

# IMPLICACIÓN DE LA QUINASA HUMANA VRK1 Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX2 EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR A TRAVÉS DE LA INDUCCIÓN DE CICLINA D1

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología y Clínica del Cáncer

2014-2015

Gema Marín Royo



# ÍNDICE

RESUMEN/PALABRAS CLAVE	<b>pág.1</b>
1. INTRODUCCIÓN	<b>pág.2</b>
1.1 Proteínas quinasa	pág.2
1.2 La quinasa humana VRK1	pág.2
1.3 Regulación del ciclo celular	pág.3
1.3.1 Expresión de VRK1 y ciclo celular	pág.4
1.3.2 Expresión de SOX2 y ciclo celular	pág.5
1.4 Macrohistonas y diferenciación	pág.5
2. OBJETIVOS	<b>pág.7</b>
3. MATERIALES Y MÉTODOS	<b>pág.8</b>
3.1 Técnicas de manipulación de ADN	pág.8
3.1.1 Obtención y purificación de ADN plasmídico de E.coli	pág.8
3.1.2 Cuantificación de ADN plasmídico	pág.8
3.1.3 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	pág.8
3.2 Técnicas de manipulación de proteínas	pág.9
3.2.1 Obtención de extractos proteicos	pág.9
3.2.2 Cuantificación de proteínas	pág.9
3.2.3 Western Blot (electroforesis en geles SDS-PAGE, transferencia húmeda e inmunodetección)	pág.9
3.3 Cultivos celulares	pág.11
3.3.1 Consideraciones generales de manipulación	pág.11
3.3.2 Líneas celulares	pág.11
3.4 Transfección transitoria de ADN en células eucariotas en cultivo en monocapa	pág.12
3.5 Inmunofluorescencia y microscopía confocal	pág.12
3.6 Determinación de la actividad transcripcional de promotores génicos ligados a un gen reportero de luciferasa	pág.13
4. RESULTADOS	<b>pág.16</b>
<i>Regulación positiva de ciclina D1 inducida por VRK1 y SOX2</i>	
4.1 Colocalización nuclear de VRK1 y SOX2	pág.16
4.2 VRK1 y SOX2 activan al promotor de ciclina D1 individualmente	pág.16
4.3 VRK1 y SOX2 cooperan positivamente potenciando la activación del promotor de ciclina D1	pág.17
<i>Regulación negativa de ciclina D1 y VRK1 por macrohistonas</i>	
4.2.1 mH2A1.2 y mH2A2 inactivan al promotor de ciclina D1	pág.18
4.2.3 mH2A1.2 y mH2A2 inactivan al promotor de VRK1	pág.19
5. DISCUSIÓN	<b>pág.21</b>
6. CONCLUSIONES	<b>pág.23</b>
7 .BIBLIOGRAFÍA	<b>pág.23</b>

## **RESUMEN**

Una correcta regulación del ciclo celular es necesaria para que el proceso de proliferación ocurra de forma adecuada. En este trabajo, demostramos que la quinasa VRK1 y el factor de transcripción SOX2 regulan la progresión del ciclo celular induciendo la expresión de ciclina D1(CCND1), proteína implicada en la transición G1/S. Por el contrario, las macrohistonas mH2A1.2 y mH2A2 actúan como represores transcripcionales, inhibiendo la expresión de VRK1 al impedir el acceso del factor de transcripción SOX2 a las regiones promotoras de sus genes diana. Alteraciones de los niveles de SOX2, VRK1 y macrohistonas provocan la desregulación de los procesos de proliferación y diferenciación pudiendo causar tumorigénesis. Teniendo en cuenta estos resultados, se propone la necesidad de profundizar en el estudio de estas macrohistonas junto a VRK1 y SOX2 considerándolas como posibles candidatas para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

## **PALABRAS CLAVE**

VRK1, SOX2, ciclina D1, proliferación, macrohistonas, diferenciación

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Proteínas quinasa**

Las proteínas quinasa son enzimas que catalizan la unión covalente de un grupo fosfato a residuos serina, treonina o tirosina en proteínas celulares específicas. Mediante esta fosforilación, las quinasas son capaces de controlar propiedades de sus proteínas sustrato tales como su actividad enzimática, su localización celular, su interacción con otras moléculas así como su degradación[1].

De este modo, la fosforilación regula procesos celulares tales como la transcripción génica, la progresión del ciclo celular, el metabolismo celular, las reorganizaciones del citoesqueleto, la apoptosis y la diferenciación [2].

Se sabe también que la desregulación de estas proteínas juega un papel importante en desórdenes fisiológicos como el cáncer[3].

En el presente trabajo nos centramos en el estudio de la quinasa humana VRK1 (*Vaccinia related kinase 1*).

