniendo en cuenta que la quinasa humana VRK1 fosforila a la coilina (Sanz-Garcia et al., 2011a), quisimos evaluar si estas dos proteínas interactuaban. En primer lugar, realizamos una inmunoprecipitación de VRK1 endógena o de coilina endógena en las líneas celulares HeLa y HEK-293T, respectivamente. En ambos casos se detectó la interacción entre VRK1 y coilina (Figura 26 A). Posteriormente, se quiso detectar la interacción con las proteínas sobreexpresadas. Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-GST-VRK1 o pCEFL-GSTØ como control. Se realizó un ensayo de *Pull-Down*, y se detectó la interacción entre coilina endógena y GST-VRK1 (Figura 26 B). Finalmente, realizamos el ensayo recíproco, transfectando esta vez células HEK-293T con el vector pCMV6-Coilina-Myc-Flag. En este caso, se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo que reconoce el epítipo Flag y se detectó a la VRK1 endógena en el precipitado (Figura 26 C). De esta manera, confirmamos que la quinasa humana VRK1 interacciona con la proteína marcadora de los cuerpos de Cajal, la coilina.

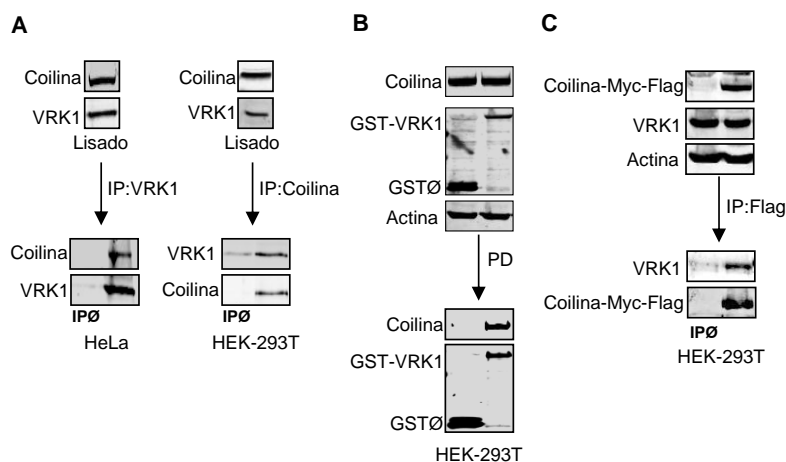


Figura 26: VRK1 y coilina interactúan. **A.** Interacción entre coilina y VRK1 endógenas. Células HeLa y HEK-293T se lisaron y se comprobó la expresión de las proteínas coilina y VRK1. Se inmunoprecipitó a VRK1 para detectar a la coilina en el precipitado, o se inmunoprecipitó a la coilina para detectar a VRK1 en el precipitado. **B.** Interacción entre coilina endógena y GST-VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-GST-VRK1 o pCEFL-GSTØ. Se realizó un ensayo de *Pull-Down* para detectar la interacción mediante electroforesis y *Western blot* con anticuerpos específicos. **C.** Interacción entre VRK1 endógena y coilina transfectada. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pCEFL-FlagØ. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo α -Flag y se detectó a la VRK1 endógena en el precipitado.

1.2. La interacción entre VRK1 y coilina se produce a través de la región amino terminal de la quinasa

Una vez confirmada la interacción entre ambas proteínas, quisimos identificar qué regiones de VRK1 podrían estar implicadas en dicha interacción. En primer lugar, utilizamos las construcciones de VRK1 correspondientes a la región amino terminal, de tal forma que tenemos a VRK1-Myc entera y dos fragmentos a los que hemos denominado VRK1-Myc NL (amino largo), que va desde el aminoácido 1 al 332 y VRK1-Myc NC (amino corto), que va desde el aminoácido 1 al 267. Se transfectaron células HEK-293T con dichas construcciones junto con el plásmido pCEFL-Coilina-AU5. Se realizó una inmunoprecipitación de VRK1 a través del epítipo Myc y se detectó a la coilina en el precipitado (Figura 27 A). Para confirmar que la coilina se unía a la región amino de VRK1, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCEFL-HA-VRK1 y pCEFL-HA-VRK1 (R358X), esta última carente de su región carboxilo terminal. Se inmunoprecipitó a VRK1 con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA y se detectó a la coilina en ambos casos, confirmándose así el resultado anterior (Figura 27 B). Finalmente, quisimos comprobar si la coilina también se unía a la región carboxilo terminal de VRK1. Con este fin, se transfectaron células HEK-293T con los vectores pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCEFL-GSTØ, pCEFL-GST-VRK1 y pCEFL-GST-C-VRK1 (267-396), este último codificante de la región carboxilo terminal de la quinasa. Se realizó un ensayo de *Pull-Down* donde vimos cómo la coilina sí interaccionaba con la VRK1 silvestre pero no con la región carboxilo terminal (Figura 27 C). Así, podemos concluir que la quinasa humana VRK1 interacciona a través de su región amino terminal con la coilina, y no con su región carboxilo terminal.

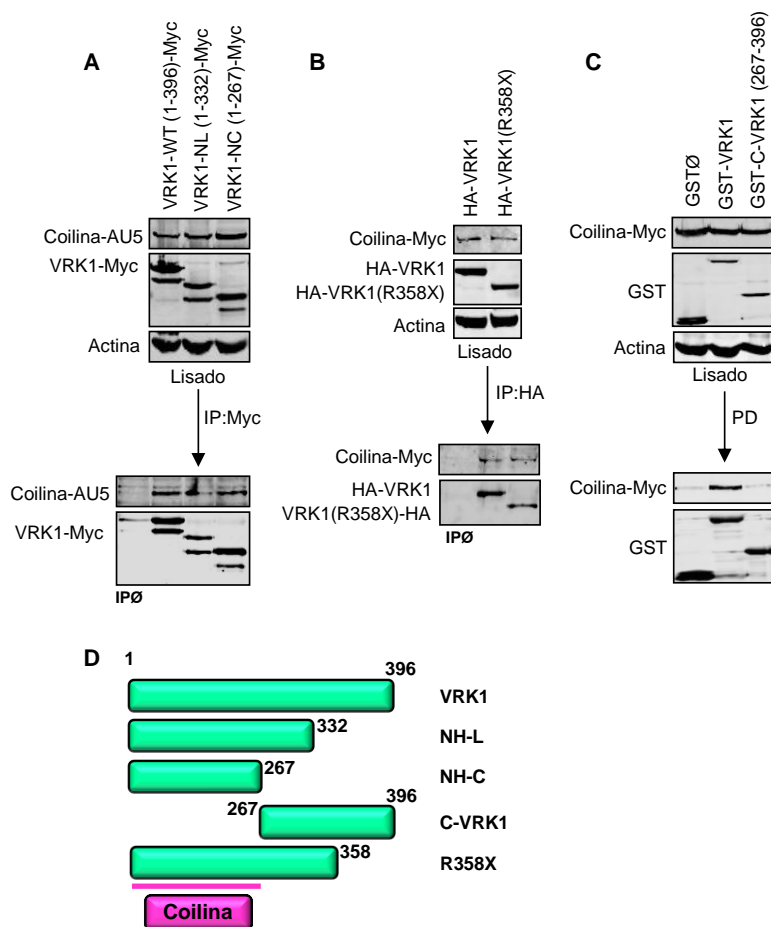


Figura 27: La coilina interacciona con la región amino terminal de VRK1. **A.** Coilina-AU5 interacciona con los fragmentos amino terminales de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-Coilina-AU5 y pcDNA3.1-VRK1-Myc (silvestre 1-396, NL 1-332, NC 1-267). Se inmunoprecipitaron las construcciones de VRK1 con un anticuerpo α -Myc y se detectó a la coilina con el anticuerpo α -AU5. **B.** Coilina-Myc interacciona con HA-VRK1 (silvestre y R358X). Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCEFL-HA-VRK1 y pCEFL-HA-VRK1 (R358X). Se utilizó un anticuerpo α -HA para inmunoprecipitar a VRK1 y se detectó a la coilina con un anticuerpo α -Myc. **C.** Coilina-Myc no interacciona con la región carboxilo terminal de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCEFL-GST \emptyset , pCEFL-GST-VRK1 y pCEFL-GST-C-VRK1 (267-396). Se llevó a cabo un ensayo de *Pull-Down* en el que se detectó a la coilina con un anticuerpo α -Myc, y a las diferentes VRK1 con un anticuerpo α -GST. **D.** Representación de la unión de la coilina a la región amino de VRK1.

1.3. VRK1 no se encuentra en los cuerpos de Cajal

Los cuerpos de Cajal (CBs) están presentes, como se mencionó en la introducción de este trabajo, en células con alta tasa de proliferación o con grandes requerimientos metabólicos, como las células tumorales y neuronales, respectivamente. Además, su número varía dependiendo de la línea celular. Para examinar cómo se visualizaban

estos suborgánulos en diferentes líneas de nuestro laboratorio, se realizó una inmunofluorescencia en las siguientes líneas celulares: WS1 (fibroblastos humanos), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A549 (carcinoma de pulmón), HEK-293T (embrionarias de riñón), HCT116 (carcinoma colorrectal) y SH-SY5Y (neuroblastoma). Se marcó a la coilina con el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta (Figura 28).

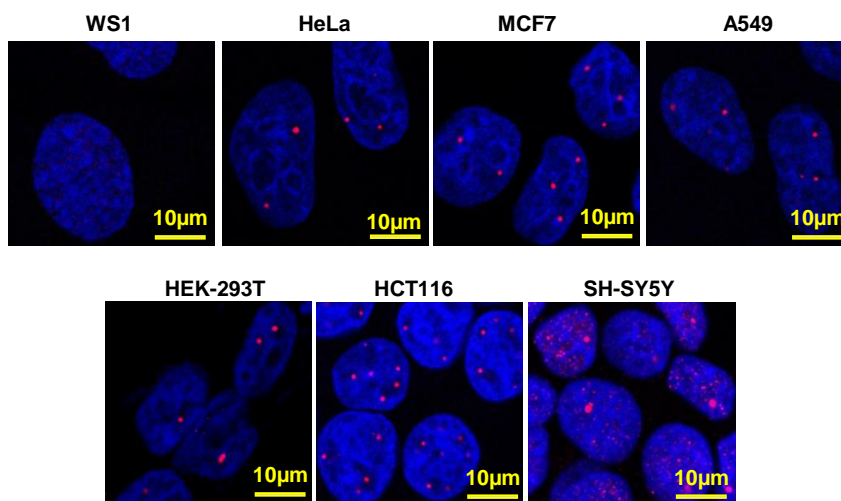


Figura 28: Marcaje de los cuerpos de Cajal en distintas líneas celulares. Se realizó el marcaje de la coilina en un panel de líneas celulares: WS1 (fibroblastos humanos), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A549 (carcinoma de pulmón), HEK-293T (embrionarias de riñón), HCT116 (carcinoma colorrectal) y SH-SY5Y (neuroblastoma). Se utilizó el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz.

No se observaron cuerpos de Cajal en la línea de fibroblasto humano no tumoral WS1, la cual tiene una lenta tasa de proliferación. Sin embargo, en el resto de líneas marcadas, sí se visualizaron los cuerpos de Cajal como puntos intensos rojos, mientras que la población de coilina libre en el nucleoplasma se detectó como un débil fondo rojo por el núcleo. En la mayoría de células se observaron entre 2 y 4 CBs, excepto en la línea HCT116 de carcinoma colorrectal, en la que se observó un mayor número (entre 4 y 6) (Figura 28).

Debido a que VRK1 es una de las quinasas más abundantes en el núcleo, e interacciona con la coilina, quisimos investigar si también se encontraba dentro de los cuerpos de Cajal. Con este fin, en primer lugar, se aislaron núcleos intactos de células HeLa (Figura 29 A). Para ello, se sembraron células HeLa en placas de 100mm y, 48 horas después, se lavaron y se recogieron por centrifugación a 600g. El *pellet* obtenido se resuspendió en un tampón RSB, el cual produce el hinchamiento de las células por choque osmótico. Se dejó la suspensión en hielo y se fue observando en

el microscopio hasta que la mayoría de las células se encontraron hinchadas. Es entonces cuando se pasan las células por un homogeneizador para su rotura mecánica, obteniendo así los núcleos intactos, los cuales son lavados con el mismo tampón RSB. Estos núcleos se marcaron en primer lugar con DAPI para verificar que se encontraban enteros (Figura 29 A). Una vez vimos que teníamos los núcleos de las células HeLa en perfecto estado, pasamos a marcar a la VRK1 y la coilina con los anticuerpos específicos correspondientes (Figura 29 B), observando la señal nuclear en verde de VRK1 y los cuerpos de Cajal (coilina) en rojo.

Finalmente, pasamos a realizar el aislamiento y purificación de los cuerpos de Cajal, siguiendo el protocolo de (Lam et al., 2002) (Figura 29 E). Este protocolo parte de núcleos intactos de células HeLa a los que, en primer lugar, a través de gradiente de sacarosa y mediante sonicación, se eliminan los nucléolos, siguiendo el procedimiento con el nucleoplasma. Seguidamente, a través de varias centrifugaciones y gradientes de *Percoll*-sacarosa, acabamos aislando y enriqueciendo los cuerpos de Cajal. Una vez realizado el protocolo, quisimos marcar tanto por inmunofluorescencia (Figura 29 C) como por *Western blot* (Figura 29 D) a la coilina (control positivo del protocolo) y a la quinasa VRK1. Se detectó a la coilina en ambas técnicas, pero VRK1 no fue observada en ningún caso, confirmando así que la quinasa no se encuentra en este compartimento nuclear o solo está presente en una población de células minoritaria.

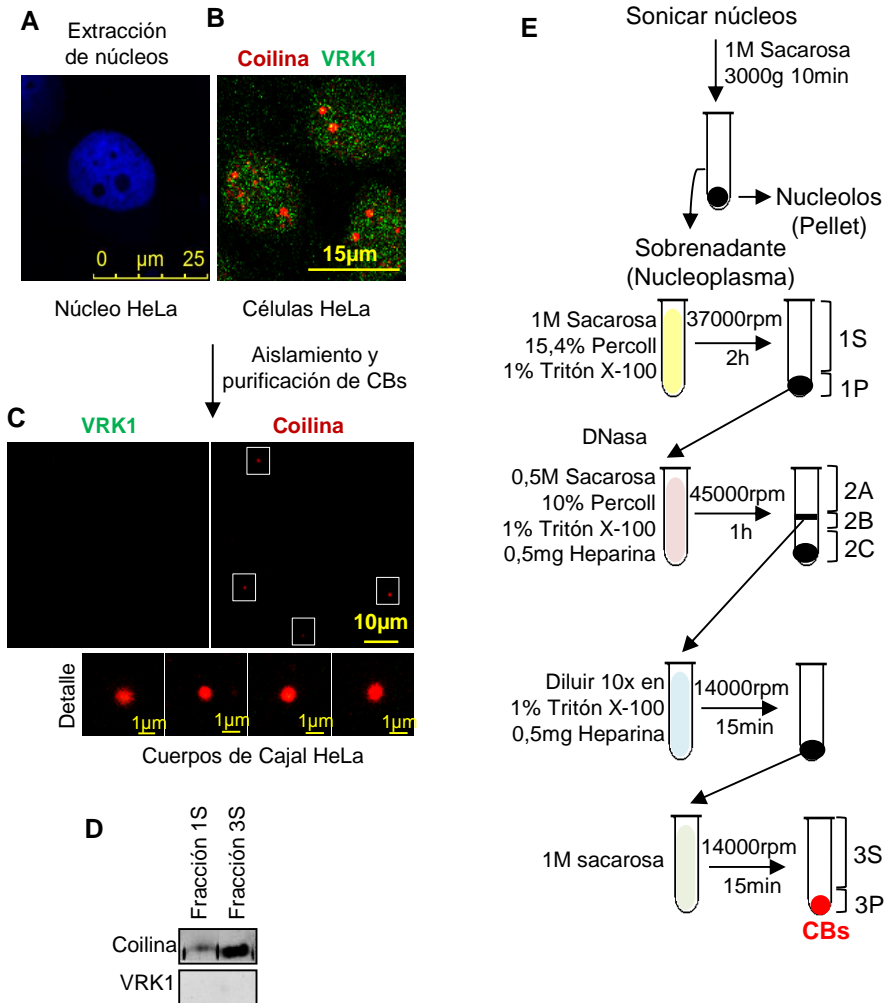


Figura 29: La quinasa VRK1 no se encuentra en los cuerpos de Cajal. **A.** Extracción de núcleos intactos de células HeLa. Células HeLa fueron sembradas en placas de 100mm y, 48 horas después, se recogieron por centrifugación a 600g. Se resuspendieron en un tampón RSB que produce su hinchamiento por choque osmótico y, posteriormente, se pasaron por un homogeneizador para su rotura de forma mecánica. Se volvieron a centrifugar a 1000g y el *pellet* se lavó con el mismo tampón. **B.** Marcaje de VRK1 y coilina en los núcleos aislados. Se realizó una inmunofluorescencia de los núcleos para marcar a VRK1 y coilina. **C.** Aislamiento y purificación de cuerpos de Cajal. A partir de los núcleos intactos, se llevó a cabo el protocolo de Lam (Lam et al., 2002) para aislar y concentrar CBs a través de gradientes de *Percoll*-Sacarosa. Se marcó por inmunofluorescencia a VRK1 (verde) y coilina (rojo). **D.** *Western blot* de una fracción negativa de cuerpos de Cajal (Fracción 1S) y de la fracción donde se encuentran los cuerpos de Cajal concentrados (Fracción 3S). Se detectó a la coilina y a VRK1 con anticuerpos específicos. **E.** Esquema del protocolo para el aislamiento y purificación de los cuerpos de Cajal donde se detallan los pasos principales del procedimiento.

1.4. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal

Como se explicó anteriormente, para la formación de los cuerpos de Cajal, es necesaria la oligomerización de la coilina, a través de su dominio de autointeracción en el extremo amino terminal de la proteína (Hebert and Matera, 2000b). De este modo, se forman los CBs, complejos macromoleculares nucleares que varían en composición y tamaño. Quisimos estudiar el efecto que podía tener el silenciamiento de la quinasa VRK1 en la oligomerización de la coilina y, por lo tanto, en la formación de los cuerpos de Cajal.

En primer lugar, se realizó un ensayo de HPLC (*high performance liquid chromatography*) en condiciones nativas. Esta técnica, junto con el análisis de las fracciones recogidas mediante electroforesis y *Western blot*, nos permite separar las proteínas que forman parte de complejos multiproteicos en función de su peso molecular. Así, se transfectaron células MCF-7 con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03) o con un siARN control (si-Control) que no tiene diana específica. Pasadas 72 horas, se lisaron las células y se realizó la HPLC recogiendo fracciones de 200µl, las cuales se precipitaron con ácido tricloroacético para su posterior análisis por electroforesis y *Western blot* (Figura 30 A).

Se detectó a la coilina tanto en complejos de alto peso molecular (700kDa) como de peso molecular medio (160kDa). VRK1 se observó mayoritariamente en complejos de peso molecular medio, aunque también se detectó una población en complejos de alto y bajo peso molecular. Sin embargo, al silenciar a VRK1, se produjo una disminución de la coilina en complejos de alto peso molecular, mientras que se producía un aumento en complejos de peso molecular medio (Figura 30 A). Estos complejos de peso molecular medio pueden ser el punto de partida para iniciar la formación de los cuerpos de Cajal y, a través de los resultados obtenidos, podemos confirmar que VRK1 es necesaria para el ensamblaje de los CBs o para mantener a la coilina en complejos de alto peso molecular.

Para mejorar la visualización de los resultados, se cuantificaron las fracciones de alto y medio peso molecular (Figura 30 B). Adicionalmente, se realizó una gráfica donde se sumaron por un lado las fracciones de alto peso molecular y por otro las de peso molecular medio (Figura 30 C).

Resultados

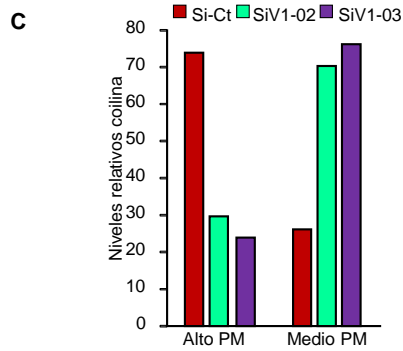
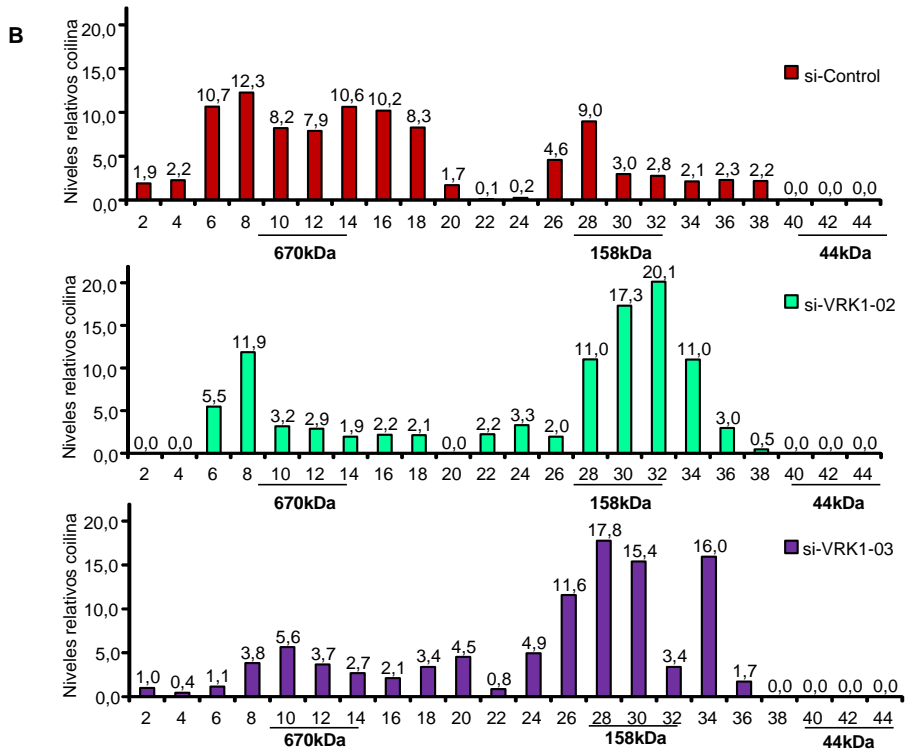
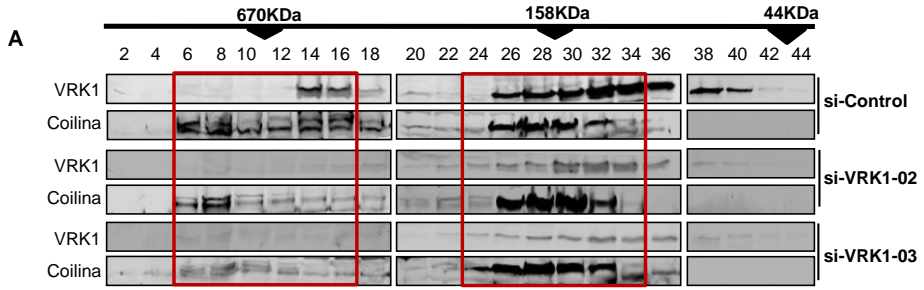


Figura 30: El silenciamiento de VRK1 desplaza a la coilina a complejos de peso molecular medio. **A.** Se lisaron células MCF-7 y se cuantificaron los extractos obtenidos de manera que para cada muestra se filtraron 3mg de proteína total, contenidos en un mismo volumen. Estos extractos se fraccionaron por HPLC de filtración en gel en una columna “*Superose 12/10/300 GL*” (GE Healthcare). Se recogieron fracciones de 200µl, de las cuales las fracciones pares se precipitaron y resuspendieron en un volumen menor para ser separadas mediante electroforesis y analizadas mediante *Western blot*. Para calibrar la columna y estimar los pesos moleculares de las fracciones obtenidas se emplearon los siguientes marcadores de peso molecular de Bio-Rad: tiroglobulina bovina 670kDa, γ -globulina bovina 158kDa, ovoalbúmina de pollo 44kDa, mioglobina de caballo 17kDa y vitamina B12 1,35kDa. **B.** Representación comparativa del porcentaje de coilina presente en las fracciones de interés, tras el tratamiento con los ARN de interferencia. La cuantificación se realizó con el programa *Quantity One* (BioRad). **C.** Representación de la suma de las fracciones de alto y medio peso molecular para mejorar la visualización de la cantidad relativa de coilina en cada una de ellas.

Una vez observamos que el silenciamiento de VRK1 producía la desoligomerización de la coilina y provocaba su desplazamiento a complejos de peso molecular medio, quisimos estudiar el efecto que tenía este resultado en la formación de los cuerpos de Cajal. Para llevarlo a cabo, realizamos inmunofluorescencias en tres líneas celulares distintas: HeLa, MCF-7 y la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se transfectaron con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03) o con un si-Control sin diana específica. Pasadas 72 horas, las células fueron lisadas para comprobar el correcto silenciamiento de la quinasa (Figura 31) o fueron fijadas para su marcaje por inmunofluorescencia y observación en el microscopio confocal (Figura 32 A, B, C).

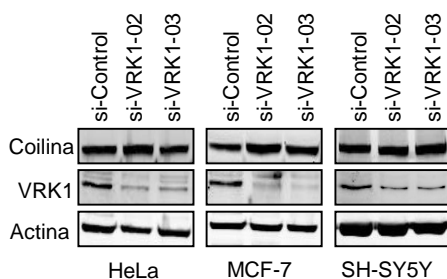
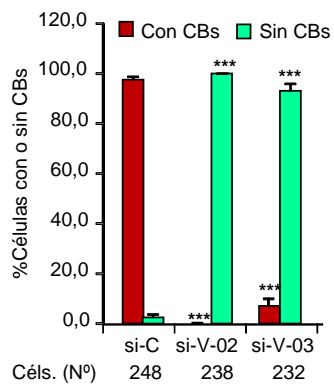
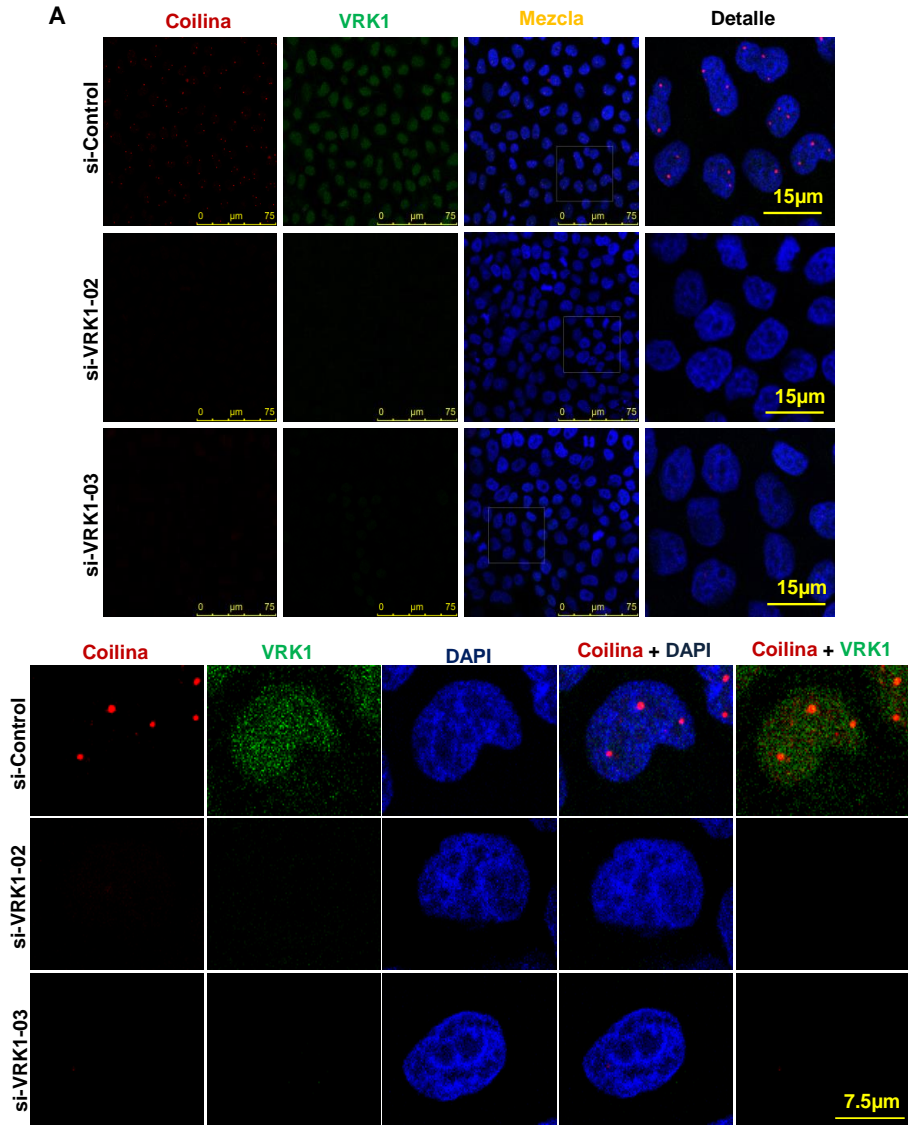
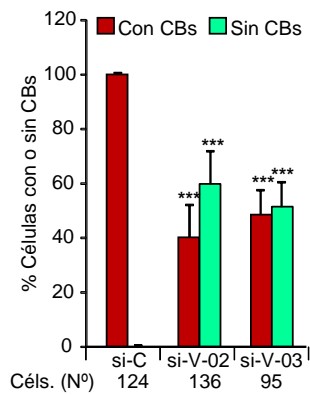
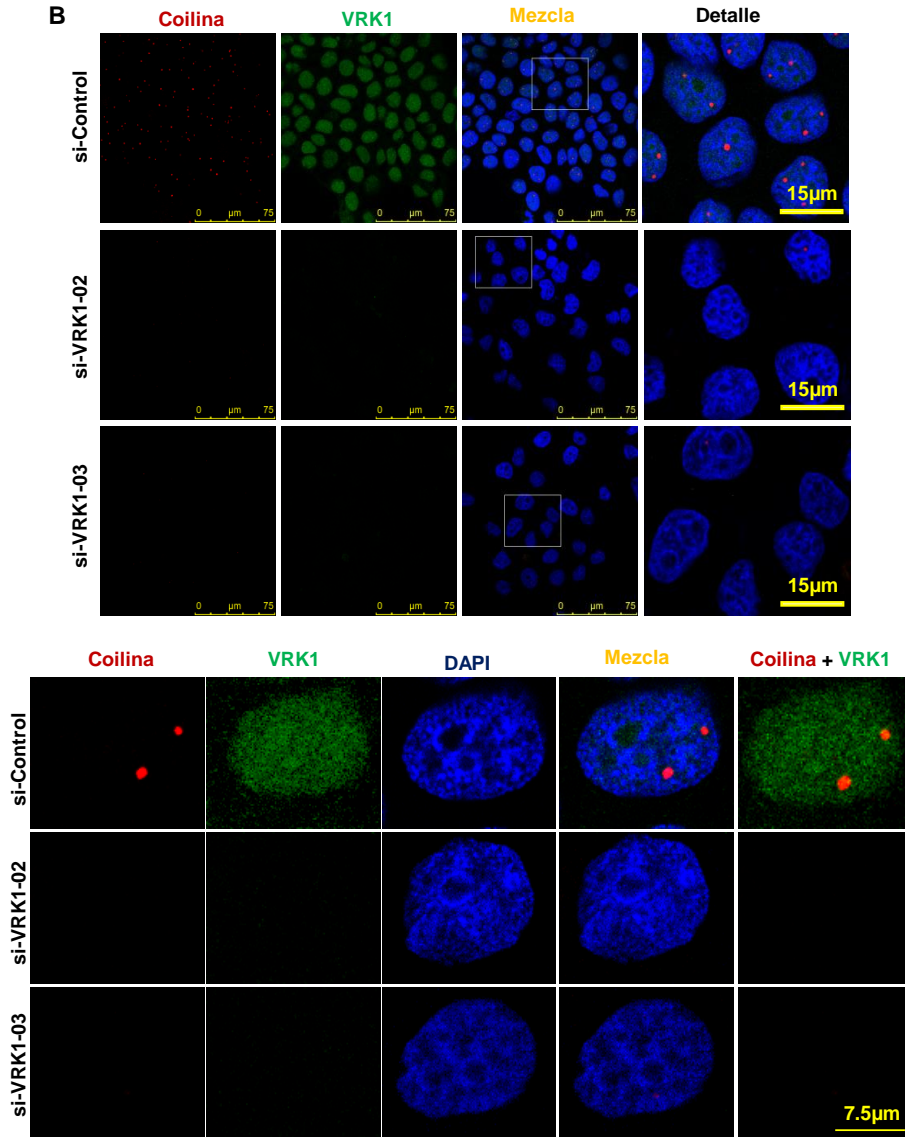


Figura 31: Silenciamiento de VRK1 en un panel de líneas celulares. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) a células HeLa, MCF-7 o SH-SY5Y para silenciar a la VRK1. Se utilizaron dos siARN específicos diferentes y un si-Control. Pasadas 72 horas, se lisaron para verificar la disminución de la expresión de VRK1. Se marcó la coilina con el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz y a la VRK1 con el anticuerpo de fabricación propia policlonal VC.





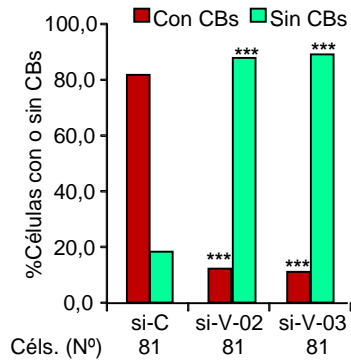
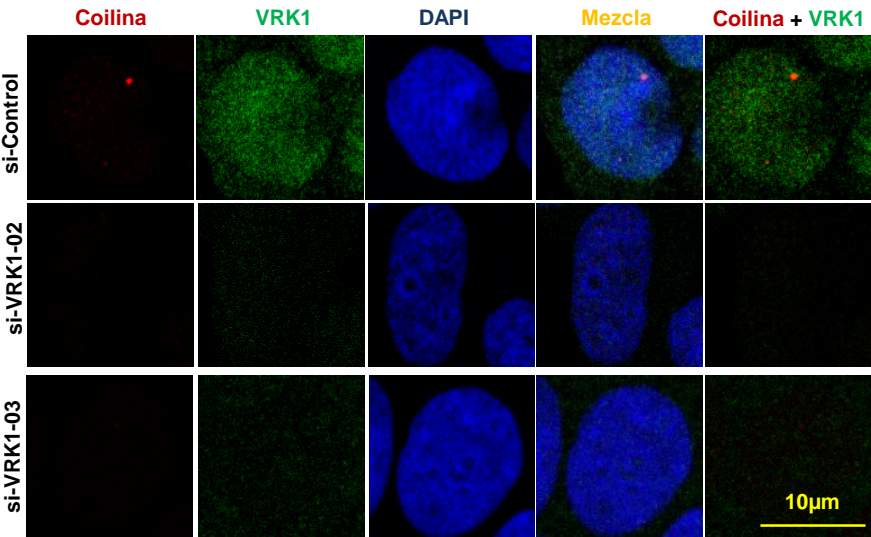
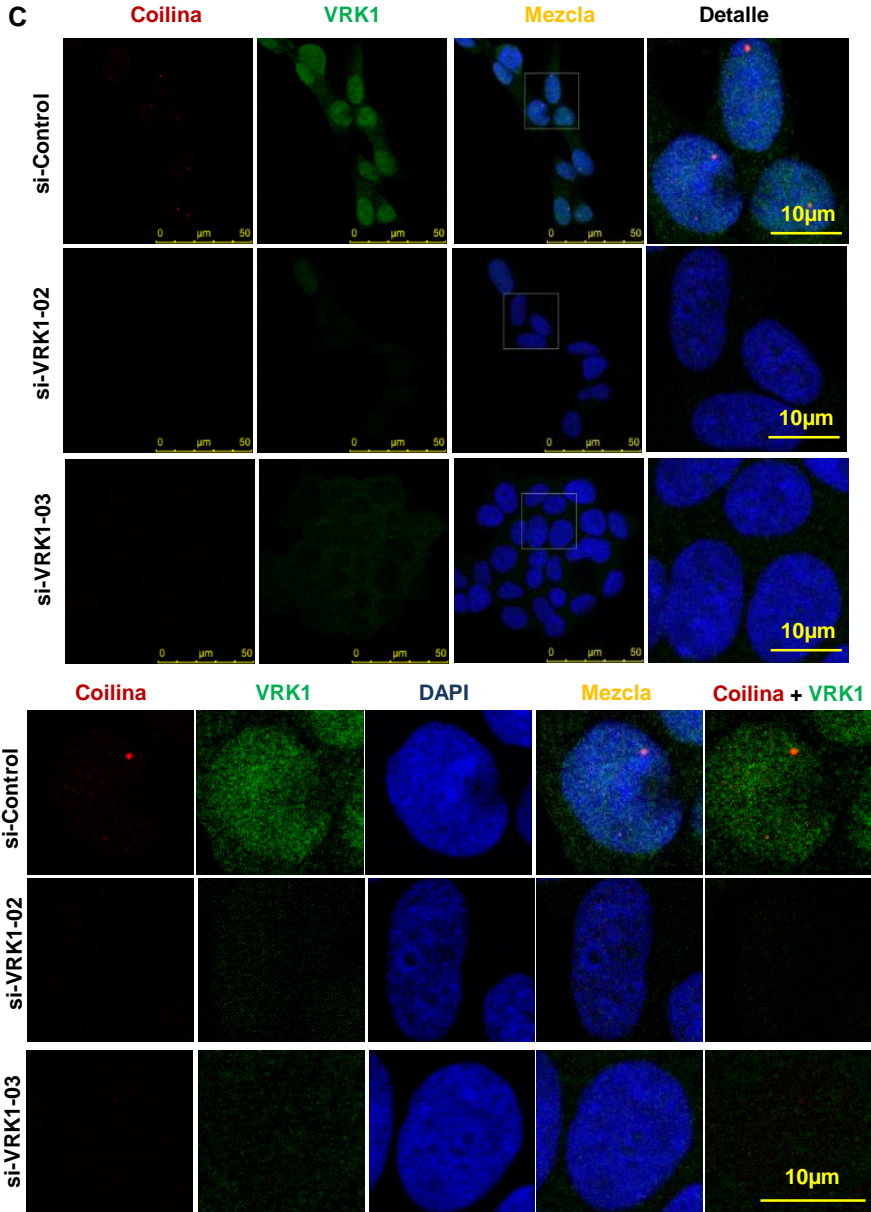


Figura 32: El silenciamiento de VRK1 produce la pérdida de los cuerpos de Cajal. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) a células HeLa **(A)**, MCF-7 **(B)** o SH-SY5Y **(C)** para silenciar a la VRK1. Se utilizaron dos siARN específicos diferentes y un si-Control. Pasadas 72 horas, se fijaron y procesaron las células para su marcaje por inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. La coilina fue detectada con el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta y la quinasa VRK1 con el anticuerpo de Sigma que reconoce la región amino de la proteína. Se cuantificó el porcentaje de células con o sin cuerpos de Cajal (gráficas de abajo). Se realizó un test *t-Student* para estudiar la significancia.* ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$). En el caso de las células SH-SY5Y se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA (diferencia de poblaciones), debido al menor número de células.

En las tres líneas celulares vimos que al silenciar a la quinasa humana VRK1 se producía una pérdida de los cuerpos de Cajal (Figura 32). La señal roja intensa que se veía en las células control correspondiente a estos compartimentos nucleares, dejaba de ser visible en la mayoría de las células, quedando una señal roja débil en el nucleoplasma, casi indetectable, debido a que la coilina produce una señal intensa solamente cuando se encuentra concentrada y oligomerizada formando el cuerpo de Cajal.

Para terminar de confirmar este resultado, quisimos silenciar a VRK1 con otra técnica diferente a la lipofección de siARN. Para ello, infectamos las células con vectores retrovirales que contienen oligonucleótidos que tienen como diana a VRK1 (pSuperior-shVRK1-H1 y pSuperior-shVRK1-H3), silenciándola (Figura 33).

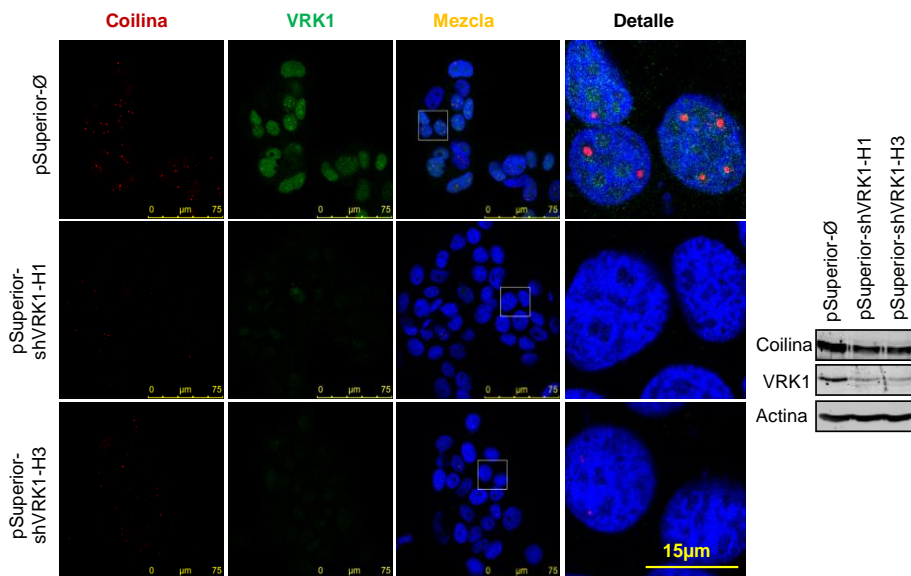


Figura 33: El silenciamiento de VRK1 mediante infección con vectores retrovirales afecta a la formación de los cuerpos de Cajal. Se infectaron células MCF-7 con los vectores retrovirales pSuperior-shVRK1-H1, pSuperior-shVRK1-H3, o con un pSuperior vacío como control. Después de 3 días seleccionando con puomicina, se lisaron las células para comprobar el silenciamiento de VRK1 mediante electroforesis y *Western blot*, y se fijaron las células para su marcaje por inmunofluorescencia. La coilina fue detectada con el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta y la VRK1 con el anticuerpo de Sigma que reconoce la región amino de la proteína.

Para realizar esta técnica se utilizaron como células empaquetadoras de la partícula viral a la línea HEK-293T, y como células diana a la línea de adenocarcinoma de mama MCF-7. Volvimos a ver cómo al silenciar a VRK1, se producía una pérdida de los cuerpos de Cajal (Figura 33), confirmando así que la quinasa humana VRK1 es necesaria para la correcta formación de los cuerpos de Cajal.

1.5. El silenciamiento de la quinasa humana VRK2 no afecta a la formación de los cuerpos de Cajal

Cuando se realizó el chip peptídico en el cual apareció la coilina como sustrato de VRK1 (Sanz-Garcia et al., 2011a), también se obtuvo este resultado con el otro miembro de la familia, VRK2. Esto puede ser debido a que presentan entre ellas una alta homología de su dominio catalítico, que hace que muchas veces compartan sustratos *in vitro*, pero no *in vivo* debido a su diferente localización subcelular.

Sin embargo, antes de seguir estudiando a la quinasa humana VRK1, quisimos descartar que VRK2 pudiera también tener un efecto en la formación de los cuerpos de Cajal. Con este fin se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en las dos líneas que se usarán a lo largo de este trabajo: la línea de adenocarcinoma de cérvix, HeLa, y la línea de adenocarcinoma de mama, MCF-7. Se transfectaron con un siARN específico de VRK2 (si-VRK2-06) o con un siARN sin diana específica (si-Control). Pasadas 96 horas, tiempo necesario para obtener una reducción significativa de la proteína, se lisaron las células para comprobar el silenciamiento de VRK2 mediante electroforesis y *Western blot*, y se fijaron los cubreobjetos redondos para su marcaje y posterior visualización en el microscopio confocal.

Observamos, en ambas líneas, un silenciamiento significativo de la quinasa VRK2, que se detecta en el *Western blot* como una doble banda correspondiente a las dos isoformas: VRK2A y VRK2B (Figura 34). También apreciamos la disminución de la expresión de esta quinasa en el ensayo de inmunofluorescencia. Sin embargo, no se observó ningún efecto en los cuerpos de Cajal, los cuales en todos los casos se detectaron como puntos rojos muy intensos bajo un fondo tenue nuclear. De este modo, concluimos que el silenciamiento de la quinasa VRK2 no afecta a la formación de los cuerpos de Cajal.

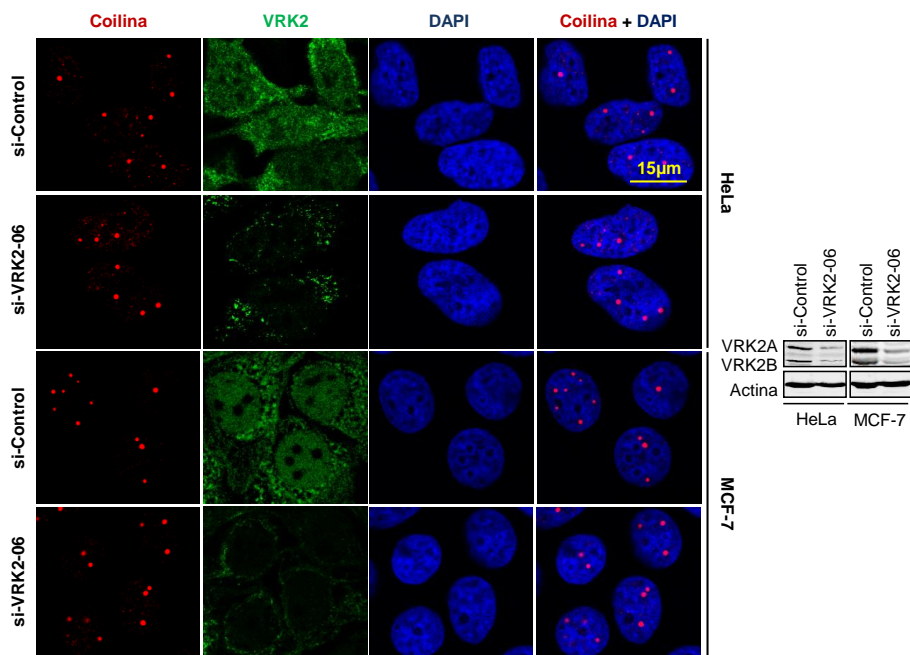
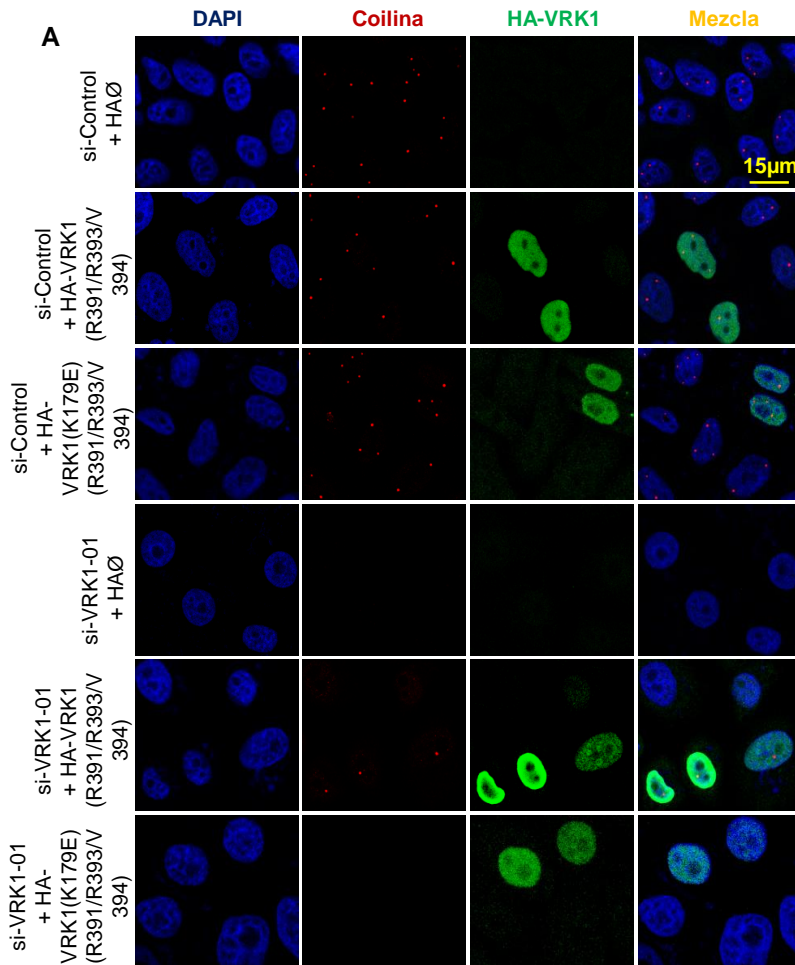


Figura 34: El silenciamiento de VRK2 en las líneas HeLa y MCF-7 no afecta a la formación de los cuerpos de Cajal. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) en células HeLa y MCF-7 para silenciar a la quinasa VRK2. Se utilizó un siARN específico para la quinasa y un si-Control. Pasadas 96 horas, se realizó la lisis para verificar la bajada de expresión de VRK2 (figura derecha) y se procesaron los cubreobjetos para microscopía confocal. La coilina fue detectada con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y la quinasa VRK2 con un anticuerpo policlonal de fabricación propia en el laboratorio.

1.6. La actividad quinasa de VRK1 es necesaria para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal

Debido a que VRK1 es una quinasa regulada durante el ciclo celular (Valbuena et al., 2008), y además fosforila a la coilina en múltiples residuos (Sanz-Garcia et al., 2011a), quisimos averiguar si la actividad quinasa de VRK1 era necesaria para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Para responder a esta pregunta, se realizó un ensayo de rescate de fenotipo en la línea celular HeLa. En primer lugar, se silenció a la VRK1 endógena con un siARN específico (si-VRK1-01), y, 36 horas después, se transfectó el plásmido pCEFL-HA-VRK1 (R391/R393/V394), el cual contiene tres mutaciones que lo hacen resistente al siARN añadido anteriormente. Se transfectó tanto la HA-VRK1 (R391/R393/V394) silvestre como la quinasa inactiva HA-VRK1 (K179E) (R391/R393/V394). Pasadas 36 horas más, se lisaron las células para comprobar el silenciamiento de VRK1 y la sobreexpresión de las HA-VRK1 (Figura 35 B), y se procesaron las células para inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los resultados mostraron nuevamente que, al silenciar VRK1, se producía la pérdida de

los cuerpos de Cajal (Figura 35 A), de tal forma que en las células control casi el 100% contenían CBs mientras que al silenciar a la quinasa, solamente un 20% de células aproximadamente contenía dichos orgánulos (Figura 35 C). Al sobreexpresar de nuevo la quinasa silvestre volvíamos a detectar a estos suborgánulos nucleares en casi el 100% de las células, del mismo modo que en la población control, sin embargo, la sobreexpresión de la quinasa inactiva no lograba rescatar el fenotipo, afirmando que es necesaria la actividad quinasa de VRK1 para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal (Figura 35).



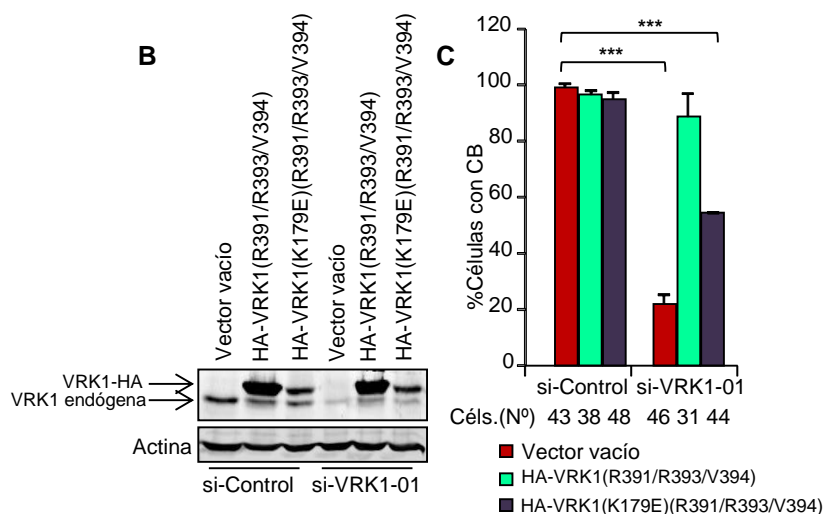


Figura 35: Rescate de fenotipo en la línea celular HeLa. **A.** Células HeLa fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-01), o con un siARN control. Pasadas 36 horas, se transfectaron las células con los plásmidos pCEFL-HAØ, pCEFL-HA-VRK1 (R391/R393/V394) o pCEFL-HA-VRK1 (K179E) (R391/R393/V394), plásmidos con mutaciones silenciosas que los hacen resistentes al si-VRK1-01. 36 horas después, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas mediante *Western blot* (**B**) y se procesaron las células para microscopía confocal. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta para detectar a la coilina y el anticuerpo policlonal α -HA para detectar a VRK1. **C.** Cuantificación del porcentaje de células con cuerpos de Cajal. Se utilizó el programa *ImageJ* para el conteo y se realizó una prueba *t-Student* para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

Este resultado se quiso confirmar mediante un nuevo ensayo de rescate de fenotipo, pero esta vez con la quinasa VRK1 murina, la cual no se degrada con el siARN de la VRK1 humana. En primer lugar, quisimos comprobar mediante un ensayo de fosforilación *in vitro*, si la quinasa murina era capaz de fosforilar el residuo serina 184 de la coilina, al igual que hacía la VRK1 humana.

Para ello se transfectaron células HEK-293T y HeLa con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pCMV6-mVRK1-Myc-Flag (tanto la quinasa murina silvestre como la quinasa murina inactiva K179E). Se inmunoprecipitó a la VRK1 y a la coilina y se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro*, habiendo desfosforilado previamente a la coilina antes de utilizarla como sustrato, con el fin de evitar señales inespecíficas. En ambas líneas celulares se observó que la VRK1 murina silvestre era capaz de fosforilar el residuo serina 184 de la coilina *in vitro*, no así la quinasa inactiva (Figura 36). De este modo confirmamos que la quinasa VRK1 murina es capaz de fosforilar a la coilina *in vitro*.

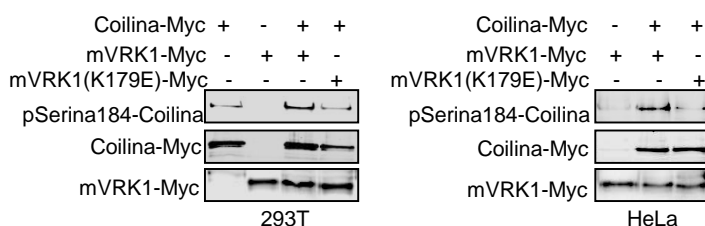


Figura 36: La quinasa VRK1 murina fosforila el residuo serina 184 de la coilina *in vitro*. Células HEK-293T (panel izquierdo) y HeLa (panel derecho) fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pCMV6-mVRK1-Myc (silvestre y quinasa inactiva K179E). Se inmunoprecipitó por separado tanto a la VRK1 como a la coilina, que fue utilizada como sustrato, previamente desfosforilada. Se detectó la fosforilación de la coilina con el anticuerpo α -Coilina pSer184 de *Antibody Production Services Ltd*.

Una vez supimos que la quinasa murina fosforilaba a la coilina, hicimos el ensayo de rescate de fenotipo utilizando la construcción pCMV6-mVRK1-Myc-Flag, la cual es resistente al si-VRK1-02. Igual que en el ensayo de rescate de fenotipo anterior, al silenciar a la quinasa humana VRK1 se produce la desaparición de los cuerpos de Cajal, quedando solamente un 10-20% de células con estos suborgánulos (Figura 37 A y C). Cuando sobreexpresamos la quinasa silvestre murina, recuperamos la formación de los CBs en un 80% de las células, igualándose a la población de células control. Sin embargo, la sobreexpresión de la quinasa murina inactiva no logró recuperar la formación de los cuerpos de Cajal, confirmándose nuevamente que la actividad quinasa de VRK1 es esencial para el ensamblaje de los cuerpos de Cajal (Figura 37).

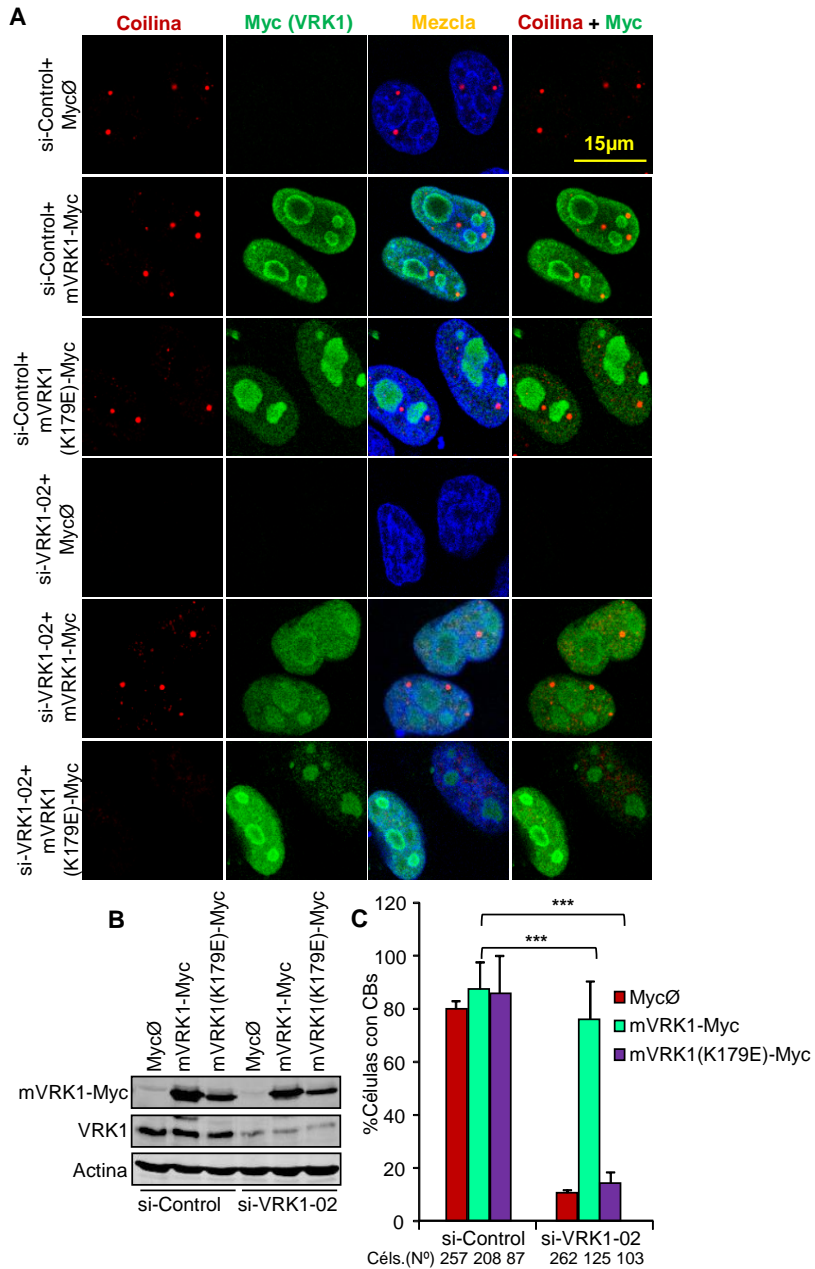


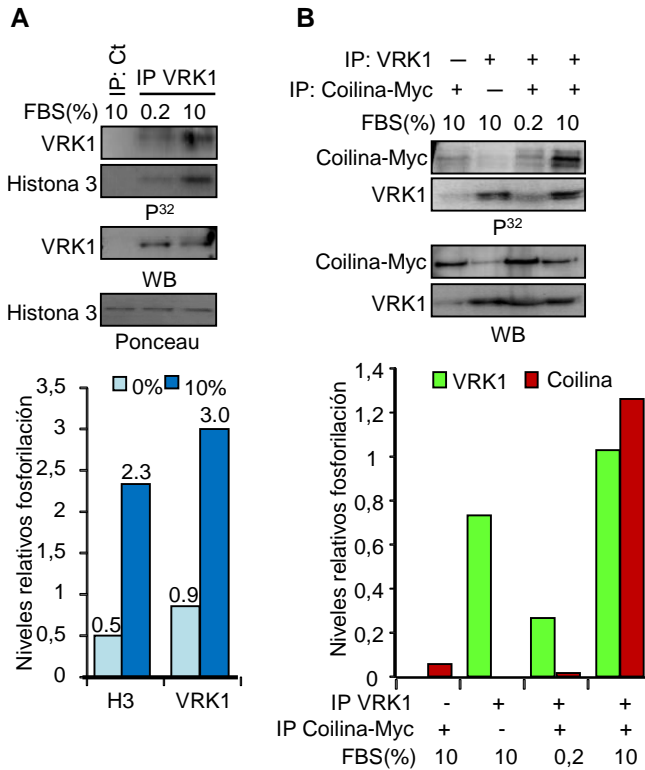
Figura 37: Rescate de fenotipo con la quinasa VRK1 murina. Células HeLa fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02), o con un siARN control. Pasadas 36 horas, se transfectaron las células con los plásmidos pCMV6-mVRK1-Myc-Flag (silvestre o K179E). 36 horas después, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas mediante *Western blot* (**B**) y se procesaron las células para microscopía confocal (**A**). Se utilizó el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta para detectar a la coilina y el anticuerpo policlonal α -Myc para detectar a la quinasa VRK1. **C.** Cuantificación del porcentaje de células con cuerpos de Cajal. Se utilizó el programa *ImageJ* para el conteo y se realizó una prueba *t-Student* para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

1.7. La fosforilación del residuo serina 184 de la coilina está asociada a la actividad de VRK1 en células en proliferación

Tanto VRK1 como coilina son proteínas que se encuentran reguladas durante el ciclo celular. Por un lado, como se explicó en la introducción de este trabajo, VRK1 es necesaria para la salida de la fase G0 y la entrada en G1, aumentando tanto sus niveles como su actividad en esta fase del ciclo y llegando a su nivel máximo en la fase G2/M, facilitando la condensación de la cromatina (Kang et al., 2007; Klerkx et al., 2009; Valbuena et al., 2008; Valbuena et al., 2011b). Por otro lado, está descrito que los cuerpos de Cajal son una estructura dinámica durante el ciclo celular, de tal forma que la hiperfosforilación de la coilina produce el desensamblaje de los CBs durante la mitosis, y vuelven a formarse en la fase G1 intermedia o tardía del ciclo celular (Andrade et al., 1993).

Quisimos estudiar más a fondo el residuo de fosforilación serina 184 de la coilina en células en proliferación. Para ver si VRK1 tenía algún efecto en la fosforilación de este residuo dependiendo del estado proliferativo, se realizaron, en primer lugar, ensayos quinasa en células MCF-7 en presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo. Se inmunoprecipitó la VRK1 endógena con el anticuerpo monoclonal 1F6 y se estudió la fosforilación de un sustrato ya conocido, como la histona H3, y de la coilina, nuestro sustrato de interés. Observamos que en condiciones de ausencia de suero, la actividad de VRK1, medida por su capacidad de autofosforilación, disminuye drásticamente, lo que conlleva a una menor fosforilación de sus sustratos, la histona H3 (Figura 38 A) y la coilina (Figura 38 B). Debido a que la actividad de VRK1 es menor en células privadas de suero en el medio de cultivo, lo siguiente que quisimos determinar fue si, al igual que ocurre al silenciar a VRK1, también se producía una pérdida de los cuerpos de Cajal al eliminar el suero de las células. Así, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el que se transfectaron células MCF-7 con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02), un siARN control sin diana específica o a las que se les eliminó el suero del medio (0,2% FBS) durante 4 días, para conseguir una parada eficiente del ciclo en G0. Se observó el mismo efecto tanto en células silenciadas para VRK1 (Figura 38 C y D) como en células paradas en G0 (Figura 38 E): en ambos casos se perdió el ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Por último, quisimos comprobar qué sucedía con la serina 184 de la coilina en ambas condiciones. Para este fin, se transfectaron células HeLa y MCF-7 con un siARN específico para VRK1, un siARN control o se dejaron sin suero durante 4 días. Pasado este tiempo, se lisaron las células y se comprobó la expresión de las proteínas en los extractos nucleares mediante electroforesis y *Western blot*. Como se

esperaba, los niveles de coilina total permanecieron constantes en las distintas condiciones, sin embargo, tanto al silenciar a VRK1 como al eliminar el suero a las células, se producía una disminución drástica del residuo de fosforilación serina 184 de la coilina (Figura 38 F). Con todos estos resultados, podemos concluir que el residuo serina 184 de la coilina se ve afectado por VRK1, ya sea al silenciarla o al disminuir su actividad en células paradas, y que, además, la pérdida de cuerpos de Cajal en estas células paradas es debida, en parte, a una menor actividad de VRK1.



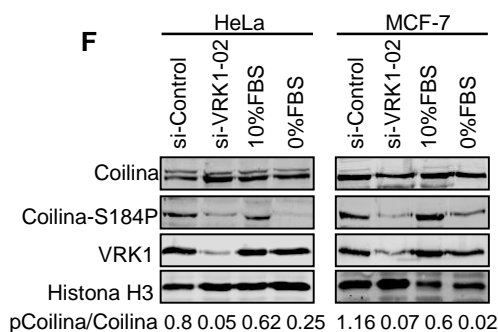
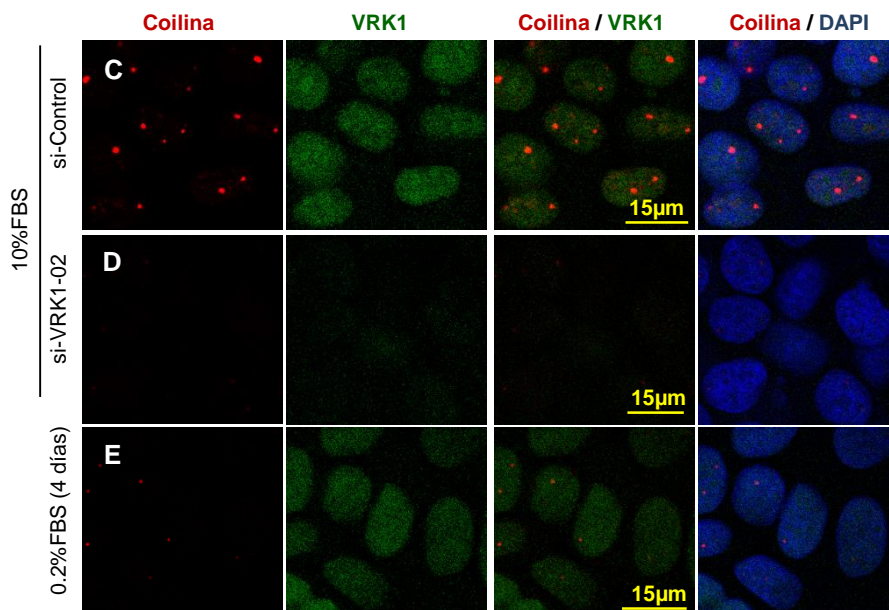


Figura 38: La fosforilación de la coilina en el residuo serina 184 está asociada a la actividad de VRK1 en células en proliferación. **A.** Fosforilación de la histona H3 por VRK1 en presencia o ausencia de suero. Se inmunoprecipitó VRK1 en células MCF-7 con el anticuerpo monoclonal 1F6 y se realizó un ensayo quinasa con γ^{32} ATP, utilizando la histona H3 purificada como sustrato. Para realizar el control de IP se utilizó el anticuerpo policlonal VE de VRK1 y la técnica del *Ponceau* para la histona H3. **B.** Fosforilación de la coilina por VRK1 en presencia o ausencia de suero. Células MCF-7 fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y, 24 horas después, se eliminó el suero del medio de cultivo durante 4 días. Se realizó un ensayo quinasa con γ^{32} ATP, en el que inmunoprecipitamos a VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1F6 y a la coilina con un anticuerpo α -Myc. Se trató la IP de la coilina con fosfatasa para eliminar señales inespecíficas. Para el control de inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo policlonal VE de VRK1 y un anticuerpo α -Myc para la coilina. **C.D.E.** Efecto del silenciamiento de VRK1 o la parada de ciclo en los cuerpos de Cajal. Células MCF-7 fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02), un siARN control (si-Control) o fueron dejadas 4 días sin suero en el medio. Se procesaron las células para microscopía confocal. Se detectó a la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal de Sigma que reconoce la región amino. **F.** Células MCF-7 fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02), un siARN control (si-Control) o fueron dejadas 4 días sin suero en el medio. Se lisaron las células para obtener extractos nucleares y se analizaron las proteínas de interés mediante electroforesis y *Western blot*.

Finalmente, realizamos ensayos *in vitro* para analizar la fosforilación específica de VRK1 sobre el residuo serina 184 de la coilina en células en presencia o ausencia de suero. Con este fin, se transfectaron células MCF-7 con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y se dejaron sin suero durante 4 días. Pasado este tiempo, se inmunoprecipitó a la VRK1 endógena por un lado, y a la Coilina-Myc por otro lado. Esta última se trató con fosfatasas para eliminar cualquier fosforilación previa y se realizó un ensayo *in vitro* poniéndola como sustrato. Observamos que VRK1 solo es capaz de fosforilar a este residuo en células en proliferación, y no en células paradas por ausencia de suero, en las cuales la actividad de VRK1 está disminuida (Figura 39). De este modo volvemos a confirmar el resultado anterior.

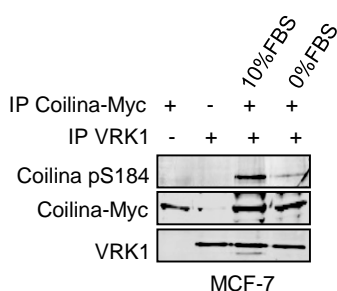


Figura 39: Fosforilación del residuo serina 184 de la coilina por la quinasa VRK1 en células privadas de suero. Células MCF-7 fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y, 24 horas después, se eliminó el suero del medio de cultivo durante 4 días. Se realizó un ensayo *in vitro*, en el que inmunoprecipitamos a VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1F6 y a la coilina con un anticuerpo α -Myc. Se trató la IP de la coilina con fosfatasas durante 20 minutos a 30°C para eliminar fosforilaciones previas. La fosforilación en el residuo serina 184 de la coilina se detectó con el anticuerpo policlonal α -Coilina pSer184.

1.8. La fosforilación de la coilina en el residuo serina 184 se produce antes del ensamblaje de los cuerpos de Cajal

Quisimos estudiar si el residuo serina 184 de la coilina se encontraba fosforilado en los cuerpos de Cajal y si VRK1 colocalizaba con éste. Para ello se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en las líneas celulares HeLa y MCF-7, dónde se detectó la coilina total, la coilina fosforilada en el residuo serina 184 y la quinasa VRK1.

Se observó que en ambas líneas celulares el residuo fosforilado se detectaba solamente en los cuerpos de Cajal, sin embargo, no todos los cuerpos de Cajal lo contenían (Figura 40 A). Además, VRK1 se detecta solamente en el nucleoplasma y no colocaliza con la serina 184 fosforilada (Figura 40 B). Estos datos nos indican que este residuo se fosforila antes del ensamblaje de los CBs y que, una vez formado el cuerpo de Cajal puede desfosforilarse, no siendo esencial para el mantenimiento de éste. Para ver la colocalización más en detalle, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de una célula mediante la generación de una línea que la atraviesa y va marcando la intensidad de cada láser del microscopio confocal (Figura 40, gráficos a la derecha).

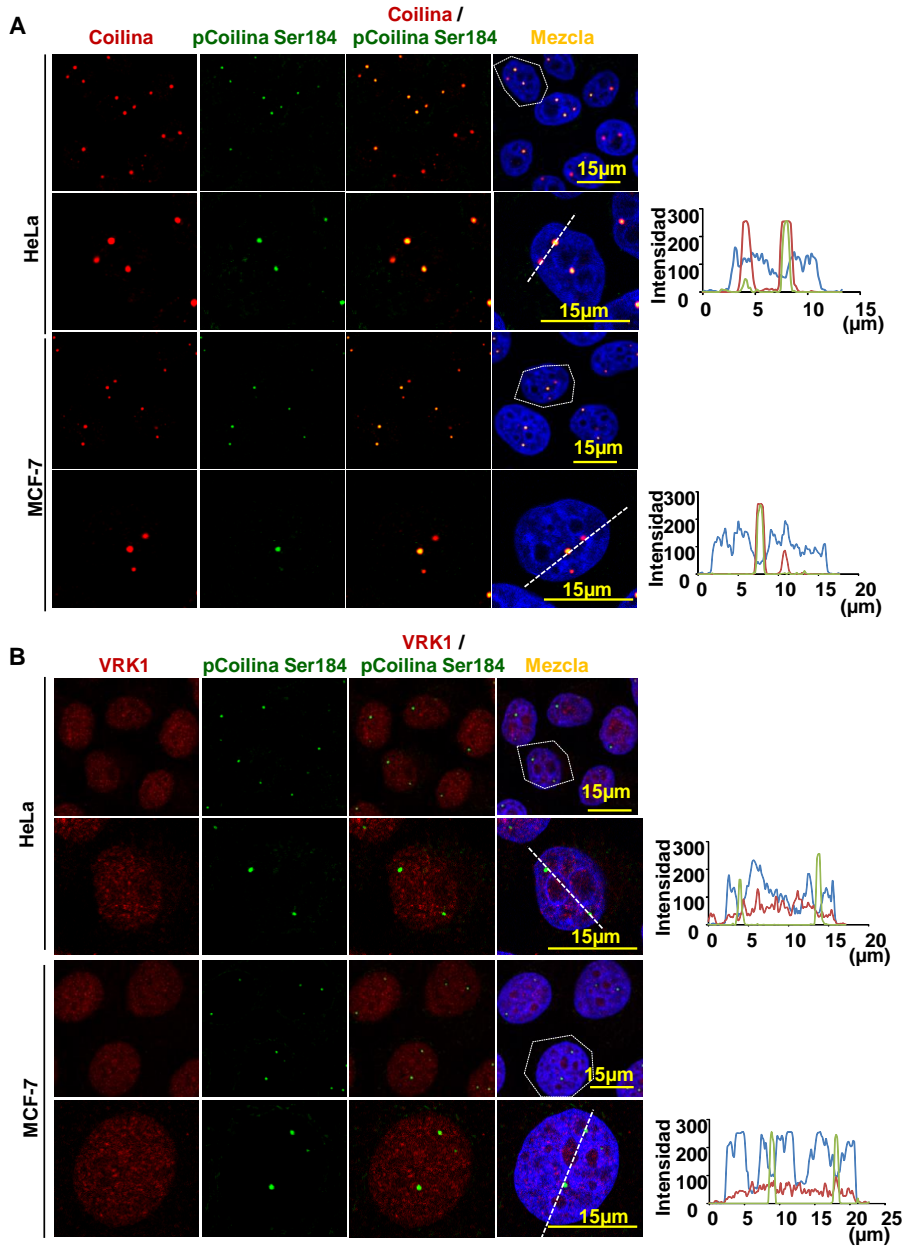


Figura 40: Colocalización de coilina total o fosforilada en el residuo serina 184 y VRK1. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en las líneas celulares HeLa y MCF-7, donde se detectó la coilina total y la coilina fosforilada en el residuo serina 184 (**A**), o la VRK1 junto con la coilina fosforilada en la serina 184 (**B**). Se utilizó el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz para la coilina total, el anticuerpo policlonal coilina pSer184, y el anticuerpo de fabricación propia 1B5 para detectar a VRK1. Se cuantificó en detalle el nivel de fluorescencia de una célula para observar la colocalización.

Posteriormente, nos propusimos determinar si este residuo de fosforilación estaba asociado a la progresión del ciclo celular. Con este fin, células HeLa fueron sometidas a un tratamiento de sincronización con timidina-nocodazol. De este modo, tenemos células a las que se ha privado de suero (FBS) en el medio de cultivo (fase G0), a células con medio de cultivo completo con 10% FBS, células a las que se ha tratado durante 24 horas con timidina (fase S), células con tratamiento de timidina seguido de tratamiento con nocodazol (G2/M) y, finalmente, células a las que se ha liberado del nocodazol y las cuales se han ido recogiendo a diferentes tiempos para obtener las distintas fases del ciclo celular hasta volver a llegar a la fase G1 (Figura 41).

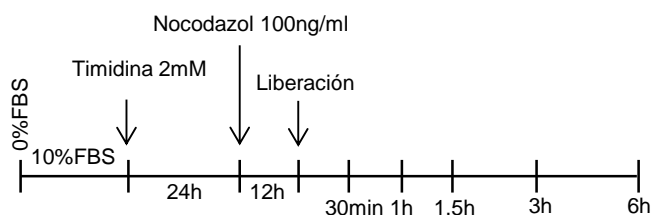
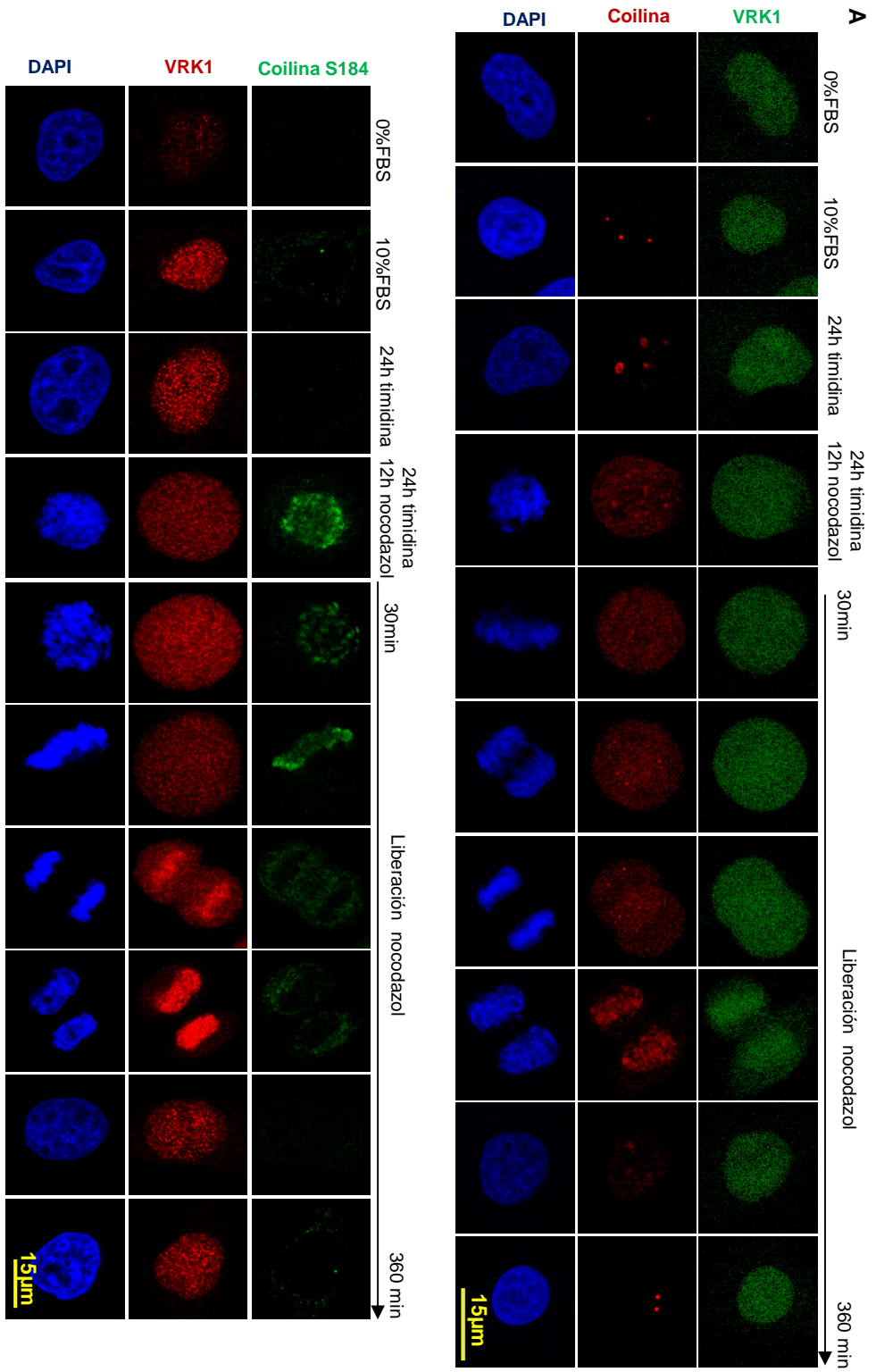


Figura 41: Esquema del protocolo de sincronización de células HeLa con timidina-nocodazol. Células HeLa fueron privadas de suero durante 3 días, mantenidas al 10% de suero, tratadas con timidina durante 24 horas o tratadas con timidina 24 horas más 12 horas de nocodazol. Estas últimas se liberaron y se recogieron puntos a diferentes tiempos.

De este tratamiento se procesaron cubreobjetos redondos para inmunofluorescencia y visualización por microscopía confocal (Figura 42 A) y se recogieron células para su lisis (Figura 42 B). Observamos que el patrón entre coilina y pSer184-coilina se invierte durante el ciclo, de tal forma que en fase G0, tal y como se describe en la bibliografía (Andrade et al., 1993), no se observan cuerpos de Cajal o son muy pequeños; en fase G1 se distinguen claramente los cuerpos de Cajal y, en la fase S del ciclo alcanzan su máximo tamaño. Sin embargo, una vez la célula entra en mitosis, los CBs se desensamblan, perdiéndose la señal. Es entonces cuando se detecta la señal de la coilina fosforilada en el residuo serina 184, la cual perdura hasta que las células vuelven a entrar en fase G1. En este punto, la fosforilación desaparece y volvemos a observar a la coilina formando nuevos cuerpos de Cajal. Así, podemos concluir, como en el apartado anterior, que el residuo serina 184 de la coilina, el cual es esencial para el ensamblaje de los CBs pero no para su mantenimiento, está fosforilado durante la mitosis y, una vez las células entran en la fase G1 del ciclo y vuelven a formar cuerpos de Cajal, éste se defosforila por un mecanismo aún desconocido.



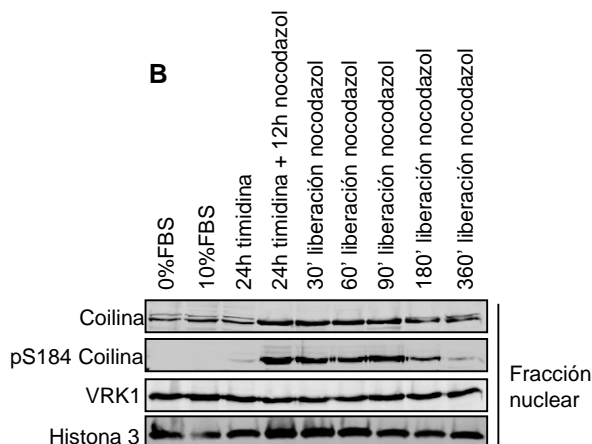


Figura 42: Coilina total y fosforilada en el residuo serina 184 durante el ciclo celular. **A.** Después del tratamiento explicado en la figura 41, se procesaron cubreobjetos de cada punto para marcar por inmunofluorescencia y poderlos observar en el microscopio confocal. Se detectó la coilina total con el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz Pdelta, la coilina fosforilada con el anticuerpo policlonal de *Antibody Production Services Ltd*, y VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1B5 de fabricación propia o con el anticuerpo policlonal de Sigma. **B.** Después del mismo tratamiento, se lisaron las células para obtener extractos nucleares. Se detectó la coilina total con el anticuerpo policlonal de Santa Cruz H-300, la coilina fosforilada con el anticuerpo policlonal de *Antibody Production Services Ltd*, la VRK1 con el anticuerpo policlonal de fabricación propia VC y como control de carga se marcó la histona H3, la cual se detectó con un anticuerpo policlonal de *Cell Signaling*.

2. Degradación de la coilina en el proteasoma

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

Para estudiar el posible mecanismo por el cual VRK1 regula el desensamblaje de los cuerpos de Cajal, lo primero que nos planteamos fue observar los niveles proteicos de la coilina al silenciar la quinasa, y si éstos se afectaban. Con este fin, silenciamos células HeLa con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control (si-Control). Se realizaron extractos nucleares y se detectaron la coilina y la VRK1 endógenas. Además, se marcó la histona H3 como control de carga.

Pudimos observar cómo, a los tres días de silenciamiento, se producía una bajada significativa de los niveles de VRK1, mientras los niveles de coilina permanecían estables. Sin embargo, al prolongar el silenciamiento 48 horas más, momento en el que ya no se detecta a VRK1, se produce también una bajada drástica de los niveles proteicos de coilina (Figura 43 A).

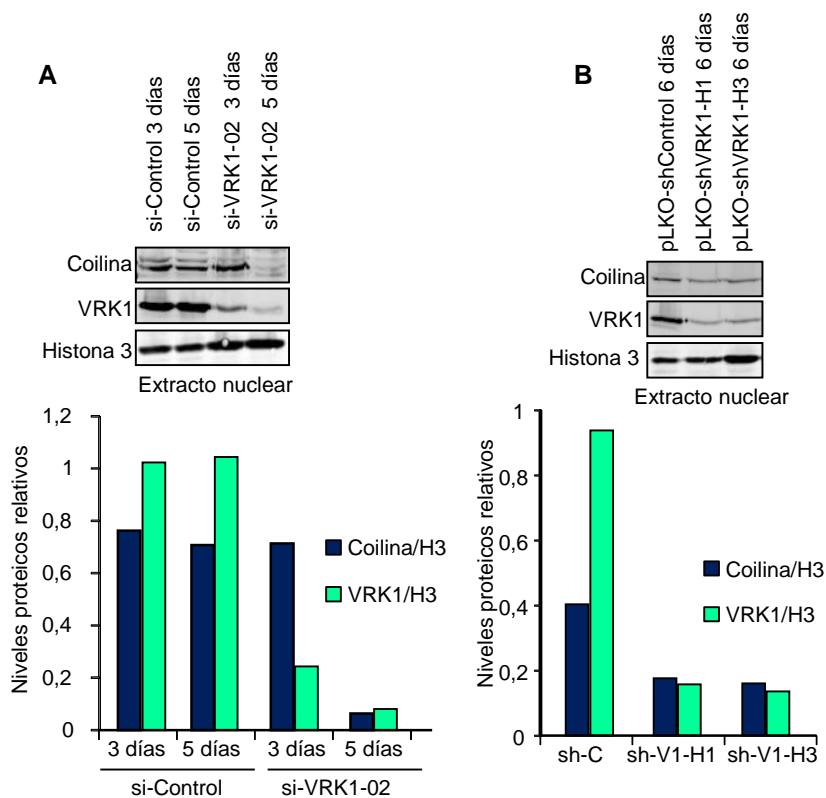


Figura 43: El silenciamiento de VRK1 durante 5 días produce una reducción de los niveles proteicos de coilina. **A.** Se silenció a VRK1 en la línea celular HeLa con un siARN específico (si-VRK1-02) y se lisaron las células a los 3 y 5 días post-transfección. Posteriormente, se realizó un fraccionamiento nuclear para detectar a la coilina. Se analizó la expresión de las proteínas de interés mediante electroforesis y *Western blot*. Se utilizó a la histona H3 como control de carga nuclear. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina y VRK1 para mejor visualización de los resultados (gráfica abajo). **B.** Células MCF-7 fueron infectadas con los vectores lentivirales pLKO (pLKO-shControl, pLKO-shVRK1-H1 y pLKO-shVRK1-H3). Después de 6 días de infección, se realizó un fraccionamiento nuclear para detectar a la coilina. Se utilizó a la histona H3 como control de carga nuclear. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina y VRK1 para mejor visualización de los resultados (gráfica abajo).

Para confirmar este resultado, quisimos silenciar a VRK1 por medio de una infección lentiviral en la línea MCF-7. En este caso, se utilizó un vector lentiviral control y dos vectores lentivirales con oligonucleótidos específicos para VRK1 (pLKO-shVRK1-H1 y pLKO-shVRK1-H3), y se dejó la infección durante 6 días, seleccionando a la población de células infectadas con puromicina. Pasado este tiempo, se realizó un fraccionamiento nuclear donde analizamos mediante electroforesis y *Western blot* a la coilina y a VRK1, utilizando como en el caso anterior a la histona H3 como control de carga (Figura 43 B). Volvimos a obtener el mismo resultado que en el ensayo de

silenciamiento por siARN: al silenciar a la quinasa humana VRK1 durante 6 días, los niveles proteicos de coilina disminuyen significativamente.

Finalmente, quisimos investigar este efecto en las líneas usadas anteriormente, HeLa y MCF-7, aunque esta vez utilizando más de un siARN para VRK1. En este caso, ambas líneas fueron transfectadas con tres siARN específicos para VRK1: si-VRK1-02, si-VRK1-03 y si-VRK1-09. Se dejó el silenciamiento durante 5 días y se lisaron con un tampón de lisis suave para detectar los niveles proteicos de coilina y VRK1 mediante electroforesis y *Western blot* (Figura 44). Observamos el mismo efecto que en los dos casos anteriores, confirmando el resultado de que el silenciamiento de VRK1 produce la disminución de los niveles proteicos de coilina.

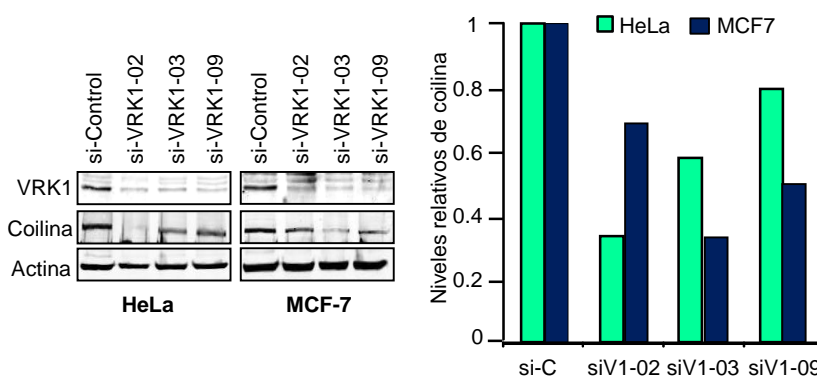


Figura 44: El silenciamiento de VRK1 durante 5 días produce una reducción de los niveles proteicos de coilina. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) a células HeLa y MCF-7 para silenciar a VRK1. Se utilizaron tres siARN específicos diferentes (si-VRK1-02, si-VRK1-03 y si-VRK1-09) y un si-Control. Pasados 5 días, se lisaron las células y se detectaron los niveles proteicos de coilina y VRK1 mediante electroforesis y *Western blot*. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina para una mejor visualización de los resultados (gráfico derecha).

2.2. El silenciamiento de VRK1 no afecta a la expresión de la coilina

El efecto del silenciamiento de VRK1 sobre los niveles proteicos de coilina podía deberse a dos motivos: el primero, que VRK1 estuviera afectando a la expresión del gen de la coilina y, el segundo, que VRK1 afectara a la estabilidad de la proteína de manera postraduccional.

Con el fin de estudiar la primera hipótesis, se realizaron ensayos de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) para determinar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de la coilina. Para ello, se silenciaron células HeLa y MCF-7 con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03) o con un siARN sin diana específica (si-

Control). Pasadas 72 horas, se realizó la extracción del ARN total. En ambas líneas celulares, los oligonucleótidos de VRK1 disminuyeron los niveles de ARNm de la quinasa de manera eficiente (Figura 45). Sin embargo, no se observaron variaciones en los niveles de ARNm de coilina, los cuales permanecieron sin cambios respecto a la condición control (Figura 45). Concluimos, por lo tanto, que VRK1 no regula la transcripción del gen de la coilina.

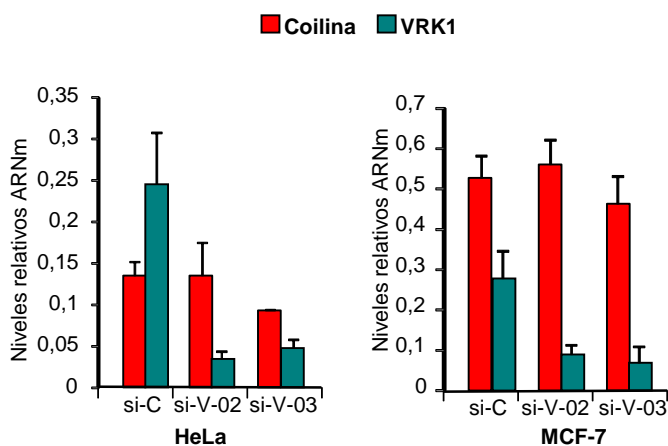


Figura 45: El silenciamiento de VRK1 no afecta a los niveles de ARNm de la coilina. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) en células HeLa y MCF-7 para silenciar VRK1. Se utilizaron dos siARN específicos diferentes y un siARN control. Pasadas 72 horas, se realizó la extracción del ARN total (*RNeasy extraction kit*, Qiagen) y se cuantificaron las muestras. Posteriormente, se realizó la qRT-PCR (*SyberGreen kit*), y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para la *GAPDH*, utilizada como control.

Debido a que el efecto en los niveles proteicos de coilina se produce 5 días después del silenciamiento de VRK1 (Figura 43 A), quisimos investigar si el efecto en la transcripción se estuviera produciendo en este rango de tiempo, y ese fuera el motivo por el que no lo observáramos en el ensayo anterior. Así, se realizaron nuevamente ensayos de qRT-PCR en las líneas celulares HeLa y MCF-7, pero esta vez dejando el silenciamiento, además de 72 horas para comparar con el ensayo anterior, 5 días, momento en el que se produce la disminución de los niveles proteicos de la coilina. Se transfectaron células HeLa y MCF-7 con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03), con un siARN sin diana específica (si-Control) y, en esta ocasión, añadimos un punto donde las células fueron mantenidas sin suero, como control de parada de ciclo. Pasados 3 o 5 días, se realizó la extracción del ARN total.

Observamos que los dos oligonucleótidos frente a VRK1 disminuyen de manera eficaz los niveles de ARNm de la quinasa a los 3 o 5 días de silenciamiento. Sin embargo, los niveles de ARNm de la coilina siguen permaneciendo constantes, tanto en los

puntos silenciados como en el punto sin suero, correspondiente a células paradas, donde la actividad de VRK1 está reducida (Figura 46). De esta manera confirmamos que la quinasa humana VRK1 no regula la transcripción del gen de la coilina.

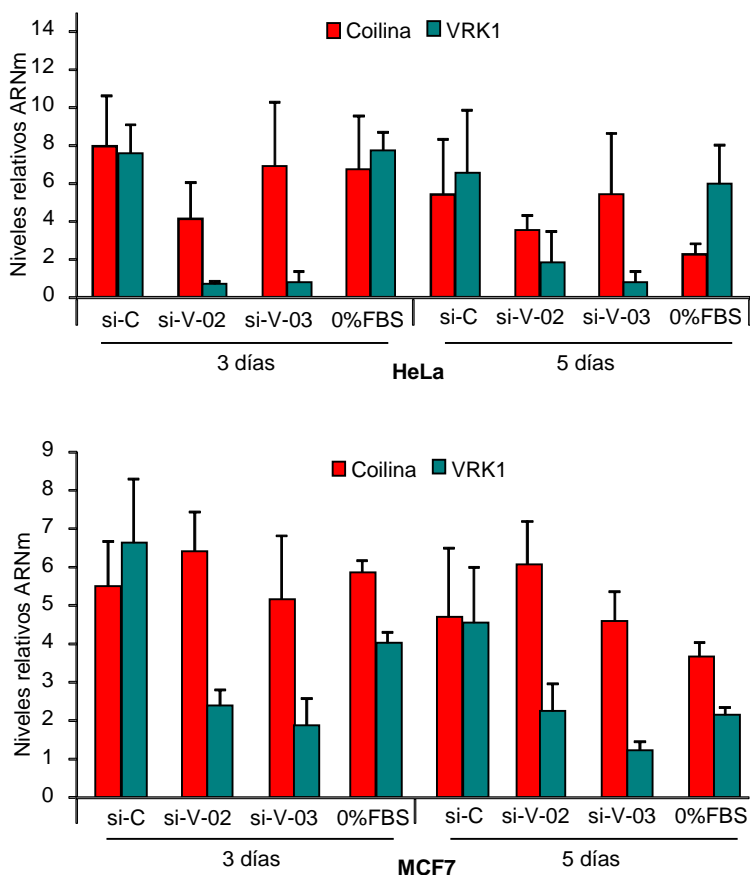


Figura 46: El silenciamiento de VRK1 no afecta a los niveles de ARNm de la coilina a los 5 días de silenciamiento o en células privadas de suero. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) en células HeLa y MCF-7 para silenciar a VRK1 o se retiró el suero del medio de cultivo. Se utilizaron dos siARN específicos diferentes y un siARN control. Pasados 3 o 5 días, se realizó la extracción del ARN total (*RNeasy extraction kit*), y se cuantificaron las muestras. Posteriormente, se realizó la qRT-PCR (*SyberGreen kit*), y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para la *GAPDH*, utilizada como control.

Finalmente, para confirmar estos resultados, se transfectaron células HeLa con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag, el cual expresa la coilina desde un promotor diferente. En este caso, el silenciamiento de la VRK1 endógena con el siARN específico (si-VRK1-02) produjo una disminución de los niveles de proteína transfectada (Figura 47), volviendo a concluir que la quinasa VRK1 no afecta a nivel transcripcional a la coilina.

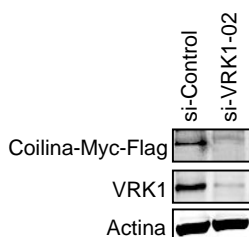
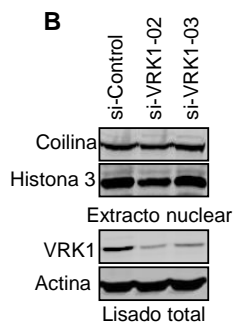
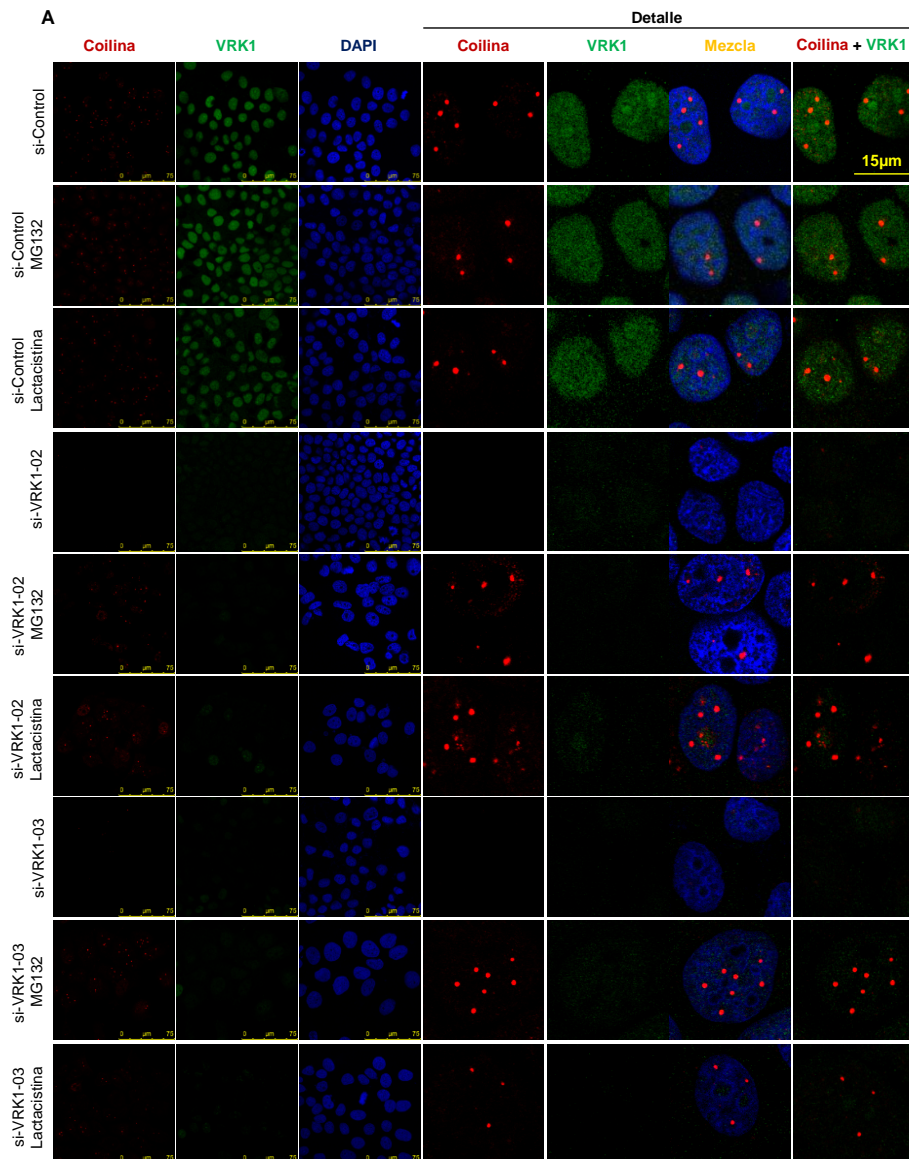


Figura 47: El silenciamiento de VRK1 produce la reducción de los niveles de coilina transfectada. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) en células HeLa con el fin de silenciar a VRK1. Se utilizó un siARN específico o un siARN control. Pasadas 24 horas, se transfeció el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y, 48 horas después, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas mediante electroforesis y *Western blot*. Se utilizó a la actina como control de carga.

2.3. Los inhibidores del proteasoma revierten el efecto producido por el silenciamiento de VRK1

Debido a que VRK1 no afectaba a la coilina a nivel transcripcional, cabía la posibilidad de que tuviese un papel importante en su regulación postraduccional. Quisimos estudiar si, de alguna manera, la fosforilación de la coilina por VRK1 estuviera protegiéndola de su degradación proteolítica. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia donde silenciamos a VRK1 y añadimos inhibidores del proteasoma. Más en detalle, se silenció a la quinasa humana VRK1 con dos siARN específicos durante 72 horas, momento en el que vemos el efecto en el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, y posteriormente, añadimos dos inhibidores del proteasoma: el MG132 (un inhibidor reversible) a 35 μ M, y la lactacistina (un inhibidor irreversible) a 5 μ M. Por un lado, se procesaron los cubreobjetos redondos para inmunofluorescencia donde se marcaron la coilina y la VRK1 endógenas (Figura 48 A), y, por otro lado, se lisaron las células para comprobar por *Western blot* el correcto silenciamiento de la quinasa (Figura 48 B).

Los dos siARN silenciaron de forma eficaz a la quinasa tras 72 horas, mantendiéndose constantes los niveles de coilina, detectados en la fracción nuclear con la histona H3 como control de carga. (Figura 48 B). Observamos en primer lugar cómo de nuevo, al silenciar a la quinasa humana VRK1, se producía una pérdida de los cuerpos de Cajal. Este efecto, sin embargo, era revertido al añadir los inhibidores del proteasoma, tanto el MG132 como la lactacistina (Figura 48 A). En ambos casos, se volvía a detectar el marcaje de la coilina igual que en las condiciones control, concluyendo que los inhibidores del proteasoma eran capaces de prevenir el desensamblaje de los cuerpos de Cajal provocado por el silenciamiento de VRK1.