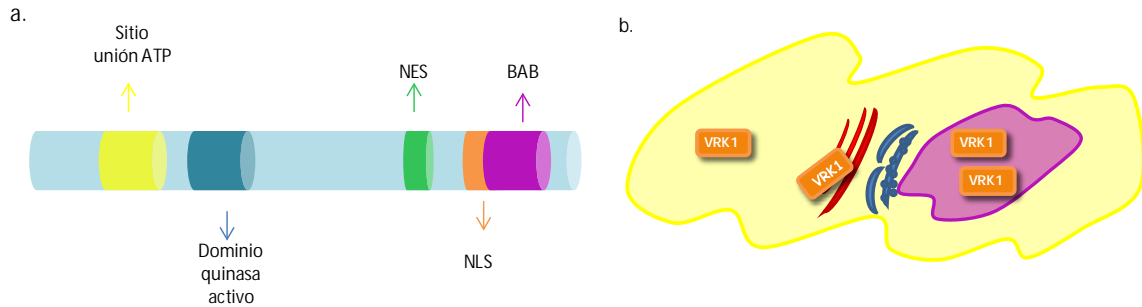
### **1.2 La quinasa humana VRK1**

La proteína humana VRK1 (*Vaccinia related kinase 1*), llamada así por su homología con la quinasa B1R del virus *Vaccinia*, fue identificada en 1997 por Nezu et.al, mientras realizaban un trabajo de búsqueda de nuevos genes humanos implicados en proliferación celular[4]. Pertenecer a la familia de quinasas humanas VRK la cual está compuesta por tres miembros: VRK1 y VRK2 catalíticamente activos, y VRK3, que es una pseudoquinasa.

Esta proteína presenta una secuencia de 396 aminoácidos y está codificada por el gen VRK1, localizado en la región cromosómica 14q32. En su región N-terminal se encuentra un motivo de unión a ATP y un sitio quinasa activo, mientras que la región C-terminal posee una señal de localización nuclear (NLS), una secuencia de exportación nuclear (NES) y un motivo básico-ácido-básico (BAB) (Fig.1a).[5]

Aunque se ha visto expresada en todos los tejidos examinados, sus niveles son especialmente elevados en aquellos con alta tasa de proliferación celular como son el hígado fetal, el timo fetal y los testículos, postulando por lo tanto un posible papel de la quinasa humana VRK1 en crecimiento celular y tumorigénesis[4]. En un estudio posterior, en el que se analizó la expresión de VRK1 en diferentes líneas celulares humanas, tanto normales como tumorales, se observó expresión de la proteína en todas ellas y en concordancia a lo esperado sus niveles eran mucho más elevados en las líneas tumorales.

En cuanto a su localización (Fig.1b), VRK1 es una proteína principalmente nuclear debido a la señal de localización nuclear presente en su secuencia. Sin embargo en determinadas condiciones y según el tipo celular, se ha visto presente en citoplasma. Además se ha detectado una subpoblación de VRK1 en el aparato de Golgi [6].



**Figura 1. Estructura y localización de la quinasa humana VRK1.** a) Representación de los dominios principales de VRK1. b) Diferentes sitios de localización de VRK1.

Inicialmente, se relacionó a VRK1 con proliferación y progresión del ciclo celular (objeto de estudio de este trabajo). A pesar de ello, en estudios posteriores se ha visto su implicación en otros procesos celulares como pueden ser la regulación de factores de transcripción como p53[7] o c- Jun, la fosforilación de la histona H3[8] el ensamblaje de la envoltura nuclear[9], la fragmentación del aparato de Golgi[10] y la neurodegeneración [11].

### 1.3 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular es un proceso necesario para garantizar la transmisión correcta de la información genética a las células hijas, pero su función no es solamente originar nuevas células sino que también se encarga de asegurar que el proceso se realice de la forma correcta y con una regulación adecuada. El ciclo se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. En la fase G1 se produce la acumulación de ATP necesario para el proceso de división y el incremento del tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del ADN nuclear; en G2 la célula se prepara para entrar en mitosis; y es en esta fase de mitosis (M) donde se divide la cromatina duplicada de modo que cada célula hija obtiene una copia idéntica del material genético. Al final de la mitosis la célula entra nuevamente en G1 para comenzar un nuevo ciclo o entra en fase G0, correspondiente a un estado de reposo en el cual la célula puede permanecer días, meses e incluso años[12].

La regulación del ciclo celular se lleva a cabo mediante la síntesis y degradación periódica de ciclinas, proteínas que se asocian a sus correspondientes quinasas dependientes de ciclina (CDKs) para activarlas[13]. Cuando se produce la salida de las células en fase G0 y por consiguiente su entrada en G1, la primera ciclina que se induce es la ciclina D1. Ésta se asocia y activa a las quinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6 cuyo sustrato es la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (Rb), componente esencial en la regulación de la progresión de la fase G1.