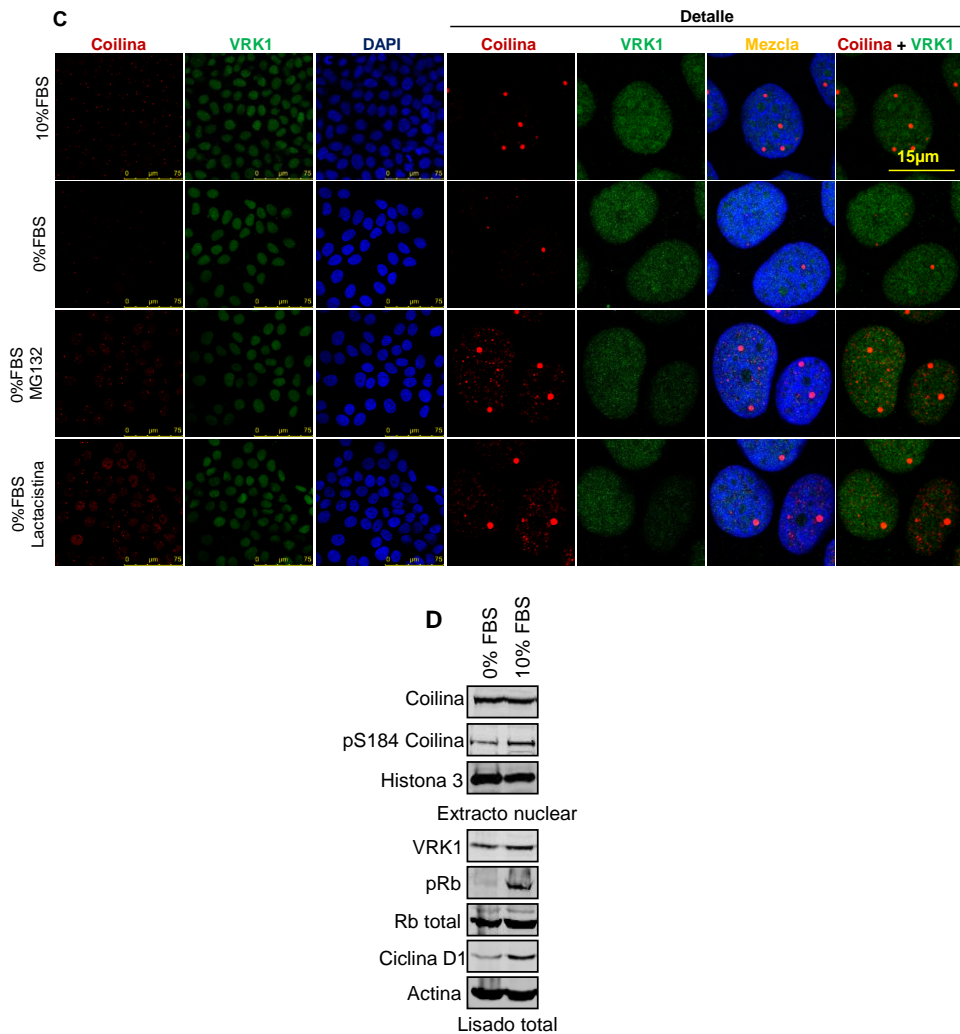


Figura 48: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 o por su inactividad en células paradas se recupera con los inhibidores del proteasoma. **A.** Células MCF-7 fueron transfectadas con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03) o con un siARN control mediante lipofección. Pasadas 72 horas, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 35µM durante 6 horas o la lactacistina a 5µM durante 10 horas. Se procesaron las muestras para inmunofluorescencia, y se detectaron la coilina y la VRK1. **B.** *Western blot* del lisado y de la fracción nuclear para comprobar el silenciamiento de VRK1 y los niveles de coilina endógena. Se utilizaron como controles de carga la histona H3 (para la fracción nuclear) y la actina (para el lisado total). **C.** Células MCF-7 fueron privadas de suero en el medio durante 96 horas, tiempo tras el cual se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 35µM durante 6 horas o la lactacistina a 5µM durante 10h. Transcurrido este tiempo, se procesaron las muestras para inmunofluorescencia, y se detectaron la coilina y la VRK1. **D.** *Western blot* del lisado y la fracción nuclear para comprobar la parada del ciclo celular y los niveles de coilina endógena. Se utilizaron como controles de carga la histona H3 (para la fracción nuclear) y la actina (para el lisado total).

Además, este efecto, lo obtuvimos al realizar el mismo ensayo pero en células privadas de suero en el medio de cultivo, condición en la que VRK1 pierde su actividad. Para ello, se sembraron células MCF-7 a las que se eliminó el suero durante 4 días para, posteriormente, añadir los inhibidores MG132 o lactacistina a 35 μ M y 5 μ M, respectivamente. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia donde se marcaron la coilina y la VRK1 endógenas. Volvimos a observar que la desaparición de los cuerpos de Cajal producida por la inactividad de VRK1 en células paradas, se revertía con los inhibidores del proteasoma (Figura 48 C), confirmando de este modo que estos inhibidores son capaces de revertir el desensamblaje de los cuerpos de Cajal en condiciones de falta o inactividad de la quinasa humana VRK1. Para comprobar que la parada de ciclo celular había sido eficiente, se lisaron células para analizar los extractos totales y nucleares mediante electroforesis y *Western blot*. En los extractos nucleares, donde utilizamos a la histona H3 como control de carga, observamos que los niveles de coilina totales se mantienen constantes; sin embargo, los niveles de coilina fosforilada en el residuo serina 184 disminuyen en condiciones de ausencia de suero (resultado observado anteriormente al caracterizar este residuo durante el ciclo celular). En los lisados totales, observamos que en células paradas los niveles de pRb y ciclina D1 disminuyen, manteniéndose constantes los niveles de Rb total (Figura 48 D). Con estos marcadores de ciclo, podemos confirmar que a los 4 días en ausencia de suero, la línea celular MCF-7 se encuentra en fase G0.

A modo de resumen, sabemos que a los tres días de silenciamiento de la quinasa humana VRK1 se produce una desoligomerización de la coilina que provoca el desensamblaje de los cuerpos de Cajal (un efecto revertido añadiendo inhibidores del proteasoma) y que, pasadas 48 horas más (5 días de silenciamiento en total), los niveles proteicos de coilina endógena se reducen drásticamente. Si esta reducción de la coilina a los 5 días de silenciamiento de VRK1 es debida a su degradación en el proteasoma, cabe esperar que a este tiempo de silenciamiento los inhibidores ya no sean capaces de recuperar la formación de los cuerpos de Cajal.

Para poder confirmar esta hipótesis, células MCF-7 fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN sin diana específica como control. Se dejó el silenciamiento durante 5 días y, pasado este tiempo, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 35 μ M. Efectivamente observamos que a los 5 días de silenciamiento de la quinasa, el inhibidor del proteasoma MG132 no es capaz de revertir el efecto producido por el silenciamiento de VRK1, seguramente debido a que la mayor parte de la coilina ya se encuentra degradada (Figura 49).

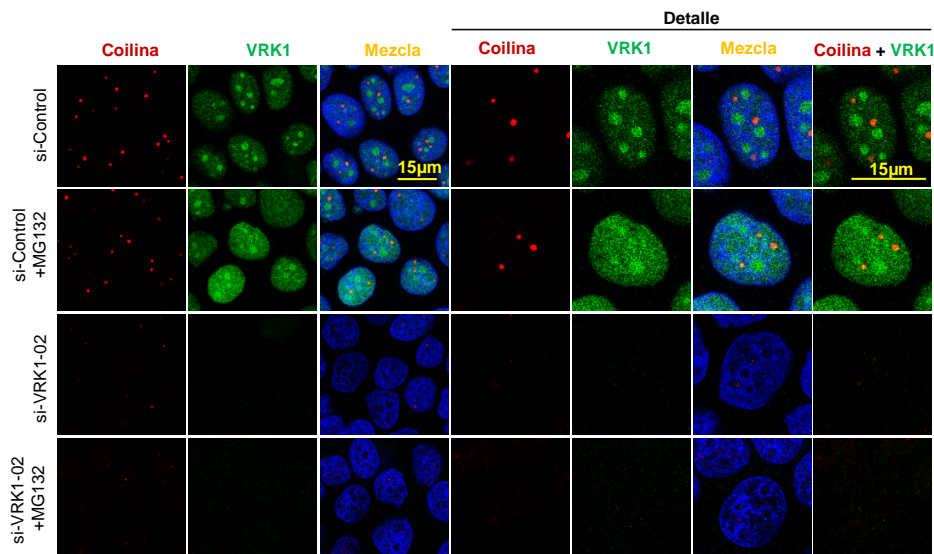


Figura 49: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 no se recupera con el inhibidor del proteasoma MG132 a los 5 días de silenciamiento. Células MCF-7 fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control mediante lipofección. Se añadió el inhibidor MG132 6 horas antes de recoger los puntos (a los 5 días). Se procesaron las muestras para inmunofluorescencia. La coilina fue detectada con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce el extremo amino de Sigma.

El hecho de que los inhibidores del proteasoma reviertan el efecto producido por el silenciamiento de VRK1 nos llevó a pensar si lo que se vuelve a formar es un cuerpo de Cajal funcional o simplemente un agregado de coilina sin otros componentes. Una de las funciones más estudiadas de los cuerpos de Cajal es la maduración de ribonucleoproteínas, mecanismo que se explicó anteriormente en este trabajo y en el cual es esencial la presencia de la proteína SMN. Es por este motivo que quisimos estudiar la presencia de esta proteína en los nuevos CBs que se estaban formando.

Con la finalidad de esclarecer esta duda, se silenciaron células MCF-7 con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02), con un siARN control o se dejaron sin suero durante 4 días para provocar la parada de ciclo celular. Pasado este tiempo, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el que se detectó, por un lado, la coilina y la VRK1 (para tener un control del ensayo) y, por otro lado, la coilina y el SMN. Observamos cómo al silenciar a la quinasa VRK1 y añadir el inhibidor del proteasoma MG132 se volvían a detectar a los cuerpos de Cajal, los cuales también contenían SMN, concluyendo que no son simples agregados de coilina, sino que contienen otros componentes esenciales para realizar sus funciones, como la proteína SMN (Figura 50).

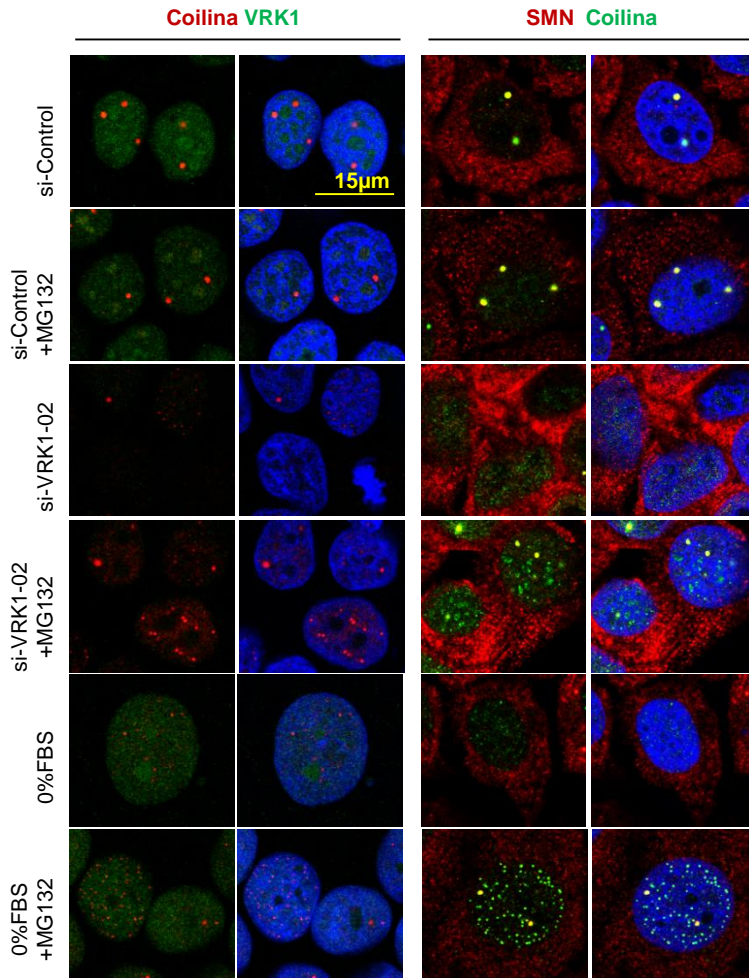


Figura 50: Los inhibidores del proteasoma revierten el efecto del silenciamiento de VRK1 formándose nuevamente cuerpos de Cajal funcionales. Células MCF-7 fueron silenciadas con un siARN específico para VRK1, con un siARN control o fueron privadas de suero en el medio de cultivo durante 4 días. Pasado este tiempo, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 35µM durante 6 horas y se procesaron los cubreobjetos para realizar una inmunofluorescencia. Se detectó la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta (panel izquierda) o con el anticuerpo policlonal H-300 (panel derecha), la VRK1 con el anticuerpo policlonal de Sigma que reconoce la región amino y el SMN con el anticuerpo monoclonal de *BD Transduction Laboratories*.

2.4. La coilina se ubiquitina

El siguiente aspecto que decidimos estudiar fue el mecanismo de degradación de la coilina. Dado que ambos inhibidores del proteasoma (MG132 y lactacistina) son capaces de recuperar el ensamblaje de los cuerpos de Cajal, es muy posible que la coilina sea una proteína que se ubiquitine para su degradación en el proteasoma. Como primera aproximación, analizamos las lisinas candidatas a ubiquitinarse introduciendo la secuencia de la coilina en un programa de predicción (Radivojac et al., 2010). Este programa generó una lista de las lisinas que posiblemente se ubiquiten, marcándolas según su probabilidad en rojas (alta puntuación), naranjas (puntuación media) o verdes (baja puntuación) (Figura 51).

```
MAASETVRLRLQFDYPPPATPHCTAFWLLVDLNRRCRVVTDLISLIRQRFGFSSGAFLGLYLEG
GLLPPAESARLVRDNDCLRVKLEERGVAENSVVISNGDINLSLRKAKKRAFQLEEGEETEPD
CKYSKKHWSRENNNNNEKVLDEPKAVTDQTVSKKNRKNKATCGTVGDDNEEAKRKSP
KKKEKCEYKKKAKNPKSPKVQAVKDWANQRCSSPKGSARNSLVKAKRKGSVSVCSKESPS
SSSESESCDESISDGPSKVTLEARNSEKLPTELSKKEEPSTKNTTADKLAIKLGFSLTPSKGK
TSGTTSSSSDSSAESDDQCLMSSSTPECAAGFLKTVGLFAGRGRPGPGLSSQTAGAAGWR
RSGSNGGGQAPGASPSVSLPASLGRGWGREENLFSWKGAKGRGMRGRGRGRGHPVSCV
VNRSTDNRQQQLNDVVKNSSTIIQNPVETPKKDYSLPLLAAPQVGEKIAFKLLELTSSYS
PDVSDYKTEGRILSHNPETQQVDIEILSSLPALREPGKFDLVYHNENGAEVVEYAVTQESKITV
FWKELIDPRLIIESPNTSSTPEA
```

Figura 51: Secuencia aminoacídica de la coilina donde se destacan en rojo (alta puntuación), naranja (puntuación media) y verde (baja puntuación) las lisinas predichas por el programa como posibles candidatas a ubiquitinarse.

Una vez supimos que existían múltiples lisinas en la secuencia de la coilina con alta probabilidad de ubiquitinarse, realizamos ensayos de ubiquitinación en la línea celular MCF-7. Se transfectaron los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pSSK-HA-Ubiquitina (para que la ubiquitina endógena no fuera limitante) y pCOC-Mdm2 (una ubiquitina ligasa para favorecer la reacción). Pasadas 48 horas de transfección, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 20µM y se lisaron las células para realizar ensayos de inmunoprecipitación.

En el primer ensayo, inmunoprecipitamos a la coilina con un anticuerpo α -Myc y detectamos a la ubiquitina con un anticuerpo que detecta al epítipo HA. Observamos una banda de ubiquitinación en el punto donde se transfectó coilina y ubiquitina, y al añadir la ubiquitina ligasa Mdm2, esta banda se intensificó y apareció una nueva banda más arriba, sugiriendo una mono- y bi-ubiquitinación de la coilina (Figura 52 A). Realizamos, además, la inmunoprecipitación recíproca. En esta ocasión, inmunoprecipitamos a la ubiquitina con un anticuerpo α -HA, y detectamos a la coilina en el inmunoprecipitado con el anticuerpo que reconoce al epítipo Myc. Volvimos a observar a la coilina en el inmunoprecipitado y cómo, al añadir Mdm2, aparecía la

doble banda de bi-ubiquitinación (Figura 52 B). De esta forma concluimos que la coilina es una proteína que se ubiquitina, al menos, con dos ubiquitinas.

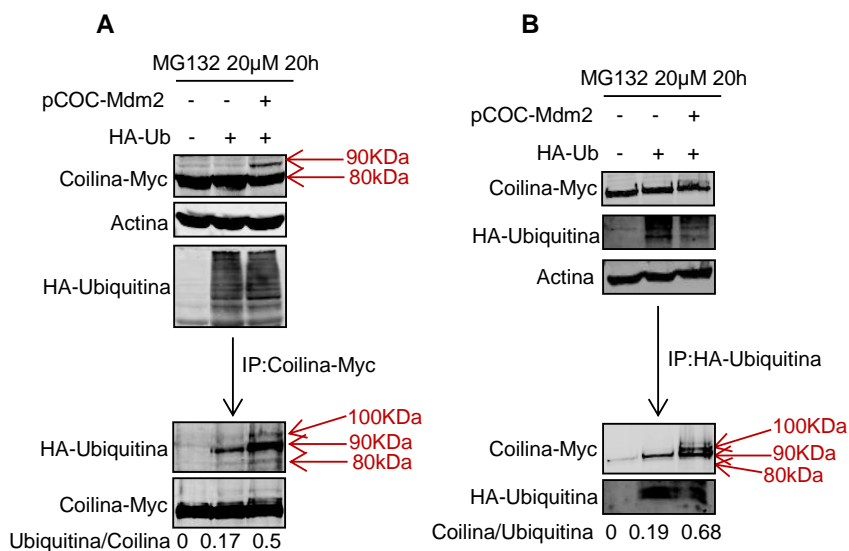


Figura 52: Ubiquitinación de la coilina. Células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCOC-Mdm2 y pSSK-HA-Ubiquitina. Pasadas 48 horas, se trataron las células con MG132 (20µM) durante 20 horas y se comprobó la expresión de las proteínas (paneles superiores). Se inmunoprecipitó a la coilina para detectar a la ubiquitina en el inmunoprecipitado (**A**), o se inmunoprecipitó a la ubiquitina para detectar a la coilina en el inmunoprecipitado (**B**). Se detallan los pesos moleculares en kDa en color rojo. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina ubiquitinada, expresados en números bajo la figura.

Quisimos, además, tener una imagen de la coilina y la ubiquitina en las células tratadas con inhibidores del proteasoma. Para ello, crecimos en cubreobjetos células HeLa, las cuales se transfectaron (a excepción de un punto control) con el plásmido pcDNA3-6xHis-Ubiquitina. Pasadas 48 horas, se añadieron los inhibidores del proteasoma MG132 (35µM, 6 horas) o lactacistina (5µM, 10 horas), y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Se detectó la coilina con el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz y la ubiquitina con el anticuerpo monoclonal α -Histidina H-3 de Santa Cruz. Observamos que, en las células sin tratar, la ubiquitina tenía una localización principalmente citosólica y los cuerpos de Cajal se detectaban como puntos verdes muy brillantes bajo un fondo nuclear muy tenue. Al añadir MG132 o lactacistina, la ubiquitina adquiría mayor intensidad de marcaje y se desplazaba al núcleo donde colocalizaba con los cuerpos de Cajal, los cuales se observaron, igual que en las condiciones control, en núcleo, aunque vimos más claramente la población de la coilina nucleoplasmática (Figura 53).

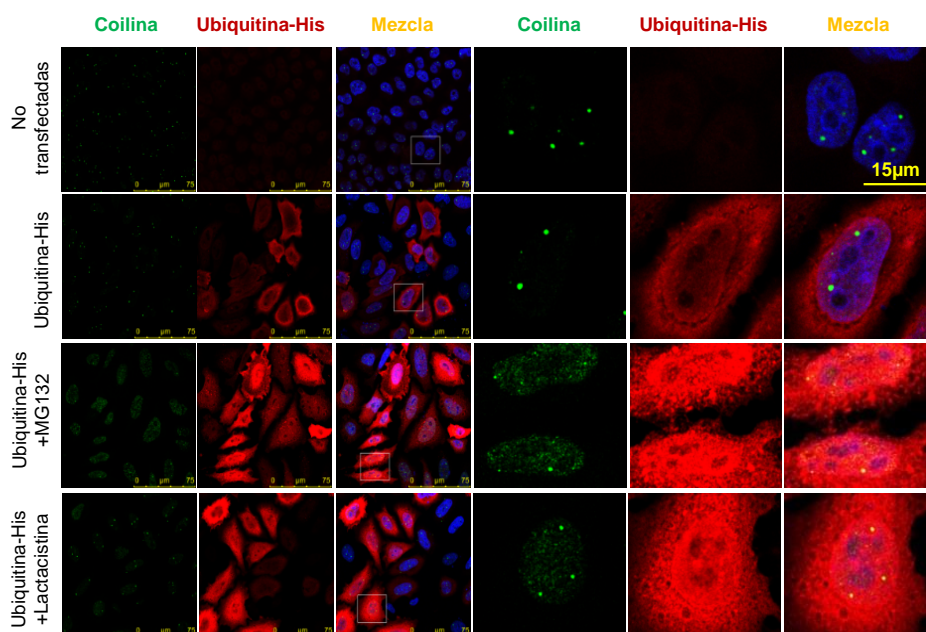


Figura 53: Colocalización de coilina endógena y ubiquitina-His. Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3-6xHis-Ubiquitina. Pasadas 48 horas, las células fueron tratadas con MG132 35μM durante 6 horas o con lactacistina 5μM durante 10 horas. Posteriormente, los cubreobjetos fueron procesados y analizados por microscopía confocal. Se detectó la coilina con el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz y la ubiquitina con el anticuerpo monoclonal α-Histidina H-3 de Santa Cruz.

2.5. Mdm2 es una ubiquitina ligasa de la coilina e interaccionan

Existen en la célula más de 600 E3 ubiquitina ligasas, encargadas del último paso en el proceso de ubiquitinación y que, además, confieren especificidad a la reacción (Komander, 2009). Nos planteamos estudiar qué posible ubiquitina ligasa estaba regulando la ubiquitinación de la coilina. Seleccionamos a las ubiquitina ligasas Mdm2 y RNF8 por su participación en procesos que son regulados por la quinasa VRK1, como la degradación del factor de transcripción p53 (Lopez-Borges and Lazo, 2000) o la respuesta a daño en el ADN (Salzano et al., 2015; Salzano et al., 2014; Sanz-Garcia et al., 2012), respectivamente. Con este fin, se transfectaron células HeLa y MCF-7 con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y con una de las ubiquitina ligasas, a través de los plásmidos pCOC-Mdm2 o pcDNA3.1.HA-RNF8. Observamos que la ubiquitina ligasa Mdm2, pero no RNF8, era capaz de inducir la degradación de la coilina en ambas líneas celulares, sin afectar a los niveles proteicos de VRK1 endógena (Figura 54 A). Además, para confirmar que no afectara a otras proteínas transfectadas, repetimos el ensayo en la línea celular HeLa, en la cual transfectamos

los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pCEFL-HA-VRK1 y pCOC-Mdm2. En el punto donde sobreexpresamos Mdm2, se produce de nuevo la degradación de la coilina, pero siguen sin afectarse los niveles de VRK1, esta vez transfecteda (Figura 54 B). Así, concluimos que la ubiquitina ligasa Mdm2, pero no RNF8, es capaz de inducir la degradación de la coilina.

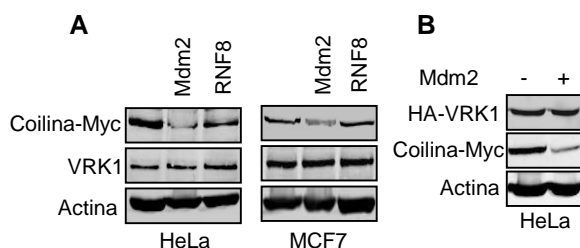


Figura 54: Mdm2, y no RNF8, induce la degradación de la coilina. **A.** Células HeLa y MCF-7 se transfectoron con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y con los plásmidos pCOC-Mdm2 o pcDNA3.1.HA-RNF8. Pasadas 48 horas, se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas de interés mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó la coilina con un anticuerpo policlonal que reconoce al epítipo Myc, la VRK1 con el anticuerpo policlonal VC, y se marcó la actina como control de carga. **B.** Células HeLa fueron transfectedas con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1, pCMV6-Coilina-Myc-Flag y con el plásmido pCOC-Mdm2. Pasadas 48 horas, se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas de interés mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó la coilina con un anticuerpo policlonal que reconoce al epítipo Myc, la VRK1 con el anticuerpo policlonal para el epítipo HA, y se marcó la actina como control de carga.

Para confirmar estos resultados, lo siguiente que analizamos fue si la coilina formaba algún complejo con estas ubiquitina ligasas. Para ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en la línea HEK-293T. Para estudiar la posible interacción entre coilina y Mdm2, se transfectoron las células con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y se realizó la inmunoprecipitación tanto de la coilina (con un anticuerpo α -Myc) como de Mdm2 endógeno. En ambos casos, pudimos observar un complejo entre coilina y Mdm2 (Figura 55 A). Para la interacción entre coilina y RNF8, se transfectoron las células con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pcDNA3.1.HA-RNF8. Se inmunoprecipitó a la coilina con el anticuerpo α -Myc o a RNF8 con el anticuerpo α -HA. En ninguna de las inmunoprecipitaciones pudimos observar ningún tipo de interacción (Figura 55 B). De esta forma, podemos confirmar que la coilina interacciona con la ubiquitina ligasa Mdm2, pero no con RNF8.

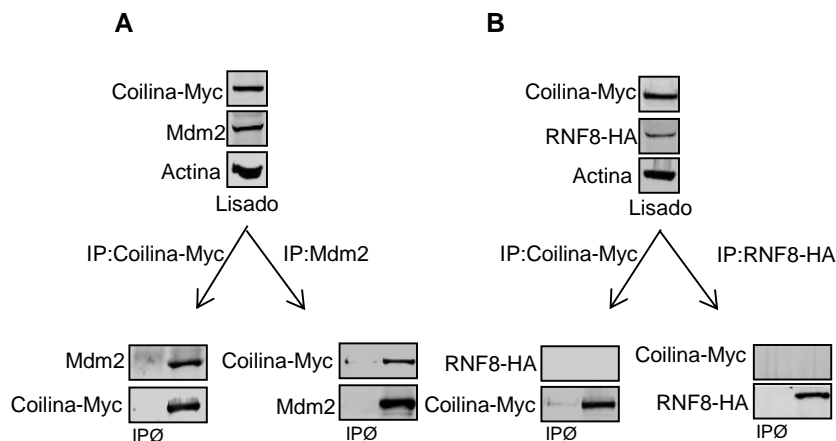


Figura 55: La coilina interacciona con la ubiquitina ligasa Mdm2, pero no con RNF8. **A.** Coilina-Myc interacciona con Mdm2 endógeno. Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag. Pasadas 48 horas, se lisaron las células y se comprobó la expresión de las proteínas (lisado). Se realizó la inmunoprecipitación de la coilina con un anticuerpo α -Myc monoclonal o de Mdm2 con un anticuerpo policlonal que reconoce a la proteína endógena. Se detectó en el inmunoprecipitado la coilina con un anticuerpo α -Myc o Mdm2 con un anticuerpo policlonal. **B.** Coilina-Myc no interacciona con HA-RNF8. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pcDNA3.1.HA-RNF8. Pasadas 48 horas, se lisaron las células y se comprobó la expresión de las proteínas (lisado). Se realizó la inmunoprecipitación de la coilina con un anticuerpo α -Myc policlonal o de RNF8 con un anticuerpo α -HA policlonal. Se detectó en el inmunoprecipitado la coilina con un anticuerpo α -Myc o RNF8 con un anticuerpo α -HA.

Además de observar la interacción entre coilina y Mdm2 mediante ensayos de inmunoprecipitación, marcamos ambas proteínas para su visualización por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se crecieron en cubreobjetos redondos células HeLa y MCF-7 y se procesaron para su marcaje por inmunofluorescencia. Se detectó la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y Mdm2 con el anticuerpo policlonal PA5-27237 de *Pierce Antibodies*. En ambas líneas celulares se pudieron observar los cuerpos de Cajal como puntos rojos brillantes discretos y a Mdm2, marcado en verde, disperso y de aspecto granular por citoplasma y núcleo. En algunos casos, se veía colocalización en los cuerpos de Cajal entre ambas proteínas (Figura 56). Para una mejor visualización, se realizó la cuantificación de la fluorescencia en una célula en detalle, donde se ven los picos que emite cada proteína y como, en algunos casos, esos picos se encuentran solapados, confirmando la colocalización de coilina y Mdm2 endógenas (Figura 56, gráficas abajo).

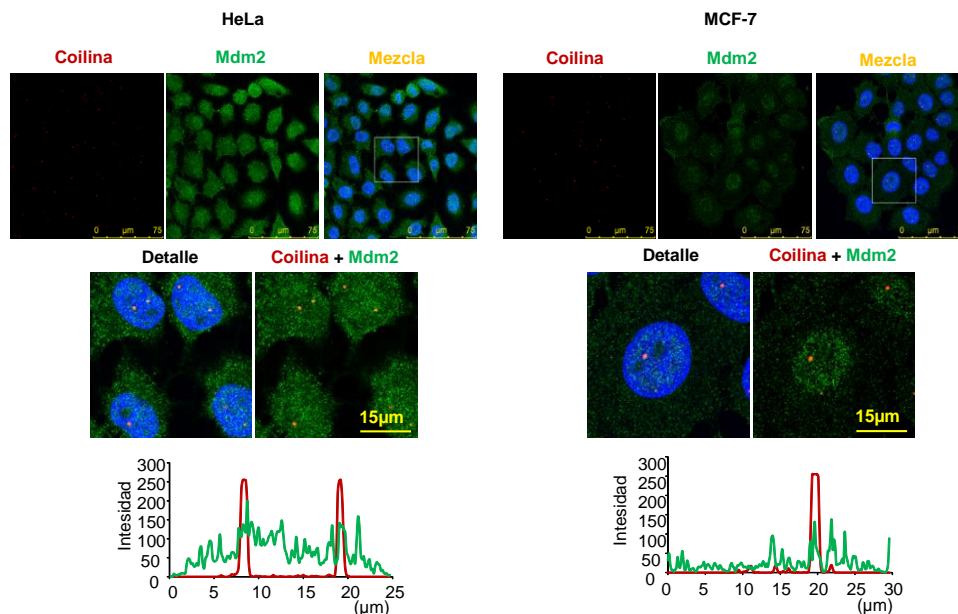


Figura 56: Colocalización entre coilina y Mdm2 endógenas. Células HeLa y MCF-7 fueron crecidas en cubreobjetos redondos y procesadas para su marcaje por inmunofluorescencia. Se detectó la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y Mdm2 con el anticuerpo policlonal PA5-27237 de *Pierce Antibodies*.

2.6. El silenciamiento de VRK1 no afecta a la interacción entre la coilina y la ubiquitina ligasa Mdm2

Una vez confirmada la interacción y colocalización entre la coilina y la ubiquitina ligasa Mdm2, quisimos comprobar si formaban, junto con VRK1, un complejo y, en ese caso, si el silenciamiento de VRK1 tenía alguna consecuencia. Para ello, en primer lugar, transfectamos células HEK-293T con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pCOC-Mdm2. Pasadas 48 horas, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132, con la finalidad de favorecer la formación del posible complejo. Se inmunoprecipitó a la coilina con el anticuerpo α -Myc y se detectó tanto a Mdm2 como a VRK1 en el inmunoprecipitado, afirmando la existencia de un complejo entre ellas (Figura 57 A). Lo que quisimos saber entonces era si, al silenciar a la quinasa VRK1, se producía algún efecto en la interacción entre la coilina y Mdm2. Con este fin, se silenciaron células MCF-7 y HEK-293T con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) y, pasadas 24 horas, se transfectó el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag. Se dejaron 48 horas más y se lisaron para comprobar la expresión de las proteínas y el correcto silenciamiento de VRK1. Se realizó la inmunoprecipitación de la coilina con un anticuerpo que reconoce al epítipo Flag y se detectó a Mdm2 endógeno en el precipitado. La interacción entre coilina y Mdm2 se mantenía estable, incluso en el

punto donde se había silenciado a VRK1 (Figura 57 B), concluyendo así que el silenciamiento de la quinasa no afecta a la interacción entre la coilina y su ubiquitina ligasa Mdm2.

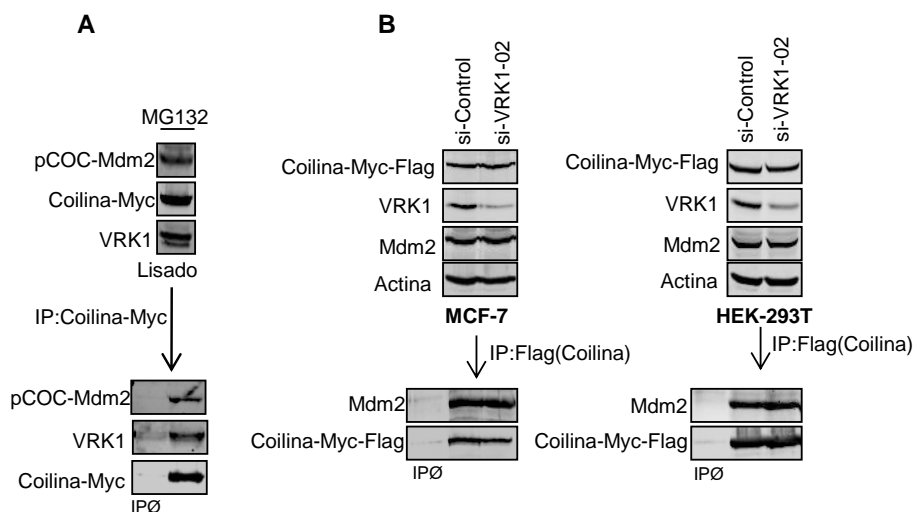


Figura 57: El silenciamiento de VRK1 no afecta a la interacción entre la coilina y Mdm2. **A.** Interacción entre coilina, Mdm2 y VRK1. Se transfectoron células HEK-293T con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag y pCOC-Mdm2. Se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 35µM durante 6 horas. Se inmunoprecipitó la coilina con un anticuerpo policlonal α-Myc y se detectó en el inmunoprecipitado a Mdm2 con el anticuerpo monoclonal de Santa Cruz SMP14 y la VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1B5. **B.** Células MCF-7 y HEK-293T se silenciaron con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02). Pasadas 24 horas, se transfecó el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y se dejaron las células 48 horas más. Se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo monoclonal α-Flag y se detectó a Mdm2 en el inmunoprecipitado con el anticuerpo policlonal PA5-27237 de *Pierce Antibodies*.

2.7. La coilina se ubiquitina a través de cadenas de lisina 48

Como se explicó más en detalle en la introducción de este trabajo, la ubiquitinación de una proteína puede tener diferentes destinos, que varían según las diferentes cadenas de ubiquitinas que se formen, a través de residuos de lisina (K). Por ejemplo, cadenas formadas por lisina 48 marcan a las proteínas ubiquitinadas para ser degradadas en el proteasoma, mientras que cadenas de ubiquitinas unidas por lisina 63 usualmente señalizan a proteínas para un cambio de localización subcelular o para reclutar a más proteínas (Pickart and Eddins, 2004). Por lo tanto, nos planteamos investigar el tipo de cadena que se estaba formando en la ubiquitinación de la coilina.

Para ello se transfectoron células MCF-7 con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag más uno de los 4 plásmidos que contienen mutaciones en la ubiquitina: pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K48R (tiene mutada la lisina 48 por

arginina), pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K63R (tiene mutada la lisina 63 por arginina), pCMV-His-Ubiquitina-K48 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 48) y pCMV-His-Ubiquitina-K63 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 63). Se inmunoprecipitó a la coilina con el anticuerpo que reconoce al epítipo Myc y se detectó a la ubiquitina en el inmunoprecipitado. Vimos ubiquitinación de la coilina en los puntos con ubiquitina silvestre, con la ubiquitina que solo tenía mutada la lisina 63 y con la ubiquitina donde solo funcionaba la lisina 48, concluyendo así que la coilina se ubiquitina a través de la formación de cadenas de ubiquitinas unidas por la lisina 48 y no por la lisina 63. Además, en los puntos donde la ubiquitina tenía mutada la lisina 48 o solo era funcional la lisina 63, se perdía la señal de ubiquitinación (Figura 58).

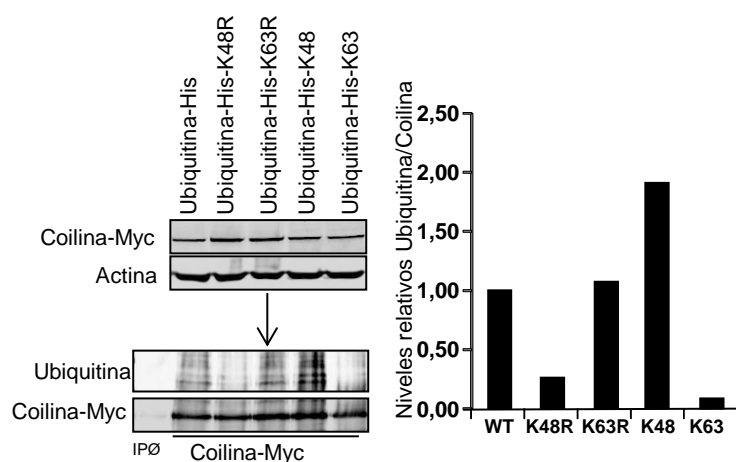


Figura 58: La coilina se ubiquitina a través de cadenas de lisina 48. Células MCF-7 fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y uno de los plásmidos que contienen mutaciones en la ubiquitina: pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K48R (tiene mutada la lisina 48 por arginina), pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K63R (tiene mutada la lisina 63 por arginina), pCMV-His-Ubiquitina-K48 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 48) y pCMV-His-Ubiquitina-K63 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 63). Pasadas 48 horas, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas (panel superior) y se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo que reconoce al epítipo Myc (panel inferior). Se detectó a la ubiquitina en el inmunoprecipitado. Se cuantificó la cantidad relativa de ubiquitina unida a coilina para cada condición (gráfico a la derecha).

Con el fin de confirmar el resultado anterior, se realizó el ensayo recíproco, para el cual se transfectaron células MCF-7 con los mismos plásmidos que en el ensayo anterior. En esta ocasión, se realizó un *Pull-Down* con la resina Talon, a la cual tienen alta afinidad las cadenas de histidinas, y se detectó a la coilina con un anticuerpo α -Myc. Volvimos a observar ubiquitinación de la coilina, además de en el punto correspondiente a la ubiquitina silvestre, en los puntos con la ubiquitina mutada solamente en la lisina 63 o con la ubiquitina donde sólo permanece funcional la lisina

48 (Figura 59), confirmando que la coilina se ubiquitina a través de cadenas de lisina 48, para su degradación en el proteasoma.

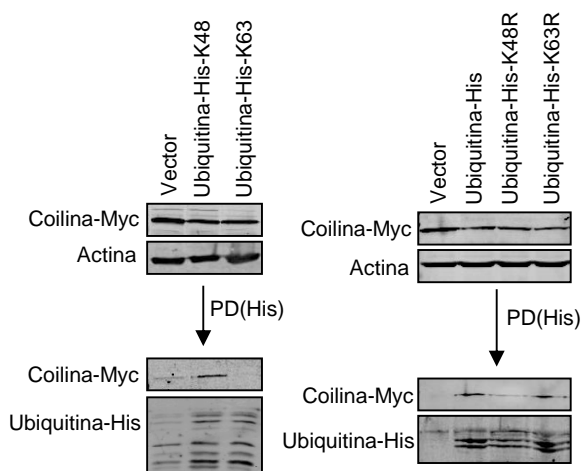


Figura 59: Ubiquitinación de la coilina a través de cadenas de lisina 48. Células MCF-7 fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-Coilina-Myc-Flag y uno de los plásmidos que contienen mutaciones en la ubiquitina: pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K48R (tiene mutada la lisina 48 por arginina), pcDNA3-6xHis-Ubiquitina-K63R (tiene mutada la lisina 63 por arginina), pCMV-His-Ubiquitina-K48 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 48) y pCMV-His-Ubiquitina-K63 (tiene todas las lisinas mutadas excepto la lisina 63). Pasadas 48 horas, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas (paneles superiores), se realizó un *Pull-Down* de histidinas con la resina Talon y se detectó a la coilina con el anticuerpo que reconoce al epítopo Myc (paneles inferiores).

2.8. El mutante de coilina Ser184Ala es más sensible a la degradación inducida por Mdm2 y tiene una mayor ubiquitinación

A modo de resumen, la coilina se ubiquitina, al menos bi-ubiquitina, a través de cadenas de lisina 48 para su degradación en el proteasoma. En esta ubiquitinación interviene la ubiquitina ligasa Mdm2, la cual interacciona con la coilina y es capaz de inducir su degradación. Sabiendo que el silenciamiento de VRK1 produce la degradación de la coilina a los 5 días de silenciamiento y que este efecto se revierte al añadir los inhibidores del proteasoma, quisimos investigar si el residuo de fosforilación serina 184 de la coilina tenía algún papel en todo este proceso. Si este residuo no podía fosforilarse o estaba permanentemente fosforilado, ¿se producía algún cambio en la ubiquitinación de la coilina? Para responder a esta pregunta, se realizaron dos ensayos: en primer lugar, células MCF-7 se transfectaron con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, tanto la proteína silvestre como sus dos mutantes Ser184Ala (un mutante no fosforilable) y Ser184Glu (un mutante fosfomimético). A estas células también se les transfectaron dosis crecientes del plásmido pCOC-Mdm2, con el fin de

determinar la sensibilidad de la proteína y de los diferentes mutantes a la degradación inducida por la ubiquitina ligasa. En todos los puntos se transfectó el plásmido pcDNA3-6xHis-Ubiquitina, para que la ubiquitina endógena no fuera limitante. Pasadas 48 horas de transfección, el punto con mayor dosis de Mdm2 se trató con el inhibidor del proteasoma MG132 con el fin de revertir la degradación producida por la ubiquitina ligasa. Se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas mediante electroforesis y *Western blot*. Observamos que en el caso de la coilina silvestre, las dosis de Mdm2 van degradando la proteína de forma gradual hasta no tener casi niveles proteicos en la dosis más alta, efecto que se revierte por completo al añadir MG132. En el caso del mutante no fosforilable S184A, se observó que la dosis más baja de Mdm2 ya era capaz de degradar a la proteína, que se mantenía casi indetectable en los diferentes puntos, a excepción del punto donde se añadió MG132, el cual volvía a recuperar los niveles de coilina. Finalmente, observamos que el mutante fosfomimético S184E era mucho más resistente a las dosis crecientes de la ubiquitina ligasa, no observándose degradación ni en la dosis más alta (Figura 60).

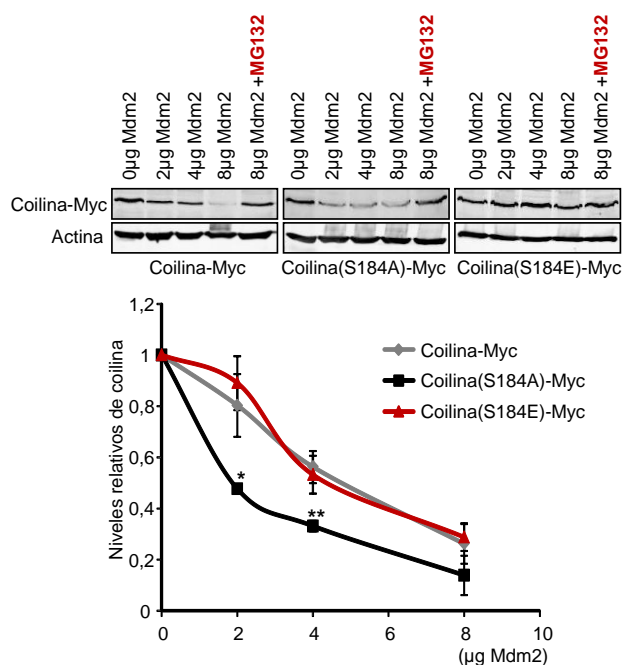


Figura 60: Sensibilidad de los mutantes de la coilina a la degradación por Mdm2. Células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag (silvestre, S184A o S184E), pcDNA3-6xHis-Ubiquitina (para que la ubiquitina intracelular no resultara limitante) y dosis crecientes de pCOC-Mdm2. El último punto fue tratado con MG132 35µM durante 6 horas. Pasadas 48 horas, se lisaron las células y se procesaron las muestras para analizarlas mediante *Western blot*. Se cuantificaron los niveles relativos de coilina en cada caso. * (P<0.05) ** (P<0.005) *** (P<0.0005).

El segundo experimento que se realizó fue un ensayo de ubiquitinación como los que se hicieron para averiguar si la coilina se ubiquitinaba, pero en esta ocasión se añadieron los dos mutantes S184A y S184E. Así, células MCF-7 se transfectaron con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, tanto la proteína silvestre como sus dos mutantes Ser184Ala y Ser184Glu, el plásmido de ubiquitina pSSK-HA-Ubiquitina y, por último, el plásmido que contiene la ubiquitina ligasa pCOC-Mdm2. Después de 48 horas, se añadió el inhibidor del proteasoma MG132 a 20 μ M durante 20 horas. Pasado este tiempo, se inmunoprecipitó a la coilina con el anticuerpo que reconoce al epítipo Myc y se detectó a la ubiquitina en el inmunoprecipitado.

Como en ensayos anteriores, vimos la mono-ubiquitinación de la coilina silvestre y la bi-ubiquitinación al añadir a Mdm2. Esta bi-ubiquitinación aumentaba en el caso del mutante S184A no fosforilable, el cual anteriormente habíamos visto que también era el más sensible a Mdm2. Sin embargo, en el caso del mutante fosfomimético S184E, se perdía la señal de ubiquitinación hasta niveles control en los cuales no se añade a Mdm2 (Figura 61).

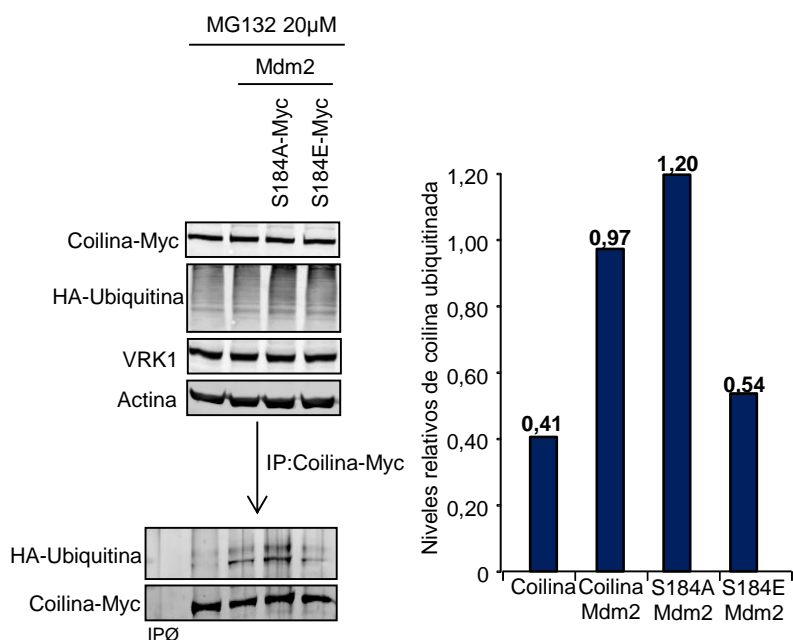


Figura 61: Ubiquitinación de los mutantes de coilina. Células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag (silvestre, S184A y S184E), pSSK-HA-Ubiquitina y pCOC-Mdm2. Pasadas 48 horas, se comprobó la expresión de las proteínas y se realizó la inmunoprecipitación de la coilina con un anticuerpo policlonal α -Myc. Se detectó la ubiquitina en el inmunoprecipitado con un anticuerpo monoclonal α -HA, y se cuantificaron los niveles relativos en cada condición (gráfica derecha).

2.9. La inhibición del transporte nuclear impide la degradación de la coilina en el proteasoma citosólico

El proteasoma es un complejo enzimático de degradación de proteínas que se encuentra tanto en núcleo como en citosol (Adams, 2003). Nuestra siguiente pregunta fue saber dónde se producía la degradación de la coilina ubiquitinada, si se realizaba todo el proceso dentro del núcleo o si bien en algún punto salía al citosol para llevarse a cabo su degradación.

La coilina es una proteína que se ha descrito como exclusivamente nuclear, ya sea libre en el nucleoplasma o formando los cuerpos de Cajal, de tal forma que sólo la podemos ver en el citoplasma en condiciones mitóticas cuando no existe envoltura nuclear. Solamente en oocitos de *Xenopus* se detectó un tráfico de coilina entre núcleo y citosol, a través de ensayos donde se inyectaba un anticuerpo monoclonal anti-coilina en el citoplasma y, al cabo de un tiempo, se localizaba dentro del núcleo, en los cuerpos de Cajal. Además, este proceso no se inhibía al añadir cicloheximida, de tal forma que no se requería nueva síntesis de coilina para este importe (Bellini and Gall, 1999). Sin embargo, en estudios similares con células humanas HeLa, aunque al inyectar el anticuerpo en el citoplasma, al cabo de una hora, se observaba coilina en los cuerpos de Cajal, este proceso no sucedía al añadir emetina (un inhibidor de la síntesis proteica), de tal forma que el anticuerpo solo importaba coilina sintetizada de nuevo, no existiendo ese tráfico como pasaba en los oocitos de *Xenopus* (Almeida *et al.*, 1998; Bellini and Gall, 1999).

Con todos estos datos quisimos, en un primer momento, estudiar si en la secuencia de la coilina existía algún tipo de señal de transporte nuclear que permitiese una degradación citosólica, ya que actualmente no hay descrita ninguna en su secuencia. Para ello, se utilizó un programa de predicción de señales de transporte nuclear ricas en leucinas llamado *NetNES 1.1 Server* (la Cour *et al.*, 2004). Introducimos la secuencia proteica de la coilina y observamos la existencia de una posible señal de transporte nuclear (NES) entre los aminoácidos 296-302: IKLGFSL (Figura 62). Este dato sugiere que la coilina, aunque sea solamente para su degradación en el proteasoma, y de forma muy rápida, es capaz de salir al citoplasma.

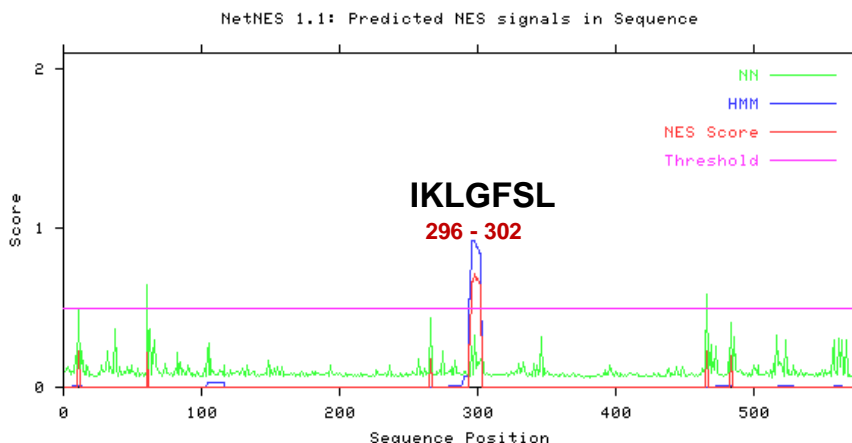


Figura 62: Existe una posible señal de exporte nuclear en la secuencia de la coilina. Gráfico donde se muestra la señal de exporte nuclear (NES) predicha en la secuencia proteica de la coilina, utilizando el programa *NetNES 1.1 Server*. En rojo se detallan los aminoácidos que forman la NES y en negro la secuencia detallada de aminoácidos.