### 1.3.1 Expresión de VRK1 y ciclo celular

La transcripción del gen de VRK1 puede estar regulada por señales que afectan a la entrada o salida del ciclo celular. En líneas celulares de fibroblastos humanos se ha visto que la retirada del suero del medio de cultivo provoca el silenciamiento del gen endógeno de VRK1 y su posterior adición, induce la expresión de VRK1 al mismo tiempo que MYC y FOS indicando que VRK1 es un gen de respuesta temprana. Además, el *knock-down* de VRK1 provoca la pérdida de la inducción de ciclina D1 y bloquea el ciclo celular en fase G1 temprana[14]. Esta activación temprana de la expresión de VRK1 en el ciclo es detectada mediante un aumento de los niveles de la proteína a medida que el ciclo celular avanza.

Esto confirma que VRK1 puede controlar la progresión del ciclo celular en un estadio temprano a través de la inducción de ciclina D1. Y esta inducción la lleva a cabo concretamente potenciando la actividad del elemento de respuesta a cAMP (CRE) en el promotor de ciclina D1, facilitando el reclutamiento de CREB fosforilado a este locus[15].

La sobreactivación de proteínas que favorecen la progresión del ciclo celular y la inactivación de aquellas que la impiden, da lugar a una proliferación celular descontrolada que juega un papel esencial en el desarrollo de cáncer.

Los genes que se encuentran principalmente alterados en tumores humanos son aquellos que codifican para proteínas que controlan la transición G1/S, como es el caso de las ciclinas. La comprensión de como estas proteínas son reguladas para activar o inhibir el ciclo celular es de gran importancia ya que puede llevarnos a encontrar terapias específicas contra el cáncer.

### 1.3.2 SOX2 y proliferación

La familia de genes *SOX* codifica para un grupo de factores de transcripción que juegan un papel crítico en organogénesis. La especificidad funcional y de tejido de las proteínas de esta familia está fuertemente determinada por su asociación con otros reguladores de la transcripción. Muchos miembros de la familia de *SOX* se han encontrado desregulados en una gran variedad de tumores destacando por tanto el posible potencial oncogénico de estos factores.

Las proteínas de la familia *SOX*, incluido *SOX2* (objeto de estudio de este trabajo) se unen a secuencias específicas de DNA (C(T/A)TTG(T/A)(T/A)) a través de sus dominios HMG (high-mobility group) que funcionan como factor de transcripción para activar o reprimir la expresión de sus genes diana [16].

Inicialmente, el estudio de *SOX2*, también conocido como *SRY-Box2* (del inglés Sex determining region Y-Box), se centraba en su papel en el desarrollo embrionario, pero posteriores investigaciones han mostrado que su sobreexpresión es un evento bastante frecuente en carcinomas de mama. Los niveles de *SOX2* presentan una fuerte correlación con el grado del tumor así como con los niveles de expresión de ciclina D1 en muestras de pacientes que presentan este tipo de cáncer.

*SOX2* promueve por lo tanto proliferación celular y tumorigénesis facilitando la transición G1/S a través de la regulación de la transcripción del gen de ciclina D1 (*CCND1*) en células de cáncer de mama[17].

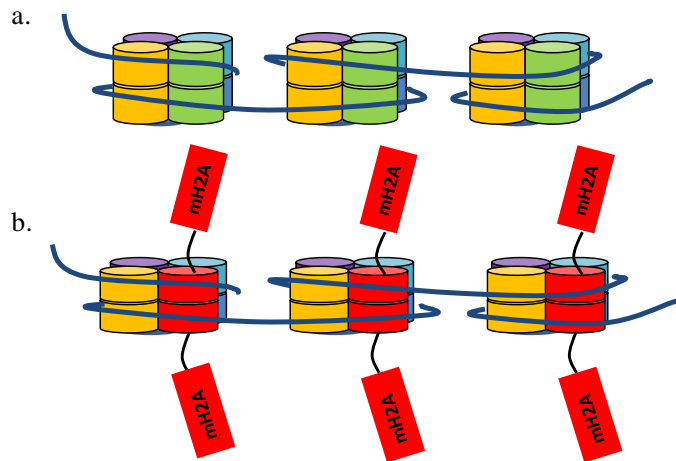
La expresión de *SOX2* se ha observado en un 43% de los carcinomas de mama *basal-like* además de aparecer fuertemente correlacionado con CK5/6, EGFR y vimentina (marcadores de tumores *basal-like*), sugiriendo que podría tener un rol confiriendo un fenotipo menos diferenciado en este tipo de tumores[18].

En relación a la diferenciación, se ha visto que la sobreexpresión de *SOX2* en células neurales *stem* de ratón bloquea dicho proceso y la inhibición de *SOX2* en estas mismas células provoca su salida prematura del ciclo celular y su posterior diferenciación a neuronas[19].

## **1.4 Macrohistonas y diferenciación**

Las alteraciones en la cromatina proporcionan las bases moleculares para la memoria epigenética de las células. Una de estas alteraciones, entre todas las que puede sufrir la cromatina es el intercambio de algunas de las histonas canónicas presentes en el nucleosoma por

una variante de las mismas (Fig. 2b). Existen numerosas variantes de las histonas H3 y H2A. Entre estas, las variantes macroH2A destacan por su tamaño y la presencia de un dominio extra conocido como macrodominio. En el dominio C-terminal se encuentra presente un linker que enlaza el dominio histona H2A y dicho macrodominio. Este macrodominio sobresale de la estructura compacta del nucleosoma y es probable que afecte a la función y organización de la cromatina circundante.