Una vez supimos que existía la posibilidad de que la coilina fuera exportada al citosol en alguna condición, estudiamos el efecto en los cuerpos de Cajal al inhibir este exporte con leptomicina B. Así, se realizó la depleción en células MCF-7 (Figura 63 A) y HeLa (Figura 63 B) con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control. Pasadas 48 horas, se añadió el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B a 0,2nM durante 24 horas. Pasado este tiempo, se procesaron los cubreobjetos para su marcaje por inmunofluorescencia. Se detectó la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce la región amino de Sigma.

En ambas líneas celulares, observamos nuevamente que al silenciar la quinasa VRK1, el marcaje de la coilina y, por ende, el de los cuerpos de Cajal, desaparece casi por completo. Sin embargo, en el punto donde se silenció a VRK1 y, posteriormente, se añadió a las células el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B, se volvió a detectar un marcaje de fluorescencia roja, no como puntos brillantes discretos, sino como un fondo nuclear algo granulado en ocasiones, sugiriendo una acumulación de la coilina que no logra formar nuevos cuerpos de Cajal, pero que se queda en el núcleo (Figura 63). Con este resultado, concluimos que la coilina sí sale del núcleo en algún momento, y que esta salida es inhibida por la leptomicina B.

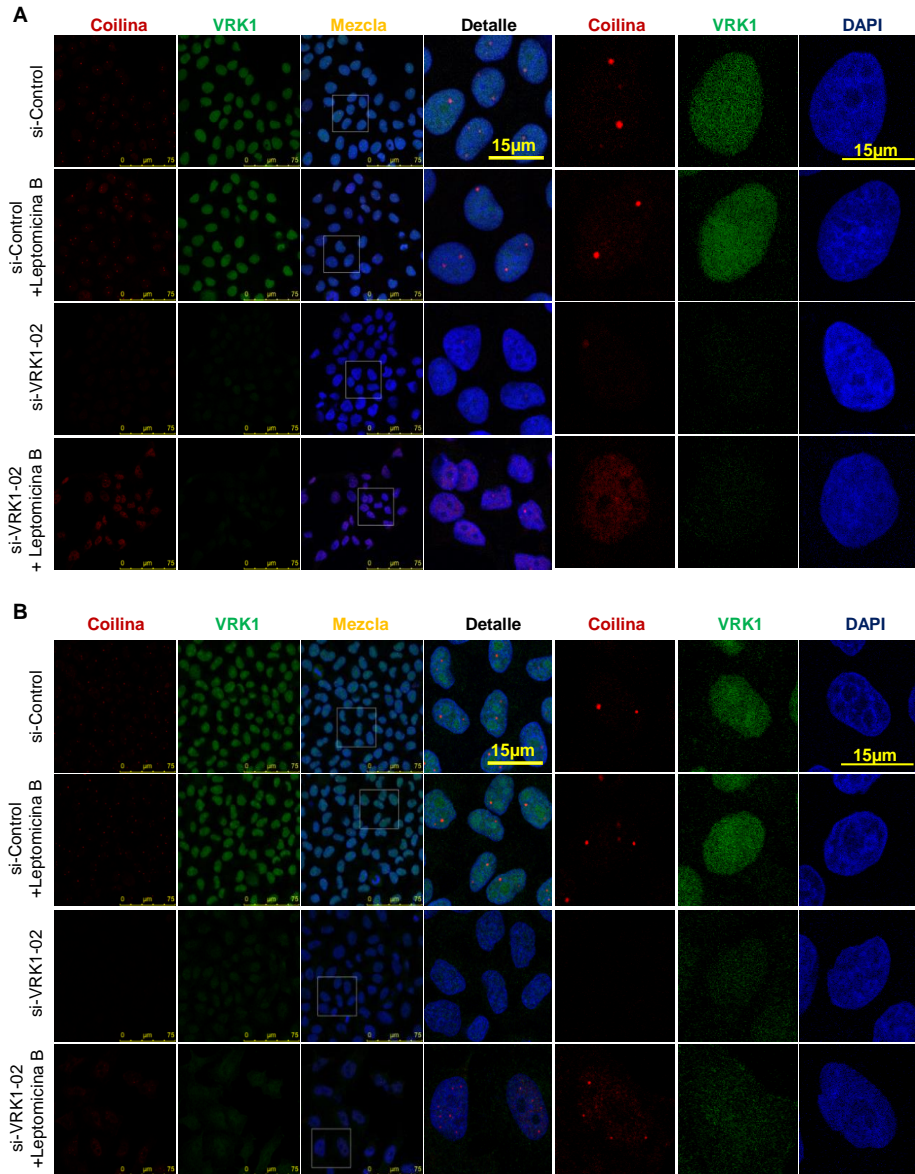


Figura 63: La desaparición de los cuerpos de Cajal provocada por el silenciamiento de VRK1 es recuperada con el inhibidor del transporte nuclear leptomicina B. Células MCF7 (A) y HeLa (B) fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control mediante lipofección. Se añadió la leptomicina B a 0,2nM 24 horas antes de recoger los puntos, tras 72 horas de transfección. Se procesaron las muestras para inmunofluorescencia. La coilina fue detectada con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce el extremo amino de Sigma.

Nuestra siguiente pregunta fue saber si esta coilina que al inhibir el exporte se acumulaba en el núcleo, estaba ubiquitinada o no. Con este fin se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en la línea celular MCF-7. Se transfectaron las células con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pSSK-HA-Ubiquitina y pCOC-Mdm2. Se trató con leptomicina B a 0,2nM durante 24 horas y, pasado este tiempo, se lisaron las células. Se realizó un fraccionamiento citosol-núcleo y se comprobó la expresión de las proteínas de interés. Se detectó la glicil-tRNA-sintetasa (GARS) y la histona H3 como controles de citosol y núcleo, respectivamente. De cada fracción, se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo que reconoce al epítipo Myc y se detectó la ubiquitina y la VRK1 en el inmunoprecipitado. Volvimos a ver una mayor señal de ubiquitina unida a coilina en el punto donde se añadió a la ubiquitina ligasa Mdm2, y únicamente se detectó en la fracción nuclear (Figura 64). Este resultado nos permite confirmar que la proteína coilina se ubiquitina dentro del núcleo, previamente a su exporte al citosol para su degradación.

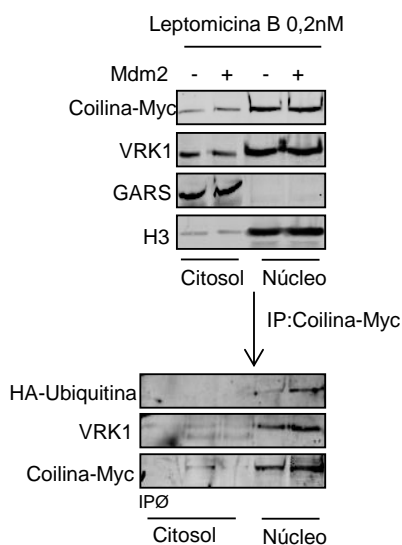


Figura 64: La coilina se ubiquitina en el núcleo antes de su exporte al citosol. Células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-Coilina-Myc-Flag, pSSK-HA-Ubiquitina y pCOC-Mdm2. Pasadas 24 horas, se añadió la leptomicina B a 0,2nM y se dejó 24 horas más. Se realizó un fraccionamiento citosol-núcleo y se comprobó la expresión de las proteínas mediante *Western blot*. De cada fracción, se inmunoprecipitó la coilina con un anticuerpo policlonal que reconoce al epítipo Myc y se detectó la ubiquitina y la VRK1 en el inmunoprecipitado con un anticuerpo α -HA monoclonal y con el anticuerpo α -VRK1 monoclonal 1B5. Para los controles de carga se marcó a GARS con un anticuerpo policlonal de Santa Cruz (H-300) y la histona H3 con un anticuerpo policlonal de *Cell Signaling* (#9715).

Finalmente, para terminar de analizar el exporte de la coilina hacia el citosol, se realizaron extractos nucleares en diferentes condiciones y tratamientos. Células HeLa fueron silenciadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) durante tres o cinco días, o fueron privadas de suero. Se trataron las células con el inhibidor del proteasoma MG132 o con el inhibidor del exporte leptomicina B. Posteriormente, se lisaron las células y se analizaron los extractos nucleares mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó la histona H3 como control de carga nuclear y se confirmó el correcto silenciamiento de la quinasa VRK1 en los puntos con el siARN. Observamos cómo, igual que en ensayos anteriores, los niveles de coilina permanecen estables a

los tres días de silenciamiento. Estos niveles, sin embargo, se reducen casi completamente a los cinco días de silenciamiento de VRK1. El inhibidor del proteasoma, al igual que pasaba en la inmunofluorescencia, no revierte el efecto del silenciamiento pasados 5 días. No obstante, al inhibir el exporte nuclear, volvemos a tener niveles proteicos de coilina de nuevo, confirmando así la salida al citosol de la proteína. Este efecto, además, se observó en las células privadas de suero durante cinco días, en las que vimos que al eliminar el suero durante este tiempo, se perdían los niveles de coilina y se recuperaban al inhibir el exporte nuclear, no teniendo de nuevo ningún efecto el inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 65).

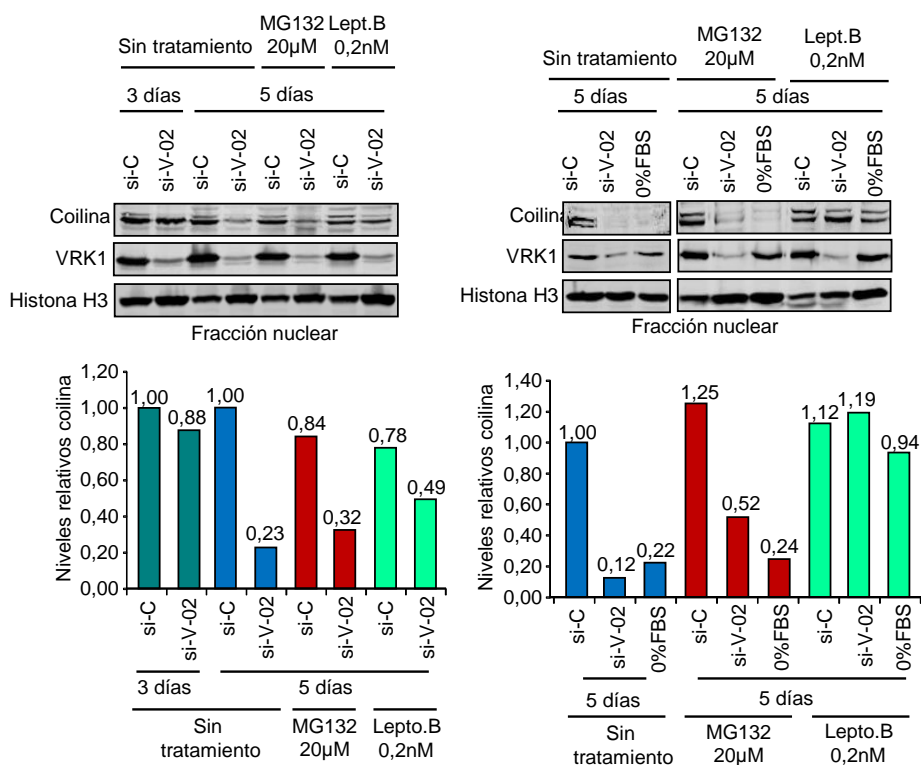


Figura 65: El inhibidor del exporte nuclear, leptomicina B, recupera los niveles de coilina en el núcleo después del silenciamiento de la quinasa VRK1. Células HeLa fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1, con un siARN control, o fueron privadas de suero durante 3 o 5 días. Se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 a 20µM durante 20 horas o con leptomicina B a 0,2nM durante 24 horas y, pasado este tiempo, se realizó la lisis para obtener los extractos nucleares. Se detectó la coilina con el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz, la VRK1 con el anticuerpo policlonal VC de fabricación propia, y se detectó la histona H3 como control de carga con el anticuerpo policlonal de *Cell Signaling* (#9715).

3. Efecto del silenciamiento de la quinasa humana VRK1 en la proteína causante de la atrofia muscular espinal SMN (*Survival Motor Neuron*)

3.1. La quinasa humana VRK1 interacciona con SMN

Como se explicó anteriormente en este trabajo, uno de los componentes más importantes en los cuerpos de Cajal es la proteína de supervivencia de las motoneuronas, SMN. Su función más estudiada es la biogénesis de ribonucleoproteínas, esenciales en el proceso de *splicing*. Además, la mutación del gen *SMN1* causa la atrofia muscular espinal, primera causa genética de muerte infantil. Esta proteína se localiza en citosol y, dentro del núcleo, se acumula en los cuerpos de Cajal. Debido a que el silenciamiento de VRK1 produce la pérdida de estos compartimentos nucleares, decidimos analizar más a fondo un posible efecto secundario sobre esta proteína como consecuencia del silenciamiento de la quinasa.

Como primer acercamiento, estudiamos si la proteína SMN estaba interaccionando con la quinasa VRK1. Para responder a esta cuestión, realizamos una inmunoprecipitación con las proteínas sobreexpresadas. Así, células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1 y pCMV6-SMN-Myc-Flag. Se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo que reconoce al epítipo Myc, y se detectó a la VRK1 en el precipitado con un anticuerpo α -HA (Figura 66 A). Observamos que existía interacción entre ambas proteínas. Además, se detectó también a la coilina endógena en el precipitado, sugiriendo que las tres proteínas podrían estar formando un complejo o bien que la coilina estaría haciendo de puente de interacción entre SMN y VRK1.

Para confirmar el resultado anterior, realizamos nuevamente una inmunoprecipitación, pero esta vez con todas las proteínas endógenas. En esta ocasión, se lisaron células HEK-293T y se inmunoprecipitó a SMN. Observamos tanto a VRK1 como a la coilina en el precipitado, ratificándose la interacción entre ellas (Figura 66 B).

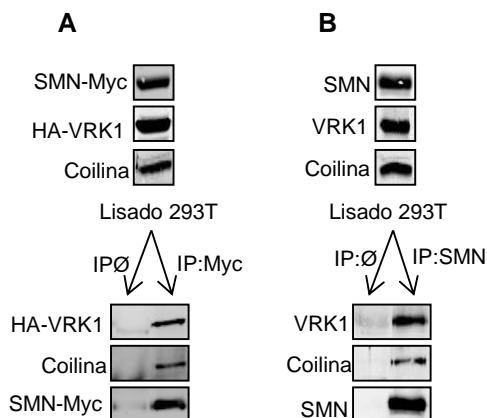


Figura 66: VRK1 interacciona con SMN. **A.** HA-VRK1 interacciona con SMN-Myc. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA-VRK1 y pCMV6-SMN-Myc. La expresión de las proteínas fue comprobada en el lisado celular preparado 48 horas después de la transfección. Se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo monoclonal α -Myc y se detectó a VRK1 y coilina en el precipitado. Se utilizó el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz para detectar a la coilina, y el anticuerpo policlonal α -HA para detectar a VRK1. **B.** Interacción entre las proteínas endógenas VRK1 y SMN. Células HEK-293T fueron lisadas y una parte del lisado fue utilizado como control de expresión de proteínas. Se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína endógena y se detectó a VRK1 y coilina en el precipitado. Se utilizó el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz para la coilina y el anticuerpo VE policlonal para VRK1.

El siguiente aspecto que determinamos fue si existía una interacción directa entre VRK1 y SMN o si, por el contrario, era la coilina la que estaba haciendo de puente en este complejo. Para resolver esta duda, hicimos un fraccionamiento citosol-núcleo en células HeLa, a las cuales se les había realizado una lipofección para silenciar a la coilina y poder ver si, en ausencia de ésta, seguía existiendo interacción entre SMN y VRK1.

Así, células HeLa fueron transfectadas con un siARN específico para la coilina (si-Coilina) o con un siARN control. Pasadas 72 horas, tiempo en el cual se observa un silenciamiento eficiente de la proteína, se realizó un fraccionamiento citosol-núcleo y se comprobó la expresión de las proteínas mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó a la glicil-tRNA-sintetasa (GARS) y a la histona H3 como control de carga de citosol y núcleo, respectivamente. Debido a que la coilina es una proteína nuclear, se inmunoprecipitó solamente a VRK1 en la fracción nuclear y se detectó a SMN en el precipitado, independientemente de la presencia o ausencia de coilina (Figura 67). Concluimos, por lo tanto, que existe una interacción directa entre VRK1 y SMN.

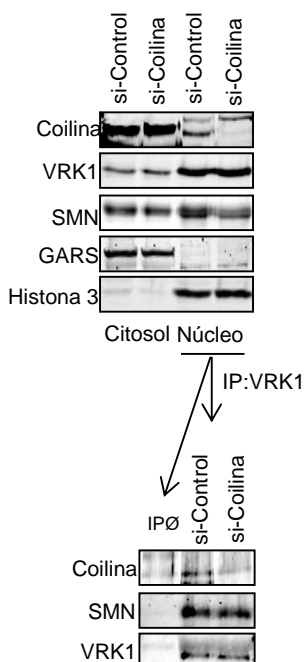


Figura 67: SMN y VRK1 interactúan independientemente de coilina. Se hizo un fraccionamiento citosol-núcleo en la línea celular HeLa, en la que se silenció a la coilina con un siARN específico durante 72 horas. De la fracción nuclear se inmunoprecipitó a la VRK1 endógena (anticuerpo policlonal VE) y se detectó a SMN endógeno y a la coilina en el precipitado. Se utilizó a la glicil-tRNA-sintetasa (GARS) como control de carga citosólico, y a la histona H3 como control de carga nuclear.

3.2. SMN interactúa con la quinasa humana VRK1 a través de su región amino terminal

Para caracterizar más en detalle la interacción entre SMN y VRK1, hicimos un ensayo de mapeo con diferentes construcciones de la quinasa. En primer lugar, realizamos una inmunoprecipitación con las construcciones de VRK1 correspondientes a la región amino terminal. Así, células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos para la VRK1 silvestre (pcDNA3.1-VRK1-Myc), para la región amino larga (pcDNA3.1-VRK1(1-332)-Myc) y para la región amino corta (pcDNA3.1-VRK1(1-267)-Myc). Se inmunoprecipitaron estas construcciones con un anticuerpo que reconoce el epítipo Myc y se detectó a SMN endógeno en el precipitado. Vimos interacción tanto en la construcción para la VRK1 entera, como para los dos fragmentos amino de VRK1 (Figura 68 A). Quisimos entonces analizar si la interacción se producía exclusivamente por la región amino de VRK1 o también participaba su región carboxilo terminal. Para ello, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCVM6-SMN-Myc-Flag, pCEFL-GST∅, pCEFL-GST-VRK1, pCEFL-GST-C-VRK1 (267-396) y pCEFL-GST-VRK1 (R358X). Se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo α -Myc y se detectó a VRK1 con un anticuerpo α -GST. Observamos interacción de SMN con la VRK1 entera y con la construcción R358X, construcción que carece de los últimos 38 aminoácidos de la quinasa. Sin embargo, no detectamos

interacción entre SMN y la construcción de la región carboxilo terminal de VRK1 (Figura 68 B), concluyendo que estas dos proteínas interaccionan por la región amino terminal de VRK1.

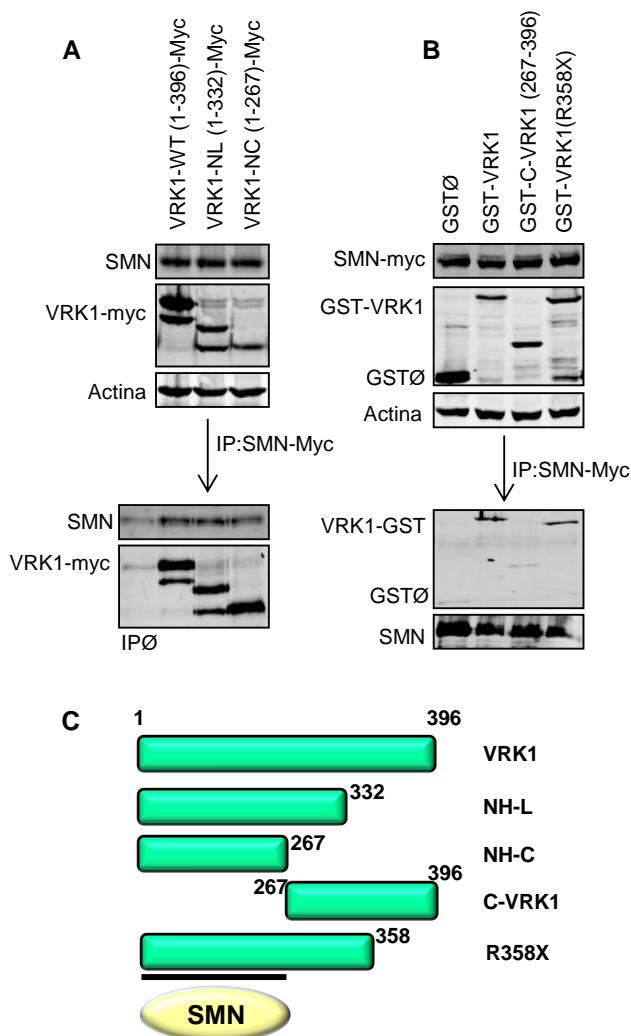


Figura 68: SMN se une a la región amino terminal de VRK1. **A.** Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1-VRK1-Myc (Silvestre: 1-396, NH-L: 1-332, NH-C: 1-267). La expresión de las proteínas fue comprobada en el lisado celular preparado 48 horas después de la transfección. Se inmunoprecipitó a VRK1 con un anticuerpo α -Myc policlonal y se detectó a SMN con un anticuerpo monoclonal de *BD Transduction Laboratories*. **B.** SMN no interacciona con la región carboxilo de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCMV6-SMN-Myc-Flag, pCEFL-GST \emptyset , pCEFL-GST-VRK1, pCEFL-GST-C-VRK1 (267-396) y pCEFL-GST-VRK1 (R358X). La expresión de las proteínas fue comprobada en el lisado celular preparado 48 horas después de la transfección. Se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo α -Myc policlonal y se detectó a VRK1 con un anticuerpo monoclonal α -GST de Santa Cruz. **C.** Representación de la unión de SMN a la región amino de VRK1.

3.3. VRK1 no fosforila a SMN

El hecho de que VRK1 sea una quinasa y que, además, fosforile a la coilina, nos hizo plantearnos la posibilidad de que quizás también estuviera fosforilando a la proteína SMN. Para poder analizarlo, se realizó un ensayo quinasa donde se añadió a la VRK1 purificada de bacterias a través de la construcción pGEX-GST-VRK1, y se inmunoprecipitó a SMN endógeno de células HeLa para utilizarlo como sustrato. Observamos, en los puntos donde había VRK1, su actividad de autofosforilación, la cual nos sirve como un control positivo del ensayo. Sin embargo, no detectamos ninguna señal de fosforilación en SMN, indicándonos que la quinasa no lo fosforila en condiciones *in vitro* (Figura 69).

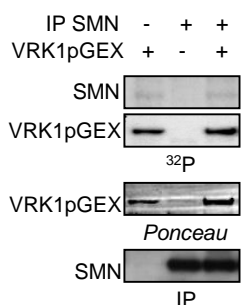


Figura 69: VRK1 no fosforila a SMN *in vitro*. Se inmunoprecipitó a SMN de células HeLa y se añadió como sustrato en un ensayo quinasa en el cual VRK1 fue añadida con el plásmido pGEX-GST-VRK1 de expresión en bacterias. Se realizó el ensayo quinasa *in vitro* en presencia de γ ³²-ATP. Se indica la incorporación de la radiactividad con ³²P.

Debido a que la quinasa VRK1 regula su actividad durante el ciclo, quisimos realizar un ensayo quinasa en las distintas etapas del ciclo celular para acabar de confirmar si existía algún tipo de fosforilación de SMN por parte de VRK1. Para obtener células sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular, se realizó un doble bloqueo con timidina y nocodazol a células HeLa. Este bloqueo consistió en añadir en primer lugar, timidina a 2mM al medio de cultivo durante 24 horas, la cual produce un bloqueo en la fase S del ciclo. Se liberan las células durante 3 horas, eliminando la timidina del medio, y se añade nocodazol a 100ng/mL durante 12 horas, punto en el cual tenemos la mayor parte de las células en fase G2/M. Se dejaron, simultáneamente, células sin suero en el medio para tener también en el ensayo la condición de parada de ciclo. Una vez las células se encontraban en las diferentes fases del ciclo, se inmunoprecipitó en paralelo a VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1F6 y a SMN con el anticuerpo monoclonal de *BD Transduction Laboratories*. A las inmunoprecipitaciones de SMN se las trató con fosfatasas para eliminar cualquier tipo de fosforilación previa al ensayo. Seguidamente, realizamos el ensayo quinasa *in vitro*.

Observamos de nuevo, como control positivo del ensayo, la actividad de autofosforilación de la quinasa humana VRK1, la cual, como se había descrito

anteriormente, disminuye significativamente en células paradas. También observamos un aumento de su actividad en mitosis y una reducción muy significativa en células paradas en fase S con timidina. Nuevamente, no observamos ninguna señal de fosforilación en SMN, concluyendo así que VRK1 no la fosforila en ninguna fase del ciclo celular (Figura 70).

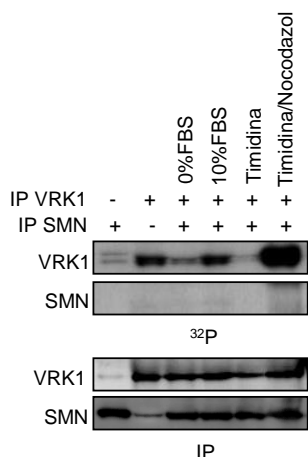


Figura 70: VRK1 no fosforila a la proteína SMN en ninguna fase del ciclo celular. Células HeLa fueron privadas de suero durante 3 días, mantenidas al 10%, tratadas con timidina 2mM durante 24 horas o tratadas con timidina 24 horas más 12 horas de nocodazol a 100ng/mL. Una vez realizado el tratamiento, se inmunoprecipitó en paralelo a VRK1 con el anticuerpo monoclonal 1F6 y a SMN con el anticuerpo monoclonal de *BD Transduction Laboratories*. A las inmunoprecipitaciones de SMN se las trató con fosfatasas durante 30 minutos a 30°C para eliminar cualquier tipo de fosforilación previa al ensayo. Seguidamente, realizamos el ensayo quinasa *in vitro* en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Se indica la incorporación de la radiactividad con ^{32}P .

3.4. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce la deslocalización de la proteína SMN

Sabemos que el silenciamiento de VRK1 produce el desensamblaje de los cuerpos de Cajal y, posteriormente, la degradación de la coilina en el proteasoma citosólico. El hecho de que SMN sea una proteína que, dentro del núcleo, se acumule en los cuerpos de Cajal, nos hizo plantearnos si el silenciamiento de VRK1 estuviera afectando a su localización.

Para analizar si VRK1 tenía algún efecto en la localización de SMN, células HeLa se transfectaron con tres siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02, si-VRK1-03 y si-VRK1-09) o con un siARN control (si-Control), mediante lipofección. Pasadas 72 horas, se realizó la lisis para comprobar la expresión de las proteínas de interés mediante electroforesis y *Western blot*, y se procesaron los cubreobjetos para su marcaje por inmunofluorescencia y visualización en el microscopio confocal.

En primer lugar, vimos como a las 72 horas de silenciamiento, los niveles proteicos de VRK1 se reducían significativamente con los tres siARN (Figura 71 A). Fijándonos en la inmunofluorescencia, observamos cómo la proteína SMN se localizaba, en condiciones control, en el citosol de forma difusa o acumulada dentro del núcleo en los cuerpos de Cajal o las geminas (Figura 71 B). Sin embargo, al silenciar a la quinasa VRK1, se producía un aumento de la fluorescencia de SMN en el citosol, el cual desaparecía casi por completo del núcleo (Figura 71 B). Para una mejor visualización, se cuantificó el nivel de fluorescencia de SMN en citosol y núcleo en cada condición, confirmándose que se reduce en núcleo y aumenta en citosol de manera significativa (Figura 71 C). Estos resultados nos estarían indicando que, al silenciar VRK1 y, por lo tanto, al desensamblarse los CBs, SMN tendría que salir al citosol casi en su totalidad, exceptuando aquel SMN que estuviera acumulado en las geminas.

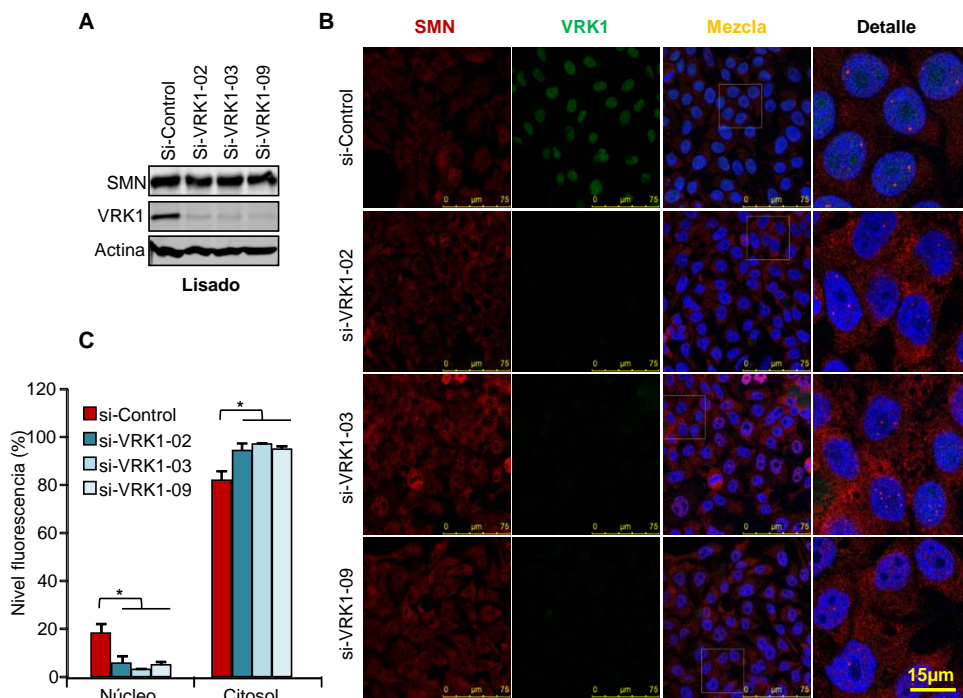


Figura 71: El silenciamiento de VRK1 produce la salida de SMN al citosol. Células HeLa se silenciaron con tres siARN específicos para VRK1 mediante lipofección. Pasadas 72 horas, se lisaron para comprobar la expresión de las proteínas (**A**), y se procesaron los cubreobjetos para su marcaje por inmunofluorescencia y visualización en el microscopio confocal (**B**). Se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce la región amino de la proteína de Sigma. **C**. Cuantificación de los niveles de fluorescencia de SMN en citosol y núcleo. Se realizó una prueba *t-Student* para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

Para corroborar que efectivamente SMN estuviera desplazándose desde el núcleo hacia el citosol, realizamos un fraccionamiento citosol-núcleo en células HeLa, las cuales se transfectaron con dos siARN específicos de VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03) o con un siARN control. Pasadas 72 horas, tiempo tras el cual obtenemos un silenciamiento eficaz de la quinasa, se lisaron las células para comprobar la expresión de las proteínas y, paralelamente, se realizó un fraccionamiento citosol-núcleo, donde utilizamos como controles de carga a la glicil-tRNA-sintetasa (GARS) para citosol y a la histona H3 para el núcleo. Pudimos observar que SMN, en los puntos donde se había silenciado a VRK1, disminuía significativamente de la fracción nuclear y aumentaba, en consecuencia, en la fracción citosólica (Figura 72). Se cuantificaron los niveles relativos de cada fracción para poder calcular la significancia en cada caso. Concluimos así que el silenciamiento de VRK1 produce la deslocalización de SMN, el cual deja de acumularse en los cuerpos de Cajal y pasa a estar de forma difusa en el citoplasma.

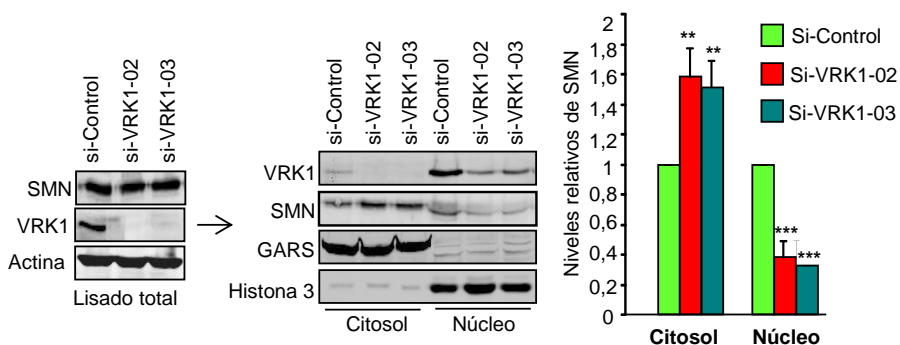


Figura 72: El silenciamiento de VRK1 provoca la salida al citosol de SMN. Células HeLa fueron transfectadas con los siARN para VRK1 si-VRK1-02 y si-VRK1-03 o con un si-Control. Pasadas 72 horas, se realizó la lisis para comprobar la expresión de las proteínas y, paralelamente, se realizó un fraccionamiento citosol-núcleo. Se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal VC de fabricación propia. Se utilizó a la actina como control de carga del lisado total y a la glicil-tRNA sintetasa GARS junto con la histona H3 como controles de carga del citosol y del núcleo, respectivamente. Se cuantificaron los niveles relativos de SMN en cada fracción y condición del ensayo. Se realizó una prueba t-Student para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

Este mismo efecto en SMN lo quisimos analizar en otra línea celular, como es la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Estas células se crecieron en cubreobjetos y se transfectaron con un siARN específico para VRK1, si-VRK1-02; o con un si-Control. Pasadas 72 horas, se procesaron los cubreobjetos para su marcaje por inmunofluorescencia y se visualizaron con el microscopio confocal. Se detectó a SMN con un anticuerpo monoclonal y a la VRK1 con un anticuerpo policlonal. Volvimos a observar que, al silenciar a la quinasa VRK1, aumentaba la fluorescencia de SMN en el citosol, indicándonos su salida del núcleo de nuevo (Figura 73). Así, podemos

afirmar que el efecto que tiene el silenciamiento de la quinasa sobre la proteína SMN se produce en dos tipos de líneas celulares muy diferentes.

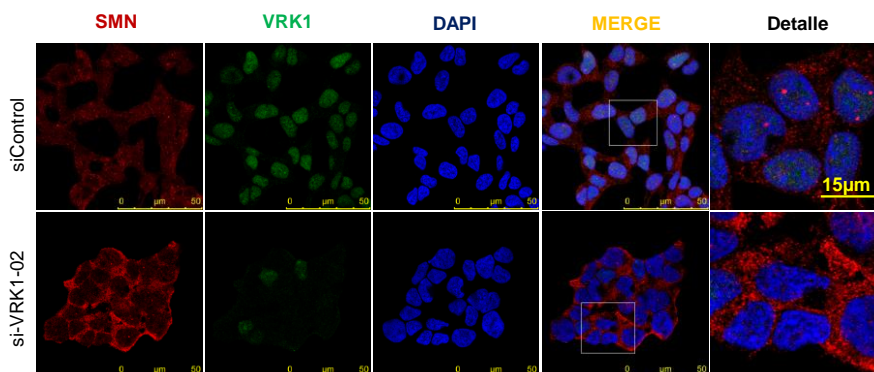


Figura 73: Efecto del silenciamiento de la quinasa VRK1 en SMN, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Se transfectaron células SH-SY5Y con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN sin diana específica como control. Pasadas 72 horas, se realizó la inmunofluorescencia, donde se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce la región amino de la proteína de Sigma.

Finalmente, para poder acabar de confirmar como SMN se deslocaliza del núcleo y sale al citosol, una vez se ha silenciado a VRK1 y los cuerpos de Cajal se han desorganizado, quisimos realizar ensayos con el inhibidor del exporte nuclear: la leptomicina B. Con este fin, se silenció a VRK1 en células HeLa con un siARN específico (si-VRK1-02). Pasadas 48 horas, se añadió leptomicina B a 0,2nM durante 24 horas más y, posteriormente, se realizó una inmunofluorescencia y un fraccionamiento citosol-núcleo para analizar los niveles de la proteína SMN antes y después del tratamiento.

Observamos de nuevo, tanto en el ensayo de inmunofluorescencia como en el *Western blot* del fraccionamiento, la salida de SMN desde el núcleo al citosol al silenciar a VRK1. Sin embargo, la leptomicina B, redujo la salida al citosol de SMN al silenciar a la quinasa VRK1, de tal forma que permanecía en el núcleo a niveles similares a las células control (Figura 74). Estos ensayos nos permiten concluir que el silenciamiento de VRK1, el cual produce el desensamblaje de los cuerpos de Cajal, tiene como consecuencia la salida de gran parte de la proteína SMN desde el núcleo, donde ya solo puede acumularse en las geminas, al citosol.

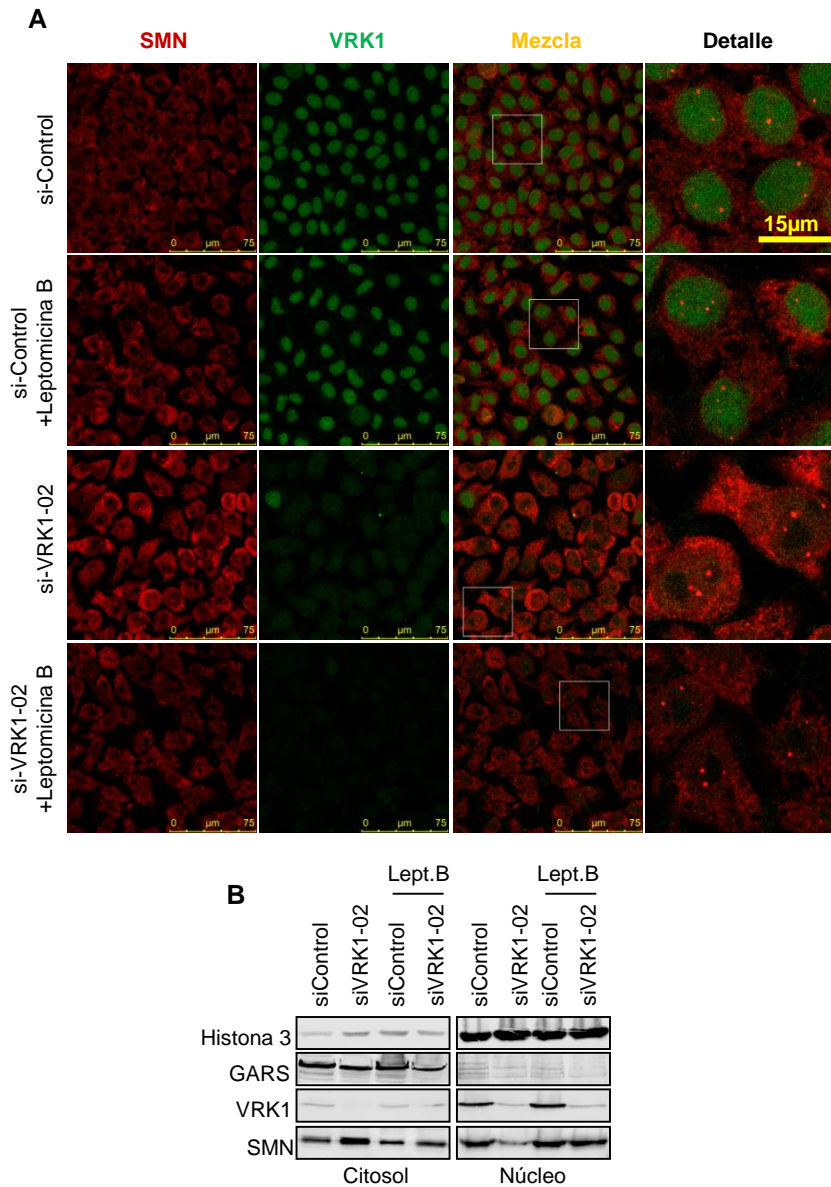


Figura 74: El inhibidor de exporte nuclear leptomicina B, reduce la salida de SMN al citosol como consecuencia del silenciamiento de VRK1. Células HeLa se transfectaron con un siARN específico de VRK1 o con un siARN control. Pasadas 48 horas, se añadió leptomicina B a 0,2nM durante 24 horas. Se realizó una inmunofluorescencia (**A**) y, paralelamente, se lisaron las células para realizar un fraccionamiento citosol-núcleo y analizarlo mediante electroforesis y *Western blot* (**B**). Se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce la región amino de la proteína de Sigma (IF) o con el anticuerpo policlonal VC de fabricación propia (WB). Se detectó a la glicil-tRNA-sintetasa (GARS) y a la histona H3 como controles de carga de citosol y núcleo, respectivamente.

3.5. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce el mismo efecto en la localización de SMN que el silenciamiento de la coilina

Si la salida al citosol de SMN es debida al desensamblaje de los cuerpos de Cajal, hecho que no le permite acumularse en estos compartimentos nucleares, es de suponer que el silenciamiento de VRK1 y el silenciamiento de la coilina debieran tener el mismo efecto en la localización de SMN. Con el fin de responder a esta cuestión, se realizó una inmunofluorescencia en la línea de carcinoma de mama MCF-7, la cual se silenció con un siARN específico para VRK1 o con un siARN específico para la coilina. Pasadas 72 horas, se detectó a SMN, a la coilina o a VRK1 y se analizó en el microscopio de fluorescencia confocal.

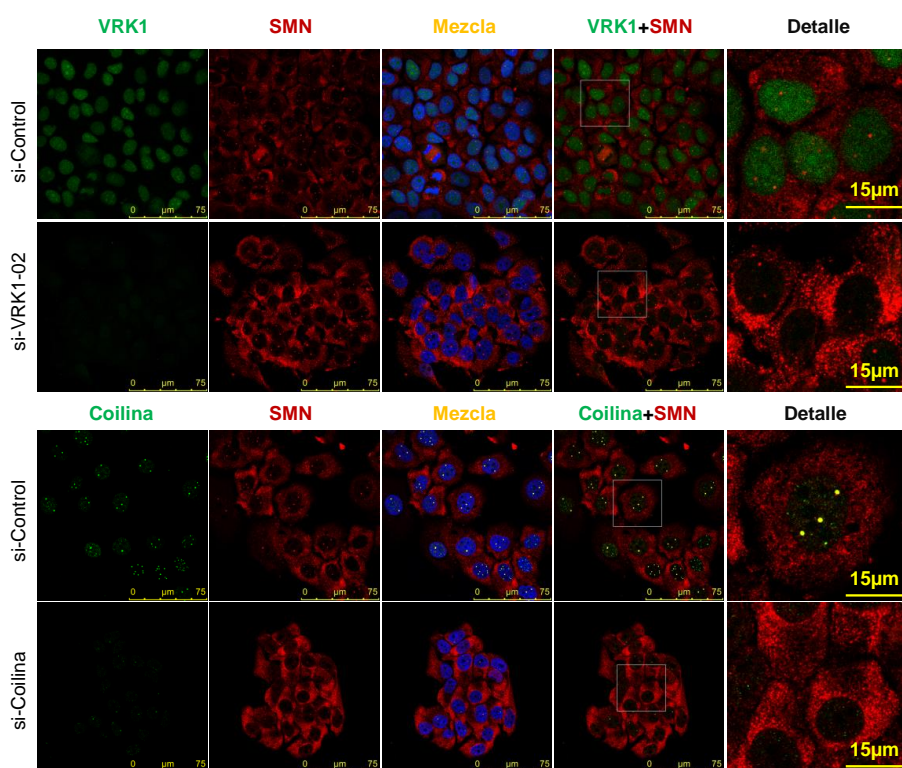


Figura 75: El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 produce el mismo efecto en la localización de SMN que el silenciamiento de la coilina. Células MCF-7 se transfectaron con siARN específicos para VRK1 o para coilina, o con un siARN control. Pasadas 72 horas, se realizó una inmunofluorescencia donde se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories*, a VRK1 con el anticuerpo policlonal que reconoce la región amino de la proteína de Sigma y a la coilina con el anticuerpo policlonal H-300 de Santa Cruz.

Observamos el mismo efecto tanto al silenciar a VRK1 como al silenciar a la coilina. Cuando silenciamos a VRK1, se producía la pérdida de los cuerpos de Cajal y, consecuentemente, se detectaba la salida al citosol de SMN, efecto que se detectaba

como un aumento de fluorescencia roja en el citosol y una disminución dentro del núcleo. Al silenciar a la coilina, proteína esencial para que se formen los cuerpos de Cajal, éstos desaparecían completamente, hecho que provocaba que todo el SMN se localizara en el citosol (Figura 75). Así, vemos como tanto el silenciamiento de VRK1 como el de la coilina, producen una pérdida de los cuerpos de Cajal y, por lo tanto, una deslocalización de SMN al citosol.

3.6. El silenciamiento de la quinasa humana VRK1 no afecta a la estabilidad de SMN

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, ratones *knock-out* de SMN son inviábiles, debido a que esta proteína es esencial para la viabilidad celular. El hecho de que el silenciamiento de la quinasa VRK1 estuviera produciendo la deslocalización de la proteína al citosol, lugar donde no puede realizar su mayor función, nos hizo plantearnos si, este silenciamiento de la quinasa, estuviera teniendo más efectos en la proteína. En primer lugar, pensamos en si, el hecho de que SMN se fuera del núcleo al citosol, hiciera a esta proteína más inestable. Para responder a esta pregunta células HeLa se silenciaron con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control. Pasadas 72 horas, tiempo necesario para una correcta bajada de los niveles proteicos de VRK1, se añadió cicloheximida (CHX: un inhibidor de la síntesis proteica) a 50µg/mL, y se fueron recogiendo puntos a los tiempos indicados. Se lisaron las células y se analizó la expresión de SMN y VRK1 mediante electroforesis y *Western blot*.

Observamos que el silenciamiento de la quinasa se realizó de forma eficaz y, en el punto control, los niveles de VRK1 fueron disminuyendo a partir de las 72 horas. Respecto a la proteína SMN, no se detectaron diferencias entre los puntos control y en los que se silenció a VRK1, empezó a disminuir a las 48 horas post cicloheximida, concluyendo de este modo que, el silenciamiento de VRK1 no afecta a la estabilidad de SMN. Se cuantificaron los niveles relativos de SMN y se realizó la gráfica con las medias y desviaciones estándar de los diferentes ensayos (Figura 76).

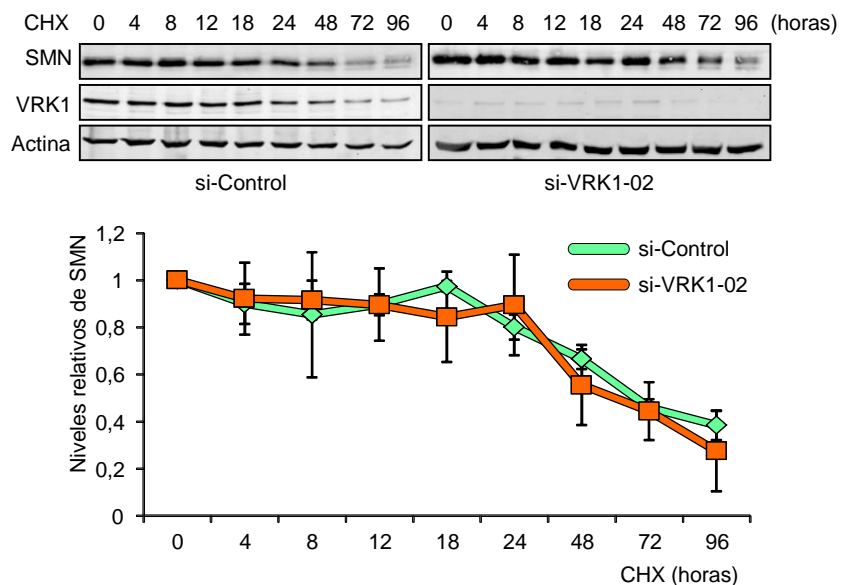


Figura 76: El silenciamiento de VRK1 no afecta a la estabilidad de la proteína SMN. Células HeLa fueron transfectadas con su siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control. Pasadas 72 horas, se añadió el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida (CHX) a 50µg/mL y se fueron recogiendo puntos a los tiempos indicados en la figura. Se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 con el anticuerpo policlonal VC de fabricación propia. Se utilizó a la actina como control de carga. Se cuantificaron los niveles relativos de SMN y se representaron en un gráfico las medias y desviaciones estándar de los diferentes ensayos.

3.7. Efecto del silenciamiento o sobreexpresión de la quinasa humana VRK1 en los niveles de expresión de SMN

El siguiente aspecto que quisimos analizar fue si el silenciamiento de VRK1, el cual ya vimos en el apartado anterior, no afectaba a la estabilidad proteica de SMN, tenía algún efecto a nivel de expresión del gen. Para poder investigarlo, realizamos ensayos de RT-PCR cuantitativa para observar cambios en los niveles de ARNm. En primer lugar, llevamos a cabo este tipo de ensayos silenciando a la quinasa con dos siARN específicos para VRK1 (si-VRK1-02 y si-VRK1-03), con un siARN control (si-Control) o se privaron de suero en el medio (como control de inactividad de la quinasa). Pasadas 96 horas, se extrajo el ARN total de las células mediante el kit *RNeasy extraction kit* de Qiagen, se cuantificó y se realizó la qRT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores del gen *GAPDH* utilizados como control interno del ensayo.

En primer lugar observamos que, los siARN de VRK1 producían una reducción significativa de los niveles de ARN mensajero de la quinasa, mientras que las condiciones en ausencia de suero (0% FBS) no tenían efecto. Sorprendentemente, sí observamos efectos en los niveles de ARNm de la proteína SMN al silenciar a VRK1, los cuales aumentan de manera significativa, no volviéndose a observar efecto en el punto al 0% de FBS (Figura 77). Estos datos nos indican que el silenciamiento de la quinasa humana VRK1 aumenta la expresión de la proteína SMN, detectándose con mayores niveles de ARNm de la proteína.

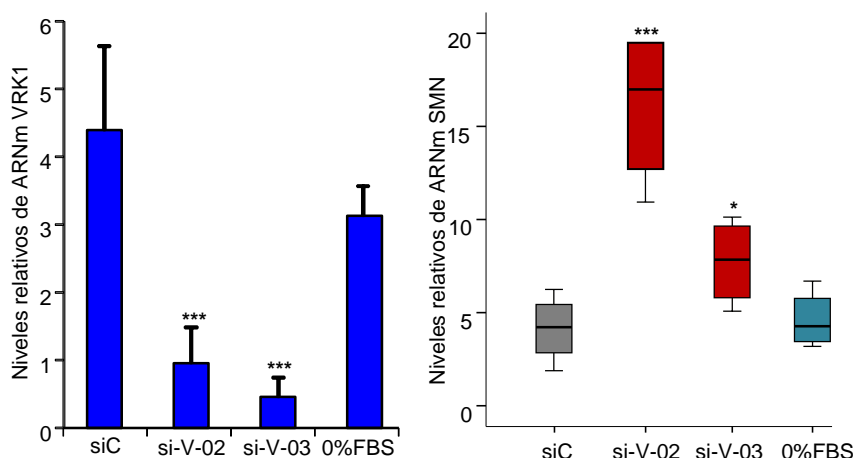


Figura 77: El silenciamiento de VRK1 produce un aumento significativo de los niveles de ARN mensajero de SMN. Se realizó la lipofección con *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) a células HeLa para silenciar a la VRK1. Se utilizaron dos siARN específicos diferentes, un siARN control o se eliminó el suero del medio. Pasadas 96 horas, se realizó la extracción del ARN total (*RNeasy extraction kit*, Qiagen) y se cuantificaron las muestras. Posteriormente, se realizó la qRT-PCR (*SyberGreen kit*), y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para la *GAPDH*, utilizada como control. Se realizó una prueba *t-Student* para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

Para confirmar este efecto en los niveles de expresión de SMN, realizamos el ensayo contrario, de tal forma que en vez de silenciar a VRK1, la sobreexpresamos a través de la infección de un vector retroviral. Se utilizaron células HEK-293T para producir partículas virales y el sobrenadante de estas células se utilizó para infectar a células HeLa, utilizadas como diana. Se infectaron los vectores retrovirales pQCXIP vacío o pQCXIP-VRK1. Se seleccionaron las células infectadas con puomicina durante 4 días y se realizó la extracción del ARN total. Realizamos la qRT-PCR y relativizamos los valores de ARNm de SMN y VRK1 con los obtenidos para el gen de la *GAPDH* utilizada como control interno del ensayo. Observamos que la infección con el vector pQCXIP-VRK1 aumentaba significativamente los niveles de VRK1, indicándonos que la infección se había realizado correctamente (Figura 78). Al observar los niveles de ARNm de SMN, detectamos cómo al sobreexpresar a la quinasa obteníamos el efecto

contrario que al silenciarla, reduciéndose los niveles de ARNm de SMN de manera significativa. Con estos resultados podemos concluir que VRK1 sí tiene efecto en la expresión de *SMN*.

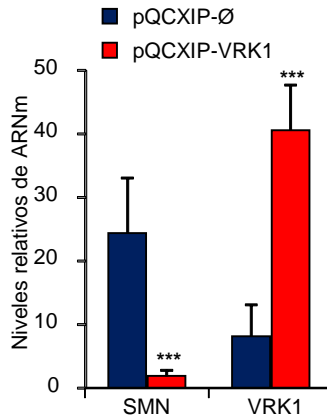


Figura 78: La sobreexpresión de VRK1 reduce significativamente los niveles de ARNm de SMN. Células HeLa se infectaron con los vectores retrovirales pQCXIP vacío o pQCXIP-VRK1. Se seleccionaron las células infectadas con puromicina durante 4 días y, pasado este tiempo, se extrajo el ARN total (*RNeasy extraction kit*, Qiagen) y se cuantificaron las muestras. Posteriormente, se realizó la qRT-PCR (*SyberGreen kit*), y se normalizaron los valores con respecto a los obtenidos para la *GAPDH*, utilizada como control. Se realizó una prueba t-Student para la estadística. * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.005$) *** ($P < 0.0005$).

3.8. La interacción entre SMN y el factor de transcripción p53 no se ve afectada al silenciar a la quinasa VRK1

Mutaciones en el gen *SMN1* causan atrofia muscular espinal. Se sabe que SMN interacciona directamente con el factor de transcripción p53 y que, mutaciones en SMN afectan a la interacción con éste, hecho que se ha visto correlaciona con la severidad de la patología. Además, la proteína truncada que se produce a través del gen *SMN2* tampoco se une de forma efectiva con p53. Estas dos proteínas, colocalizan en los cuerpos de Cajal, sin embargo, en fibroblastos derivados de pacientes con SMA, p53 se redistribuye al nucléolo (Young et al., 2002). Todos estos datos indicarían una interacción funcional entre ambos, o quizás explicaría la muerte de las motoneuronas en este tipo de patología, datos que aún se desconocen. Con toda esta información, y sabiendo que VRK1 regula al factor de transcripción p53 e interacciona con la proteína SMN, quisimos estudiar si la quinasa tenía algún efecto en la interacción entre ambos.

Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación en los que silenciamos a VRK1 y vimos si tenía algún efecto en la interacción entre SMN y p53. Primeramente, hicimos este ensayo en células MCF-7 a las que silenciamos con un siARN específico para VRK1. Pasadas 72 horas, se inmunoprecipitó a p53 endógeno y se detectó a SMN en el precipitado. No se observó ningún cambio en la interacción entre SMN y p53 al silenciar a la quinasa VRK1 (Figura 79 A). Debido a que en el trabajo de *Young* y colaboradores utilizan la línea celular de osteosarcoma U2OS y, además, realizan varios tipos de estímulos para ver dicha interacción o cambios en ésta, realizamos este mismo ensayo en la línea celular U2OS, añadiendo cicloheximida a 10mM durante 4 horas (Figura 79 B). Realizamos también el ensayo en MCF-7 de nuevo, pero probando con otro de los tratamientos citados en el artículo, la leptomicina B (Figura 79 C). En todos los casos se silenció a VRK1 con un siARN específico y, posteriormente, se añadió cada tratamiento a las concentraciones y tiempos indicados. No vimos ninguna diferencia en la interacción entre la proteína SMN y el factor de transcripción p53 en cualquiera de las condiciones y líneas estudiadas, confirmando que VRK1 no juega ningún papel esencial en el complejo entre ambas proteínas.

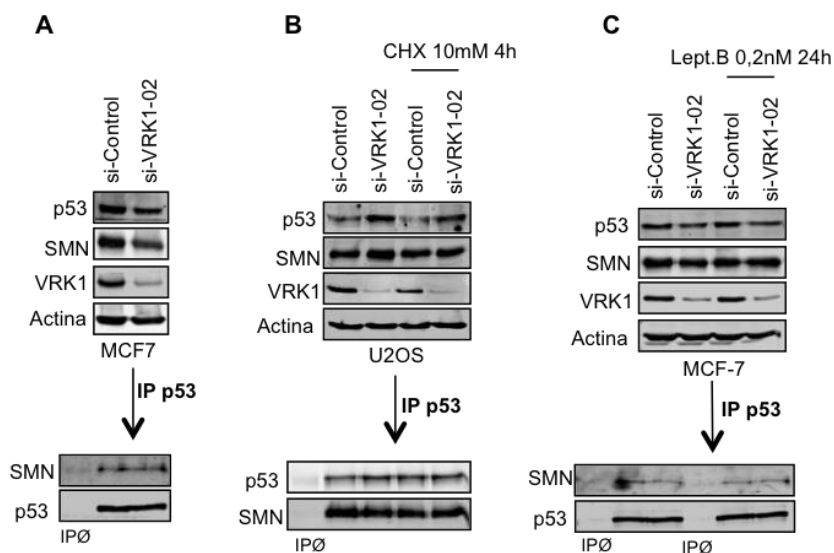


Figura 79: La interacción entre SMN y el factor de transcripción p53 no se ve afectada por el silenciamiento de la quinasa VRK1. Células MCF-7 o U2OS fueron transfectadas con un siARN específico para VRK1 (si-VRK1-02) o con un siARN control (si-Control). Pasadas 72 horas, se añadieron los tratamientos indicados en la figura y se realizó la inmunoprecipitación de p53 endógeno con el anticuerpo policlonal CM1 de Novocastra. Se detectó a SMN en el precipitado con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories*.

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

VRK1 y coilina son proteínas que se regulan durante el ciclo celular, por este motivo nos resultó de interés analizar más a fondo el comportamiento de ellas, junto con SMN, durante las distintas fases del ciclo. Con este fin, células HeLa se sometieron al doble bloqueo con timidina y nocodazol explicado anteriormente en este trabajo, en la figura 41. De forma resumida tenemos células a las que se eliminó el suero del medio de cultivo (fase G0), a células con medio de cultivo completo con 10% FBS, células a las que se ha tratado durante 24 horas con timidina (fase S), células con tratamiento de timidina seguido de tratamiento con nocodazol (G2/M) y, finalmente, células a las que se ha liberado del nocodazol y las cuales se van recogiendo a diferentes tiempos para obtener las distintas fases del ciclo celular hasta volver a llegar a la fase G1.

En primer lugar, con los puntos recogidos en el ensayo, se realizaron lisados para comprobar la expresión de todas las proteínas de interés, además de distintos marcadores del ciclo celular como control interno del ensayo. En la parte superior de la Figura 80, donde se muestra el lisado total, observamos que los niveles de VRK1 y SMN permanecen constantes durante el ciclo celular. Detectamos, además, a las proteínas pRb y ciclina D1, las cuales se observan en las fases de mitosis y van disminuyendo conforme vuelven a entrar las células en fase G1. Se utilizó a la proteína del retinoblastoma (Rb) total como control de carga para la fosforilada (pRb) y a la actina como control de carga para el resto de proteínas.

También se realizó un fraccionamiento nuclear (Figura 80, panel inferior) para poder detectar a la coilina, tanto total como fosforilada en el residuo serina 184. Vimos cómo los niveles de coilina total se mantenían constantes durante el ciclo, si bien en la mitosis la banda aparecía más intensa y no como un doblete como en el resto de condiciones. La fosforilación en la serina 184, tal y como habíamos mostrado en ensayos anteriores al caracterizar a este residuo, aparecía exclusivamente en las fases mitóticas. Se utilizó a la histona H3 como control de carga nuclear. Con estos resultados, podíamos confirmar que el tratamiento con timidina y nocodazol sincronizaba en las distintas fases del ciclo a la línea celular HeLa, pudiendo seguir analizando otros aspectos de interés.

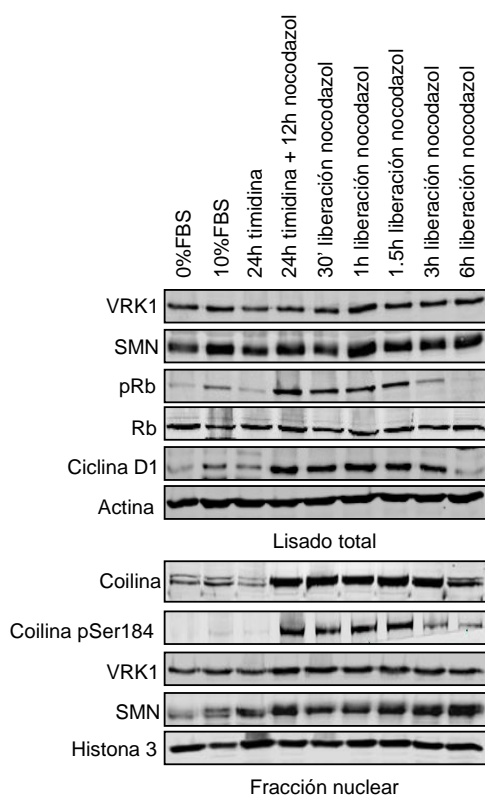


Figura 80: Lisado y extractos nucleares de células tratadas con timidina y nocodazol. Células HeLa fueron privadas de suero durante 3 días, mantenidas al 10% de suero, tratadas con timidina durante 24 horas o tratadas con timidina 24 horas más 12 horas de nocodazol. Estas últimas se liberaron y se recogieron puntos a diferentes tiempos. Se lisaron las células para realizar lisados totales o extractos nucleares. Se detectó a la coilina con el anticuerpo policlonal de Santa Cruz H-300, la coilina pSer184 con el anticuerpo policlonal de *Antibody Production Services Ltd*, a la VRK1 con el anticuerpo policlonal de fabricación propia VC, a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories*, a la ciclina D1 con el anticuerpo policlonal M-20 de Santa Cruz, pRb fue detectado con el anticuerpo policlonal 9308 de *Cell Signaling*, Rb total se detectó con el anticuerpo policlonal C-15 de Santa Cruz y, finalmente, se detectaron a la actina y a la histona H3 como controles de carga.

Si nos fijamos en la figura anterior (Figura 80), tanto la coilina como SMN, en la fracción nuclear, aparecen como una doble banda que, en las fases mitóticas, se une en una sola banda más intensa y, una vez se va finalizando la mitosis, vuelven a aparecer las dos bandas nuevamente. Para poder confirmar que se trataba de las formas hipo e hiper fosforiladas de coilina y SMN, realizamos un fraccionamiento nuclear con células HeLa al 10% de suero o tratadas con timidina y nocodazol (mitóticas). Los extractos fueron incubados con fosfatasas para eliminar cualquier fosforilación y ver si, de este modo, se volvía a desdoblarse la banda única en mitosis. Observamos que en las células sin tratar con fosfatasas, se volvía a producir la banda más intensa y de mayor tamaño en la coilina y en SMN. Sin embargo, cuando tratamos con fosfatasas, esta banda efectivamente se desdoblaba en dos bandas, sugiriendo que lo que vemos en los extractos es la forma hipofosforilada e hiperfosforilada en la mitosis (Figura 81).

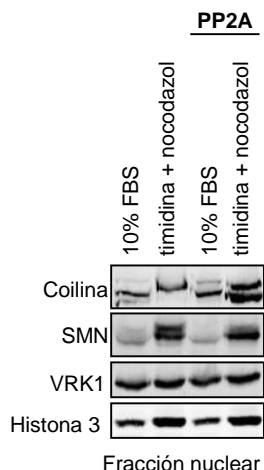


Figura 81: Extractos nucleares al 10% de suero o con timidina y nocodazol tratados con fosfatasas. Se trataron células HeLa con timidina y nocodazol para obtener extractos mitóticos o bien se dejaron al 10% de suero. Se realizó un fraccionamiento nuclear y se trataron los extractos con fosfatasas. Se detectó a la coilina, a SMN y a VRK1 mediante electroforesis y *Western blot*. Se utilizó a la histona H3 como control de carga nuclear.

El siguiente aspecto que quisimos analizar, fue la interacción y colocalización entre las distintas proteínas durante el ciclo celular. Para ello, en primer lugar, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de las proteínas endógenas en células HeLa tratadas con el doble bloqueo de timidina – nocodazol. Se volvieron a analizar la expresión de las proteínas en los lisados y fracciones nucleares mediante electroforesis y *Western blot*, así como los marcadores de ciclo usados anteriormente, como control.

En el primer ensayo, se inmunoprecipitó a la VRK1 endógena y se detectó tanto a SMN como a la coilina en el precipitado. Ambas proteínas interactúan con VRK1 durante la mitosis, de tal forma que aparece la interacción en el punto tratado con timidina y nocodazol, y ésta permanece a lo largo del ciclo, disminuyendo cuando las células vuelven a entrar en la fase G1, aproximadamente a las 3 o 6 horas de liberación del nocodazol (Figura 82).

Realizamos también la inmunoprecipitación de SMN endógeno para ver su interacción con la coilina. Detectamos a estas dos proteínas formando un complejo en el punto al 10% de suero, y cuando añadíamos timidina y nocodazol, interacción que se mantenía hasta las 3 horas de liberación, cuando las células ya salen de mitosis (Figura 82). Por lo tanto, vemos como VRK1 interactúa con SMN y coilina durante la mitosis o en células no sincronizadas (10% FBS), al igual que ocurre con SMN y coilina.

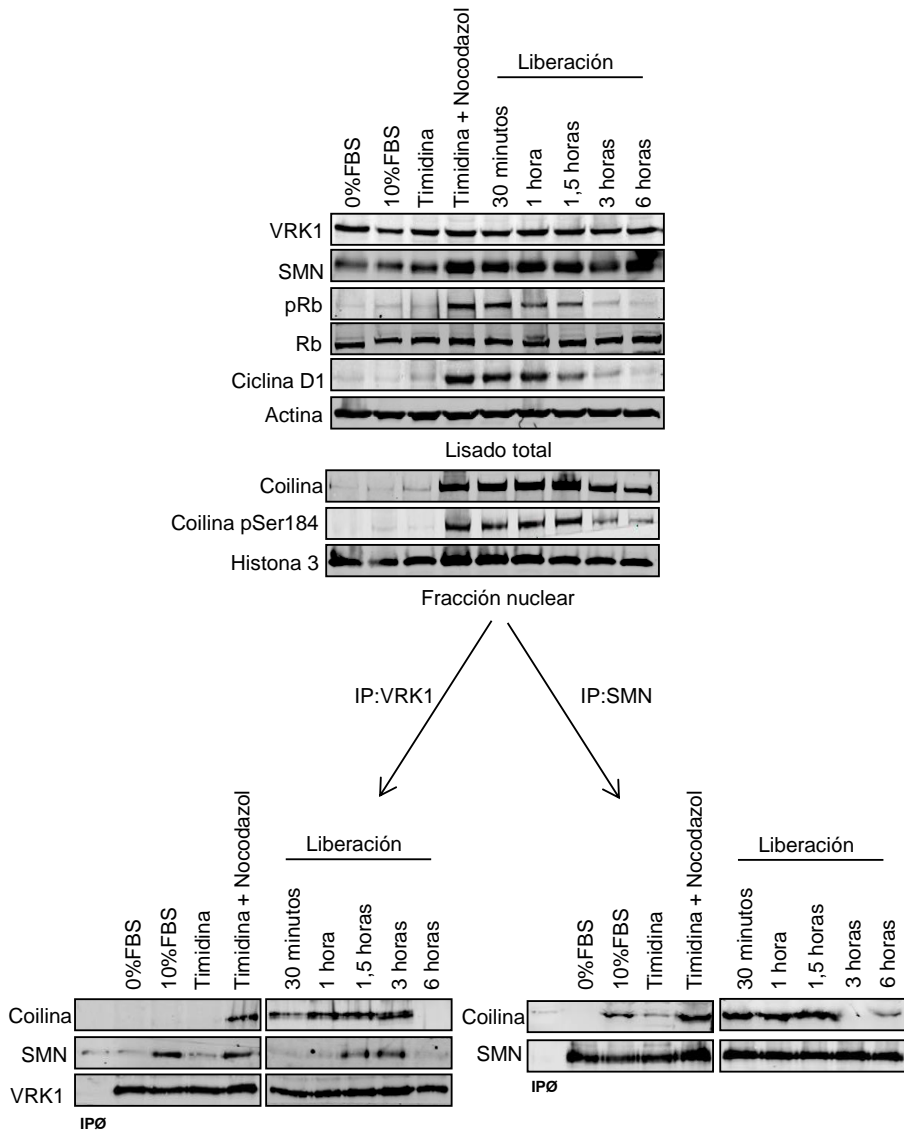


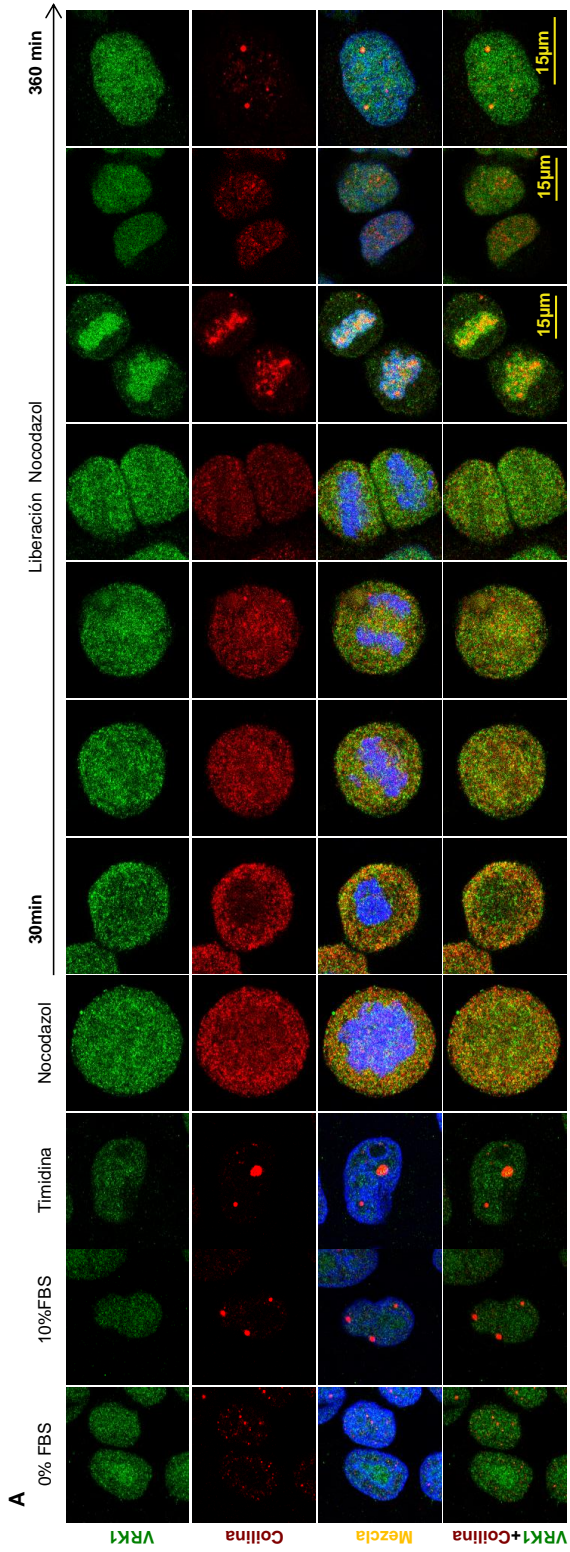
Figura 82: Interacción entre VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular. Células Hela fueron privadas de suero durante 3 días, mantenidas al 10% de suero, tratadas con timidina durante 24 horas o tratadas con timidina 24 horas más 12 horas de nocodazol. Estas últimas se liberaron y se recogieron puntos a los tiempos indicados. Se lisaron las células para realizar lisados totales o extractos nucleares. Se inmunoprecipitó a VRK1 o a SMN, y se detectó a la coilina o a SMN en el precipitado.

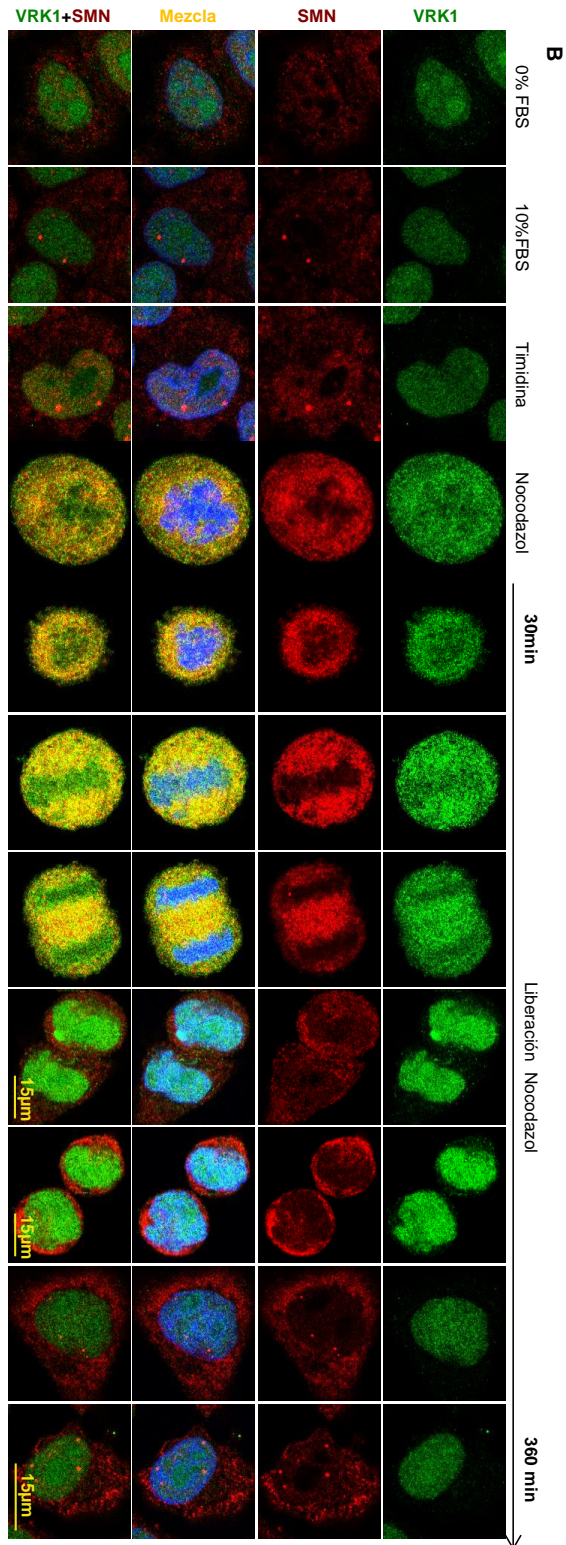
Una vez detectada la interacción entre las tres proteínas a través de ensayos de interacción, quisimos un resultado más visual a través de inmunofluorescencias vistas en el microscopio confocal. Para ello, crecimos células HeLa en cubreobjetos redondos tratados con poli-L-lisina al 0,01%, a las que se realizó el mismo tratamiento que en los ensayos anteriores. Se detectó a la coilina, a SMN y a VRK1 endógenas en las combinaciones indicadas en cada ensayo.

En la Figura 83 A, se detectó a VRK1 y coilina endógenas. En el punto sin suero, donde las células se encuentran paradas, no se observan cuerpos de Cajal, sino un marcaje disgregado nuclear. En fase G1 se detectan cuerpos de Cajal, dos o tres por célula, brillantes y discretos, sobre un fondo nucleoplasmático muy tenue. En células en fase S, bloqueadas con timidina, los cuerpos de Cajal aumentan considerablemente el tamaño y, una vez la célula entra en mitosis, éstos desaparecen y solo se aprecia un marcaje uniforme rojo que, una vez las células empiezan la citocinesis se concentra en la cromatina. Una vez se han separado las células hijas, tal y como está descrito en la bibliografía, no detectamos cuerpos de Cajal hasta la G1 intermedia o tardía, a las seis horas de liberación. El marcaje de VRK1 en verde, se mantiene constante durante el ciclo. Cabe destacar que durante la separación de las células hijas, también se concentra en la cromatina, igual que la coilina.

Si nos fijamos en la figura 83 B, donde hemos marcado a VRK1, esta vez junto con SMN, se aprecia a simple vista una gran colocalización durante la mitosis, cuando ambas proteínas están libres por la célula. En este caso, cabe destacar las fases de telofase y citocinesis, ya que, mientras VRK1 se concentra en la cromatina como en el caso anterior, SMN se queda en el citosol, donde una vez formada la célula hija permanecerá hasta que vuelvan a formarse los cuerpos de Cajal, donde se concentrará en el núcleo.

Finalmente, quisimos marcar a SMN junto con la coilina (Figura 83 C). En fase G0, al no existir cuerpos de Cajal, SMN permanece en el citosol. En células al 10% de suero, SMN y coilina colocalizan en los cuerpos de Cajal, que se vuelven a agrandar al tratar a las células con timidina. Durante la mitosis ambas proteínas colocalizan de forma considerable, y vuelven a separarse en la telofase y citocinesis, cuando la coilina se dirige a la cromatina y SMN se queda en el citosol. No volverán a colocalizar hasta bien entrada la fase G1, cuando vuelven a formarse los cuerpos de Cajal y SMN se puede concentrar en ellos.





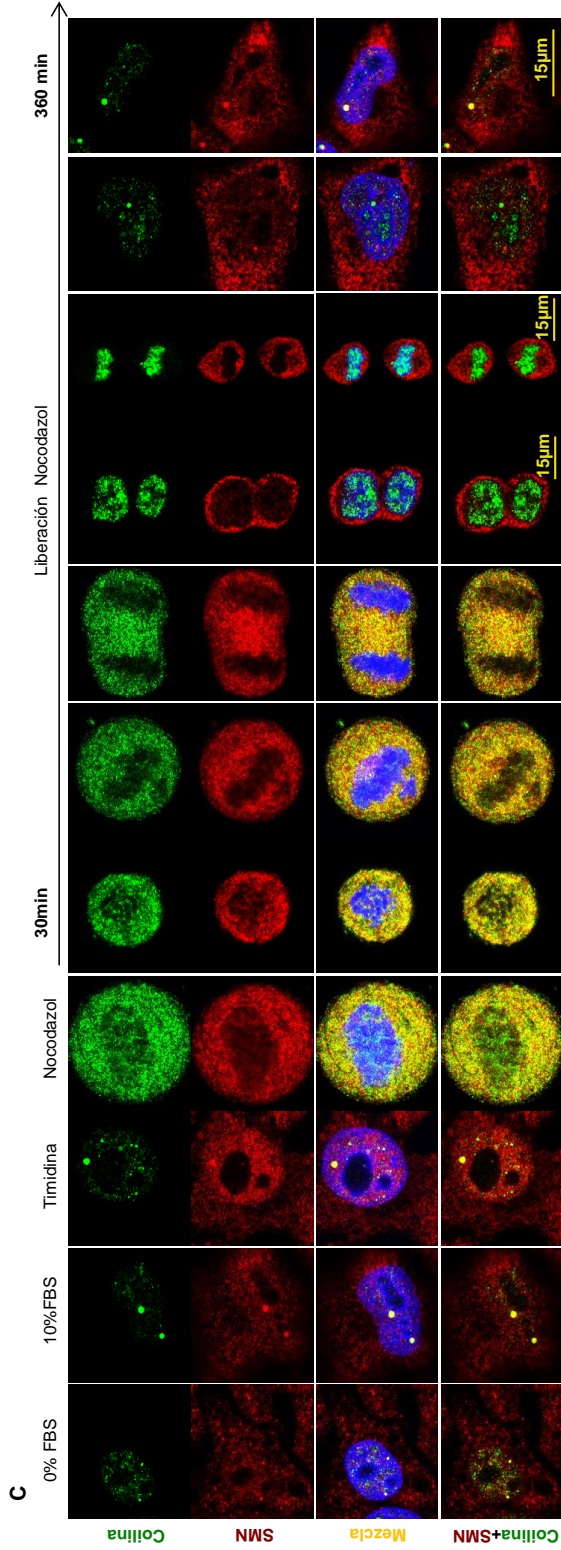


Figura 83: Colocalización de las proteínas colina, SMN y VRK1 durante el ciclo celular. Células HeLa sembradas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina al 0,01%, fueron privadas de suero durante 3 días, mantenidas al 10% de suero, tratadas con timidina durante 24 horas o tratadas con timidina 24 horas más 12 horas de nocodazol. Estas últimas se liberaron y se recogieron puntos a los tiempos indicados. Se realizaron inmunofluorescencias donde se detectó a la colina con el anticuerpo monoclonal Pdelta (rojo) o el policlonal H-300 (verde) de Santa Cruz, a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a VRK1 con el anticuerpo policlonal de Sigma que reconoce la región amino terminal de la proteína.

Con estos datos, podemos concluir que VRK1 interacciona con SMN y coilina durante la mitosis y, una vez la célula vuelve a entrar en G1 se pierde dicha interacción. En el caso de SMN y coilina, éstas interaccionan en células asincrónicas, ya que ambas están dentro de los cuerpos de Cajal. Vuelven a interaccionar libres en la célula durante la mitosis y, una vez llegada la telofase y citocinesis, se separan y pierden su interacción y colocalización, hasta que los cuerpos de Cajal vuelven a formarse en la fase G1 intermedia o tardía.

5. Caracterización de las mutaciones en VRK1 (R89Q, R133C, V236M, R358X) causantes de patologías neurodegenerativas

Como se explicó en la introducción de este trabajo, se han descrito, recientemente, varias mutaciones en la quinasa humana VRK1, que causan atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelosa o neuropatía sensoriomotora hereditaria con microcefalia. El hecho de que sean mutaciones descubiertas hace muy poco tiempo hizo necesaria su caracterización a nivel de estabilidad, y actividad, además de analizar su interacción con otras proteínas, como la coilina o SMN.

5.1. Estudio de la estabilidad de los diferentes mutantes de VRK1

Está descrito como la mutación K179E en VRK1 genera una quinasa inactiva que, además, presenta una menor estabilidad proteica en comparación con la VRK1 silvestre (Valbuena et al., 2008). Así, lo primero que quisimos evaluar fue la estabilidad de los diferentes mutantes de VRK1. Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1 (Silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X o K179E). Pasadas 48 horas, se añadió cicloheximida a 50 μ g/mL y se fueron recogiendo puntos a los tiempos indicados. Se lisaron las células y se analizó la expresión de los diferentes mutantes de VRK1 mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectó a las diferentes VRK1 con un anticuerpo α -HA, y se marcó a la actina como control de carga.

Observamos que las mutaciones K179E y R358X fueron las más inestables, no detectándose proteína a las 12 horas de cicloheximida. La mutación R133C fue la siguiente en degradarse, a las 24-48 horas de tiempo con cicloheximida. Finalmente, tanto la VRK1 silvestre como las mutaciones R89Q y V236M se mostraron muy estables, no observándose degradación a las 48 horas post cicloheximida (Figura 84). Se representaron en un gráfico los valores a las 0 horas y 24 horas después del tratamiento.

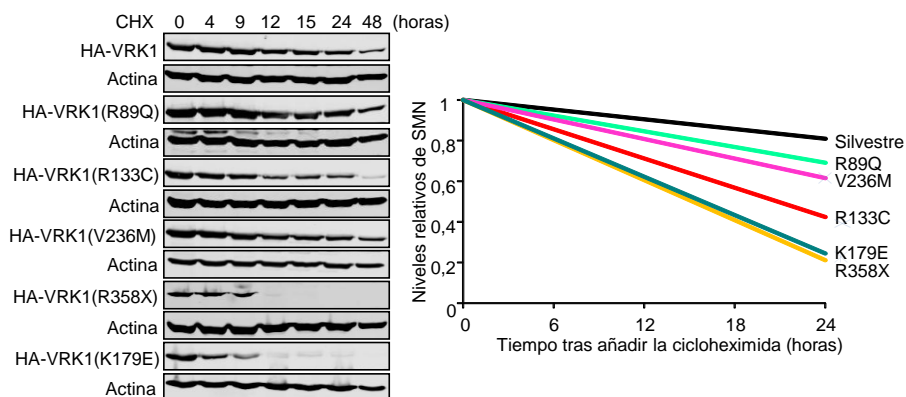


Figura 84: Ensayo de estabilidad de los mutantes de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1 (silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X o K179E). Pasadas 48 horas, se añadió el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida a 50 μ g/mL y se recogieron puntos a los tiempos indicados en el ensayo. Se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas mediante electroforesis y *Western blot*. Se detectaron las mutaciones de VRK1 con un anticuerpo α -HA policlonal y se utilizó a la actina como control de carga. Se representaron en un gráfico los niveles relativos a las 0 y 24 horas de tratamiento para una mejor visualización.

5.2. Estudio de la actividad de los mutantes de VRK1

Una vez supimos la estabilidad de los diferentes mutantes, quisimos estudiar la actividad de éstos, medida tanto en su capacidad de autofosforilarse como de fosforilar a un sustrato conocido como es el factor de transcripción p53 (Lopez-Borges and Lazo, 2000). Con este fin, realizamos un ensayo quinasa *in vitro* utilizando células HEK-293T a las que transfectamos con los plásmidos pCEFL-GST \emptyset o pCEFL-GST-VRK1 (silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X o K179E). Se inmunoprecipitaron a los mutantes mediante un *Pull-Down* y se utilizó como sustrato la proteína purificada pGEX-GST-p53 (1-85). En la autorradiografía se detectó la autofosforilación de los diferentes mutantes de VRK1, así como la fosforilación sobre p53. Observamos que la mutación R89Q es mucho más activa que la VRK1 silvestre, detectándose tanto una mayor autofosforilación como una mayor fosforilación sobre p53. Sin embargo, los mutantes R133C y R358X son casi tan inactivos como la VRK1 inactiva K179E, no observándose capacidad de autofosforilase ni de fosforilar a p53. Finalmente, la mutación V236M, era menos activa que la VRK1 silvestre, pero sí se observó autofosforilación y fosforilación de p53, aunque en menor medida (Figura 85).

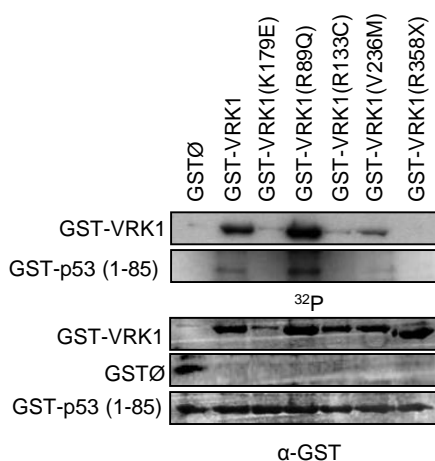


Figura 85: Fosforilación de p53 por los mutantes de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-GST \emptyset o pCEFL-GST-VRK1 (silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X o K179E). Pasadas 48 horas, se realizó un ensayo de *Pull-Down* y se llevó a cabo el ensayo quinasa, en presencia de γ 32 -ATP, utilizando como sustrato a la proteína purificada pGEX-GST-p53 (1-85). Se indica la incorporación de la radiactividad (^{32}P) y los controles detectados con el anticuerpo monoclonal α -GST.

Para confirmar el resultado anterior, y, además, centrarnos más en el residuo descrito de fosforilación de VRK1 en p53, la treonina 18, quisimos realizar un ensayo *in vitro* con anticuerpo fosfoespecífico. Para ello, células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1 (silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X y K179E). Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitaron los mutantes con un anticuerpo α -HA policlonal, y se realizó un ensayo con ATP frío, añadiendo como sustrato a la proteína purificada pGEX-GST-p53 (1-85). Se detectó la fosforilación de p53 en la treonina 18 con el anticuerpo policlonal fosfoespecífico para ese residuo (Abcam ab30659). Volvimos a observar una mayor fosforilación de p53 con el mutante R89Q, mientras que el mutante V236M fosforilaba en menor medida en comparación a la VRK1 silvestre. Tanto el mutante R133C como el mutante R358X eran igual de inactivos a la quinasa inactiva K179E (Figura 86).

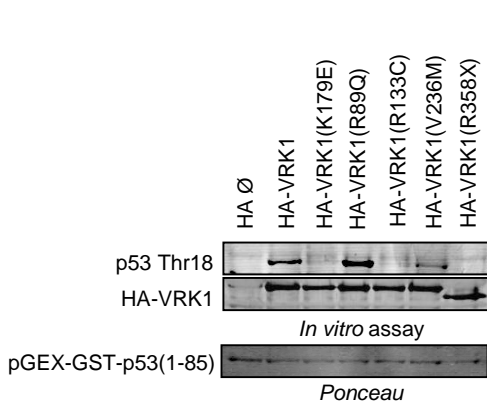


Figura 86: Fosforilación de la treonina 18 de p53 por los mutantes de VRK1. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1 (silvestre, R89Q, R133C, V236M, R358X y K179E). Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitaron los mutantes con un anticuerpo α -HA policlonal, y se realizó un ensayo con ATP frío a 30 μM , añadiendo como sustrato a la proteína purificada pGEX-GST-p53(1-85). Se detectó la fosforilación de p53 en la treonina 18 con el anticuerpo policlonal fosfoespecífico (Abcam ab30659).

5.3. Interacción y colocalización entre los mutantes de VRK1 y las proteínas coilina y SMN

Quisimos analizar la colocalización e interacción entre los distintos mutantes de VRK1, los cuales hemos visto presentan diferente estabilidad y actividad, con las proteínas coilina y SMN.

En primer lugar, realizamos una inmunofluorescencia en células MCF-7, las cuales se transfectaron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Se procesaron los cubreobjetos para su marcaje y se detectó a la coilina con un anticuerpo monoclonal y a VRK1 sobreexpresada con un anticuerpo policlonal que detecta al epítipo HA. Observamos que los diferentes mutantes de VRK1 mostraban una señal nuclear uniforme, a excepción del mutante R358X que, como se explicó anteriormente, es exclusivamente citosólico debido a que su mutación se sitúa en la señal de localización nuclear de la quinasa. En ningún caso, la sobreexpresión de los mutantes afectó al marcaje de la coilina ni a los cuerpos de Cajal (Figura 87 A).

Además, quisimos comprobar si todos los mutantes de VRK1 mostraban interacción con coilina. Por este motivo, células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes, junto con el plásmido pCVM6-Coilina-Myc-Flag. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitó a la coilina y se detectó a VRK1 en el precipitado. Se observó interacción entre la coilina y todos los mutantes de VRK1, concluyendo que existe interacción sin importar la mutación de la quinasa (Figura 87 B).

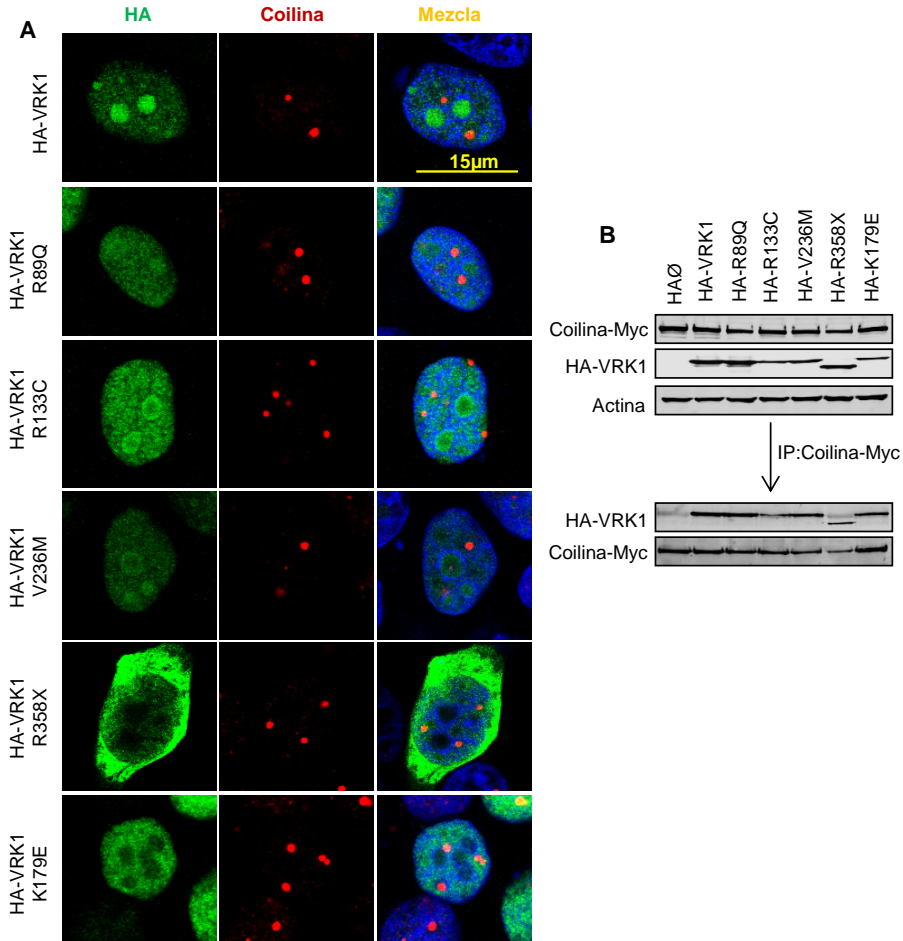


Figura 87: Colocalización e interacción entre la coilina y los mutantes de VRK1. **A.** Inmunofluorescencia de coilina y los mutantes de VRK1. Células MCF-7 se transfectoron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Se procesaron los cubreobjetos para su marcaje y se detectó a la coilina con el anticuerpo monoclonal Pdelta de Santa Cruz y a la VRK1 sobreexpresada con un anticuerpo policlonal que detecta al epítipo HA. **B.** Interacción entre la coilina y los mutantes de VRK1. Células HEK-293T se transfectoron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes junto con el plásmido pCVM6-Coilina-Myc-Flag. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitó a la coilina con un anticuerpo α -Myc policlonal y se detectó a HA-VRK1 en el precipitado con un anticuerpo α -HA monoclonal.

Examinamos entonces, la colocalización e interacción entre los distintos mutantes de VRK1 y la proteína SMN. Para empezar, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia en células MCF-7, las cuales se transfectoron con los plásmidos pCEFL-HA \emptyset o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Se marcó a SMN con un anticuerpo monoclonal y a los mutantes de VRK1 con un anticuerpo policlonal que reconoce al epítipo HA. Observamos el mismo patrón de

marcaje para la VRK1 que en el ensayo anterior. Además, ningún mutante afectó a la localización de SMN, que se observó tanto disperso en el citoplasma como concentrado en los cuerpos de Cajal o en las geminas (Figura 88 A). Además, analizamos la interacción de estos mutantes con SMN, tanto transfectada como endógena. Con este fin, células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-SMN-Myc-Flag junto con los diferentes mutantes de VRK1, sobreexpresados con los plásmidos pCEFL-HA. Se inmunoprecipitó a SMN y se detectó a los mutantes en el precipitado. Observamos interacción en todos los casos (Figura 88 B). Para confirmar el resultado, realizamos el mismo ensayo de interacción pero, en esta ocasión, con SMN endógeno. Así, células HEK-293T se transfectaron con los mutantes de VRK1 a través del plásmido pCEFL-HA-VRK1. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitaron todos los mutantes con un anticuerpo α -HA policlonal y se detectó a SMN endógeno en el precipitado. Volvimos a ver que se producía interacción en todos los casos, concluyendo que las mutaciones en VRK1 no afectan a la interacción de ésta con la proteína causante de la atrofia muscular espinal, SMN (Figura 88 C).

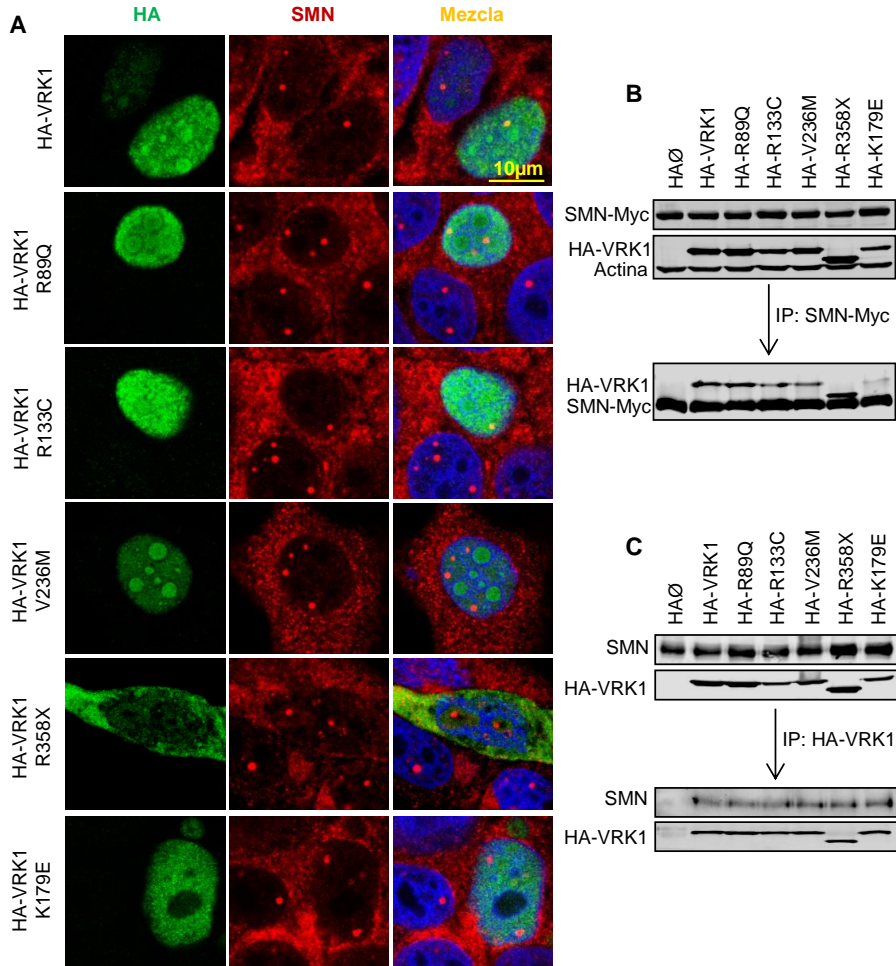
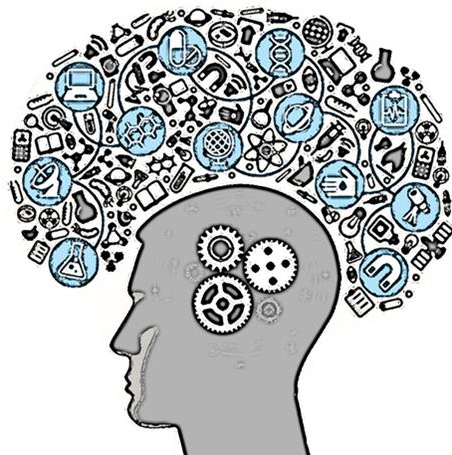


Figura 88: Colocalización e interacción entre SMN y los mutantes de VRK1. **A.** Células MCF-7 se transfectoron con los plásmidos pCEFL-HAØ o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Se procesaron los cubreobjetos para su marcaje y se detectó a SMN con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories* y a la VRK1 sobreexpresada con un anticuerpo policlonal que detecta al epítipo HA. **B.** Interacción entre SMN-Myc y los mutantes de VRK1. Células HEK-293T se transfectoron con los plásmidos pCMV6-SMN-Myc-Flag y pCEFL-HAØ o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitó a SMN con un anticuerpo α -Myc policlonal y se detectó a HA-VRK1 en el precipitado con un anticuerpo α -HA monoclonal. **C.** Interacción entre SMN endógeno y los mutantes de VRK1. Células HEK-293T se transfectoron con los plásmidos pCEFL-HAØ o pCEFL-HA-VRK1, tanto la proteína silvestre como los mutantes. Pasadas 48 horas, se inmunoprecipitó a VRK1 con un anticuerpo α -HA policlonal, y se detectó a SMN endógeno en el precipitado con el anticuerpo monoclonal 610647 de *BD Transduction Laboratories*.

DISCUSIÓN

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.”

Carl Sagan



1. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la formación de los cuerpos de Cajal

VRK1 es una serina/treonina quinasa muy abundante en el núcleo y regulada durante la progresión del ciclo celular (Valbuena et al., 2008). Esta quinasa es necesaria para la correcta salida de G0 y entrada a la fase G1, fase en la cual aumentan sus niveles proteicos y su actividad. Por otro lado, la coilina, proteína marcadora y de ensamblaje de los cuerpos de Cajal, es una proteína regulada por metilaciones y fosforilaciones que varía sus funciones y distribución durante el ciclo celular (Carmo-Fonseca et al., 1993; Hearst et al., 2009a; Hebert et al., 2002a; Toyota et al., 2010). Hasta el momento, solamente han sido descritas tres quinastas que fosforilen a la coilina de forma directa: la caseína quinasa II (CKII) (Hebert and Matera, 2000a), la quinasa Cdk2/ciclina E (Liu et al., 2000), y la quinasa humana VRK1 (Sanz-Garcia et al., 2011b).

La primera relación entre la familia de quinastas VRK y la coilina fue descrita a través del *array* peptídico donde se mostró una posible fosforilación en el residuo serina 184 de la coilina (Sanz-Garcia et al., 2011b). Este resultado se confirmó con ensayos quinasa *in vitro*, en los cuales se pudo observar que existían más residuos en la coilina que eran fosforilados por la quinasa VRK1. Una vez supimos que existía una fosforilación directa en la coilina por la quinasa humana VRK1, quisimos estudiar si había una interacción directa entre ambas proteínas. Este resultado fue confirmado a través de ensayos de co-inmunoprecipitación, tanto con proteínas endógenas como transfectadas. Sabemos que VRK1 es una quinasa mayoritariamente nuclear, debido a su NLS en la región carboxilo terminal (Kang et al., 2007; Valbuena et al., 2007b; Vega et al., 2004), y, por otro lado, la coilina, se localiza libre en el nucleoplasma o bien agregada formando los cuerpos de Cajal (Whittom et al., 2008a). Así, nuestra siguiente cuestión fue determinar si la interacción entre VRK1 y coilina se estaba produciendo dentro de los cuerpos de Cajal o de forma libre en el nucleoplasma. Para ello, se aislaron y concentraron los CBs (Lam et al., 2002) y observamos que VRK1 no se localizaba dentro de estos compartimentos nucleares o bien que lo hacía de forma minoritaria. Debido a la poca cantidad de muestra obtenida en cada aislamiento quedó pendiente marcar a otros componentes de los CBs, tales como SMN. Así, con estos resultados, postulamos que la interacción entre ambas proteínas podría tener un efecto previo a la formación de los cuerpos de Cajal, o bien participar en alguna función independiente a dicho compartimento. Una posibilidad se plantea en el hecho de que VRK1 es una quinasa que actúa en la remodelación de la cromatina y sobre

las histonas y actúa en respuesta al daño en el ADN (Kang et al., 2007; Salzano et al., 2015), y, la coilina también es esencial en la respuesta a daño por irradiación o cisplatino, inhibiendo la actividad de la ARN polimerasa 1 (Gilder et al., 2011), además de que los cuerpos de Cajal se ha observado que se asocian a la cromatina cuando hay transcripción (Platani et al., 2002).