**Figura 2. Estructura de la cromatina.** a) Estructura normal de la cromatina donde octámeros de histonas forman los nucleosomas. b) Estructura de la cromatina alterada por intercambio de histonas H2A por la variante macrohistona mH2A.

En el presente trabajo estudiaremos tres de estas proteínas variantes de histonas, macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2, generadas a partir de dos genes diferentes. El gen *MACROH2A* presente en el cromosoma 5 codifica mediante *splicing* alternativo para macroH2A1.1 y macroH2A1.2. La proteína macroH2A2 identificada posteriormente es codificada sin embargo por el gen *MACROH2A2* (idéntico en un 68% a *MACROH2A1*) presente en el cromosoma 10[20].

La ocupación de macroH2A generalmente correlaciona con represión génica y baja actividad transcripcional[21]. Sin embargo, aunque macroH2A ha sido considerada desde el inicio como una marca represiva de la cromatina existen evidencias recientes que muestran que la presencia de macroH2A1, principalmente macroH2A1.2, es requerida para la correcta inducción de genes de diferenciación[22].

La activación de genes de diferenciación se sabe que desencadena mecanismos de retroalimentación negativa que contribuyen a la inactivación de los factores de pluripotencia, la cual es requerida para la correcta ejecución de los programas de diferenciación. Por lo tanto, señales que inducen diferenciación, como puede ser por ejemplo la adición de ácido retinoico,



aumentan los niveles de macrohistonas y reducen los niveles de mRNA de los tres principales reguladores de pluripotencia Nanog, OCT4 y SOX2.

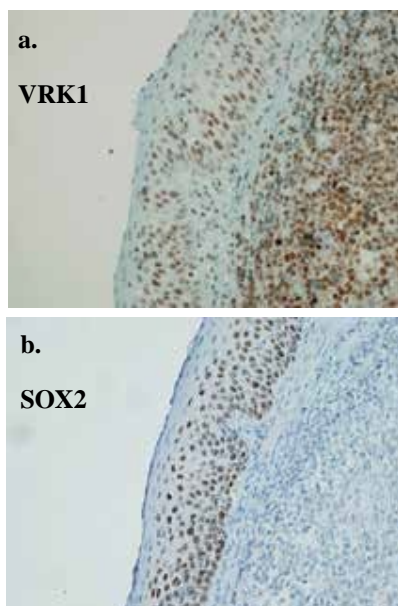
Este hecho podría explicarse mediante la idea de que para que se diera la correcta activación de estos genes implicados en diferenciación sería necesaria la supresión de genes de pluripotencia y auto-renovación como Sox2, Oct4 y Nanog y sería en esta inactivación en la que estarían implicadas las macrohistonas, ya que se ha visto mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que durante diferenciación, las macrohistonas son reclutadas a regiones reguladoras de pluripotencia y genes de desarrollo trimetilados en H3K27 contribuyendo al silenciamiento de éstos[23].

## 2. OBJETIVOS

En los epitelios escamosos se puede distinguir entre la capa basal interna (compartimento caracterizado por alta tasa de proliferación) y la capa externa, en la cual las células se encuentran diferenciadas, queratinizadas y por lo tanto no se dividen. En nuestro laboratorio, mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha observado que la expresión de VRK1 y SOX2 coincide en las células proliferativas presentes en la capa basal (Fig. 3).

Teniendo en cuenta las evidencias observadas en el laboratorio así como los datos previos aportados en la introducción, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- Ø Estudiar una posible cooperación entre VRK1 y SOX2 en la inducción de la expresión de ciclina D1
- Ø Investigar la posible implicación de las macrohistonas mH2A1.1, mH2A1.2 y mH2A2 en la inhibición de SOX2 y VRK1 y por lo tanto su consecuente regulación negativa del ciclo celular



**Fig 3. Expresión de VRK1 y SOX2 en epitelios escamosos normales.** Se realizó tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos (a) VRK1-N-terminal (Sigma) y (b) SOX2-E.4 (Santa Cruz) a una dilución 1:30 detectándose VRK1 y SOX2 respectivamente en el núcleo de las células. Aumento utilizado, 400x. Como se puede observar, tanto VRK1 como SOX2 se expresan más en la zona basal de alta proliferación y se va perdiendo su expresión a medida que las células van dejando de dividirse, comenzando a diferenciarse perdiendo completamente su expresión cuando las células ya están queratinizadas.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Técnicas de manipulación de ADN**

##### 3.1.1 Obtención y purificación de ADN plasmídico de *E.coli*

La técnica de lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly (Birnboim & Doly, 1979), fue utilizada para el aislamiento de ADN plasmídico a partir de *E.coli*. Esta técnica se basa en la alcalinización de las células de *E.coli* con NaOH (Hidróxido de sodio) en presencia de un detergente aniónico como el SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), provocando la lisis celular, la desnaturalización del ADN cromosómico y proteínas, y posteriormente, la liberación de los plásmidos. Para la extracción de ADN plasmídico a gran escala, comúnmente conocida como MAXI-Prep, se utilizó el sistema comercial JETStar The Novel Plasmid Purification System (GENOMED) llevándose a cabo el protocolo indicado por la casa comercial.