La formación de los cuerpos de Cajal es producida por la oligomerización de la coilina, mientras que durante la mitosis, su hiperfosforilación impide la oligomerización y, por lo tanto, se produce su desensamblaje (Hebert and Matera, 2000a). Así, este compartimento nuclear se modifica durante el ciclo celular por quinasas aún desconocidas. En este trabajo de tesis doctoral, hemos querido investigar el mecanismo por el cual VRK1 regula la formación de los cuerpos de Cajal a través de la fosforilación de la coilina.

Sabiendo que VRK1 fosforila a la coilina, y que ambas interaccionan en el nucleoplasma, pensamos, en primer lugar, que quizás esta fosforilación tuviera algún efecto en la formación de los cuerpos de Cajal. Analizando mediante electroforesis y *Western blot* las fracciones obtenidas por HPLC, podemos estudiar el tamaño de los complejos proteicos en los que están nuestras proteínas de interés. De este modo, pudimos observar que la coilina se sitúa tanto en complejos de alto peso molecular (670kDa) como de peso molecular medio (158kDa). Sin embargo, el silenciamiento de VRK1, desplaza a la coilina casi por completo a complejos de peso molecular medio, dejando de estar presente en los de alto peso molecular. Pensamos que este complejo de aproximadamente 158kDa pueda ser la unidad básica a partir de la cual se generan los cuerpos de Cajal, y que, esta formación, es VRK1 dependiente. Para que se formen correctamente los cuerpos de Cajal, la coilina debe oligomerizar con ella misma, hecho que se inhibe durante la mitosis por hiperfosforilación (Carmo-Fonseca et al., 1993; Hebert and Matera, 2000a). El hecho de que, al silenciar a VRK1, se estuviera afectando dicha oligomerización, nos hizo plantearnos si pudieran estarse afectando, en consecuencia, los cuerpos de Cajal. A través de ensayos de inmunofluorescencia, pudimos observar cómo el silenciamiento de VRK1 producía la desaparición de los cuerpos de Cajal en varias líneas celulares, sin afectarse los niveles proteicos de proteína, a los tres días del silenciamiento. Así, el patrón que se detecta al marcar a la coilina en células control, nos muestra unos puntos discretos y brillantes en el núcleo celular, mientras que, al silenciar a VRK1, estos compartimentos desaparecen. El hecho de no ver casi a la población de coilina libre en nucleoplasma es debido a que estamos utilizando un microscopio confocal y que, además, la señal se detecta cuando tenemos a la proteína oligomerizada y

estructurada formando el cuerpo de Cajal, de tal forma que, al desensamblarse éste, la señal dispersa es mucho menos detectable en este tipo de microscopio. Así, en la bibliografía, encontramos más inmunofluorescencias donde se ve de la misma forma a la coilina, siempre visible cuando está formando el CB y sin casi señal detectable cuando está desoligomerizada (Mahmoudi et al., 2010). Además, también varía mucho dependiendo de la línea celular, por ejemplo, en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y la coilina tiene una señal más dispersa, con más fondo. Es por este motivo que también se analizaron mediante *Western blot* los niveles proteicos de la coilina, los cuales permanecían estables a los tres días de silenciamiento. De este modo, al silenciar a VRK1 durante tres días, la coilina sigue estando presente en la célula igual que en condiciones control, sin embargo, ya no está oligomerizada y formando el cuerpo de Cajal, sino que se encuentra disgregada por el nucleoplasma. Este mismo efecto en los CBs se observa al silenciar a otros componentes de éstos, como por ejemplo, a Fam118, uno de los descubiertos más recientemente. Cuando utilizan un siARN específico para esta proteína, se dejan de observar cuerpos de Cajal en el núcleo, aunque los niveles de coilina sigan constantes (Li et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, en el *chip* peptídico donde se postuló a la coilina como diana de fosforilación de las VRK, apareció tanto para VRK1 como para VRK2. Debido a este resultado, y antes de continuar con más ensayos estudiando a VRK1, quisimos investigar si VRK2 también tenía algún efecto en los CBs. No observamos ningún cambio en éstos al silenciar a VRK2. De hecho, si bien VRK1 y VRK2, debido a su alta homología del dominio catalítico, tienden a compartir sustratos *in vitro*, las diferencias en su extremo carboxilo terminal, responsable de su diferente localización subcelular, hacen que difieran en sus sustratos fisiológicos *in vivo*. Como ejemplo, sabemos que las tres quinasas fosforilan al factor de transcripción p53 *in vitro*, pero tan solo VRK1 y VRK2B pueden activarlo transcripcionalmente (Blanco et al., 2006a).

El siguiente aspecto que quisimos estudiar fue si el efecto que se obtenía en los cuerpos de Cajal al silenciar a VRK1 era actividad quinasa dependiente. Muchas veces, el efecto de una quinasa no depende de la fosforilación de su sustrato, sino de la simple presencia de la quinasa que juega un papel fundamental interaccionando con otras proteínas, permitiendo o inhibiendo una determinada acción. Para estudiar este aspecto, realizamos ensayos de rescate de fenotipo, en los que una vez tenemos el efecto provocado por el silenciamiento de la quinasa, sobreexpresamos tanto la forma activa como inactiva de VRK1. Vimos que la desaparición de los CBs al silenciar a VRK1 se recuperaba al sobreexpresar de nuevo a la quinasa silvestre (tanto la humana como la murina), no obteniéndose el rescate de fenotipo con una

quinasa inactiva. Con este dato, confirmamos que es necesaria la actividad de la quinasa para recuperar el ensamblaje de los cuerpos de Cajal.

Se sabe que la coilina es una proteína con múltiples residuos de fosforilación, sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos o funciones de cada uno de ellos. Está descrito que la fosforilación en la serina 489 está implicada en la interacción de la coilina con el ARN (Broome et al., 2013), además de que puede contribuir al desensamblaje de los CBs (Carrero et al., 2011). La fosforilación en la región carboxilo terminal de la coilina modula su interacción con el complejo SMN y las proteínas Sm (Toyota et al., 2010). Sabiendo la importancia de la fosforilación en el residuo serina 184 de la coilina por VRK1, quisimos estudiarlo más a fondo. Es un residuo que se fosforila durante la mitosis, fase en la que los cuerpos de Cajal están desensamblados. Una vez se vuelven a formar en la fase G1 intermedia, este residuo de fosforilación vimos que no era esencial para su mantenimiento, de tal forma que podía ser defosforilado, por alguna fosfatasa aún desconocida. Una buena candidata podría ser la fosfatasa PPM1G, al ser la única fosfatasa descrita que modifica directamente a la coilina, jugando un papel clave en la localización de SMN (Hearst et al., 2009b). A través de ensayos quinasa vimos que este residuo serina 184 disminuía su fosforilación al silenciar a VRK1 o bien en células privadas de suero en el medio, condición en la que VRK1 pierde su actividad, por el contrario, permanecía fosforilado durante la mitosis, fase en la que VRK1 tiene mayor actividad y niveles proteicos. Con todos estos datos pensamos que esta fosforilación podría ser clave en la formación de los cuerpos de Cajal después de la mitosis y que, una vez formados, este residuo se defosforila debido a que no es esencial para su mantenimiento (Figura 89). Se debería estudiar qué otros residuos de fosforilación son necesarios para el mantenimiento de los cuerpos de Cajal y que quinastas son las encargadas de fosforilarlos.

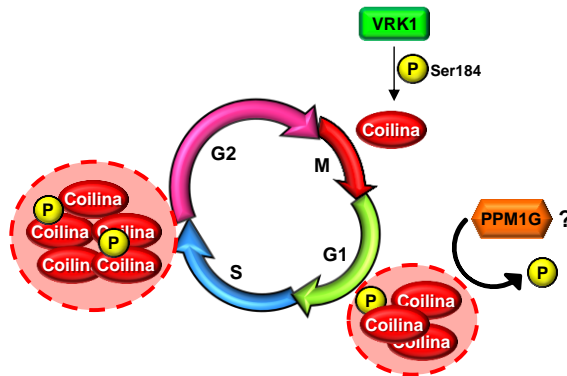


Figura 89: Esquema representativo de la fosforilación del residuo serina 184 de la coilina por la quinasa humana VRK1.

2. Degradación de la coilina en el proteasoma

Al silenciar a la quinasa humana VRK1, en un primer momento, observamos una desoligomerización de la coilina (a través de ensayos de HPLC) y, en consecuencia, la desaparición de los cuerpos de Cajal. Sin embargo, al analizar los niveles proteicos de coilina a los tres días de silenciamiento, no detectamos ningún cambio en éstos. Decidimos analizar los niveles proteicos de coilina, esta vez dejando cinco días el silenciamiento de la quinasa. Realizamos este ensayo debido a que muchas veces el efecto del silenciamiento de una proteína sobre los niveles de una segunda, se observa en períodos de tiempo más largos, debido a que un efecto es consecuencia del otro. A través de ensayos de *Western blot* vimos que, a los cinco días de silenciamiento de VRK1, se producía una bajada drástica en los niveles de coilina. Esta disminución podría deberse a dos motivos: el primero, a que el silenciamiento estuviera afectando a la expresión del gen de la coilina y, el segundo, a que estuviera afectando a nivel postraduccional favoreciendo su degradación.

A través de ensayos de qRT-PCR confirmamos que el silenciamiento de VRK1 no estaba afectando la expresión del gen de la coilina, ni a los tres ni a los cinco días de silenciamiento. De esta manera, descartábamos la primera hipótesis. En consecuencia, nos centramos en la segunda posibilidad, es decir, que el silenciamiento de VRK1 estuviera afectando de manera postraduccional a la coilina. La vía mayoritaria de degradación de proteínas es la vía ubiquitina-proteasoma. Esta degradación mantiene el balance de los niveles proteicos, para mantener la homeostasis celular y ayudar a diferentes procesos tales como el ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis o la expresión génica (Lecker et al., 2006). En una primera aproximación, vimos cómo los inhibidores del proteasoma MG132 (inhibidor reversible) y lactacistina (inhibidor irreversible), eran capaces de revertir el efecto del silenciamiento de VRK1 en los cuerpos de Cajal. Este efecto se producía solamente a los tres días de silenciamiento, mientras que a los cinco días ya no se revertía el efecto. Esto nos puede estar indicando que a los cinco días de silenciamiento de VRK1 la mayoría de la coilina ya ha sido degradada y, por lo tanto, no recuperamos la formación de los cuerpos de Cajal al añadir los inhibidores. Analizamos otras vías de degradación proteica como, por ejemplo, la vía lisosomal. Sin embargo, al añadir cloroquina a las células (fármaco que aumenta el pH del lisosoma inactivando sus enzimas), no recuperábamos los niveles proteicos de coilina ni se volvían a formar cuerpos de Cajal (resultados no mostrados), descartando este tipo de proteólisis.

Nuestra siguiente pregunta fue la siguiente: estos cuerpos de Cajal que se vuelven a formar al añadir los inhibidores, ¿están formados exclusivamente por coilina nuevamente oligomerizada o contienen otros componentes como, por ejemplo, SMN? Pensamos en SMN debido a que es una de las proteínas más importantes funcionalmente dentro del cuerpo de Cajal. Pudimos detectar por ensayos de inmunofluorescencia que en estos CBs formados al inhibir el proteasoma se detectaba a SMN, dato que nos sugería que no son simples agregados de coilina y que pueden ejercer sus funciones de forma eficiente.

Hasta ahora, solo existen datos predictivos acerca de la ubiquitinación de la coilina. A través de técnicas proteómicas se detectaron dos lisinas en su secuencia como candidatas a ubiquitinarse (K473 y K493), sin existir ensayos *in vitro* para su verificación (Kim et al., 2011). Solo existe una relación entre la coilina y una proteína con estructura homóloga a la ubiquitina: UBL5. Sin embargo, parece que la interacción entre ambas, que es independiente del estado de fosforilación de la coilina, está involucrada en el proceso de *splicing* de pre-ARNm y no en la modificación postraduccional de proteínas (Sveda et al., 2013).

Para confirmar que la coilina se ubiquitinaba, realizamos ensayos de ubiquitinación, donde detectamos, al menos, su mono y bi-ubiquitinación. Esta bi-ubiquitinación se detectaba al transfectar la ubiquitina ligasa Mdm2, dato que nos hizo plantearnos la posibilidad de que fuera una de sus posibles enzimas ligasa. Mediante ensayos de inmunoprecipitación, *Western blot* e inmunofluorescencia, pudimos confirmar que la coilina y Mdm2 interactuaban, de manera independiente a VRK1, y que se encontraba a Mdm2 en algunos cuerpos de Cajal, colocalizando. Se debería hacer un nuevo aislamiento y purificación de cuerpos de Cajal, para poder determinar si hay ubiquitina y Mdm2 dentro de éstos, debido a que solo tenemos resultados preliminares de inmunofluorescencias donde se ve que tanto la ubiquitina como Mdm2 colocalizan en los cuerpos de Cajal al añadir MG132 a las células (datos no mostrados).

Existen 7 residuos de lisina en la ubiquitina que pueden formar cadenas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63). Dependiendo del residuo de lisina utilizado en la ubiquitinación, el destino de la proteína sustrato será diferente. Por ejemplo, la formación de cadenas a través de lisina 48 marca a la proteína para su degradación en el proteasoma, mientras que cadenas formadas por lisina 63 modifican la localización de una proteína o ayudan al reclutamiento de otras (Pickart and Eddins, 2004). Una vez supimos que la coilina se ubiquitinaba a través de la ubiquitina ligasa

Mdm2, quisimos saber a través de qué residuo de lisina se estaban formando las cadenas de ubiquitinación. A través de ensayos de inmunoprecipitación y *Pull-Down* de histidinas, comprobamos que se estaban formando cadenas a través de la lisina 48, y no de la lisina 63 (únicos mutantes que pudimos analizar). Este dato nos confirmaba que efectivamente la coilina se estaba marcando para su degradación en el proteasoma. En trabajos futuros quedaría investigar, a través de ensayos con el resto de mutantes si, además de cadenas de lisina 48, se estuvieran formando otro tipo de cadenas que llevaran a la coilina a otros destinos. Una posibilidad sería el reclutamiento de la coilina a los focos de reparación del ADN. Se ha descrito que la coilina se recluta de manera casi inmediata (15-20 segundos) a una lesión en el ADN después de irradiación (Bartova et al., 2014). Este proceso podría ser una respuesta primaria para atraer a las proteínas implicadas en la respuesta a roturas de doble cadena, como γ H2AX o 53BP1, proteínas reguladas por VRK1 (Salzano et al., 2015; Sanz-García et al., 2012). Así, sería muy interesante investigar si en la coilina se forman cadenas de ubiquitinas a través de lisinas implicadas en la respuesta a daño en el ADN, como las lisinas 6 o 27 (Gatti et al., 2015; Messick and Greenberg, 2009; Praefcke et al., 2012) y qué funciones tendría.

Si el silenciamiento de VRK1 produce el desensamblaje de los cuerpos de Cajal, favoreciendo la ubiquitinación y degradación de la coilina en el proteasoma, cabe esperar que la fosforilación de la quinasa esté, de alguna manera, protegiendo a la coilina de su degradación. Es por este motivo que quisimos estudiar más a fondo el residuo de fosforilación serina 184, a través de los mutantes Ser184Ala (un mutante no fosforilable) y Ser184Glu (mutante fosfomimético). Mediante ensayos de inmunoprecipitación y *Western blot*, pudimos comprobar que el mutante no fosforilable S184A es más sensible a la degradación inducida por la ubiquitina ligasa Mdm2, y se ubiquitina más; sin embargo, el mutante fosfomimético se ubiquitinaba menos. Estos resultados nos indican que la fosforilación en esta serina de la coilina por la quinasa VRK1 la protege de su degradación. Se deberían realizar otros ensayos para estudiar más a fondo esta fosforilación. Está descrito que esta serina 184 se encuentra dentro de una señal de localización nucleolar (NoLS) que en condiciones fisiológicas se encuentra encriptada. Cuando este residuo no se fosforila (mutación Ser184Ala), se expone esta NoLS, dirigiendo a la coilina hacia el nucléolo (Hebert and Matera, 2000a). Sin embargo, aún se desconocen las funciones o consecuencias que tiene este cambio de localización de la coilina hacia el nucléolo.

El nucléolo es lugar de síntesis de los ARNr, y participa además en otras funciones, como en el control de la fisiología y homeostasis celular. Las alteraciones en la

actividad nucleolar, llamadas “estrés nucleolar” están siendo actualmente muy investigadas en el ámbito neuronal. Estudios muestran que las funciones nucleolares son esenciales para la supervivencia neuronal, además de participar en el control de la actividad mitocondrial y en la respuesta a estrés celular, puntos críticos en enfermedades neurodegenerativas (Parlato and Kreiner, 2013). De hecho está descrito que, bajo condiciones de estrés, aumenta el número de proteínas que se desplazan a este compartimento (Figura 90) (Boulon et al., 2010).

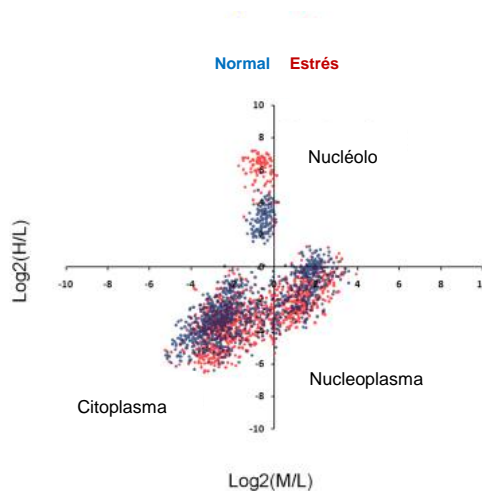


Figura 90: Aumento de proteínas en el nucléolo bajo condiciones de estrés celular. Las células se marcan con un isótopo que contiene aminoácidos (SILAC) y se analizan por LC-MS/MS. Así se analiza en qué compartimento se encuentran las proteínas en las condiciones de estudio (Boulon et al., 2010).

Se sabe que los cuerpos de Cajal se deslocalizan y forman agregados perinucleolares bajo condiciones de estrés y, concretamente, la coilina se redistribuye al nucléolo. Este suceso se ha visto, por ejemplo, en motoneuronas de atrofia muscular espinal de tipo 1 (Tapia et al., 2012). Además, los CBs que restan, no reclutan a SMN ni a las RNPs, mientras que acumulan PA28, un activador del proteasoma, asociado a estrés celular. En estas motoneuronas con SMA, aumentan también los PMLs, cuerpos nucleares asociados a respuesta a estrés celular (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2010). Por todos estos datos, sería de gran interés estudiar más a fondo el residuo de fosforilación serina 184 de la coilina y, en qué condiciones, una vez se ha defosforilado, se dirige al nucléolo o se degrada en el proteasoma.

Como se explicó anteriormente en este trabajo, la coilina es una proteína con múltiples residuos de fosforilación descritos, de los cuales, en la gran mayoría, se desconocen las funciones o efectos. Estos residuos se clasifican en 4 grupos según la

región de la proteína donde se localizan (Carrero et al., 2011). Así, tenemos al grupo 1 que se localiza en la región que contiene la señal de localización nuclear y la señal de localización nucleolar encriptada. El segundo grupo, se sitúa en el centro de la proteína y contiene múltiples ácidos glutámicos y aspárticos, que, sumado a las fosforilaciones en estos residuos, generan una región muy negativa, que puede producir cambios de conformación o interacción con otras proteínas. El tercer grupo, se localiza en la caja RG, zona de unión con SMN y Sm, y, finalmente, el cuarto grupo, que se localiza en la región carboxilo terminal de la coilina, responsable de regular el número de CBs por célula.

Utilizamos un programa de predicción de residuos de fosforilación para determinar qué otros residuos eran candidatos a ser fosforilados por las VRK, con alta probabilidad (Xue et al., 2008). El de mayor puntuación fue la serina 184, sin embargo, otros residuos, tanto serinas como treoninas, fueron identificados como muy probables de ser fosforilados (Figura 91). Sería interesante poder realizar mutantes de los más significativos, como la Ser159 o la Thr289, para analizar qué efectos producen sus mutaciones o si son esenciales para la formación del cuerpo de Cajal, ya que son datos que, hoy en día, se desconocen.

4	S	CK1/VRK	****MAA S ETVRLRL	7,6
157	T	CK1/VRK	PKAVTDQ T VS K KNKR	5,8
159	S	CK1/VRK	AVTDQ T VS K KNKRKN	9,1
169	T	CK1/VRK	NKRKNKATCGTVGDD	5,9
184	S	CK1/VRK	NEEA K R S PK K KE K C	11,8
202	S	CK1/VRK	KKAKNP S PKVQAVK	7,4
237	S	CK1/VRK	AKRKG S V S VCS K ESP	5,7
240	S	CK1/VRK	KG S V S VCS K ESPSS	6
271	S	CK1/VRK	VTLEARN S SEKL P TE	7,2
285	S	CK1/VRK	ELS K EE P ST K NTTAD	6,3
286	T	CK1/VRK	LS K EE P ST K NTTADK	6,5
289	T	CK1/VRK	EE P ST K NT T ADKLAI	10,3
290	T	CK1/VRK	EE P ST K NT T ADKLAIK	7,2
305	S	CK1/VRK	LG F SL T PS K G K TS G T	5,6
310	S	CK1/VRK	TP S K G K T SG T SSSS	5,8
312	T	CK1/VRK	SK G K T SG T SSSSDS	6,5
313	T	CK1/VRK	KG K T S GT S SSSDSS	7
314	S	CK1/VRK	G K T S GT S SSSDSSA	8,6
315	S	CK1/VRK	KT S GT S SSSDSSAE	7,5
316	S	CK1/VRK	TS G TT S SSSDSSAES	6,3
370	S	CK1/VRK	GAAG W RR S GS N GGG Q	6,7
382	S	CK1/VRK	GG Q AP G AS P SVSL P A	6,4
545	T	CK1/VRK	EV V EYAV T Q S ES K ITV	6,3

Figura 91: Predicción de los posibles residuos de fosforilación en la coilina por la familia de quinasas humanas CK1/VRK utilizando el programa GPS 2.0 (Xue et al., 2008).

Otra modificación postraduccional que nos gustaría estudiar es la sumoilación. SUMO-1 y la SUMO ligasa Ubc9 colocalizan transitoriamente en los CBs en células neuronales no diferenciadas (Navascues et al., 2008). Además, en neuronas de tejido nervioso adulto, SUMO-1 se localiza en los cuerpos de Cajal en respuesta a estrés osmótico o cuando se inhibe la actividad metiltransferasa celular. En estos CBs también se encuentra SMN o las RNPs, por lo que se sabe que son funcionales. Se postula así que la sumoilación de la coilina pueda jugar un papel en la reorganización de los CBs en la diferenciación neuronal o en la respuesta a estrés (Navascues et al., 2008). Estos datos, junto con el hecho de que la sumoilación puede ser regulada por fosforilación, nos hicieron pensar en una posible regulación de VRK1 en la sumoilación de la coilina. Además, mediante programas de predicción, se detectó una señal canónica de tipo 1 de sumoilación (ψ -K-X-E, ψ : aminoácido hidrofóbico grande) en la posición 84 de la coilina (LRVKLEE), dentro del dominio de auto-interacción. Tenemos resultados preliminares donde hemos visto la interacción de la coilina con SUMO (SUMO 1, 2 y 3) a través de ensayos de *Pull-down in vitro*. Estos ensayos se realizaron añadiendo NEM (*N-Ethylmaleimide*) al tampón de lisis. Este compuesto bloquea la sumoilación y favorece la detección de las proteínas sumoiladas. Falta mucho por hacer para poder determinar si esta interacción se afecta por la fosforilación de VRK1 en la coilina e investigar sobre las posibles funciones de esta modificación.

Finalmente, investigamos acerca de dónde estaba produciéndose todo este proceso de ubiquitinación y degradación de la coilina. Como se explicó anteriormente, la coilina está descrita como una proteína exclusivamente nuclear, ya sea de forma libre en el nucleoplasma o formando los cuerpos de Cajal. Solamente en oocitos de *Xenopus* se ha detectado tráfico de coilina entre citoplasma y núcleo, proceso que nunca ha sido visto en células humanas (Almeida et al., 1998; Bellini and Gall, 1999). A través del programa de predicción de señales de exporte nuclear (la Cour et al., 2004), detectamos una secuencia candidata en la coilina; entre los aminoácidos 296-302. Este dato nos daba la posibilidad de que, al menos parte del proceso de ubiquitinación o degradación, se estuviera produciendo en el citosol. Efectivamente confirmamos que la coilina estaba siendo exportada en algún momento al citosol, ya que al tratar las células silenciadas para VRK1 con el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B, volvíamos a ver coilina dentro del núcleo. Esta coilina no llegaba a formar cuerpos de Cajal similares a una célula control, sino que teníamos a la coilina acumulada en el nucleoplasma de forma difusa. Una de las hipótesis a este resultado nos la sugiere el trabajo publicado por Carvalho y colaboradores, quienes vieron que al tratar las células durante tres horas con leptomicina B no se formaban cuerpos de

Cajal de *nov*o. Una vez las células terminan la mitosis y vuelven a entrar en fase G1, momento en que se da la formación de los CBs, las células tratadas con el inhibidor del transporte nuclear no son capaces de formar CBs como lo hacen las células control (Carvalho et al., 1999a). Esta podría ser una explicación de por qué no tenemos casi cuerpos de Cajal aunque veamos coilina acumulada de nuevo en el núcleo. Sin embargo, se deberían hacer más ensayos debido a que la dosis utilizada en este trabajo (0,2nM) es muy inferior a la usada en el trabajo de Carvalho (30nM), y también hay diferencia en los tiempos de duración del tratamiento. Es posible que si observáramos a las células durante más tiempo volviéramos a detectar cuerpos de Cajal, este es un dato que se debería analizar más a fondo. Además, sería interesante realizar una mutación en esta posible señal de transporte nuclear en la coilina para confirmar que realmente funciona como tal.

Como resumen de este apartado (Figura 92), planteamos que la fosforilación de VRK1 en el residuo serina 184 de la coilina se produce durante la mitosis, antes del ensamblaje de los cuerpos de Cajal. Una vez formados, este residuo puede defosforilarse por fosfatasas aún desconocidas. Cuando silenciamos a VRK1 o ésta pierde su actividad por falta de suero en el medio de cultivo, la coilina, en un primer momento, se desoligomeriza (efecto que produce el desensamblaje de los cuerpos de Cajal), y, posteriormente, se ubiquitina a través de lisinas 48 por la ubiquitina ligasa Mdm2, al menos con dos ubiquitinas. Esta coilina, debido a la existencia de su señal de transporte nuclear, se dirige al citosol donde se degrada en el proteasoma.

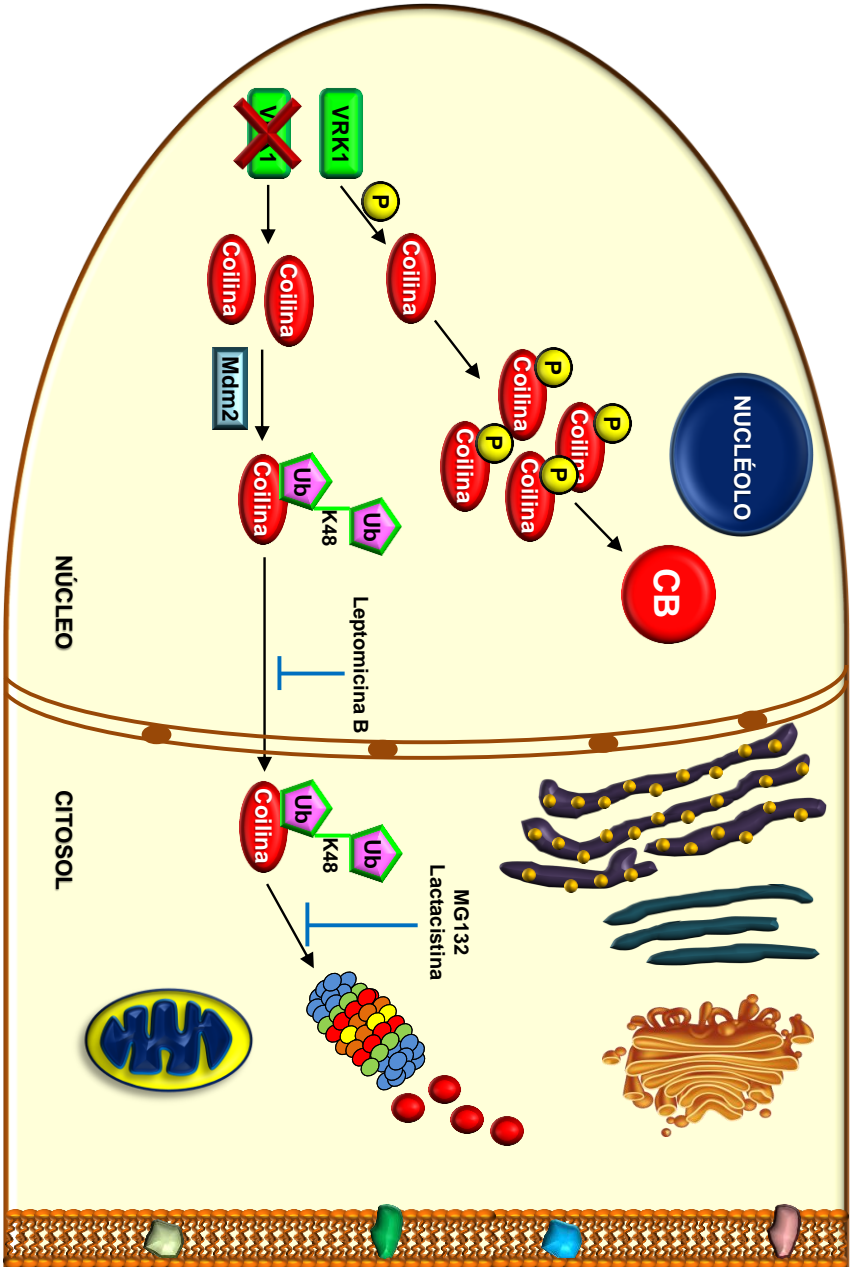


Figura 92: Esquema del modelo que planteamos en este trabajo acerca de la fosforilación de la colina por VRK1 y de su degradación en el proteasoma.

3. Efecto del silenciamiento de VRK1 en la proteína causante de la atrofia muscular espinal SMN

La atrofia muscular espinal (SMA) es la principal causa genética de muerte infantil, y está causada por la mutación en el gen *SMN1*. SMN es una proteína que forma parte de un gran complejo necesario para la biogénesis de ribonucleoproteínas (RNPs), las cuales son indispensables en los procesos de *splicing* celular. Está descrito que SMN interacciona directamente con la coilina, y que esta interacción es necesaria para el reclutamiento de SMN a los cuerpos de Cajal (Hebert et al., 2001a).

A través de ensayos de inmunoprecipitación determinamos la interacción entre SMN y la quinasa humana VRK1. Sin embargo, sabiendo que SMN interaccionaba con la coilina, quisimos descartar que la interacción que veíamos entre SMN y VRK1 no fuera indirecta, debido a que la coilina formara un puente entre ambas. Vimos que existía una unión directa entre SMN y VRK1, ya que al silenciar a la coilina con un ARN de interferencia específico se seguía produciendo la interacción.

A pesar de que el papel de esta proteína en la biogénesis de RNPs sea un proceso bien caracterizado y estudiado, a día de hoy poco se conoce acerca de su regulación o modificaciones postraduccionales. Recientemente se ha publicado un mapa de fosforilaciones del complejo SMN, donde se han identificado más de 40 residuos, 7 de ellos en SMN y el resto en las geminas, siendo la gemina 3 la más fosforilada con 13 residuos descritos. Estas fosforilaciones pueden afectar a la actividad del complejo, como las de las serinas 28 y 31 (Grimmler et al., 2005) y también a su localización subcelular. Además, se ha visto que algunas tirosinas han sido relacionadas con tumores de pulmón. Si se generan mutantes sin estas tirosinas, SMN no se localiza en el núcleo y, por lo tanto, en los cuerpos de Cajal (Husedzinovic et al., 2014). El hecho de que VRK1 sea una quinasa, nos hizo plantearnos si pudiera estar fosforilando a SMN. Sin embargo, no observamos fosforilación en SMN por VRK1 en ninguna fase del ciclo celular, sugiriendo que la interacción entre ambas y la función que realicen juntas es de manera actividad quinasa independiente.

Si el silenciamiento de VRK1 produce la desoligomerización de los cuerpos de Cajal, cabe esperar que el SMN acumulado en ellos se deslocalice. Este efecto se ve también al silenciar a WRAP53. El gen *WRAP53* genera un transcrito antisentido de p53 que regula a este factor de transcripción, de igual modo que lo hace VRK1. Además, codifica a una proteína que dirige a los ARN específicos del cuerpo de Cajal

(scaARNs) a este compartimento. Se ha descrito que WRAP53 interacciona con la coilina, con SMN y con la importina β , responsable del importe al núcleo del complejo SMN junto con las RNPs. Cuando se silencia a WRAP53, los CBs se desorganizan y SMN se acumula en citoplasma debido a que no puede permanecer en el núcleo. Además, la interacción entre WRAP53 y SMN se ve reducida en pacientes con SMA, sugiriéndose un posible papel de esta interacción en la patología (Mahmoudi et al., 2010).

Quisimos evaluar si el silenciamiento de VRK1 también estaba produciendo esta deslocalización de SMN. En condiciones control, SMN tiene un marcaje difuso por el citoplasma y en el núcleo aparece como puntos discretos que pueden colocalizar con los cuerpos de Cajal o no, cuando se trata de las geminas. Sin embargo, al silenciar a VRK1, se produce un aumento de fluorescencia en el citosol y solo permanecen en el núcleo algunos puntos discretos correspondientes a las geminas, ya que en éstos no se detecta a la coilina. Este cambio de localización se detectó también realizando un fraccionamiento citosol – núcleo, confirmando que se producía una salida de SMN al citosol al desensamblarse los cuerpos de Cajal como consecuencia del silenciamiento de VRK1. Finalmente, estudiamos si el silenciamiento de la coilina producía el mismo efecto en SMN que el silenciamiento de VRK1. Vimos por inmunofluorescencia que se producía la salida de SMN al citosol en ambos casos, confirmando que era el desensamblaje de los cuerpos de Cajal el hecho que obligaba de alguna manera a SMN a salir al citosol.

A modo de resumen, planteamos el siguiente modelo (Figura 93): cuando VRK1 fosforila a la coilina y el cuerpo de Cajal está formado, SMN puede acumularse en éste a través de la interacción con la coilina, o bien permanecer en las geminas. Sin embargo, al silenciar a VRK1, el desensamblaje de los CBs produce que el SMN nuclear sea exclusivamente el de las geminas, mientras que el que estuviera en los CBs sale fuera al citosol, un efecto inhibido por la leptomicina B.

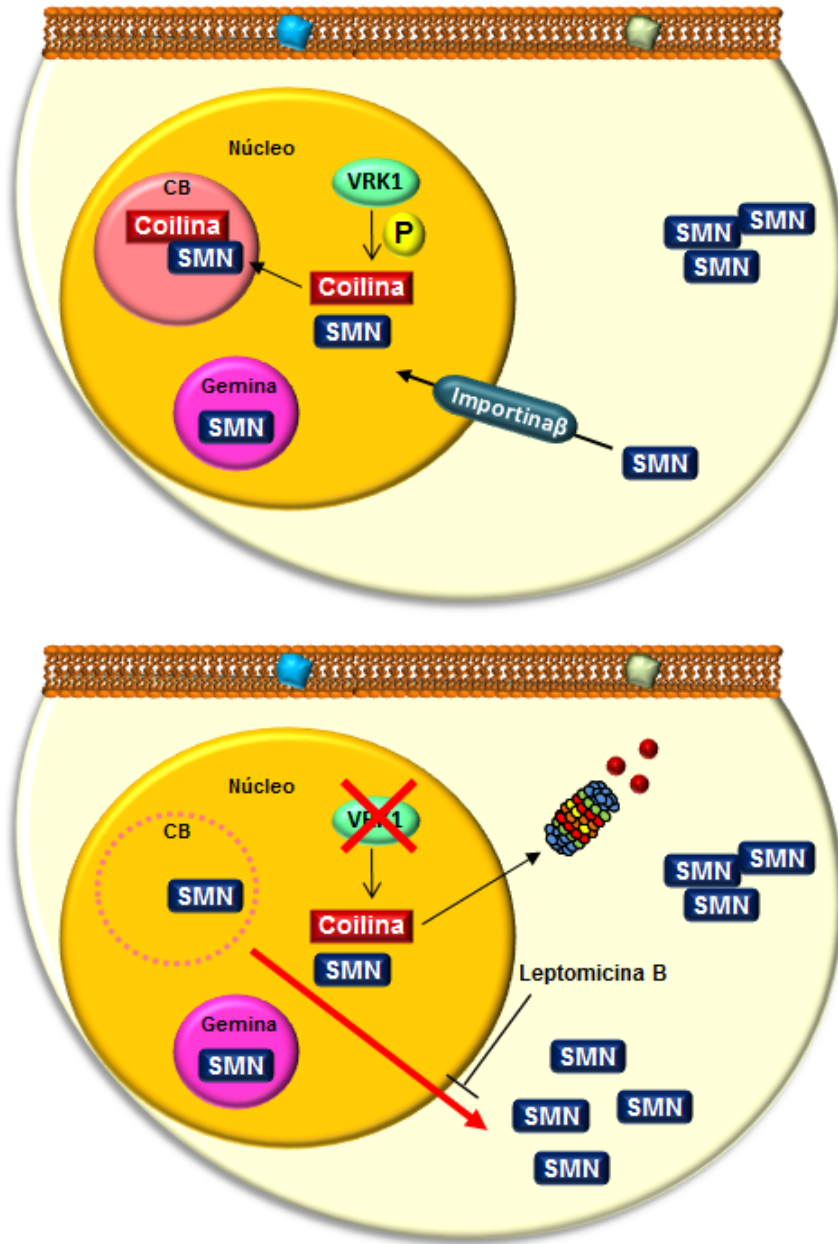


Figura 93: Esquema de la salida al citosol de SMN por el silenciamiento de VRK1.

Cuando observamos la salida de SMN al citosol, parece que la fluorescencia que aumenta es mucho mayor que la que desaparece en el núcleo, sin embargo, los niveles totales de la proteína detectados por *Western blot* no varían. Por este motivo, nos planteamos si se estaba produciendo algún tipo de aumento de SMN o estabilización. Se sabe que la estabilidad de SMN viene determinada mayoritariamente por su capacidad de oligomerización, la mutación de los exones que codifican para los dominios de autointeracción o interacción con las geminas producen la disminución en la vida media de la proteína (Burnett et al., 2009). De este modo, nuestra primera cuestión fue determinar si VRK1 estaba afectando a la estabilidad proteica de SMN, de forma dependiente o no a su oligomerización. A través de ensayos con cicloheximida confirmamos que el silenciamiento de la quinasa no estaba afectando a la estabilidad proteica del SMN endógeno, el cual empezaba a disminuir entre 48 y 72 horas, demostrándose que es una proteína estable. Se podrían realizar ensayos de HPLC silenciando a VRK1 y observando si los complejos en los que se encuentra SMN se desplazan a menor peso molecular o no, lo que podría indicar una menor oligomerización.

Esta estabilidad de SMN está controlada, en parte, por la proteína quinasa A (PKA). Este dato se vio a través del estudio donde la estimulación con AMP cíclico (cAMP) aumentaba los niveles de SMN. Además, al tratar las células con forskolina (un activador de la adenilato ciclasa), y, en consecuencia, aumentar los niveles de cAMP, se acumula SMN en fibroblastos derivados de paciente con SMA (Burnett et al., 2009). Para explicar estos datos, existen dos hipótesis principalmente. En el año 2004, se identificaron dos dominios CRE (elementos de respuesta a cAMP) en el promotor de *SMN*. Estos dominios interaccionan con las proteínas de unión a dominios CRE, la familia de proteínas CREB. La estimulación con forskolina, induce el aumento de cAMP y, por consiguiente, la activación del promotor, al igual que la sobreexpresión de la proteína CREB1 (Majumder et al., 2004). Sin embargo, en el año 2009, se realizaron ensayos de qRT-PCR para analizar los niveles de ARNm de SMN después del tratamiento con forskolina y no se detectaron cambios, sugiriendo una inducción post-transcripcional. Además, los niveles de SMN también aumentan al sobreexpresar PKA constitutivamente activa, indicando que la quinasa está por debajo de la ruta inducida por la forskolina (Burnett et al., 2009).

A través de ensayos de qRT-PCR observamos que al silenciar a la quinasa VRK1 aumentaban los niveles de ARNm de SMN, mientras que al sobreexpresar a la quinasa mediante infección los niveles se reducían de manera significativa. Este resultado podría ser debido a que VRK1 fosforila la serina 133 de CREB1, facilitando

su unión a los dominios CRE del promotor, al igual que pasa con la activación del promotor de la ciclina D1 por VRK1 (Kang et al., 2008b). En este caso, la unión de CREB1 al promotor inactivaría la transcripción por algún mecanismo aún desconocido, de tal forma que al silenciar a la quinasa se activara el promotor de *SMN*. Es posible que la fosforilación en CREB1 no sea en la serina 133. Se postula que la fosforilación en la serina 142 bloquea la activación de la transcripción de genes debido a que no se forma el complejo CREB-CBP (un co-activador) *in vitro* (Mayr and Montminy, 2001). Para confirmar este resultado, se podría mutar el sitio CRE del promotor y realizar ensayos de qRT-PCR, para observar si VRK1 sigue teniendo efecto en el promotor o si, por el contrario, no es dependiente de la fosforilación de CREB1. Además, se clonó el promotor del gen *SMN1* (1000 pares de bases *upstream*) en un vector que contiene el gen de la luciferasa, para confirmar los resultados de las qRT-PCR. Nuestro objetivo es observar si al silenciar a VRK1 se obtiene una mayor actividad del promotor o si, por el contrario, al sobreexpresar a la quinasa el promotor se vuelve más inactivo. Aún no tenemos conclusiones definitivas debido a que solo poseemos datos preliminares, en los que no se observaron cambios significativos. Esto podría deberse a que los elementos en los que actúa la quinasa no se encontraran en estas 1000 pares de bases, sino en dominios más lejanos al gen *SMN1*. Quizás VRK1 fosforile o interaccione directamente con otros factores de transcripción que actúen más *upstream* del gen, impidiendo su transcripción (Figura 94).

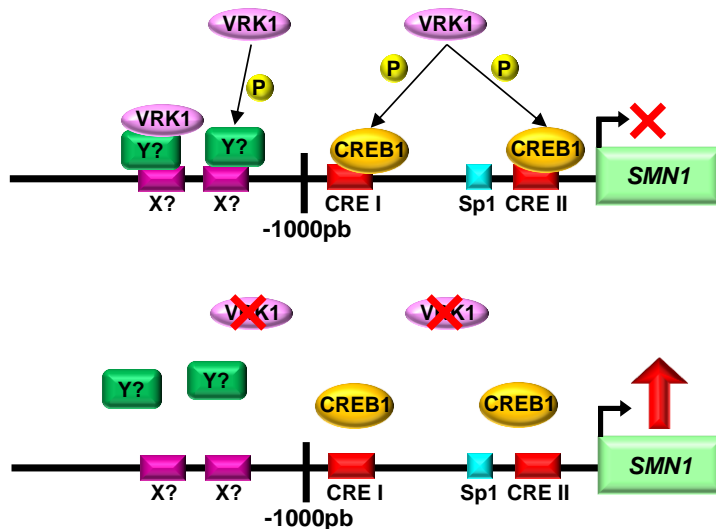


Figura 94: Hipótesis de por qué VRK1 afecta a la expresión del gen *SMN1*. Quizás el efecto sea debido a la fosforilación de CREB1, el cual se uniría a los sitios CRE del promotor de *SMN1*, inactivándolo. Otra opción es que VRK1 actúe a más de 1000pb del gen, ya sea fosforilando o uniéndose a algún factor de transcripción que se una al promotor y lo inactive.

Finalmente, este aumento en la expresión de SMN al silenciar a la quinasa VRK1 puede ser un mecanismo compensatorio de la célula, debido a que SMN ha salido del núcleo donde realiza su función, una función que es vital. Si fuera éste el motivo del aumento en los niveles de ARNm, el SMN sintetizado y posteriormente traducido en el citosol, se importaría de nuevo al núcleo para intentar realizar sus funciones en ese compartimento. Se deberían realizar ensayos con un inhibidor del importe, como el importazole (Soderholm et al., 2011), para ver si se retiene aún más en el citosol, o si por el contrario, no llega a traducirse o se degrada antes (hecho que explicaría que no detectemos el aumento de SMN a nivel proteico por *Western blot*). Se realizaron ensayos con este inhibidor sin llegar a tener resultados concluyentes.

Quisimos estudiar algún otro efecto que pudiera estar teniendo el silenciamiento de VRK1 en la proteína SMN y sus funciones. El primer dato que nos llamó la atención fue la interacción directa entre SMN y el factor de transcripción p53 (Young et al., 2002). La proteína codificada por *SMN2* no es capaz de unirse a p53. Además, en fibroblastos derivados de paciente, SMN y p53 ya no colocalizan en los cuerpos de Cajal, y p53 se redistribuye al nucléolo; hecho que se sugiere podría explicar la muerte neuronal en la SMA, aunque en otro trabajo se determina que la susceptibilidad de estos fibroblastos a un agente quimioterapéutico como la camptotecina es p53-independiente (Wu et al., 2009). Estos datos, sumados al hecho de que VRK1 fosforila y estabiliza a p53 (Vega et al., 2004), nos hicieron pensar en si el silenciamiento de la quinasa estaba afectando a esta interacción con SMN. Sin embargo, a través de ensayos de inmunoprecipitación, pudimos observar que se producía la interacción entre SMN y p53 tanto en presencia como ausencia de VRK1, afirmando que la quinasa no tenía un papel esencial en dicha interacción.

Otro de los aspectos que creemos sería interesante investigar es acerca de los procesos de *splicing* celular, en los que SMN tiene un papel clave. Como se explicó en la introducción de este trabajo, últimamente se está dando mucha importancia al espliceosoma menor, el cual procesa los intrones U12 dependientes (<1% del total de intrones), a diferencia del espliceosoma mayor, el cual actúa en intrones U2 dependientes (Hall and Padgett, 1994; Sharp and Burge, 1997; Will and Luhrmann, 2005; Will et al., 2001). Se ha descrito que en modelos animales con SMA, hay un defecto de RNPs U11 y U12, correspondientes al espliceosoma menor. Además, los genes que éste procesa están relacionados con canales iónicos dependientes de voltaje, asociados a transporte axonal (Gabanella et al., 2007; Wu and Krainer, 1999). Si el silenciamiento de VRK1, produce la salida de SMN al citosol, cabe esperar que estos genes procesados por el espliceosoma menor se vean afectados. Para poder

estudiar este aspecto, se pueden realizar ensayos de qRT-PCR en los que se generan oligonucleótidos que o bien amplifican dentro de un mismo intrón (nos indicaría el pre-ARNm) o que se unen a un exón y en la parte de unión entre exones, donde ya no existe intrón (nos indicaría el ARNm procesado), una técnica que se ha descrito como muy efectiva para el análisis de transcripción de genes (Ponzio et al., 2007). A través de una base de datos donde se muestran todos los genes U12 dependientes (Alioto, 2007), pudimos averiguar qué genes podían ser buenos candidatos para ser regulados por VRK1, como consecuencia de la deslocalización de SMN. Escogimos al gen que codifica a la glicil-tRNA sintetasa (GARS), debido a que hemos visto en el laboratorio que interacciona con VRK1 y que, además, su mutación es causante del Charcot-Marie-Tooth de tipo 2 (Motley et al., 2010), una neuropatía axonal hereditaria. Aún no contamos con conclusiones definitivas debido a que estos ensayos los estamos realizando actualmente en el laboratorio.

4. Interacción entre VRK1, coilina y SMN

Se sabe que la coilina interacciona con SMN a través de su caja RG, rica en argininas y glicinas (Hebert et al., 2001a), y que la dimetilación simétrica de estos residuos de arginina aumenta dicha interacción (Hebert et al., 2002a), a través de la unión a residuos aromáticos conservados en el dominio Tudor de SMN (Sprangers et al., 2003). Mediante inmunoprecipitaciones en las distintas fases del ciclo celular, hemos visto que esta interacción se produce tanto en interfase, seguramente dentro de los cuerpos de Cajal, como en mitosis, cuando no existe membrana nuclear. Sin embargo, en células al 0% de suero, o en células que han terminado la mitosis pero todavía no están en fase G1, esta interacción se pierde. Esto pueda ser debido a que en estas células no hay cuerpos de Cajal, y, seguramente, la mayor parte de SMN se encuentre en el citosol (no hemos visualizado geminas al marcar a SMN) y la coilina libre en nucleoplasma. Además, ya en fase G1 intermedia, cuando se forman los CBs, está descrito que aún no se detecta a SMN. Parece que éste se localiza ya en cuerpos de Cajal bien formados, a partir de la fase G1 tardía (Carvalho et al., 1999a). De hecho, en el año 2003 se publicó un ensayo de *time lapse* donde se marcaba a la coilina y a SMN (Sleeman et al., 2003). Vieron que existía interacción entre ambas (vista como colocación por microscopía) durante la mitosis, hasta que se alcanzaba la telofase. En esta fase, la coilina se dirigía a los núcleos de las células hijas y SMN se distribuía por el citoplasma. Este dato también explicaría la pérdida de interacción que observamos al final de la mitosis. Finalmente, hemos observado que la interacción entre coilina y SMN aumenta al silenciar a VRK1 (resultado no mostrado). Pensamos que al silenciar a VRK1, quinasa que interacciona tanto con

SMN como con coilina de manera directa, aumenta la cantidad de estas proteínas libres y, de este modo, su interacción. Quedaría investigar sobre dónde se está produciendo esta interacción, ya que al silenciar a VRK1 no hay CBs, de tal forma que podría darse una interacción en el nucleoplasma de forma inicial, o bien que el SMN al desplazarse al citosol se llevara a la coilina a su degradación en este compartimento (Figura 95).

Sabemos, a través de inmunoprecipitaciones, que tanto la coilina como SMN interaccionan con VRK1. Además, se observa dicha unión tanto en células asincrónicas al 10% de suero, como en las distintas fases de la mitosis. Sin embargo, volvemos a no ver la interacción en células paradas o justo acabada la mitosis antes de entrar en la fase G1. Creemos que esta interacción pueda ser dos a dos y no formando un triplete, debido a que tanto SMN como coilina se unen a la misma región de la quinasa: la zona amino terminal de VRK1. Es posible que, por un lado, VRK1 se una a la coilina en el nucleoplasma, donde la fosforile; y, por otro lado que, VRK1 se una a SMN. Esta interacción, mediante fraccionamiento citosol-núcleo, sabemos que se produce en el núcleo de manera independiente a la coilina, ya que silenciando a ésta, la interacción se mantiene estable.

Sería interesante realizar ensayos de competición entre las tres proteínas para ver si realmente se unen a la misma región o se favorece antes una unión que otra. Por ejemplo, realizamos inmunoprecipitaciones donde vimos que la interacción entre VRK1 y coilina disminuía al añadir cantidades crecientes de SMN (datos preliminares), sugiriendo que el papel de ambas es de gran importancia en la célula. Además, se deben realizar más ensayos para intentar determinar qué pasa en las células paradas en G0, ya que todas las interacciones disminuyen en este punto. Esto tiene mucho sentido en la interacción entre la coilina y SMN, ya que en esta fase no hay cuerpos de Cajal, lugar donde ambas interaccionan. Sin embargo, queda menos claro en la interacción entre VRK1 con coilina y SMN, ya que si la interacción se produce en el nucleoplasma no tendría por qué desaparecer en esta fase. Quizás la interacción entre coilina y VRK1 se produzca justo antes de la formación de los CBs, en la fase G1 tardía y por eso no la detectamos. Por otro lado, quizás en esta fase SMN no se encuentre en el nucleoplasma debido a que su entrada sea más tardía, y por eso no interaccione con VRK1. Son datos que aún están por analizar a través de fraccionamientos e inmunoprecipitaciones.