##### 3.1.2 Cuantificación de ADN plasmídico

Para conocer la concentración final del ADN plasmídico obtenido, se midió en el espectrofotómetro (Hitachi U-2001). La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo la absorbancia a 260nm y comparando con un blanco. Dado que las proteínas absorben a 280nm la interferencia de contaminantes se define calculando el cociente A260/A280 pudiendo determinar así la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos. El cociente del ADN puro debe estar entre 1.8 y 2.0. La concentración de ADN es confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

##### 3.1.3 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La confirmación de la presencia de ADN plasmídico extraído mediante la técnica MAXI-Prep se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM), que mantiene el pH cercano a 8 durante el recorrido, lo cual es de gran importancia puesto que la migración del ADN depende de las cargas negativas de los fosfatos y de los iones cargados en el medio. Dado que los ácidos nucleicos tienen carga negativa, migrarán hacia el polo positivo al ser sometidos a un campo eléctrico. Se utilizó como marcador de peso molecular el ADN Ladder 1 kb (Promega). Para la visualización de las bandas de ADN se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/ml) al tampón de electroforesis, un agente que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y que al ser expuesto a la luz ultravioleta (UV) emite fluorescencia. Las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN y los marcadores de peso molecular fueron captados con una cámara digital acoplada al analizador de imagen Gel Doc TM 2000 (Bio-Rad) e impresas en papel térmico.

## **3.2 Técnicas de manipulación de proteínas**

### 3.2.1 Obtención de extractos proteicos

A partir de células en cultivo se obtienen extractos de proteínas totales mediante su lisis en un tampón de lisis suave (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 1mM EDTA) al que se le han añadido inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de leupeptina) e inhibidores de fosfatasa (1mM de ortovanadato de sodio y 1mM de fluoruro de sodio, NaF). Tras la aspiración del medio de cultivo, 3 lavados con PBS y la adición del tampón de lisis se procede a rascar las células con la ayuda de un scraper y se pasan a un eppendorf. Se incuban en hielo durante 20 minutos y posteriormente se centrifugan otros 20 minutos (4°C, 12000 rpm). Tras la centrifugación se descarta el *pellet* y se recupera la fracción soluble. Las proteínas presentes en esta fracción serán utilizadas para realizar los ensayos de actividad luciferasa y por otro lado serán también cuantificadas mediante el método Bradford para ser posteriormente analizadas mediante Western Blot.

### 3.2.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se lleva a cabo mediante el método de Bradford basado en el cambio de color del colorante *Coomasie brilliant-blue G-250* (de pardo a rojo azulado) en respuesta a su unión con diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos provocando un cambio en su máximo de absorción desde 465 a 595 nm.

Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancias entre 595 y 465 nm (595-465nm). Para ello se utiliza el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) y se realiza una curva patrón con la proteína BSA (albúmina sérica bovina) para poder cuantificar cada extracto proteico.

### 3.2.3 Western Blot (electroforesis en geles SDS-PAGE, transferencia húmeda e inmunodetección)

El primer paso llevado a cabo en el *Western Blot* es realizar una electroforesis vertical en geles SDS-PAGE (del inglés *Sodium Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) que permite separar a las proteínas en base a su tamaño. El SDS es un detergente aniónico capaz de desnaturalizar las proteínas e unirse a ellas proporcionándoles una carga negativa uniforme gracias a los grupos sulfato presentes en su estructura. Bajo estas condiciones desnaturalizantes y de reducción, las proteínas cargadas negativamente migran al electrodo positivo cuando se someten a un campo eléctrico. Debido a que el SDS iguala la carga en todas las proteínas, la

tasa de migración se debe únicamente al peso molecular de la proteína donde las moléculas pequeñas migran más rápidamente que aquellas más grandes.

El tamaño de los poros del gel depende de la concentración de acrilamida a la que se prepare la cual varía dependiendo del tamaño de las proteínas con las que se está trabajando. El gel consta de dos regiones, *resolving gel* y *stacking gel*. El *resolving gel*, que quedaría en la parte inferior, se ha preparado a un 10% de acrilamida (0,25% bis-acrilamida en un tampón de 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 y 3,5 mM SDS) porcentaje idóneo para resolver las proteínas que se están estudiando (30-100 kDa). Para mejorar la nitidez de la banda una vez solidificado el gel separador se prepara el gel concentrador ("*stacking*") al 4,75 % de acrilamida (0,128% bis-acrilamida en tampón M Tris-HCl pH 6,8 y 3,5 mM de SDS). Una vez se tienen las muestras de proteína se combinan con un tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2,3 % SDS, 0,1% de azul de bromofenol y 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol). Tanto en el *resolving gel* como en el *stacking* se añaden para que pueda darse la solidificación dos reactivos, persulfato de amonio y TEMED, encargados de la generación de radicales libres que catalizan la reacción de polimerización y del potenciamiento de la generación de dichos radicales, respectivamente.

Previamente a la carga del gel las muestras se someten a 100°C durante 5 minutos para asegurar que la desnaturalización proteica es total. La electroforesis se realiza en un tampón que lleva 25 mM Tris (mantiene el pH), 200 mM de glicina (conduce electricidad) y 1,7 mM SDS (mantiene las proteínas cargadas negativamente). El progreso en el gel se monitoriza observando el frente coloreado por el colorante presente en el tampón de carga y la posición de los marcadores de tamaño los cuales se encuentran teñidos. Los marcadores de peso molecular utilizados son *Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards Dual-Color* (Bio-rad).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren del gel de poliacrilamida a una membrana de *Immobilion-FL* (Millipore), soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar. Para esta transferencia húmeda el tampón utilizado es 25mM Tris-HCl, 19,2 mM de glicina y 15% de metanol. Dicha transferencia se lleva a cabo gracias a la generación de un campo eléctrico que conduce a las proteínas desde el electrodo negativo al positivo.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloquea con leche desnatada en polvo al 5% resuspendida en tampón TBS-T (25mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM NaCl, 2,5mM KCl y 0,1% *Tween-20*) durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Seguidamente se realizan 3 lavados de 10 minutos en TBS-T y se incuba durante una hora a temperatura ambiente o a 4° durante toda la noche con el anticuerpo primario contra la proteína de interés en TBS-T con azida. Tras la incubación se realizan otros 3 lavados de 10 minutos en

TBS-T en agitación. Después se incubaba durante una hora con los anticuerpos secundarios (*Goat anti-Rabbit IgG, DyLight™ 800* y/o *Goat anti-Mouse IgG, DyLight™ 680*), se lava otras tres veces en TBS-T y finalmente se escanea con el *equipo LI-COR Odyssey Infrared Imaging System*, que detecta la fluorescencia emitida por los anticuerpos secundarios

### **3.3 Cultivos celulares**

#### 3.3.1 Consideraciones generales de manipulación

Cuando se trabaja con cultivos celulares es imprescindible mantener condiciones estrictas de esterilidad, y es extremadamente importante mantener un seguimiento de las características observables del cultivo al microscopio, para detectar tempranamente contaminaciones (bacterias, hongos, levaduras) o cambios espontáneos en el fenotipo de los cultivos.

Las condiciones de cultivo eran de 37 °C, 98% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. Se procuró mantener las células el menor tiempo posible fuera del incubador. Debido a que las células con las que trabajamos son inmortalizadas, es relativamente fácil la aparición de alteraciones fenotípicas debidas a la adquisición espontánea de características de transformación; por ello seguíamos atentamente el aspecto de los cultivos en la observación microscópica, y no utilizábamos células de más de 15 subcultivos a partir del pase cero.

#### 3.3.2 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas se recogen en la siguiente tabla:

<b>Línea celular</b>	<b>Organismo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Medio de cultivo</b>
<b>HEK-293T</b>	Humano	Epitelial de riñón	DMEM
<b>MDA-MB-231</b>	Humano	Adenocarcinoma de mama	DMEM

**Tabla 1. Líneas celulares utilizadas**

El cultivo de dichas líneas se hizo en flasks (Falcon) y el medio utilizado, DMEM (Sigma-Aldrich) fue suplementado con 10% FBS (Fetal bovine serum), 2 mM de L-Glutamina y con los antibióticos penicilina (50 unidades/mL) y estreptomina (50 µg/mL) (GIBCO-life technologies).

### **3.4 Transfección transitoria de ADN en células eucariotas en cultivo en monocapa**

Las células se siembran en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Falcon) 24 horas antes de la transfección de forma que hayan alcanzado una confluencia aproximada del 50-70%. Las cantidades de ADN transfectado son específicas en cada experimento y la concentración final de ADN se mantiene constante gracias a la adición de los microgramos necesarios de un vector vacío.

Para llevar a cabo las transfecciones se ha utilizado el reactivo comercial PEI, Polietilenimina (*PolySciences*) el cual es un polímero catiónico capaz de compactar el ADN en el interior de partículas cargadas positivamente para que puedan unirse a los proteoglicanos cargados negativamente de la superficie celular, siendo posteriormente introducidos al interior de la célula mediante endocitosis.