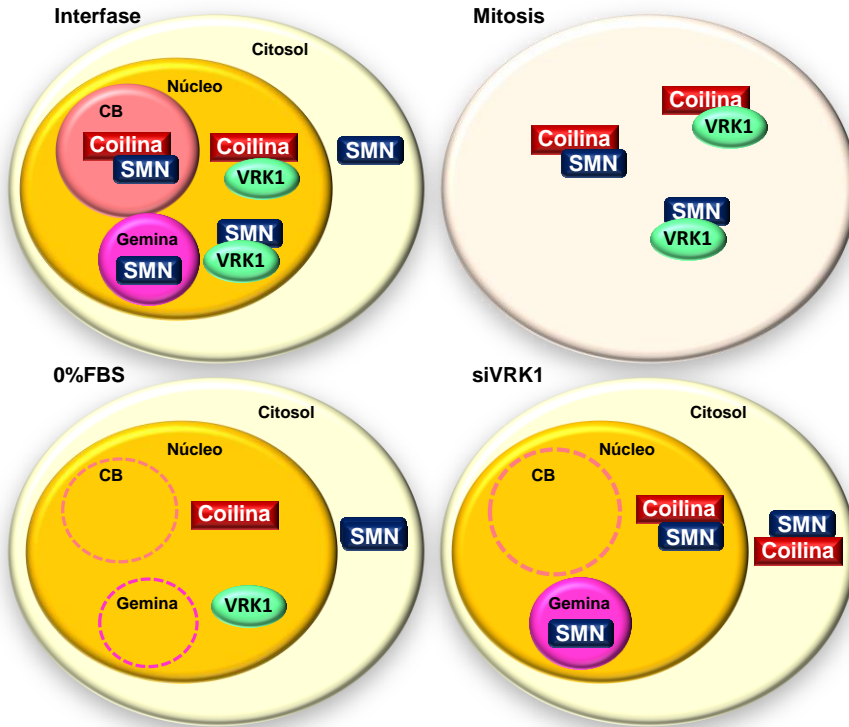


Figura 95: Modelo propuesto para las interacciones entre VRK1, SMN y coilina durante el ciclo celular o al silenciar a la quinasa VRK1.

5. Caracterización de las mutaciones en VRK1 (R89Q, R133C, V236M, R358X)

La primera mutación descrita en VRK1 implicada en neurodegeneración fue la mutación R358X. Ésta genera hipoplasia pontocerebelosa de tipo 1, la cual conlleva a la muerte en edades muy tempranas (Renbaum et al., 2009a). Esta mutación en VRK1 consiste en una transición C>T, en homocigosis, en el nucleótido 4 del exón 12 del gen, generando un codón de terminación (Renbaum et al., 2009b). Esta mutación se encuentra específicamente en la señal de localización nuclear, generándose de esta manera una proteína truncada exclusivamente citosólica (Sanz-Garcia et al., 2011a). Posteriormente, se detectó una nueva mutación en VRK1 que causaba la misma patología: la mutación R133C, situada dentro del dominio quinasa (Najmabadi et al., 2011), la cual fue descubierta en un estudio reciente para detectar posibles genes implicados en trastornos cognitivos recesivos (Najmabadi et al., 2011; Peeters et al., 2014).

Además, han sido descritas dos nuevas mutaciones en VRK1 causantes de neuropatía sensoriomotora hereditaria con microcefalia: las mutaciones R89Q y V236M, ambas situadas también en el dominio quinasa (Eggens et al., 2014; Gonzaga-Jauregui et al., 2013; Peeters et al., 2014).

El único dato que se conoce hasta ahora es acerca de la mutación R358X. Se sabe que debido a que se encuentra en la señal de localización nuclear, es una VRK1 exclusivamente citosólica y que presenta una menor actividad quinasa y, por lo tanto, una menor fosforilación de sustratos conocidos como p53 o la coilina (Sanz-García et al., 2011b). Quisimos estudiar, por lo tanto, cómo se comportaban el resto de mutantes, su estabilidad o su capacidad de autofosforilarse y fosforilar a sustratos ya conocidos.

Sabemos que la quinasa VRK1 inactiva (K179E) es mucho más inestable que la quinasa silvestre, de tal forma que sobre las 6 horas post-tratamiento con cicloheximida ya vemos su degradación, mientras que la quinasa activa pasadas las 10 horas aún sigue siendo estable (Valbuena et al., 2008). A través de ensayos de estabilidad proteica con cicloheximida, pudimos observar que el mutante R89Q era igual de estable que la VRK1 silvestre, mientras que los mutantes R133C y R358X se asemejaban en estabilidad a la quinasa inactiva K179E. La relación estabilidad-actividad la confirmamos a través de ensayos quinasa en los cuales vimos que, la mutación que era más estable, R89Q, presentaba una mayor capacidad de autofosforilación; mientras que los mutantes más inestables, R133C y R358X, eran prácticamente inactivos e incapaces de fosforilar a sustratos conocidos como p53. Vemos así como a pesar de que tanto la mutación R89Q como R133C se localicen dentro del dominio quinasa, sus consecuencias a nivel de estabilidad y actividad son opuestas. Estamos realizando en el laboratorio actualmente los ensayos de fosforilación *in vitro* con los mutantes de VRK1, pero cambiando a p53 por la coilina como sustrato. Debido a que nos queremos centrar en el residuo serina 184, hemos clonado el fragmento de la coilina de los aminoácidos 160 a 214 en un vector pGEX de expresión en bacteria. Los resultados hasta ahora parecen mostrar que, igual que pasa con la fosforilación en la treonina 18 de p53, los mutantes R133C, V236M y R358X fosforilan menos a este residuo. Si recordamos los ensayos de rescate de fenotipo, la quinasa inactiva K179E no lograba recuperar la formación de los cuerpos de Cajal al silenciar a VRK1, por lo que se confirmaba que era esencial la actividad quinasa. Sería muy interesante realizar estos mismos ensayos de rescate de fenotipo sobreexpresando los distintos mutantes de VRK1, para ver qué mutaciones afectan a la formación de los CBs. Lo que sí podemos confirmar es que todos los mutantes

interaccionan tanto con la coilina como con SMN y que su sobreexpresión no tiene ningún efecto en estas proteínas, ya que a través de ensayos de inmunofluorescencia no vimos cambios en el marcaje respecto a las condiciones control.

Si intentamos unir todos los resultados, obtenemos una red de interacciones entre proteínas que tienen un nexo común: su implicación en patologías neurodegenerativas. Tenemos a la coilina, la proteína de ensamblaje de los cuerpos de Cajal, lugar donde se recluta al factor de supervivencia de las motoneuronas: SMN. VRK1 fosforila a la coilina y es esencial para la correcta formación de los cuerpos de Cajal, los cuales cuando se desensamblan producen la salida al citosol de SMN, lugar donde no puede realizar una de sus funciones más importantes: el *splicing* de genes U12 dependientes. Además, parece que entre estos genes se encuentra el de la glicil tRNA sintetasa GARS, mutaciones del cual producen el síndrome de Charcot Marie Tooth, una neuropatía periférica de adultos. Se ha visto en el laboratorio que GARS interacciona con VRK1, aunque no sabemos aún la función de esta unión. Por otro lado, la coilina interacciona con la ataxina 1, proteína que codifica el gen *SCA-1*, y que se encuentra mutado en la ataxia espinocerebelar de tipo 1. Resultados preliminares del laboratorio indican que VRK1 también interacciona con la ataxina 1. Esta ataxina mutada contiene la expansión del triplete CAG, provocando un tracto de poli glutaminas (poliQ) que se agregan en la célula y son los causantes de la patología. Estos tractos de poliQ se unen a la proteína VCP, fosforilada por VRK1 de manera aún desconocida. Además, VRK1 también regula a p53, factor de transcripción que se une a SMN, unión que se ve afectada en pacientes con atrofia muscular espinal. Así, tenemos un conjunto de fosforilaciones e interacciones (Figura 96) que se necesitan caracterizar y estudiar más a fondo para poder conocer los mecanismos de diferentes enfermedades como las atrofas musculares espinales, la hipoplasia pontocerebelosa o las ataxias espinocerebelares, y poder así buscar nuevos tratamientos o dianas terapéuticas que nos ayuden a combatir las y evitar así la muerte en edades tan tempranas.

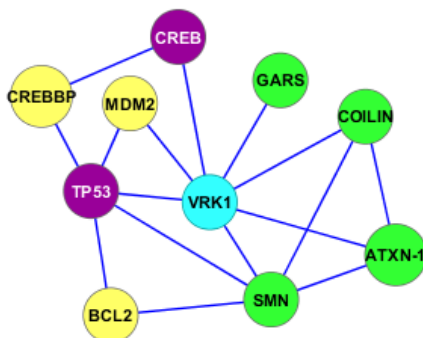


Figura 96: Mapa de las interacciones entre VRK1 y las proteínas más importantes en este trabajo. Se utilizó el programa *Cytoscape* 3.0.2.

CONCLUSIONES

*“Caminante no hay camino,
se hace camino al andar.”*

Antonio Machado

- La coilina, proteína de ensamblaje de los cuerpos de Cajal, interacciona con la quinasa humana VRK1. Dicha interacción se produce en el nucleoplasma debido a que VRK1 no se encuentra en los cuerpos de Cajal.
- El silenciamiento de VRK1 produce la desoligomerización de la coilina, la cual deja de estar presente en complejos de alto peso molecular, lo que conlleva al desensamblaje de los cuerpos de Cajal, de manera quinasa dependiente.
- El residuo serina 184 de la coilina, fosforilado por VRK1 durante la mitosis, es necesario para el correcto ensamblaje de los cuerpos de Cajal pero no para su mantenimiento, y está asociado a la actividad de VRK1 en células en proliferación.
- La ausencia de VRK1 conduce a la ubiquitinación de la coilina en el núcleo a través de la ubiquitina ligasa Mdm2, formándose cadenas de lisina 48, para posteriormente ser exportada al citosol donde se degradará en el proteasoma. El mutante de coilina Ser184Ala es más sensible a la degradación por Mdm2 y se ubiquitina más, mientras que el mutante fosfomimético Ser184Glu se ubiquitina en menor medida que la coilina silvestre y es resistente a la degradación por Mdm2.
- La quinasa VRK1 interacciona con la proteína de supervivencia de las motoneuronas SMN, pero no la fosforila. Además, esta quinasa regula transcripcionalmente a SMN por un mecanismo aún desconocido.
- El silenciamiento de VRK1 provoca la salida de SMN al citosol como efecto secundario al desensamblaje de los CBs, acción inhibida por la leptomicina B.
- VRK1, coilina y SMN, interaccionan a lo largo del ciclo celular, excepto en células paradas o en células que acaban de completar la mitosis (G1 temprana).
- El mutante de VRK1 R89Q es más estable que la proteína silvestre y tiene una mayor actividad de autofosforilación y fosforilación de sustratos conocidos. Por el contrario, los mutantes R133C y R358X, presentan una menor estabilidad proteica y una menor actividad, tanto de autofosforilación como de fosforilación de sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

“Si no conozco una cosa, la investigaré.”

Louis Pasteur



1. Técnicas de manipulación del ADN

1.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico de *E. Coli*

La obtención de ADN plasmídico a partir de *E. Coli* se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979. Para obtener una mayor pureza, el ADN se purificó mediante lavados con fenol:cloroformo y posterior precipitación con etanol. Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche mannheim Germany)*. Para la extracción a gran escala se utilizó el sistema comercial *JETStar The Novel Plasmid Purification System de GENOMED*. En ambos casos se siguieron las especificaciones del fabricante.

1.2 Cuantificación de ADN plasmídico

La concentración final del ADN plasmídico obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260nm en el espectrofotómetro (Hitachi U-2001). Para calcular la pureza de los ácidos nucleicos se empleó el cociente de las absorbancias A260/A280 que debe estar entre 1.8 y 2.0 para el ADN purificado. Posteriormente, se confirmó la concentración de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

1.3 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa preparados a la concentración adecuada para el tamaño de los fragmentos a separar (entre 1 y 1,5% m/v de agarosa) en tampón TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM). Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante, entre 50 y 70V. Se utilizó como marcador de peso molecular el *ADN Ladder 1Kb de Promega*. Para la visualización del ADN (bandas) 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 imágenes fueron captadas con una cámara digital acoplada al analizador de imagen *Gel DocTM 2000* de Bio-Rad e impresas en papel térmico.

1.4 Generación de vectores de ADN recombinante

Las construcciones de ADN recombinante diseñadas en el laboratorio fueron generadas mediante la inserción de secuencias de ADN codificante en los vectores de interés mediante

la digestión de fragmentos de ADN con endonucleasas de restricción (*Promega* o *Fermentas*) y posterior ligación con la enzima T4 ADN-Ligasa (*Promega*). Las construcciones obtenidas fueron transformadas en bacterias competentes de *E. Coli*, como las DH5 α o BL21DE3, las cuales fueron cultivadas en medio LB (*Luria Broth*) con su antibiótico correspondiente (ampicilina 10 μ g/mL o kanamicina 25 μ g/mL) e incubadas a 37°C toda la noche. La verificación de las construcciones de ADN se llevó a cabo por análisis o digestiones con enzimas de restricción y posterior secuenciación, para confirmar la secuencia correcta mediante su alineamiento en los programas *Chromas* y *DS-GENE*.

1.5 Transformación de plásmidos en *E. Coli*

Los plásmidos de ADN recombinante utilizados fueron transformados en bacterias *E. Coli* competentes de las cepas DH5 α o BL21DE3, mediante choque térmico. De este modo, las bacterias preservadas a -80°C se descongelaron y se mezclaron con una pequeña cantidad del ADN de interés. Se dejaron 30 minutos en hielo y se sometieron a un choque térmico de 30 segundos a 42°C. Posteriormente se volvieron a dejar a 4°C en el hielo. En este tiempo las bacterias aún no han podido expresar el gen de resistencia al antibiótico de selección, por lo que se incubaron a 37°C en agitación con medio LB sin antibiótico durante 1-2 horas. Finalmente, se sembraron en placas Petri de LB-Agar con el antibiótico de selección adecuado (generalmente ampicilina 50 μ g/mL) y se dejaron a 37°C toda la noche hasta obtener colonias individuales en las que se verificó la presencia del plásmido por secuenciación. Las colonias positivas se guardaron a -80°C en glicerol al 30% v/v como crioprotector.

1.6 Mutagénesis dirigida

Para realizar mutaciones en nucleótidos puntuales, se siguió el protocolo recomendado por el sistema comercial *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* (*Stratagene*, USA). Para llevar a cabo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se preparó una reacción que contenía 20ng del plásmido utilizado como ADN molde, 125ng de cada oligonucleótido diseñado con la mutación puntual de interés, 0.2mM de dNTPs (Roche), tampón de PCR (KCl 100mM, (NH₄)₂SO₄ 100mM, Tris-HCl 200mM pH 8.8, MgSO₄ 20mM, 1% Tritón X-100, BSA 1mg/mL) y una unidad de la enzima PFU turbo ADN polimerasa (*Stratagene*) en un volumen final de 50 μ L. Antes de la adición de la polimerasa, la reacción fue incubada a 95°C durante 10 minutos para la desnaturalización de las hebras del ADN. Tras la adición de la enzima, se llevaron a cabo 16 ciclos de 95°C durante 30 segundos, seguidos de 1 minuto a 55°C y una

elongación durante 22 minutos a 68°C. El ADN sustrato fue eliminado mediante la incubación del producto de la PCR con la enzima *DpnI* (*Fermentas*), la cual actúa específicamente sobre secuencias metiladas y hemimetiladas, resultando así seleccionadas sólo las copias mutantes. El producto de PCR se transformó en cepas de *E. Coli* DH5 α , seleccionando las colonias transformantes por su resistencia específica al antibiótico. Los plásmidos fueron aislados y purificados con el método indicado en *High Pure Plasmid Isolation Kit* (*Roche, Mannheim Germany*) y posteriormente analizados por secuenciación para confirmar la presencia del nucleótido mutado. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 1.

2. Técnicas de manipulación de proteínas

2.1 Purificación de proteínas de fusión con GST

Esta técnica permite la expresión y purificación de proteínas de fusión a GST (Glutación-S-Transferasa) a gran escala a partir de cepas de *E. Coli* BL21DE3, previamente transformadas con los plásmidos pGEX-4T-GST donde han sido clonadas las proteínas de interés. Estos plásmidos presentan un promotor *lac* que permite inducir su expresión químicamente con lactosa o un análogo, como el isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Se crecieron las bacterias con los plásmidos de interés durante toda la noche a 37°C en medio LB con ampicilina (50 μ g/mL). Al día siguiente, se diluyó el pre-inóculo 1:10 en medio selectivo (LB+ampicilina) y se incubó a 37°C en agitación 1-2 horas, hasta que la densidad óptica a 600nm estuvo entre 0.6 y 0.8. Este valor nos indica que el cultivo está en su fase exponencial de crecimiento, momento en el que se puede inducir con IPTG a 0,2mM la expresión de la proteína. Se dejó el cultivo de 2 a 4 horas más a 37°C en agitación y, transcurrido este tiempo, se centrifugó a 8000rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* bacteriano en tampón de lisis (PBS frío con 1% Tritón X-100, 0,2 μ g/mL lisozima, 1mM PMSF, 5mM DTT, 10 μ g/mL aprotinina y 10 μ g/mL leupeptina). Una vez lisadas las bacterias, se sonicó la suspensión a 4°C a baja potencia realizando 5 pulsos de 10 segundos cada uno con intervalos de 10 segundos sin sonicar (sonicador *Misonic XL2010*). Pasados 30 minutos en hielo, se centrifugó a 15000rpm durante 30 minutos. El sobrenadante resultante contiene proteínas solubles, entre las que se encuentra mayoritariamente la proteína de fusión expresada. Esta fracción se incubó con la resina de alta afinidad al GST *Glutathion Sepharose 4B beads* (*GE Healthcare*) durante toda la noche a 4°C en agitación orbital. Posteriormente, la resina se lavó varias veces con PBS frío más inhibidores de proteasas centrifugando a 2000rpm. Posteriormente, se dejó la

misma cantidad de PBS que de resina (50%) y, para guardar la proteína a -20°C , se añadió glicerol al 20%. A la hora de eluir la proteína de fusión de la resina se utilizó una solución de 10mM de glutatión reducido en 50mM Tris-HCl pH 8 a 4°C , durante 4-12 horas en agitación orbital, y se recogió el sobrenadante con la proteína eluída tras centrifugar 3 minutos a 2000rpm. Se verificó la purificación de la proteína mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con *azul de Coomassie* o *Western blot*. La concentración proteica se determinó por colorimetría mediante *BIORAD protein assay* (Bio-Rad), utilizando proteína seroalbúmina bovina (BSA) para la recta patrón.

2.2 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. Dependiendo del tamaño de la proteína a analizar, se utilizaron diferentes concentraciones de acrilamida: para proteínas con pesos moleculares entre 30-100kDa se emplearon geles del 10% de acrilamida, para aquellas entre 15-30kDa, geles del 12.5% y para proteínas mayores de 120kDa, geles del 7.5%. 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% β - mercaptoetanol) y se hirieron durante 5 minutos. El gel se corrió 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 ProteinTM Standards Dual Color* (Bio-Rad).

2.3 Tinción con azul de *Coomassie*

Se utilizó la tinción azul *Coomassie* para ver las proteínas en geles de poliacrilamida. Esta tinción está compuesta por 0.5% de *Coomassie brilliant blue R250 (Merck)*, 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial. Se añadió la solución a los geles y se dejó en agitación suave durante 5-10 minutos. Posteriormente, se procedió a la destinción de dichos geles con la solución de destinción (50% de metanol, 10% de ácido acético glacial), en agitación hasta que las bandas de las proteínas se visualizaron correctamente. Finalmente, para la conservación de estos geles, se transfirieron a papel *Whatman 3M* y se secaron con el secador de geles (Bio-Rad) durante 2 horas a 80°C.

2.4 Transferencia húmeda y *Western blot* de extractos proteicos

Para la detección de las proteínas separadas por electroforesis con anticuerpos específicos se realizó la transferencia húmeda de las proteínas a una membrana de PVDF *Immobilon-P* o *Immobilon-FL (Millipore)* descrita por Towbin (1979), en un tampón compuesto por 25mM Tris-HCl, 19,2mM glicina y 10-20% metanol. El porcentaje de metanol varía según el peso molecular de las proteínas a transferir, siendo mayor contra más pequeña es la proteína, y viceversa. La transferencia se realizó durante 1-1,5 horas a 80-90V o durante toda la noche a 40V.

Para llevar a cabo el *Western blot*, la membrana de transferencia se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C 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 con el anticuerpo primario necesario para detectar la proteína de interés (anticuerpos utilizados en Tabla 2), a la dilución recomendada (siguiendo las instrucciones de la casa comercial), en TBS-T durante 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T en agitación. Los anticuerpos secundarios *Goat Anti-Mouse IgG, DyLight™ 680* y/o *Goat anti-Rabbit Ig-G, DyLight™ 800 (Thermo scientific)* se incubaron a la dilución adecuada (1:10000) durante 1 hora, y 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.

En algunos casos, el anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado con peroxidasa (*ECL anti-mouse IgG, horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody* de Amersham

o anti-rabbit IgG (*whole molecule*) peroxidase conjugate de SIGMA-ALDRICH), por lo que después de la incubación con la membrana durante 1 hora, se realizaron 3 lavados con TBS-T y se detectó la luminiscencia tras la incubación con el reactivo ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences), exponiendo las membranas a películas de rayos X (Fujifilm).

2.5 Tinción con rojo Ponceau

En determinadas ocasiones, las proteínas transferidas a las membranas de PVDF se visualizaron con tinción rojo Ponceau. Las membranas fueron incubadas durante 10-15 minutos con la solución compuesta por 0.2% de Ponceau S (ácido 3-Hidroxi-4[2-sulfo-4-(4-sulfo-fenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico), 3% de ácido sulfosalicílico, 3% de ácido trifluoroacético y 1% de ácido acético. Tras la incubación, las membranas se lavaron con agua hasta la visualización de las bandas.

3. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo así como el medio de cultivo usado para el correcto crecimiento de estas células se especifican en la Tabla 3. Las líneas celulares se cultivaron en Flask (BD Falcon) en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los medios de cultivos (DMEM, RPMI, McCoy's, DMEM 1:1 DMEM F-12) fueron suplementados con 10% de FBS (suero fetal bovino), 2mM de L-glutamina, y los antibióticos penicilina (50unidades/mL) y estreptomina (50µg/mL). Para levantar las células de los Flask se utilizó tripsina-EDTA. Los medios de cultivo fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH o GIBCO-life technologies y el suero y los suplementos fueron obtenidos de GIBCO-life technologies. Las líneas celulares se observaron con un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 25.

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

La sobreexpresión transitoria de las proteínas de interés se realizó llevando a cabo transfecciones de los plásmidos de ADN codificante de expresión eucariota (Tabla 4). Para ello, las células fueron sembradas 24 horas antes para alcanzar la confluencia adecuada (50-70%). La cantidad de ADN transfectado se especifica en cada experimento, siendo la

concentración final constante en todos los puntos de un mismo ensayo mediante la adición de vectores vacíos.

4.1 Transfección con *JetPEI*

La mayoría de las transfecciones se realizaron con el polímero catiónico comercial (polietilenimina) *JetPEI*TM (*Polyplus transfection*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este polímero compacta el ADN en el interior de partículas cargadas positivamente que se adhieren a los proteoglicanos cargados negativamente de la superficie celular y son introducidos posteriormente por endocitosis.

Se resuspendió el ADN en un volumen de NaCl 150mM, al cual se le añade un volumen de NaCl en el que se ha resuspendido el *JetPEI* (por cada microgramo de ADN se añaden 2µl de reactivo). Esta mezcla se incubó durante 20-30 minutos y se añadió por goteo a las células a transfectar.

4.2 Transfección con *Lipofectamine*

Para los ensayos de supresión de la expresión de una proteína mediante ARN de interferencia se utilizó el reactivo *Lipofectamine*TM 2000 (*Invitrogen*), con la finalidad de obtener una mayor eficiencia de transfección de los oligonucleótidos. Este reactivo contiene subunidades lipídicas que forman liposomas en ambiente acuoso. Así, estos liposomas de naturaleza catiónica se unen a los ácidos nucleicos (cargados negativamente), facilitando la fusión con la membrana celular y su incorporación a la célula.

Se diluyó la *Lipofectamine TH 2000* en un volumen de *Opti-MEM* (*GIBCO-life technologies*) y se incubó durante 5-10 minutos. Pasado este tiempo, se añadió la mezcla a un volumen de *Opti-MEM* en el que se diluyó previamente el oligonucleótido a la concentración indicada por el fabricante. Tras 20-30 minutos de incubación, se añadió la mezcla a las células que habían sido cultivadas en medio sin antibiótico. Tras 12 horas, se puede reemplazar el medio de cultivo por medio con antibiótico, haciendo previamente lavados con PBS para eliminar todos los restos del reactivo.

Los dúplex de ARN de interferencia utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Siempre se ha utilizado un ARN sin diana específica en la célula como control.

5. Infección celular para el silenciamiento o sobreexpresión de la quinasa VRK1

Para el silenciamiento o sobreexpresión de VRK1 por infección se utilizaron vectores retrovirales y lentivirales (Tabla 1) o el plásmido retroviral pQCXIP (Tabla 4), respectivamente. Se sembraron células HEK-293T 24 horas antes de la transfección. Pasado este tiempo, necesario para que adquieran la confluencia adecuada, se transfectaron con los vectores de envuelta y empaquetamiento viral (necesarios para la producción de las partículas virales con capacidad de infección) y con los vectores de interés (p*Superior*, pLKO o pQCXIP). Pasadas 20 horas como máximo, se cambió el medio a las células por medio de cultivo fresco y se sembraron las células diana. Pasadas 24 horas, se procedió a la primera infección, eliminando el medio a las células diana y añadiéndoles el medio de las HEK-293T filtrado previamente con filtros de 0,45µm (*Acrodisc® Syringe Filters, Pall Corporation*) y al que se añadió el polímero catiónico *Polybrene* a una concentración de 16ng/µl para aumentar la eficiencia de la infección. A las células HEK-293T se les volvió a añadir medio de cultivo fresco, de forma que acumule nuevas partículas virales. Pasadas 24 horas se repitió la infección y, al día siguiente, se empezó la selección de las células infectadas con el antibiótico de selección puromicina (1-2µg/ml) los días necesarios según la línea celular y los plásmidos transfectados.

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 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 fosfatasa (1mM de ortovanadato de sodio y 1mM de NaF). 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*. Este método se basa en el cambio de color de pardo a rojo-azulado que experimenta el colorante G-250 *Coomassie* cuando se une a las proteínas, cambiando así su máximo de absorción de 465 a 595nm. El reactivo comercial que se utilizó fue Bio-Rad *Protein assay* (Bio-Rad). Para la obtención de una recta patrón, se usó la proteína seroalbúmina bovina (BSA).

7. Fraccionamiento citosol-núcleo de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos fraccionando citosol y núcleo a partir de células en cultivo, se lisaron las células con tampón de lisis de fracción citosólica (10mM HEPES pH 7.6, 3mM MgCl₂, 40mM KCl, 5% glicerol, 0,5% NP-40). Se centrifugaron a 1250g y 4°C durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante como la fracción citosólica. Se lavó el *pellet* dos veces por centrifugación a 1250g y 4°C durante cinco minutos, evitando así posibles contaminaciones en la fracción nuclear. A continuación, se lisó el *pellet* con el tampón de lisis de fracción nuclear (10mM HEPES pH 7.9, 0,1mM EGTA, 1,5mM MgCl₂, 420mM NaCl, 25% glicerol), y se incubó en hielo durante 20 minutos. Finalmente se centrifugó a 1250g y 4°C durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante como la fracción nuclear.

Se cuantificó cada fracción por el método de *Bradford* explicado en el apartado anterior, y se analizaron las muestras por electroforesis y SDS-PAGE.

8. Ensayos de interacción entre proteínas

8.1 Ensayos de coimmunoprecipitación

Se partió de 1,5-3mg de extracto proteico celular, obtenido de la lisis con el tampón de lisis suave mencionado en el apartado 6. Estos extractos se llevaron hasta un volumen final de 1mL y se incubaron con 30μL de la resina equilibrada *GammaBind Plus Sepharose* (GE Healthcare) durante 1 hora a 4°C en rotación, con el fin de eliminar todo lo que se pueda unir de manera inespecífica a la resina.

Posteriormente, se eliminó la resina por centrifugación suave y se incubó el extracto preclareado con el anticuerpo específico a la concentración adecuada (generalmente 1:50 – 1:500) durante 4-6 horas (o toda la noche) a 4°C en agitación orbital. Una vez incubado el anticuerpo, se añadieron 40μL de resina (*GammaBind Plus Sepharose*) previamente equilibrada mediante lavados con tampón de lisis a 4°C a 2800rpm. Esta mezcla se incubó durante 4 horas o toda la noche a 4°C en agitación orbital para que, de este modo, se una el anticuerpo a la resina.

Finalmente, se lavó la resina con tampón de lisis de 3 a 5 veces por centrifugación suave y se procesó con tampón de carga. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por

electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*. En todos los casos se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo inespecífico como control negativo del ensayo.

8.2 Ensayos de *Pull-Down*

El objetivo de los ensayos de *Pull-Down* es precipitar proteínas fusionadas a GST que han sido transfectadas en células eucariotas, con el fin de determinar posibles interacciones o complejos proteicos.

Se lisaron las células 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 y fosfatasas (1mM PMSF, 10µg/mL aprotinina, 10µg/mL leupeptina, 1mM ortovanadato de sodio y 1mM NaF). Se utilizó entre 1-3mg de extracto proteico, el cual fue incubado con la resina equilibrada *GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare)* durante 1 hora a 4°C en agitación orbital, con el fin de eliminar proteínas que se pudieran unir de manera inespecífica a la resina. Posteriormente, se eliminó la resina por centrifugación suave y se añadió al extracto 40µL de la resina "*Glutathion Sepharose 4B beads*" (*GE Healthcare*) previamente equilibrada mediante lavados con tampón de lisis a 2800rpm a 4°C. Se incubó la mezcla durante toda la noche en agitación orbital y a 4°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados con tampón de lisis y se procesó la resina con tampón de carga para su análisis por electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*. En este tipo de ensayos, siempre se añadió un punto en el que se precipita el GST vacío como control negativo de interacción.

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

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo este flujo de presión llega a una columna donde se encuentra la fase estacionaria. Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.

La máxima utilidad de esta técnica se obtiene al combinarla con el SDS-PAGE, lo que permite comparar la masa molecular de la proteína nativa y la proteína desnaturizada y obtener conclusiones sobre su estructura cuaternaria y sobre la formación de complejos multiproteicos. En este tipo de separaciones, las moléculas de menor tamaño son las últimas en filtrarse dado que penetran en todos los poros recorriendo un camino mayor. Para la determinación de complejos proteicos por cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular, se lisaron las células en tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH 7,4, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 25mM β -glicerofosfato, 10% glicerol, 1% Tritón-X-100) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 13200rpm durante 20 minutos a 4°C y posterior filtración con jeringa. Se cuantificaron las muestras de manera que para cada muestra se filtraron 3mg de proteína total, contenidos en un mismo volumen. Estos extractos se fraccionaron por HPLC de filtración en gel en una columna "Superose 12/10/300 GL" (GE Healthcare). El tampón de equilibrado y elución de la columna empleado fue : 50mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 100mM KCl y azida sódica 0,025%, el cual fue previamente filtrado (filtro 0,42 μ m) y desgasificado mediante sonicación y se empleó a un flujo de 0,3ml/min. Se recogieron fracciones de 200 μ l, de las cuales las fracciones pares se precipitaron y se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*. Para calibrar la columna y estimar los pesos moleculares de las fracciones obtenidas se emplearon los siguientes marcadores de peso molecular de Bio-Rad: tiroglobulina bovina 670kDa, γ -globulina bovina 158kDa, ovoalbúmina de pollo 44kDa, mioglobina de caballo 17kDa y vitamina B12 1,35kDa.

10. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

Esta técnica permite la amplificación y cuantificación con gran exactitud y fiabilidad de una molécula concreta de ARN, para la cual se han diseñado oligonucleótidos específicos. Para ello, mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa, se transforma la molécula de ARN en su correspondiente molécula de ADN, la cual se amplifica mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El número de copias del oligonucleótido diana al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia asociada al ADN amplificado, con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

Se lavaron las células con PBS 1x frío y se extrajo el ARN total mediante el kit comercial *RNeasy Mini Kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron lisadas y homogeneizadas en un tampón desnaturizante (RLT) que contiene tiocianato de guanidina que inactiva las ribonucleasas, asegurando la purificación del ARN intacto. Posteriormente, se añadió etanol al 70%, y esta mezcla se pasó a las columnas con membranas de sílica gel, donde el ARN total se une, haciendo lavados para eliminar posibles contaminantes. Finalmente, se eluyó el ARN con agua libre de RNasas. El ARN total purificado se cuantificó y analizó mediante el sistema *Bioanalyzer 2100 nano-lab chip (Agilent Technologies)*.

Para la reacción de RT-PCR cuantitativa en tiempo real se utilizaron: 100ng de ARN total diluido a 50ng/μl, el kit *QuantiTec SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen)*, un termociclador *iCycler (Bio-Rad)* y los *primers* específicos para cada caso (Tabla 1). La fluorescencia emitida por el fluorocromo *SYBR Green*, asociada al ADN amplificado, fue cuantificada y analizada en el software de *iCycler*. Para cada experimento, los niveles de ARN específico se normalizaron respecto a los niveles de ARN de la *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) determinados para cada muestra, como control interno para corregir la variabilidad.

11. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Con el objetivo de detectar los niveles de expresión y localización subcelular de proteínas, tanto endógenas como sobreexpresadas en células en cultivo, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Se sembraron las células en cubreobjetos de cristal estériles, siendo tratados con poli-L-lisina (*SIGMA-ALDRICH*) al 0.01% cuando fueron células de la línea HEK-293T, con el fin de mejorar la adhesión al cristal. Transcurridas de 24 a 72 horas, dependiendo del tipo de ensayo, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se realizó un tratamiento con glicina (200mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente para reducir los grupos aldehído libres, dado que estos pueden reaccionar con aminos y proteínas generando productos fluorescentes. Posteriormente, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0.2% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, las células fueron bloqueadas con BSA 1% en PBS 1X y azida 2X durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. En la mayoría de los experimentos se detectaron dos proteínas a la vez. Para ello, se incubaron los anticuerpos primarios de manera secuencial. El primer anticuerpo primario se diluyó en BSA 1% en PBS

1X y azida 2X a la concentración adecuada y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBS 1X se incubó el segundo anticuerpo primario de diferente origen al primero en las mismas condiciones. Siempre se realizaron 3 lavados con PBS 1X tras la incubación de los anticuerpos para eliminar los restos de anticuerpo libre. Los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos de cianina Cy2 (CyTM2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L) de Jackson ImmunoResearch) y Cy3 (CyTM3-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L) de Jackson ImmunoResearch) se diluyeron a 1:1000 en BSA 1% en PBS 1X y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente siempre en oscuridad. A partir de este punto, todo el protocolo se realiza evitando la exposición a la luz para preservar los fluoróforos. Tras los lavados, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) diluido en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de los 3 últimos lavados con PBS 1X, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con MOWIOL®4-88 (Calbiochem). La localización subcelular de las proteínas se analizó mediante microscopía confocal en el microscopio Leica TCS SP5 y el software usado para la captura y análisis de las imágenes fue LAS AF Lite.

12. Ensayos de actividad quinasa

La actividad serina/treonina quinasa se analizó mediante ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando la proteína quinasa GST-VRK1 recombinante expresada en *E. Coli*. Se emplearon como sustrato proteínas recombinantes purificadas o bien proteínas inmunoprecipitadas con la resina GammaBind Plus Sepharose. Para analizar la actividad quinasa de VRK1 se usó un tampón específico para caseína quinasa (20mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 0,5mM DTT y 150mM KCl), con 5μM de ATP y 5μCi (0,1μM) de [γ-³²P] ATP en un volumen final de 30-40μL. En algunos casos se utilizaron como sustratos la histona H3 de *Xenopus Laevis* (Upstate) y la proteína recombinante GST-p53, que corresponde al fragmento de p53 que comprende los aminoácidos 1-85. Las reacciones de fosforilación se incubaron durante 30 minutos a 30°C en agitación (800rpm) en un Thermomixer Compact (Eppendorf). En los experimentos donde se determinó la actividad quinasa de la proteína VRK1 endógena se utilizó la quinasa inmunoprecipitada en las mismas condiciones usadas para las reacciones con la quinasa recombinante.

Tras el tiempo de incubación, las reacciones de fosforilación fueron procesadas con tampón de carga (62,5mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 0.1% azul de bromofenol y 5% β-mercaptoetanol) e incubadas a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas fosforiladas se

analizaron por electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilon-P* (Millipore). Para detectar las bandas radiactivas, se expusieron las membranas a películas de rayos X (*Fujifilm*) durante varios minutos u horas. Como controles se utilizaron las bandas de proteínas teñidas con rojo *Ponceau* o detectadas con anticuerpos específicos en el *Western blot*.

13. Aislamiento de núcleos en células HeLa

Se realizó el aislamiento de núcleos en células HeLa como paso previo al aislamiento de los cuerpos de Cajal. Para ello, se sembraron en placas de cultivo hasta que alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente. Se recogieron las células por tripsinización y se lavaron dos veces con PBS 1x por centrifugación suave, resuspendiendo con una pipeta *Pasteur* de cristal para evitar la rotura de las células. El *pellet* obtenido se resuspendió en 10 volúmenes de tampón RSB frío (0,01M NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01M Tris-HCl pH 7,4) y se dejó durante 10 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se cogió una pequeña muestra para mirarla al microscopio y poder comprobar como las células estaban hinchadas debido a la entrada de agua al citoplasma por ósmosis. Se pasó la suspensión de células a un homogeneizador “*Dounce-type homogeneizer*” y se hicieron unos 10-12 choques. En este punto, se volvió a mirar en el microscopio la suspensión celular, donde se observaron los núcleos libres. Se centrifugó 3 minutos a 1000g y 4°C para *pelletear* los núcleos. Este *pellet* se lavó tres veces con el mismo tampón RSB por centrifugación suave a 1000g y a 4°C, finalmente, se dejó resuspendido en 10 volúmenes de tampón RSB.

14. Aislamiento de cuerpos de Cajal a partir de núcleos aislados de células HeLa

Para el aislamiento de cuerpos de Cajal a partir de núcleos aislados de células HeLa, se empleó el protocolo diseñado por el Dr. Yun Wah Lam (Lam et al., 2002). Todo el protocolo se realizó en hielo y a 4°C. Se añadió la solución S1 (0.25M sacarosa, 10mM MgCl₂) a los núcleos aislados de las células HeLa hasta alcanzar un volumen final de 30mL. Se añadieron 15mL a dos tubos Falcon de 50mL de solución S2 (0.35M sacarosa, 0.5mM MgCl₂), y posteriormente se añadió a cada uno de ellos 15mL de la suspensión de los núcleos, quedando en dos fases claramente diferenciables. Estos tubos se centrifugaron a 1430g durante 5 minutos y el sobrenadante se decantó cuidadosamente. Los *pellets* se resuspendieron en 30mL de solución 2, y se dividieron en 3 tubos Falcon de 15mL para mejorar la sonicación (3x6 segundos). En este paso, la solución se examina en el

microscopio (los núcleos deberían haberse lisado de tal forma que lo que se ven son nucléolos libres). Todas las alícuotas se volvieron a juntar en dos tubos Falcon de 50mL, a los que se añadió 0,42x volumen de una solución de sacarosa 2,55M (quedando así a una concentración final de 1M). Se volvió a dividir la mezcla en fracciones de 20mL en tubos Falcon de 50mL (aproximadamente 20mL por tubo) y se centrifugó a 3000g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante (contiene el nucleoplasma con los cuerpos de Cajal) se recogió con pipeta. Se añadió 0,82x volumen de tampón SP1 (1M sacarosa, 34.2% Percoll, 22.2mM Tris-HCl pH 7.4, 1,11mM MgCl₂) y 0,05x volumen de Tritón al 20%. Esta mezcla se repartió en tubos pre-enfriados de ultracentrífuga SW41, y se centrifugó a 37000rpm durante dos horas. El sobrenadante se eliminó con cuidado dejándolo a unos 5mm del *pellet* para poder resuspenderlo y pasarlo a un tubo Falcon de 15mL. En este punto, se añadieron 600 unidades de DNasa1 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación orbital. Después de esta incubación, se añadió 0,05x volumen de heparina (10mg/mL) y se añadió 1x volumen de solución SP2 (20% Percoll, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tritón-X100, 0.5mg/ml heparina), volviéndose a incubar la mezcla durante 1 minuto. En este punto se volvió a repartir la mezcla en tubos pre-enfriados de ultracentrífuga SW55, y se centrifugaron a 45000rpm durante 1 hora. Después de esta centrifugación, los tubos tienen tres bandas visibles, siendo la banda del medio la que contiene los cuerpos de Cajal, y, por lo tanto, la que se recogió con una pipeta. Se añadió entonces 10x volumen de tampón HT (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tritón X100, 0.5mg/ml heparina) y se dejó que se mezclara todo bien en agitación orbital. Se dividió la mezcla en tubos Eppendorf de 1,5mL y se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron descartados y se resuspendieron los pellets en 500µl del tampón HT. Estos *pellets* ya resuspendidos se juntaron en un solo tubo Eppendorf y se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. De nuevo se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 500µl de solución S3 (0.5M sacarosa, 25mM Tris-HCl pH 9.0). Se centrifugó a 8000rpm durante 5 minutos, repitiendo este paso una vez. El sobrenadante se diluyó 10 veces en Tris-HCl 25mM pH 9.0 y se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. Nuevamente, el sobrenadante se descartó y el *pellet* obtenido se resuspendió en Tris-HCl 25mM pH 9.0 y se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante dejando unos 20µl para poder resuspender el *pellet*, obteniendo la fracción enriquecida en cuerpos de Cajal.

Para el análisis por microscopía confocal de la muestra, se utilizaron 10µl de la fracción 1S (negativa para cuerpos de Cajal) y de la fracción 3S (enriquecida en cuerpos de Cajal). Se añadió el volumen correspondiente a cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina y se

dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Se realizó el marcaje con anticuerpos específicos.

Para el análisis por electroforesis SDS-PAGE y *Western blot*, se procesó con tampón de carga la misma cantidad de las fracciones 1S y 3S.

15. Reactivos y estimulaciones

Para el tratamiento de las células en cultivo con inhibidores del proteasoma se utilizaron tanto el MG132 de *Calbiochem* (inhibidor potente y reversible), a 20 μ M durante 12 horas o a 35 μ M durante 6 horas, como la lactacistina de *SIGMA-ALDRICH* (inhibidor irreversible), a 5 μ M durante 10 horas.

Para los ensayos de estabilidad proteica se usó la cicloheximida (*SIGMA-ALDRICH*) a una concentración de 50 μ g/mL. Este compuesto inhibe la síntesis proteica en organismos eucariotas, interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional.

Para los ensayos en los que se quiso inhibir el exporte nuclear, se utilizó la leptomicina B (*SIGMA-ALDRICH*) a una concentración de 0,2nM durante 24 horas. Este compuesto inhibe a *CRM1*, proteína esencial en el exporte de proteínas que contienen una señal de exporte nuclear (NES).

OLIGONUCLEÓTIDOS		
Denominación	Secuencia 5'→3'	Uso
Pex2hVRK1 forward	GAGGCCATACAGACCCGTTTC	Amplificación VRK1 humana RT- PCR
Pex2hVRK1 reverse	TCCACCTCGCAAGACTCACA	Amplificación VRK1 humana RT- PCR
COILINA forward	TTACCCCCAGCAAGGGCAAGACCTC	Amplificación COILINA humana RT-PCR
COILINA reverse	GGCCTACTGTCTTTAAGAAACCCGCAGCA	Amplificación COILINA humana RT-PCR
GAPDH forward	GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTG	Amplificación GAPDH humana RT-PCR
GAPDH reverse	ACCTAACTACATGGTTTACATGTT	Amplificación GAPDH humana RT-PCR
DOLRA siVRK1-01 (Thermo) forward	GAAAGAGAGUCCAGAAGUAUUUU	ARN de interferencia VRK1 humana
DOLRA siVRK1-01 (Thermo) reverse	AAUACUUCUGGACUCUCUUUCUU	ARN de interferencia VRK1 humana
siVRK1-02	CAAGGAACCUUGGUGUUGAAUU	ARN de interferencia VRK1 humana
siVRK1-03	GGAAUGGAAAGUAGGAUUA	ARN de interferencia VRK1 humana
si-VRK1-09	AGGUGUACUUGGUAGAUUA	ARN de interferencia VRK1 humana
pSuperior-shVRK1-H1	CCGGCCTGGTGTGAAGATACGGAACTCGAG TTCCGTATCTTCAACACCAGGTTTTT	Vector retroviral silenciamiento de VRK1

pSuperior-shVRK1-H3	CCGGGTAGATTATGGCCTTGCCTTATCTCGA GATAAGCAAGGCCATAATCTACTTTTT	Vector retroviral silenciamiento de VRK1
pLKO-shVRK1-H1	CCGGCCTGGTGTGAAGATACGGAACCTCGAG TTCCGTATCTTCAACACCAGGTTTTT	Vector lentiviral silenciamiento de VRK1
pLKO-shVRK1-H3	CCGGGTAGATTATGGCCTTGCCTTATCTCGA GATAAGCAAGGCCATAATCTACTTTTT	Vector lentiviral silenciamiento de VRK1
COILINA S184A forward	CGAAGAGGCCAAAAGAAAAGCACCAAAGAAA AAGGAG	Mutagénesis de Coilina Ser184Ala
COILINA S184A reverse	CTCCTTTTTCTTTGGTGCCTTTCTTTTGGCCTC TTCG	Mutagénesis de Coilina Ser184Ala
COILINA S184AE forward	CGAAGAGGCCAAAAGAAAACAACCAAAGAAA AAGGAG	Mutagénesis de Coilina Ser184Glu
COILINA S184E reverse	CTCCTTTTTCTTTGGTGTCTTTCTTTTGGCCTC TTCG	Mutagénesis de Coilina Ser184Glu
mVRK1-Myc-DKK K179E forward	GTGCACGGGGACATCGAGGCCTCCAACCTG CTCCT	Mutagénesis K179E en VRK1 murina
mVRK1-Myc-DKK K179E reverse	AGGAGCAGGTTGGAGGCCTCGATGTCCCCG TGCAC	Mutagénesis K179E en VRK1 murina
VRK1 K179E forward	AGTATGTGCATGGAGATATCGAGGCCTCAA TCTTCTTCTGAACT	Mutagénesis K179E en VRK1
VRK1 K179E reverse	AGTTCAGAAGAAGATTTGAGGCCTCGATATCT CCATGCACATACT	Mutagénesis K179E en VRK1

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados. Secuencias de cada oligonucleótido y su uso en este trabajo.

ANTICUERPOS				
Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Dilución	Procedencia
Coilina Pdelta	Coilina C-terminal	Monoclonal ratón	IF 1:200	Santa Cruz
Coilina H-300	Coilina (aa 277-576)	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:200	Santa Cruz
pCoilina Ser184	Serina 184 fosforilada	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:200	Antibody Production Services Ltd
SMN (610647)	SMN (aa 14-174)	Monoclonal ratón	WB 1:1000 IF 1:200	BD Transduction Laboratories
GlyRS (GARS) H-300	GARS (aa 440-732)	Policlonal conejo	WB 1:200	Santa Cruz
VRK1 1F6	VRK1 (aa 333-396)	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Producción propia
VRK1 1B5	VRK1	Monoclonal ratón	WB 1:1000 IF 1:200	Producción propia
VRK1 VE	VRK1	Policlonal conejo	WB 1:1000	Producción propia
VRK1 VC	VRK1 (aa 267-396)	Policlonal conejo	WB 1:1000	Producción propia
VRK1 HPA000660	VRK1 (aa 5-1425)	Policlonal conejo	IF 1:200	SIGMA-ALDRICH
β-Actina AC-15	β-Actina N-terminal	Monoclonal ratón	WB 1:5000	SIGMA-ALDRICH
Histona 3 #9715	Histona 3 C-terminal	Policlonal conejo	WB 1:1000	Cell Signaling
Myc tag	Epítipo Myc	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Millipore
Myc tag	Epítipo Myc	Policlonal conejo	WB 1:1000	Millipore
HA tag F-7	Epítipo HA	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
HA tag	Epítipo HA	Policlonal conejo	WB 1:1000	SIGMA-ALDRICH
Mdm2 SMP14	Mdm2 (aa 154-167)	Monoclonal ratón	WB 1:200	Santa Cruz
Mdm2 PA5-27237	Mdm2 (aa 104-157)	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:200	Pierce antibodies

His tag H-3	Proteína recombinante His	Monoclonal ratón	IF 1:50	Santa Cruz
Rb C-15	Rb C-terminal	Policlonal conejo	WB 1:1000	Santa Cruz
pRb #9308	Ser807/811	Policlonal conejo	WB 1:1000	Cell Signaling
Ciclina D1 M-20	Ciclina D1 C-terminal	Policlonal conejo	WB 1:500	Santa Cruz
GST tag	Epítipo GST	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
AU5 tag	Epítipo AU5	Policlonal conejo	WB 1:1000	Covance
AU5 tag	Epítipo AU5	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Covance
Flag tag	Epítipo Flag	Policlonal conejo	WB 1:1000	SIGMA-ALDRICH
Flag tag	Epítipo Flag	Monoclonal ratón	WB 1:1000	SIGMA-ALDRICH
p53 DO-1	p53 (aa 11-25)	Monoclonal ratón	WB 1:500	Santa Cruz
p53 Pab-1801	p53 (aa32-79)	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz
p53 CM1	p53	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:200	Novocastra
p53 pThr18 ab30659	p53 fosforilada Thr18	Policlonal conejo	WB 1:1000	Abcam
Ubiquitina ab19247	Ubiquitina libre o proteínas ubiquitinadas	Policlonal conejo	WB 1:1000	Abcam

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados con su correspondiente dilución para *Western blot* (WB) e inmunofluorescencia (IF).

LÍNEAS CELULARES				
Línea celular	Organismo	Procedencia	Características	Medio de cultivo
HEK-293T	Humano	Embrionarias de riñón		DMEM, 10%FBS
A549	Humano	Carcinoma de pulmón		DMEM, 10%FBS
HeLa	Humano	Adenocarcinoma de cérvix	Transformadas por VPH-18	DMEM, 10%FBS
MCF-7	Humano	Adenocarcinoma de pulmón		DMEM, 10%FBS
HCT116	Humano	Carcinoma colorectal		McCoy's, 10%FBS
WS1	Humano	Fibroblastos		DMEM, 10%FBS
SH-SY5Y	Humano	Neuroblastoma		DMEM 1:1 DMEM F12, 10%FBS
U2OS	Humano	Osteosarcoma		DMEM, 10%FBS

Tabla 3. Información de las líneas celulares utilizadas.