El ADN se resuspende en un volumen adecuado de NaCl 150 mM y se mezcla con otro volumen igual de NaCl 150 mM en el que previamente ha sido añadido el reactivo PEI (2 µl de PEI por cada µg de ADN que se transfecte). Esta mezcla se incuba durante 20-30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añade por goteo a las células sembradas el día anterior y se homogeneiza con el medio de cultivo.

### **3.5 Inmunofluorescencia y microscopía confocal**

La inmunofluorescencia es una técnica que permite detectar los niveles de expresión y localización subcelular de proteínas endógenas o sobreexpresadas en células en cultivo. En estos ensayos las células se siembran sobre cubreobjetos estériles de vidrio. Cuando las células han alcanzado la confluencia idónea para el experimento, se lavan con PBS 1X y se fijan al cubreobjetos con paraformaldehído (PFA) al 3 % en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade glicina a 200 mM durante 15-30 minutos, con el objetivo de neutralizar los grupos aldehído que quedan libres procedentes del PFA, ya que pueden reaccionar con aminos o proteínas y generar productos fluorescentes. Seguidamente, se permeabilizan las células con Tritón X-100 al 0,2 % en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se bloquea con PBS 1X-BSA 1% y azida 2X durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

El siguiente paso es la incubación de los anticuerpos primarios (Ver tabla 4). Se incuban los dos anticuerpos de forma secuencial, diluyéndolos según las recomendaciones del fabricante en

PBS-1X BSA 1% y azida 2X, durante dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° y lavando 3 veces con PBS 1X para eliminar los restos de anticuerpo libre. Posteriormente, se incuban con los anticuerpos secundarios, Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L) y Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit/anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Research), y se incuban durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, manteniendo estas condiciones durante el resto del proceso para evitar la pérdida de fluorescencia de los fluoróforos. Tras lavar 3 veces con PBS 1X, se tiñen los núcleos con DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol) diluido en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente y, tras los lavados correspondientes, se montan los cubreobjetos sobre los portaobjetos con MOWIOL 4-88 (Calbiochem). Por último, se analiza la localización subcelular mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio Leica TCS SP5 y el *software* de captura de análisis de imagen *Image J*.

### **3.6 Determinación de la actividad transcripcional de promotores génicos ligados a un gen reportero de luciferasa.**

Para la caracterización del efecto del factor de transcripción de SOX2 y de las macrohistonas (macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2) sobre los promotores de VRK1 y ciclina D1 (cycD1) se realizaron estudios *in vitro* de actividad luciferasa.

El sistema de valoración de la actividad transcripcional mediante el gen reportero de la luciferasa, se basa en la transfección de un vector que contiene un gen de la luciferasa bajo el control de un promotor concreto. La unión de los factores de transcripción adecuados a sus sitios de unión en el promotor permitirá la transactivación del gen reportero de la luciferasa con la consiguiente síntesis de la proteína.

Tras 24 horas de transfección en el caso de las HEK-293T y 48 horas para MDA-MB-231, se lisaron las células como se describe en el apartado 3.2.1 Obtención de extractos proteicos, se recogió el sobrenadante y se procedió a cuantificar la actividad de la luciferasa mediante el kit *Dual-luciferase reporter assay system* (Promega). El mecanismo de reacción se basa en la adición de un reactivo capaz de oxidar a la luciferasa con la consiguiente producción de luz a 556 nm, la cual se cuantifica en un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold Technologies).

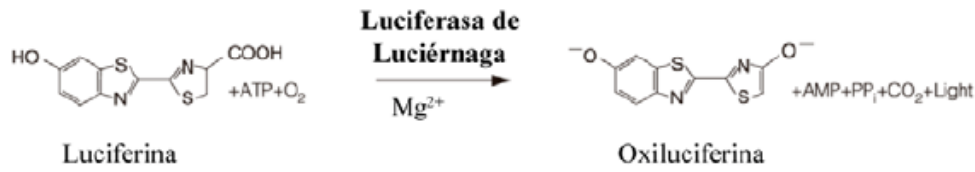


Figura 4. Reacción de bioluminiscencia catalizada por la enzima luciferasa.

Las líneas celulares utilizadas en este ensayo fueron HEK-293T y MDA-MB-231. La transfección transitoria de los plásmidos se llevó a cabo en el momento en el que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%. El método utilizado para la transfección fue mediante el reactivo PEI como se ha explicado anteriormente.

Estos experimentos se realizaron siempre al menos 3 veces de forma independiente y cada punto por triplicado, para luego analizar estadísticamente los resultados mediante el *test t-de Student*. Los valores entre cada experimento independiente fueron normalizados con el vector reportero control y relativizados al promotor de ciclina D1. Como control negativo se utilizaron células transfectadas con vector vacío .

En la siguiente tabla (Tabla 2) se recogen los plásmidos transfectados necesarios para los distintos ensayos de actividad luciferasa.