PLÁSMIDOS DE ADN RECOMBINANTE			
Construcción	Vector	Inserto	Uso
Coilina-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	Coilina	Expresión en eucariotas
AU5-Coilina	pCEFL-AU5	Coilina	Expresión en eucariotas
SMN-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	SMN	Expresión en eucariotas
Coilina(S184A)-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	Coilina mutantes Serina 184 Alanina	Expresión en eucariotas
Coilina(S184E)-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	Coilina mutantes Serina 184 Glutámico	Expresión en eucariotas
Ubiquitina-His	pcDNA3. 6xHis	Ubiquitina	Expresión en eucariotas
Ubiquitina(K48R)-His	pcDNA3. 6xHis	Ubiquitina mutante Lys48Arg	Expresión en eucariotas
Ubiquitina(K63R)-His	pcDNA3. 6xHis	Ubiquitina mutante Lys63Arg	Expresión en eucariotas
Ubiquitina(K48)-His	pCMV5-His	Ubiquitina todas las Lys mutadas excepto Lys48	Expresión en eucariotas
Ubiquitina(K63)-His	pCMV5-His	Ubiquitina todas las Lys mutadas excepto Lys63	Expresión en eucariotas
HA-Ubiquitina	pSSK-HA	Ubiquitina	Expresión en eucariotas
HA-RNF8	pcDNA3.1-HA	RNF8	Expresión en eucariotas
Mdm2	pCOC	Mdm2	Expresión en eucariotas
VRK1-Myc	pcDNA3.1	VRK1	Expresión en eucariotas
VRK1-NL-Myc	pcDNA3.1	VRK1-NL (1-332)	Expresión en eucariotas
VRK1-NC-Myc	pcDNA3.1	VRK1-NC (1-267)	Expresión en eucariotas
GST-VRK1	pCEFL-GST	VRK1	Expresión en eucariotas
GST-VRK1-C	pCEFL-GST	VRK1-C (267-396)	Expresión en eucariotas

pGEX-GST-VRK1	pGEX4T1-GST	VRK1	Proteína de fusión
pGEX-p53 (1-85)	pGEX-2T	p53 murino (aa 1-85)	Proteína de fusión
mVRK1-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	VRK1 murina	Expresión en eucariotas
mVRK1 (K179E)-Myc-DKK	pCMV6-Myc-DKK	VRK1 murina K179E	Expresión en eucariotas
HA-VRK1	pCEFL-HA	VRK1	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (K179E)	pCEFL-HA	VRK1 mutación K179E	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R89Q)	pCEFL-HA	VRK1 mutación R89Q	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R133C)	pCEFL-HA	VRK1 mutación R133C	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (V236M)	pCEFL-HA	VRK1 mutación V236M	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R358X)	pCEFL-HA	VRK1 mutación R358X	Expresión en eucariotas
HA-VRK1 (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1 resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
HA-VRK1 (K179E) (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1(K179E) resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
HA-VRK1 (R89Q) (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1(R89Q) resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
HA-VRK1 (R133C) (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1(R133C) resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
HA-VRK1 (V236M) (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1(V236M) resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
HA-VRK1 (R358X) (R391/R393/V394)	pCEFL-HA (R391/R393/V394)	VRK1(R358X) resistente a siVRK1-01	Rescate de fenotipo
pMD26-VSV-G	pMD26	VSV-G	Envuelta vírica
pCMV-dRp8.91-Gag-Pol	pCMV-dRp8.91	Gag-Pol	Empaquetamiento del virus
pQCXIP-VRK1	pQCXIP	VRK1 humana	Infección VRK1
pCL-Ampho	pCL-Ampho (<i>Retrovirus packaging vector</i>)		Empaquetamiento

Tabla 4. Información de los vectores recombinantes utilizados. Se indican los plásmidos utilizados con su inserto correspondiente.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS**A**

aa: aminoácidos
 ADN: ácido desoxirribonucleico
 ADNc: ADN codificante
 aDMA: *asymmetric dimethylation*
 AP1: *activator protein 1*
 Apaf-1: *apoptosis protease-activating factor-1*
 APP: *amyloid-precursor protein*
 ARN: ácido ribonucleico
 ATF-2: *activating transcription factor 2*
 ATP: *adenosina 5'trifosfato*
 ARNr: ARN ribosomal
 ARNm: ARN mensajero
 ARNsn: *small nuclear RNAs*
 ARNsno: *small nucleolar RNAs*
 ARNsca: ARNs del cuerpo de Cajal

B

BAF: *barrier to autointegration factor*
 Bax: *Bcl-2 associated x protein*
 Bcl-2: *B-cell leukemia/lymphoma 2*
 Bcl-xL: *B cell lymphoma-extra large*
 BSA: *bovine serum albumin*

C

CKI: *casein kinase I*
 CKII: *casein kinase II*
 CAMK-IV: *calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV*
 CREB: *cAMP response element binding*
 CBs: *Cajal bodies*
 COX-2: *ciclooxigenasa-2*

D

DAPI: 4',6', DiAmidino-2-Phenil Indol
 DMEM: *Dulbecco's modified – minimum essential medium*
 DMSO: dimetil sulfóxido
 DRAM: *damage-regulated autophagy modulator*

E

EDTA: *ethylenediamine-tetraacetic acid*
 EFG: factor de crecimiento epidérmico
 ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase*
 EST: *expressed sequence tag*

F

FBS: *fetal bovine serum*

G

GST: *Glutati6n-S-Transferasa*

H

h: hora
 H2AX: histona 2AX
 HA: hemaglutinina
 HLBS: *histone locus bodies*
 hnRNPs (R/Q): ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas R y Q
 hTR (TERC): *human telomerase RNA or telomerase RNA component*

I

IF: inmunofluorescencia
 IPTG: IsoPropil-β-D-tiogalactopiranósido

J

JIP1: *JNK-Interaction protein 1*
 JNK: *c-jun N-terminal kinase*

K

kb: kilobase
 kDa: kilodalton
 KSR1: *kinase supressor of Ras 1*

L

LB: medio "Luria Bertani"
 LEM: *lamin-interacting proteins*

M

m/v: relación masa/volumen
 M: molar
 mg: miligramo
 min: minuto

mL: mililitro
 mm: milímetro
 mM: milimolar
 MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
 MMA: *monomethylathion*
 MBP: *myelin basic protein*
 MDC1: *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*
 MEK1: *mitogen-activated protein kinase 1*

N

NFAT: *nuclear factor of activated T cells*
 NPAT: *nuclear protein of the ataxia telangiectasia mutated locus*
 NLS: *nuclear localization signal*
 NMJ: *neuromuscular junction*
 NoLS: *nucleolar localization signal*
 nm: nanómetro
 nM: nanomolar

P

PARP: *poly ADP ribose polymerase*
 PBS: *phosphate buffer salinum*
 PCH: *hipoplasia pontocerebelosa*
 PCR: *polymerase chain reaction*
 PKA: *protein kinase A*
 Plk3: *polo-like kinase 3*
 PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*
 PMLs: *promyelocytic leukemia nuclear bodies*
 PMSF: *phenyl methyl sulfonyl fluoride*
 PPM1G: *protein phosphatase 1G*
 pre-ARNm: *precursor del ARNm*
 PRMTs: *protein arginine methyltransferases*
 PVDF: *PolyVinylidene Fluoride*

R

Ran: *ras-related nuclear*
 RNF8: *ring finger 8*
 RNPs: *ribonucleoproteínas*
 rpm: *revoluciones por minuto*
 RPMI: *medio de cultivo, Roswell Park Memorial Institute*
 RT: *región transmembrana*

RT-PCR: *reverse transcriptase PCR*
 RNPsn: *small nuclear ribonucleoproteins*
 RNPсно: *small nucleolar ribonucleoproteins*

S

SDS: *sodium dodecyl sulfate*
 SDS-PAGE: *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
 sDMA: *symmetric dimethylation*
 SmB: *small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B*
 SMN: *survival motor neuron*
 SMA: *spinal muscular atrophy*
 SUMO: *small ubiquitin-related modifier*
 siARN: *small-interference RNA*

T

TAE: *Tris-Acetato-EDTA*
 TAK1: *TGF-β activated kinase*
 TBS-T: *Tris buffer salino con Tween-20*
 TNF: *tumor necrosis factor*

U

Ub: *ubiquitina*
 Ubc9: *ubiquitin-conjugating enzyme E2I*
 UNRIP: *UNR-interacting protein*
 UV: *radiación ultravioleta*

V

V: *voltio*
 VRK: *vaccinia related kinase*
 v/v: *relación volumen/volumen*

W

WB: *Western blot*

Z

ZPR1: *zinc finger protein 1*

μCi: *microcurio*
 μg: *microgramo*
 μL: *microlitro*
 μM: *micromolar*
 μm: *micrómetro*
 °C: *grado centígrado*

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

Bases Nitrogenadas	
A	Adenina
T	Timina
G	Guanina
C	Citosina
U	Uracilo

Tabla 5. Aminoácidos y bases nitrogenadas con sus abreviaturas correspondientes.

BIBLIOGRAFÍA

Acharya, U., Mallabiarrena, A., Acharya, J.K., and Malhotra, V. (1998). Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* 92, 183-192.

Adams, J. (2003). The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1, 3-9.

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

Alias, L., Bernal, S., Fuentes-Prior, P., Barcelo, M.J., Also, E., Martinez-Hernandez, R., Rodriguez-Alvarez, F.J., Martin, Y., Aller, E., Grau, E., *et al.* (2009). Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene. *Hum Genet* 125, 29-39.

Alioto, T.S. (2007). U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* 35, D110-115.

Almeida, F., Saffrich, R., Ansorge, W., and Carmo-Fonseca, M. (1998). Microinjection of anti-coilin antibodies affects the structure of coiled bodies. *The Journal of cell biology* 142, 899-912.

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

Anderton, R.S., Meloni, B.P., Mastaglia, F.L., and Boulos, S. (2013). Spinal muscular atrophy and the antiapoptotic role of survival of motor neuron (SMN) protein. *Mol Neurobiol* 47, 821-832.

Anderton, R.S., Meloni, B.P., Mastaglia, F.L., Greene, W.K., and Boulos, S. (2011). Survival of motor neuron protein over-expression prevents calpain-mediated cleavage and activation of procaspase-3 in differentiated human SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 181, 226-233.

Anderton, R.S., Price, L.L., Turner, B.J., Meloni, B.P., Mitropant, C., Mastaglia, F.L., Goh, C., Wilton, S.D., and Boulos, S. (2012). Co-regulation of survival of motor neuron and Bcl-xL expression: implications for neuroprotection in spinal muscular atrophy. *Neuroscience* 220, 228-236.

Andrade, L.E., Chan, E.K., Raska, I., Peebles, C.L., Roos, G., and Tan, E.M. (1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *The Journal of experimental medicine* 173, 1407-1419.

Andrade, L.E., Tan, E.M., and Chan, E.K. (1993). 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, 1947-1951.

Barcia-Sanjurjo, I., Vazquez-Cedeira, M., Barcia, R., and Lazo, P.A. (2013). Sensitivity of the kinase activity of human vaccinia-related kinase proteins to toxic metals. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 18, 473-482.

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

- Bartova, E., Foltankova, V., Legartova, S., Sehnalova, P., Sorokin, D.V., Suchankova, J., and Kozubek, S. (2014). Coilin is rapidly recruited to UVA-induced DNA lesions and gamma-radiation affects localized movement of Cajal bodies. *Nucleus* 5, 460-468.
- Battle, D.J., Kasim, M., Yong, J., Lotti, F., Lau, C.K., Mouaikel, J., Zhang, Z., Han, K., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2006). The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 313-320.
- Bauer, D.W., and Gall, J.G. (1997). Coiled bodies without coilin. *Molecular biology of the cell* 8, 73-82.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C., and Gygi, S.P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12130-12135.
- Bedford, M.T. (2007). Arginine methylation at a glance. *Journal of cell science* 120, 4243-4246.
- Bedford, M.T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* 18, 263-272.
- Bellini, M., and Gall, J.G. (1999). Coilin shuttles between the nucleus and cytoplasm in *Xenopus* oocytes. *Molecular biology of the cell* 10, 3425-3434.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977). 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, 3171-3175.
- Blanco, S., Klimcakova, L., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2006a). The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *Febs J* 273, 2487-2504.
- Blanco, S., Klimcakova, L., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2006b). The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *The FEBS journal* 273, 2487-2504.
- Blanco, S., Santos, C., and Lazo, P.A. (2007). Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Molecular and cellular biology* 27, 7273-7283.
- Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Santos, C.R., and Lazo, P.A. (2008). Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS one* 3, e1660.
- Bohmann, K., Ferreira, J.A., and Lamond, A.I. (1995). Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *The Journal of cell biology* 131, 817-831.
- Boon, K.L., Xiao, S., McWhorter, M.L., Donn, T., Wolf-Saxon, E., Bohnsack, M.T., Moens, C.B., and Beattie, C.E. (2009). Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Human molecular genetics* 18, 3615-3625.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., and Alessi, D.R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* 16, 443-452.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40, 216-227.

- Bowerman, M., Anderson, C.L., Beauvais, A., Boyl, P.P., Witke, W., and Kothary, R. (2009). SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol Cell Neurosci* 42, 66-74.
- Broome, H.J., Carrero, Z.I., Douglas, H.E., and Hebert, M.D. (2013). Phosphorylation regulates coilin activity and RNA association. *Biol Open* 2, 407-415.
- Broome, H.J., and Hebert, M.D. (2013). Coilin displays differential affinity for specific RNAs in vivo and is linked to telomerase RNA biogenesis. *Journal of molecular biology* 425, 713-724.
- Burghes, A.H., and Beattie, C.E. (2009). Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature reviews Neuroscience* 10, 597-609.
- Burnett, B.G., Munoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., and Fischbeck, K.H. (2009). Regulation of SMN protein stability. *Molecular and cellular biology* 29, 1107-1115.
- Carissimi, C., Baccon, J., Straccia, M., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., and Pellizzoni, L. (2005). Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS letters* 579, 2348-2354.
- Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J., and Lamond, A.I. (1993). Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *The Journal of cell biology* 120, 841-852.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T., and Lamond, A.I. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *The Journal of cell biology* 117, 1-14.
- Carrero, Z.I., Velma, V., Douglas, H.E., and Hebert, M.D. (2011). Coilin phosphomutants disrupt Cajal body formation, reduce cell proliferation and produce a distinct coilin degradation product. *PLoS One* 6, e25743.
- Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., and Carmo-Fonseca, M. (1999a). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* 147, 715-728.
- Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., and Carmo-Fonseca, M. (1999b). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *The Journal of cell biology* 147, 715-728.
- Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2009). TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *Journal of structural biology* 167, 235-241.
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A.G., and Lamond, A.I. (2006). UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *The Journal of cell biology* 175, 401-413.
- Cioce, M., and Lamond, A.I. (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 105-131.
- Coady, T.H., and Lorson, C.L. (2011). SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 546-564.
- Consortium, E., Consortium, E.M., Steffens, M., Leu, C., Ruppert, A.K., Zara, F., Striano, P., Robbiano, A., Capovilla, G., Tinuper, P., *et al.* (2012). Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. *Human molecular genetics* 21, 5359-5372.

- Coovert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W., and Burghes, A.H. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* 6, 1205-1214.
- Chan, E.K., Takano, S., Andrade, L.E., Hamel, J.C., and Matera, A.G. (1994). Structure, expression and chromosomal localization of human p80-coilin gene. *Nucleic acids research* 22, 4462-4469.
- Chang, H.C., Hung, W.C., Chuang, Y.J., and Jong, Y.J. (2004). Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int* 45, 1107-1112.
- Chen, C., Nott, T.J., Jin, J., and Pawson, T. (2011). Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 629-642.
- Chen, Y., Deng, Z., Jiang, S., Hu, Q., Liu, H., Songyang, Z., Ma, W., Chen, S., and Zhao, Y. (2015). Human cells lacking coilin and Cajal bodies are proficient in telomerase assembly, trafficking and telomere maintenance. *Nucleic acids research* 43, 385-395.
- Choi, Y.H., Park, C.H., Kim, W., Ling, H., Kang, A., Chang, M.W., Im, S.K., Jeong, H.W., Kong, Y.Y., and Kim, K.T. (2010). Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells. *PloS one* 5, e15254.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10762-10767.
- Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 659-671.
- Dundr, M., Hebert, M.D., Karpova, T.S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K.B., Meier, U.T., Neugebauer, K.M., Matera, A.G., and Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *The Journal of cell biology* 164, 831-842.
- Eggens, V.R., Barth, P.G., Niermeijer, J.M., Berg, J.N., Darin, N., Dixit, A., Fluss, J., Foulds, N., Fowler, D., Hortobagyi, T., *et al.* (2014). EXOSC3 mutations in pontocerebellar hypoplasia type 1: novel mutations and genotype-phenotype correlations. *Orphanet journal of rare diseases* 9, 23.
- Fernandez, I.F., Blanco, S., Lozano, J., and Lazo, P.A. (2010). VRK2 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling and inversely correlates with ErbB2 in human breast cancer. *Molecular and cellular biology* 30, 4687-4697.
- Fernandez, R., Pena, E., Navascues, J., Casafont, I., Lafarga, M., and Berciano, M.T. (2002). cAMP-dependent reorganization of the Cajal bodies and splicing machinery in cultured Schwann cells. *Glia* 40, 378-388.
- Finetti, P., Cervera, N., Charafe-Jauffret, E., Chabannon, C., Charpin, C., Chaffanet, M., Jacquemier, J., Viens, P., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2008). Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer research* 68, 767-776.
- Fischer, U., Englbrecht, C., and Chari, A. (2011). Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 2, 718-731.

- Fournier, M.V., Martin, K.J., Kenny, P.A., Xhaja, K., Bosch, I., Yaswen, P., and Bissell, M.J. (2006). Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer research* 66, 7095-7102.
- Frey, M.R., and Matera, A.G. (2001). RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2 snRNA genes. *The Journal of cell biology* 154, 499-509.
- Gabanella, F., Butchbach, M.E., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A.H., and Pellizzoni, L. (2007). Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS one* 2, e921.
- Gabanella, F., Carissimi, C., Usiello, A., and Pellizzoni, L. (2005). The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Human molecular genetics* 14, 3629-3642.
- Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annual review of cell and developmental biology* 16, 273-300.
- Gall, J.G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS letters* 498, 164-167.
- Gangwani, L., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2005). ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to Cajal bodies. *Molecular and cellular biology* 25, 2744-2756.
- Garcera, A., Mincheva, S., Gou-Fabregas, M., Caraballo-Miralles, V., Llado, J., Comella, J.X., and Soler, R.M. (2011). A new model to study spinal muscular atrophy: neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-X(L) Overexpression in motoneurons. *Neurobiol Dis* 42, 415-426.
- Gary, J.D., and Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 61, 65-131.
- Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015). RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep* 10, 226-238.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 947-956.
- Gilder, A.S., Do, P.M., Carrero, Z.I., Cosman, A.M., Broome, H.J., Velma, V., Martinez, L.A., and Hebert, M.D. (2011). Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Molecular biology of the cell* 22, 1070-1079.
- Gonzaga-Jauregui, C., Lotze, T., Jamal, L., Penney, S., Campbell, I.M., Pehlivan, D., Hunter, J.V., Woodbury, S.L., Raymond, G., Adesina, A.M., *et al.* (2013). Mutations in VRK1 associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly. *JAMA neurology* 70, 1491-1498.
- Gorjanacz, M., Klerkx, E.P., Galy, V., Santarella, R., Lopez-Iglesias, C., Askjaer, P., and Mattaj, J.W. (2007). *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *The EMBO journal* 26, 132-143.
- Grimmler, M., Bauer, L., Nousiainen, M., Korner, R., Meister, G., and Fischer, U. (2005). Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep* 6, 70-76.

- Guermah, M., Palhan, V.B., Tackett, A.J., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2006). Synergistic functions of SII and p300 in productive activator-dependent transcription of chromatin templates. *Cell* 125, 275-286.
- Hall, S.L., and Padgett, R.A. (1994). Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites. *Journal of molecular biology* 239, 357-365.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 576-596.
- Hao le, T., Wolman, M., Granato, M., and Beattie, C.E. (2012). Survival motor neuron affects plastin 3 protein levels leading to motor defects. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 5074-5084.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K.K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K.L., and Hiraoka, Y. (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *Journal of cell science* 114, 4575-4585.
- Hearst, S.M., Gilder, A.S., Negi, S.S., Davis, M.D., George, E.M., Whitton, A.A., Toyota, C.G., Husedzinovic, A., Gruss, O.J., and Hebert, M.D. (2009a). Cajal-body formation correlates with differential coilin phosphorylation in primary and transformed cell lines. *J Cell Sci* 122, 1872-1881.
- Hearst, S.M., Gilder, A.S., Negi, S.S., Davis, M.D., George, E.M., Whitton, A.A., Toyota, C.G., Husedzinovic, A., Gruss, O.J., and Hebert, M.D. (2009b). Cajal-body formation correlates with differential coilin phosphorylation in primary and transformed cell lines. *Journal of cell science* 122, 1872-1881.
- Hebert, M.D. (2010). Phosphorylation and the Cajal body: modification in search of function. *Archives of biochemistry and biophysics* 496, 69-76.
- Hebert, M.D., and Matera, A.G. (2000a). Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Mol Biol Cell* 11, 4159-4171.
- Hebert, M.D., and Matera, A.G. (2000b). Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Molecular biology of the cell* 11, 4159-4171.
- Hebert, M.D., Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., and Matera, A.G. (2002a). Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell* 3, 329-337.
- Hebert, M.D., Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., and Matera, A.G. (2002b). Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Developmental cell* 3, 329-337.
- Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B., and Matera, A.G. (2001a). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* 15, 2720-2729.
- Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B., and Matera, A.G. (2001b). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & development* 15, 2720-2729.
- Helbig, I., and Lowenstein, D.H. (2013). Genetics of the epilepsies: where are we and where are we going? *Current opinion in neurology* 26, 179-185.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M., and Andrews, B. (1997). Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 581-586.

Hoekstra, M.F., Liskay, R.M., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G., and Heffron, F. (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science (New York, NY)* *253*, 1031-1034.

Hong, S., Ka, S., Kim, S., Park, Y., and Kang, S. (2003). p80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. *Biochimica et biophysica acta* *1638*, 35-42.

Hua, Y., and Zhou, J. (2004). Modulation of SMN nuclear foci and cytoplasmic localization by its C-terminus. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *61*, 2658-2663.

Husedzinovic, A., Oppermann, F., Draeger-Meurer, S., Chari, A., Fischer, U., Daub, H., and Gruss, O.J. (2014). Phosphoregulation of the human SMN complex. *Eur J Cell Biol* *93*, 106-117.

International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Electronic address, e.-a.u.e.a. (2014). Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology* *13*, 893-903.

Irish Schizophrenia Genomics, C., and the Wellcome Trust Case Control, C. (2012). Genome-wide association study implicates HLA-C*01:02 as a risk factor at the major histocompatibility complex locus in schizophrenia. *Biological psychiatry* *72*, 620-628.

Jablonka, S., Bandilla, M., Wiese, S., Buhler, D., Wirth, B., Sendtner, M., and Fischer, U. (2001). Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* *10*, 497-505.

Kakizuka, A. (2008). Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochemical Society transactions* *36*, 105-108.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., *et al.* (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* *421*, 231-237.

Kang, T.H., and Kim, K.T. (2006). Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nature cell biology* *8*, 863-869.

Kang, T.H., and Kim, K.T. (2008). VRK3-mediated inactivation of ERK signaling in adult and embryonic rodent tissues. *Biochimica et biophysica acta* *1783*, 49-58.

Kang, T.H., Park, D.Y., Choi, Y.H., Kim, K.J., Yoon, H.S., and Kim, K.T. (2007). Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* *27*, 8533-8546.

Kang, T.H., Park, D.Y., Kim, W., and Kim, K.T. (2008a). VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *Journal of cell science* *121*, 3035-3041.

Kang, T.H., Park, D.Y., Kim, W., and Kim, K.T. (2008b). VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *J Cell Sci* *121*, 3035-3041.

Kerner, B., Rao, A.R., Christensen, B., Dandekar, S., Yourshaw, M., and Nelson, S.F. (2013). Rare Genomic Variants Link Bipolar Disorder with Anxiety Disorders to CREB-Regulated Intracellular Signaling Pathways. *Frontiers in psychiatry* *4*, 154.

Kerr, D.A., Nery, J.P., Traystman, R.J., Chau, B.N., and Hardwick, J.M. (2000). Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 13312-13317.

- Kim, J., Choi, Y.H., Chang, S., Kim, K.T., and Je, J.H. (2012a). Defective folliculogenesis in female mice lacking Vaccinia-related kinase 1. *Scientific reports* 2, 468.
- Kim, S., Park, D.Y., Lee, D., Kim, W., Jeong, Y.H., Lee, J., Chung, S.K., Ha, H., Choi, B.H., and Kim, K.T. (2014a). Vaccinia-related kinase 2 mediates accumulation of polyglutamine aggregates via negative regulation of the chaperonin TRiC. *Molecular and cellular biology* 34, 643-652.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., *et al.* (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell* 44, 325-340.
- Kim, W., Chakraborty, G., Kim, S., Shin, J., Park, C.H., Jeong, M.W., Bharatham, N., Yoon, H.S., and Kim, K.T. (2012b). Macro histone H2A1.2 (macroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase. *The Journal of biological chemistry* 287, 5278-5289.
- Kim, Y.S., Kim, S.H., Shin, J., Harikishore, A., Lim, J.K., Jung, Y., Lyu, H.N., Baek, N.I., Choi, K.Y., Yoon, H.S., *et al.* (2014b). Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1. *PLoS one* 9, e109655.
- Kitami, M.I., Kitami, T., Nagahama, M., Tagaya, M., Hori, S., Kakizuka, A., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2006). Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation. *FEBS letters* 580, 474-478.
- Klerkx, E.P., Lazo, P.A., and Askjaer, P. (2009). Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family. *Histology and histopathology* 24, 749-759.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 37, 937-953.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.
- Lallemand-Breitenbach, V., and de Thé, H. (2010). PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000661.
- Lam, Y.W., Lyon, C.E., and Lamond, A.I. (2002). Large-scale isolation of Cajal bodies from HeLa cells. *Molecular biology of the cell* 13, 2461-2473.
- Lancaster, O.M., Cullen, C.F., and Ohkura, H. (2007). NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. *The Journal of cell biology* 179, 817-824.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807-1819.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., *et al.* (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155-165.
- Li, M., Wang, Y., Zheng, X.B., Ikeda, M., Iwata, N., Luo, X.J., Chong, S.A., Lee, J., Rietschel, M., Zhang, F., *et al.* (2012). Meta-analysis and brain imaging data support the involvement of VRK2 (rs2312147) in schizophrenia susceptibility. *Schizophrenia research* 142, 200-205.
- Li, Y., Fong, K.W., Tang, M., Han, X., Gong, Z., Ma, W., Hebert, M., Songyang, Z., and Chen, J. (2014). Fam118B, a newly identified component of Cajal bodies, is required

- for Cajal body formation, snRNP biogenesis and cell viability. *J Cell Sci* 127, 2029-2039.
- Liu, J., Hebert, M.D., Ye, Y., Templeton, D.J., Kung, H., and Matera, A.G. (2000). Cell cycle-dependent localization of the CDK2-cyclin E complex in Cajal (coiled) bodies. *Journal of cell science* 113 (Pt 9), 1543-1552.
- Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *The EMBO journal* 15, 3555-3565.
- Lopez-Borges, S., and Lazo, P.A. (2000). The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene* 19, 3656-3664.
- Lopez-Sanchez, I., Sanz-Garcia, M., and Lazo, P.A. (2009a). PIK3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Mol Cell Biol* 29, 1189-1201.
- Lopez-Sanchez, I., Sanz-Garcia, M., and Lazo, P.A. (2009b). PIK3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation. *Molecular and cellular biology* 29, 1189-1201.
- Lopez-Sanchez, I., Valbuena, A., Vazquez-Cedeira, M., Khadake, J., Sanz-Garcia, M., Carrillo-Jimenez, A., and Lazo, P.A. (2014). VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage. *FEBS letters* 588, 692-700.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., and Wirth, B. (1999). 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, 6307-6311.
- Lu, B., and Bishop, C.E. (2003). Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biology of reproduction* 69, 161-168.
- Lyon, C.E., Bohmann, K., Sleeman, J., and Lamond, A.I. (1997). Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Experimental cell research* 230, 84-93.
- Machyna, M., Heyn, P., and Neugebauer, K.M. (2013). Cajal bodies: where form meets function. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 4, 17-34.
- Mahmoudi, S., Henriksson, S., Weibrecht, I., Smith, S., Soderberg, O., Stromblad, S., Wiman, K.G., and Farnebo, M. (2010). WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies. *PLoS Biol* 8, e1000521.
- Majumder, S., Varadharaj, S., Ghoshal, K., Monani, U., Burghes, A.H., and Jacob, S.T. (2004). Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279, 14803-14811.
- Malatesta, M., Scassellati, C., Meister, G., Plottner, O., Buhler, D., Sowa, G., Martin, T.E., Keidel, E., Fischer, U., and Fakan, S. (2004). Ultrastructural characterisation of a nuclear domain highly enriched in survival of motor neuron (SMN) protein. *Experimental cell research* 292, 312-321.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences* 27, 514-520.

- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)* 298, 1912-1934.
- Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Gruenbaum, Y. (2007). Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends in cell biology* 17, 202-208.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
- Messick, T.E., and Greenberg, R.A. (2009). The ubiquitin landscape at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 187, 319-326.
- Molitor, T.P., and Traktman, P. (2014). Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes. *Molecular biology of the cell* 25, 891-903.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., and McPherson, J.D. (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human molecular genetics* 8, 1177-1183.
- Monani, U.R., Sendtner, M., Coover, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T.W., *et al.* (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* 9, 333-339.
- Monsalve, D.M., Merced, T., Fernandez, I.F., Blanco, S., Vazquez-Cedeira, M., and Lazo, P.A. (2013). Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. *Cell death & disease* 4, e513.
- Motley, W.W., Talbot, K., and Fischbeck, K.H. (2010). GARS axonopathy: not every neuron's cup of tRNA. *Trends Neurosci* 33, 59-66.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., *et al.* (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478, 57-63.
- Narayanan, U., Ospina, J.K., Frey, M.R., Hebert, M.D., and Matera, A.G. (2002). SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Human molecular genetics* 11, 1785-1795.
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2008). SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163, 137-146.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M.H., and Shimane, M. (1997). Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics* 45, 327-331.
- Nichols, R.J., and Traktman, P. (2004a). Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family. *The Journal of biological chemistry* 279, 7934-7946.
- Nichols, R.J., and Traktman, P. (2004b). Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family. *J Biol Chem* 279, 7934-7946.

- Nichols, R.J., Wiebe, M.S., and Traktman, P. (2006). The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Molecular biology of the cell* 17, 2451-2464.
- Nishijo, K., Chen, Q.R., Zhang, L., McCleish, A.T., Rodriguez, A., Cho, M.J., Prajapati, S.I., Gelfond, J.A., Chisholm, G.B., Michalek, J.E., *et al.* (2009). Credentialing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer research* 69, 2902-2911.
- Nizami, Z., Deryusheva, S., and Gall, J.G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000653.
- Nolle, A., Zeug, A., van Bergeijk, J., Tonges, L., Gerhard, R., Brinkmann, H., Al Rayes, S., Hensel, N., Schill, Y., Apkhazava, D., *et al.* (2011). The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Human molecular genetics* 20, 4865-4878.
- Nousiainen, M., Sillje, H.H., Sauer, G., Nigg, E.A., and Korner, R. (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5391-5396.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.
- Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E., and Wirth, B. (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science (New York, NY)* 320, 524-527.
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2014). Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 848-859.
- Park, C.H., Choi, B.H., Jeong, M.W., Kim, S., Kim, W., Song, Y.S., and Kim, K.T. (2011). Protein kinase Cdelta regulates vaccinia-related kinase 1 in DNA damage-induced apoptosis. *Molecular biology of the cell* 22, 1398-1408.
- Parlato, R., and Kreiner, G. (2013). Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J Mol Med (Berl)* 91, 541-547.
- Parsons, D.W., McAndrew, P.E., Monani, U.R., Mendell, J.R., Burghes, A.H., and Prior, T.W. (1996). An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Human molecular genetics* 5, 1727-1732.
- Paushkin, S., Gubitza, A.K., Massenet, S., and Dreyfuss, G. (2002). The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Current opinion in cell biology* 14, 305-312.
- Peeters, K., Chamova, T., and Jordanova, A. (2014). Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain : a journal of neurology* 137, 2879-2896.
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1695, 55-72.
- Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A.I., and Swedlow, J.R. (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 4, 502-508.
- Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J.R., and Lamond, A.I. (2000). In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *The Journal of cell biology* 151, 1561-1574.

- Ponzio, T.A., Yue, C., and Gainer, H. (2007). An intron-based real-time PCR method for measuring vasopressin gene transcription. *J Neurosci Methods* 164, 149-154.
- Praefcke, G.J., Hofmann, K., and Dohmen, R.J. (2012). SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 37, 23-31.
- Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of cell science* 116, 3677-3685.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., and Iakoucheva, L.M. (2010). Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78, 365-380.
- Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., King, M.C., and Levy-Lahad, E. (2009a). Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am J Hum Genet* 85, 281-289.
- Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., King, M.C., and Levy-Lahad, E. (2009b). Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *American journal of human genetics* 85, 281-289.
- Renvoise, B., Colasse, S., Burlet, P., Viollet, L., Meier, U.T., and Lefebvre, S. (2009). The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* 18, 1181-1189.
- Renvoise, B., Khoobarly, K., Gendron, M.C., Cibert, C., Viollet, L., and Lefebvre, S. (2006). Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. *Journal of cell science* 119, 680-692.
- Riggi, N., Knoechel, B., Gillespie, S.M., Rheinbay, E., Boulay, G., Suva, M.L., Rossetti, N.E., Boonseng, W.E., Oksuz, O., Cook, E.B., *et al.* (2014). EWS-FLI1 Utilizes Divergent Chromatin Remodeling Mechanisms to Directly Activate or Repress Enhancer Elements in Ewing Sarcoma. *Cancer cell* 26, 668-681.
- Rodriguez-Hernandez, I., Vazquez-Cedeira, M., Santos-Briz, A., Garcia, J.L., Fernandez, I.F., Gomez-Moreta, J.A., Martin-Vallejo, J., Gonzalez-Sarmiento, R., and Lazo, P.A. (2013). VRK2 identifies a subgroup of primary high-grade astrocytomas with a better prognosis. *BMC clinical pathology* 13, 23.
- Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R., and Sendtner, M. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of cell biology* 163, 801-812.
- Ruan, Q., Wang, Q., Xie, S., Fang, Y., Darzynkiewicz, Z., Guan, K., Jhanwar-Uniyal, M., and Dai, W. (2004). Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle. *Experimental cell research* 294, 51-59.
- Salzano, M., Sanz-Garcia, M., Monsalve, D.M., Moura, D.S., and Lazo, P.A. (2015). VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics*, 1-11.
- Salzano, M., Vazquez-Cedeira, M., Sanz-Garcia, M., Valbuena, A., Blanco, S., Fernandez, I.F., and Lazo, P.A. (2014). Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) confers resistance to DNA-damaging agents in human breast cancer by affecting DNA damage response. *Oncotarget* 5, 1770-1778.
- Santos, C.R., Rodriguez-Pinilla, M., Vega, F.M., Rodriguez-Peralto, J.L., Blanco, S., Sevilla, A., Valbuena, A., Hernandez, T., van Wijnen, A.J., Li, F., *et al.* (2006). VRK1

signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer research* : MCR 4, 177-185.

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

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

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

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

Sareen, D., Ebert, A.D., Heins, B.M., McGivern, J.V., Ornelas, L., and Svendsen, C.N. (2012). Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS one* 7, e39113.

Sato, K., Eguchi, Y., Kodama, T.S., and Tsujimoto, Y. (2000). Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell death and differentiation* 7, 374-383.

Scheeff, E.D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., and Manning, G. (2009). Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure (London, England : 1993)* 17, 128-138.

Schober, C.S., Aydiner, F., Booth, C.J., Seli, E., and Reinke, V. (2011). The kinase VRK1 is required for normal meiotic progression in mammalian oogenesis. *Mechanisms of development* 128, 178-190.

Sevilla, A., Santos, C.R., Barcia, R., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2004a). c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene* 23, 8950-8958.

Sevilla, A., Santos, C.R., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2004b). Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK. *The Journal of biological chemistry* 279, 27458-27465.

Shanbhag, R., Kurabi, A., Kwan, J.J., and Donaldson, L.W. (2010). Solution structure of the carboxy-terminal Tudor domain from human Coilin. *FEBS letters* 584, 4351-4356.

Sharp, P.A., and Burge, C.B. (1997). Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* 91, 875-879.

Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., Matera, A.G., and Hebert, M.D. (2003). Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of cell science* 116, 303-312.

Sleeman, J.E., Ajuh, P., and Lamond, A.I. (2001). snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *Journal of cell science* 114, 4407-4419.

- Sleeman, J.E., Trinkle-Mulcahy, L., Prescott, A.R., Ogg, S.C., and Lamond, A.I. (2003). Cajal body proteins SMN and Coilin show differential dynamic behaviour in vivo. *J Cell Sci* *116*, 2039-2050.
- Soderholm, J.F., Bird, S.L., Kalab, P., Sampathkumar, Y., Hasegawa, K., Uehara-Bingen, M., Weis, K., and Heald, R. (2011). Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-beta. *ACS Chem Biol* *6*, 700-708.
- Sohn, H., Kim, B., Kim, K.H., Kim, M.K., Choi, T.K., and Lee, S.H. (2014). Effects of VRK2 (rs2312147) on white matter connectivity in patients with schizophrenia. *PLoS one* *9*, e103519.
- Sprangers, R., Groves, M.R., Sinning, I., and Sattler, M. (2003). High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J Mol Biol* *327*, 507-520.
- Stanek, D., and Neugebauer, K.M. (2006). The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* *115*, 343-354.
- Steinberg, S., de Jong, S., Irish Schizophrenia Genomics, C., Andreassen, O.A., Werge, T., Borglum, A.D., Mors, O., Mortensen, P.B., Gustafsson, O., Costas, J., *et al.* (2011). Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia. *Human molecular genetics* *20*, 4076-4081.
- Stern, J.L., Zyner, K.G., Pickett, H.A., Cohen, S.B., and Bryan, T.M. (2012). Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Molecular and cellular biology* *32*, 2384-2395.
- Sun, J., Xu, H., Subramony, S.H., and Hebert, M.D. (2005). Interactions between coilin and PIASy partially link Cajal bodies to PML bodies. *J Cell Sci* *118*, 4995-5003.
- Sveda, M., Castoralova, M., Lipov, J., Ruml, T., and Knejzlik, Z. (2013). Human UBL5 protein interacts with coilin and meets the Cajal bodies. *Biochem Biophys Res Commun* *436*, 240-245.
- Tapia, O., Bengoechea, R., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2010). Nucleolar targeting of coilin is regulated by its hypomethylation state. *Chromosoma* *119*, 527-540.
- Tapia, O., Bengoechea, R., Palanca, A., Arteaga, R., Val-Bernal, J.F., Tizzano, E.F., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2012). Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem Cell Biol*.
- Toyota, C.G., Davis, M.D., Cosman, A.M., and Hebert, M.D. (2010). Coilin phosphorylation mediates interaction with SMN and SmB'. *Chromosoma* *119*, 205-215.
- Traktman, P., and Boyle, K. (2004). Methods for analysis of poxvirus DNA replication. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *269*, 169-186.
- Trulzsch, B., Garnett, C., Davies, K., and Wood, M. (2007). Knockdown of SMN by RNA interference induces apoptosis in differentiated P19 neural stem cells. *Brain research* *1183*, 1-9.
- Tucker, K.E., Berciano, M.T., Jacobs, E.Y., LePage, D.F., Shpargel, K.B., Rossire, J.J., Chan, E.K., Lafarga, M., Conlon, R.A., and Matera, A.G. (2001). Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *The Journal of cell biology* *154*, 293-307.
- Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews Molecular cell biology* *8*, 530-541.

- Valbuena, A., Castro-Obregon, S., and Lazo, P.A. (2011a). Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway. *PLoS One* 6, e17320.
- Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I., and Lazo, P.A. (2008). Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PLoS One* 3, e1642.
- Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I., Vega, F.M., Sevilla, A., Sanz-Garcia, M., Blanco, S., and Lazo, P.A. (2007a). Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Archives of biochemistry and biophysics* 465, 219-226.
- Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I., Vega, F.M., Sevilla, A., Sanz-Garcia, M., Blanco, S., and Lazo, P.A. (2007b). Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch Biochem Biophys* 465, 219-226.
- Valbuena, A., Sanz-Garcia, M., Lopez-Sanchez, I., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2011b). Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cellular signalling* 23, 1267-1272.
- Valbuena, A., Suarez-Gauthier, A., Lopez-Rios, F., Lopez-Encuentra, A., Blanco, S., Fernandez, P.L., Sanchez-Cespedes, M., and Lazo, P.A. (2007c). Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer* 58, 303-309.
- Valbuena, A., Vega, F.M., Blanco, S., and Lazo, P.A. (2006). p53 downregulates its activating vaccinia-related kinase 1, forming a new autoregulatory loop. *Molecular and cellular biology* 26, 4782-4793.
- Vazquez-Cedeira, M., Barcia-Sanjurjo, I., Sanz-Garcia, M., Barcia, R., and Lazo, P.A. (2011). Differential Inhibitor Sensitivity between Human Kinases VRK1 and VRK2. *PLoS One* 6, e23235.
- Vazquez-Cedeira, M., and Lazo, P.A. (2012). Human VRK2 (vaccinia-related kinase 2) modulates tumor cell invasion by hyperactivation of NFAT1 and expression of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* 287, 42739-42750.
- Vega, F.M., Gonzalo, P., Gaspar, M.L., and Lazo, P.A. (2003). Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS letters* 544, 176-180.
- Vega, F.M., Sevilla, A., and Lazo, P.A. (2004). p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Molecular and cellular biology* 24, 10366-10380.
- Velma, V., Carrero, Z.I., Allen, C.B., and Hebert, M.D. (2012). Coilin levels modulate cell cycle progression and gammaH2AX levels in etoposide treated U2OS cells. *FEBS letters* 586, 3404-3409.
- Velma, V., Carrero, Z.I., Cosman, A.M., and Hebert, M.D. (2010). Coilin interacts with Ku proteins and inhibits in vitro non-homologous DNA end joining. *FEBS letters* 584, 4735-4739.
- Vinograd-Byk, H., Sapir, T., Cantarero, L., Lazo, P.A., Zeligson, S., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Renbaum, P., Reiner, O., and Levy-Lahad, E. (2015). The Spinal Muscular Atrophy with Pontocerebellar Hypoplasia Gene VRK1 Regulates Neuronal Migration through an Amyloid-beta Precursor Protein-Dependent Mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 936-942.
- Walker, M.P., Tian, L., and Matera, A.G. (2009). Reduced viability, fertility and fecundity in mice lacking the cajal body marker protein, coilin. *PLoS One* 4, e6171.

- Wang, J., and Dreyfuss, G. (2001). Characterization of functional domains of the SMN protein in vivo. *The Journal of biological chemistry* 276, 45387-45393.
- Waters, K., Yang, A.Z., and Reinke, V. (2010). Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C.elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53. *Developmental biology* 344, 1011-1025.
- Wee, C.D., Kong, L., and Sumner, C.J. (2010). The genetics of spinal muscular atrophies. *Current opinion in neurology* 23, 450-458.
- Whittom, A.A., Xu, H., and Hebert, M.D. (2008a). Coilin levels and modifications influence artificial reporter splicing. *Cell Mol Life Sci* 65, 1256-1271.
- Whittom, A.A., Xu, H., and Hebert, M.D. (2008b). Coilin levels and modifications influence artificial reporter splicing. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 1256-1271.
- Wiebe, M.S., Nichols, R.J., Molitor, T.P., Lindgren, J.K., and Traktman, P. (2010). Mice deficient in the serine/threonine protein kinase VRK1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia. *Biology of reproduction* 82, 182-193.
- Will, C.L., and Luhrmann, R. (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biol Chem* 386, 713-724.
- Will, C.L., Schneider, C., MacMillan, A.M., Katopodis, N.F., Neubauer, G., Wilm, M., Luhrmann, R., and Query, C.C. (2001). A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *The EMBO journal* 20, 4536-4546.
- Wu, C.Y., Gomez-Curet, I., Funanage, V.L., Scavina, M., and Wang, W. (2009). Increased susceptibility of spinal muscular atrophy fibroblasts to camptothecin is p53-independent. *BMC Cell Biol* 10, 40.
- Wu, Q., and Krainer, A.R. (1999). AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Molecular and cellular biology* 19, 3225-3236.
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7, 1598-1608.
- Yang, Y., and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature reviews Cancer* 13, 37-50.
- Young, P.J., Day, P.M., Zhou, J., Androphy, E.J., Morris, G.E., and Lorson, C.L. (2002). A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *The Journal of biological chemistry* 277, 2852-2859.
- Yuan, P., Wang, Z., Lv, W., Pan, H., Yang, Y., Yuan, X., and Hu, J. (2014). Telomerase Cajal body protein 1 depletion inhibits telomerase trafficking to telomeres and induces G cell cycle arrest in A549 cells. *Oncology letters* 8, 1009-1016.
- Zelko, I., Kobayashi, R., Honkakoski, P., and Negishi, M. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 352, 31-36.
- Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular biology of the cell* 15, 81-90.

-Parte del trabajo mostrado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en los siguientes artículos científicos:

Cantarero L, Sanz-García M, Vinograd-Byk H, Renbaum P, Levy-Lahad E, Lazo PA, *VRK1 regulates Cajal body dynamics and protects coilin from proteasomal degradation in cell cycle*. **Scientific Reports**; 2015-; 5(); 10543; 26068304

Vinograd-Byk H, Sapir T, **Cantarero L**, Lazo PA, Zeligson S, Lev D, Lerman-Sagie T, Renbaum P, Reiner O, Levy-Lahad E, *The Spinal Muscular Atrophy with Pontocerebellar Hypoplasia Gene VRK1 Regulates Neuronal Migration through an Amyloid- β Precursor Protein-Dependent Mechanism*. **The Journal of Neuroscience**; 2015-Jan; 35(3); 936-42; 25609612

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que haya llegado el momento de sentarme a escribir los agradecimientos de esta tesis. En primer lugar, quiero dar las gracias al director de este trabajo, el Dr. Pedro A. Lazo: Pedro, muchas gracias por aceptarme en tu laboratorio y darme la oportunidad de realizar un trabajo como éste, he aprendido tantísimas cosas...Darte las gracias por enseñarme que el trabajo constante y con esfuerzo siempre da buenos frutos, gracias por hacer que hoy en día quiera seguir dedicándome a esto. Agradecer también a mi tutora Rocío Rodríguez Macías, por estar siempre pendiente y hacer que los trámites sean algo sencillo.

Agradecer a toda la gente del CIC, que día a día hacen que el trabajo sea fácil en situaciones de estrés, gracias por ser como una familia en estos cinco años... ¡Angelino! Echaré de menos tantísimas horas de confocal con Sálvame... ¡Te debo muchísimo! Acuérdate de tu rabinuca, eh? A Rosa, del servicio de proteómica, gracias por soportar tantos HPLC conmigo, tantas repeticiones, y siempre con tu mejor sonrisa, eres una gran profesional. Gracias a María, Carlos, Celso, Lucía, Paco, Sonia, Euge... ¡Siempre habéis estado con vuestra mejor sonrisa!

A todos lo amigos que me llevo, Alejandra, mi pechocha, gracias por tantos momentos compartidos, por las risas y las lágrimas, por ser como una hermana mayor para mí, por cantarme las mañanitas en cada cumpleaños, ¡te quiero! A todos los del laboratorio 6, que tantos anticuerpos me han prestado, Vero, Sarita, Edward, Mariana, Janny, gracias por enseñarme que el trabajo en equipo es fundamental. A Laura del lab 9, por tus plásmidos, ¡al final el pGEX no se resistió! Nachico, debería escribirte tantas páginas para agradecerte...Mil gracias por la paciencia, por enseñarme que clonar puede ser divertido, por tantas minis, y por las fiestas, la tesis sin ti no hubiera sido igual...Te echaré de menos macarra! A mi Laurencia, chigui! ¿Qué puedo decirte? GRACIAS, me llevo una grandísima amiga, eres única... A los chicos del laboratorio 17, Arturo y JAM, gracias por esas cenitas y conciertos inolvidables, lo hemos pasado genial, ¡extrañaré los cafés de media tarde!

Por supuesto, a mi pequeña gran familia del laboratorio 4: a Martiña, por enseñarme tantas cosas, por esos cachitos de empanada y por el membrillo, lo echaré de menos...Mouris!!! Ya lo sabes, tienes una amiga para toda la vida, gracias por ser tan buen compañero, por ayudarme tanto y por soportar mis malos días, ahora no tendré que corregir el “ninguém”...Marcella, gracias por hacerme reír tanto y enseñarme que a veces hay que tomarse la vida con más calma, suerte en tu nueva etapa, ¡vas a ser

toda una madraza! Isina, fuiste una gran maestra para mí, gracias por todos los grandes momentos, por esas raclette y por los dinosaurios que nunca crecieron pero nos hicieron ser unas niñas por un instante... A mis niños: Elenussss, contigo los días de trabajo son alegres, gracias por tantas risas y conversaciones, por Calixto, por los piños y el pre-piños, aquí tienes a Larousse para siempre, te quiero mucho...Y a mi rubí, ¡Nacho! Agradecerte tantas charlas, en los buenos y malos momentos siempre estás ahí, eres un gran amigo (paupérrimamente hablando claro). A mi mami Virgi, gracias por tu gran acogida desde el primer día, por cuidarme tanto y por enseñarme todas las técnicas con tu enorme paciencia...Sin ti el lab no hubiera sido igual, ¡te quiero mucho! Echaré de menos hasta tus broncas por no comer bien o por no abrigarme cuando hacía frío... Y cómo no, a la persona más importante para mí en este lab y en esta ciudad, mi Dianis...creo que es imposible agradecer tantísimas cosas a una misma persona...Albóndiga, la palabra gracias se queda pequeña...Ya lo sabes, tu has sido el pilar en el que sostenerme siempre, gracias por tanta ayuda, por enseñarme tantísimas cosas, por las risas en cultivos, por las fiestas, por las celebraciones sin motivo, por estar en los buenos y en los malos momentos, por esos viajecitos a climas extremos, por las sopitas cuando estaba enfermita y, sobretodo, por ser como eres, una persona maravillosa que he tenido la suerte de conocer y de tener a mi lado toda la tesis...Formas parte de mi familia, y sabes que pronto podremos abrazarnos de nuevo, estos últimos años sin ti han sido duros, pero siempre has sabido estar cerquita, te quiero montones...Eres una mujer excepcional. Por supuesto, agradecer también a mi mami colombiana, doña Nancy, gracias por cuidarme tanto estos meses que estuviste aquí con nosotras, mucha fuerza y aquí tienes a tu hijita española para siempre, eres todo un ejemplo de esfuerzo y superación...

A mi niña del otro lado del charco, Ximenunxis, ¡cuántas cosas debería escribirte! Contigo empezó mi aventura salmantina, has sido para mí un gran apoyo aquí en Salamanca, una más de la familia, ¡te quiero muchísimo mi flaca! Gracias por tantísimos buenos momentos, por los chistes malos, por tener siempre una sonrisa, por los consejos, por cuidarme, por estar SIEMPRE, espero verte pronto...

A la meva catalana: Esterilla, per fi termina aquesta aventura que fa molt temps vam començar juntes, encara penso en el dia que vam arribar a Salamanca amb nervis i emoció, tot són bons records...Gràcies per ser tan bona amiga sempre, per tants bons moments, per les il·luminacions, i per visitar-me tot i el poc temps que tens amb tant de treball, merci per tot! T'estimo molt...Per fi si tot va bé tornarem a estar ben a prop!

Al mexicano de mi corazón, Diego, gracias por acompañarme en estos últimos años, has sido un apoyo constante e incondicional. Gracias por tantas horas de soporte informático y sobretodo por todo el ánimo y cariño que me das día a día, te quiero ojitos, seguiremos luchando juntos como hasta ahora...

Finalmente, solo me queda dar las gracias a mi familia, uno no se da cuenta a veces de lo importante que es tener una familia unida y que se quiere hasta que no está lejos... sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. A mis tios Olga y Salva, gracias por todas las palabras de apoyo y las enseñanzas, por las visitas exprés para darme vuestro cariño. A mi murcileja, no se puede tener mejor hermana...Tu siempre has sido mi ejemplo a seguir y ¡mira dónde estoy! Eres todo un ejemplo de superación y valentía, te quiero. Y a mis padres, sin vosotros no hubiera conseguido nada de esto...Gracias por apoyarme siempre, los inicios fueron difíciles pero siempre estuvisteis conmigo luchando por mis sueños, gracias por los consejos, las enseñanzas, por ser mi apoyo constante, por creer y confiar en mí, por enseñarme que siempre hay que superarse y, sobretodo, gracias por hacerme tan feliz, aunque lejos, siempre habéis estado muy cerquita...os quiero, os adoro.