<b>Plásmidos de ADN recombinante</b>			
<b>Clon</b>	<b>Vector</b>	<b>Inserto</b>	<b>Procedencia</b>
<b>pCEFL-HA vacío</b>	pCEFL-HA	Vacío	Laboratorio
<b>pA3-CyCD1-Prom.Luc(wt-1745+134)</b>	pA3-Luc	Promotor ciclina D1	Laboratorio
<b>pGL2 promoter (-1028+52)</b>	pGL2-promoter	Promotor VRK1	Laboratorio
<b>pGL2-basic</b>	pGL2-basic	Vector reportero	Promega
<b>pGL2-control</b>	pGL2-control	Vector reportero control	Promega
<b>pGEX-GST vacío</b>	pGEX-KG	Vacío	Promega
<b>pCMV6-SOX2-Myc</b>	pCMV6-Entry(Myc/Flag tagged)	SOX2	Laboratorio
<b>pCMV-Tag2A Flag-m mH2A1</b>	pCMV-Tag2A	mH2A1.1	Laboratorio



<b>pCMV-Tag2A Flag-mH2A1.2</b>	pCMV-Tag2A	mH2A1.2	Laboratorio
<b>pCMV-Tag2A Flag-mH2A2</b>	pCMV-Tag2A	mH2A2	Laboratorio

**Tabla 2. Plásmidos de ADN recombinante utilizados en el ensayo de actividad luciferasa.** pA3-Luc, pGL2-promoter y pGL2-control contienen el gen de luciferasa bajo el control de un promotor determinado que permitirá la expresión de la proteína luciferasa cuando dicho promotor sea activado o por el contrario la inhibición de la expresión cuando el promotor se reprime.

Con el lisado proteico obtenido para medir la actividad luciferasa posteriormente se realizó un *Western Blot* para comprobar que se había producido una correcta transfección. Los anticuerpos utilizados para ello se muestran en Tabla 3.

<b>Anticuerpos</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Dilución de uso</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Anti-VRK1</b>	VRK1 humana (aa 5-142)	Policlonal conejo	WB 1:1000 IF 1:200	Sigma
<b>Anti-SOX2 (D6D9)</b>	SOX2	Monoclonal conejo	IF 1:400	Cell signaling
<b>Anti-Myc</b>	Epítipo myc	Policlonal conejo	WB 1:1000	Millipore
<b>Anti-Myc</b>	Epítipo myc	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Millipore
<b>Anti-Flag (M2)</b>	Epítipo Flag	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Sigma
<b>Anti-Flag (M5)</b>	Epítipo Flag	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Sigma
<b>Anti-Flag</b>	Epítipo Flag	Policlonal conejo	WB 1:1000	Sigma
<b>Anti-HA</b>	Epítipo HA	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti-HA</b>	Epítipo HA	Policlonal conejo	WB 1:1000	Sigma
<b><math>\beta</math>-actina (AC-15)</b>	B-actina	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Sigma
<b>GST (B14)</b>	GST	Monoclonal ratón	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology

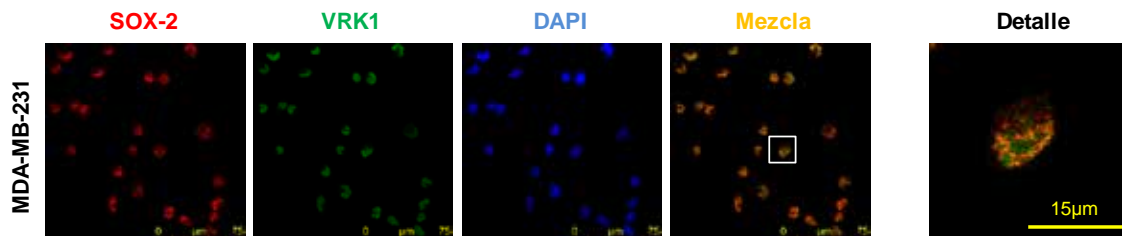
**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para *Western Blot* e inmunofluorescencia**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Colocalización nuclear de VRK1 y SOX2

Se había visto que SOX2 y VRK1 se expresaban en epitelios escamosos normales en zonas con alta tasa de proliferación. Al ser ambas proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular y aparecer expresadas a la vez en dichas zonas proliferativas se pensó que podría existir cierta regulación entre ambas durante el proceso de proliferación.

Se quiso comprobar por tanto si existía colocalización dentro de la célula y para ello se sembraron células MDA-MB-231 sobre cubreobjetos estériles de vidrio y cuando alcanzaron la confluencia adecuada se fijaron e incubaron con los anticuerpos específicos para SOX2 y VRK1 y se analizó mediante microscopía confocal. Efectivamente se observó colocalización dentro del núcleo (Fig.5), lo que nos acercaba a nuestra hipótesis de la posible regulación entre VRK1 y SOX2.



**Figura 5. Colocalización de VRK1 y SOX2 en núcleo.** VRK1 endógena y SOX2 endógeno se marcaron con anticuerpos específicos para estudiar la localización celular mediante microscopía confocal. Se observó que colocalizan en el núcleo.

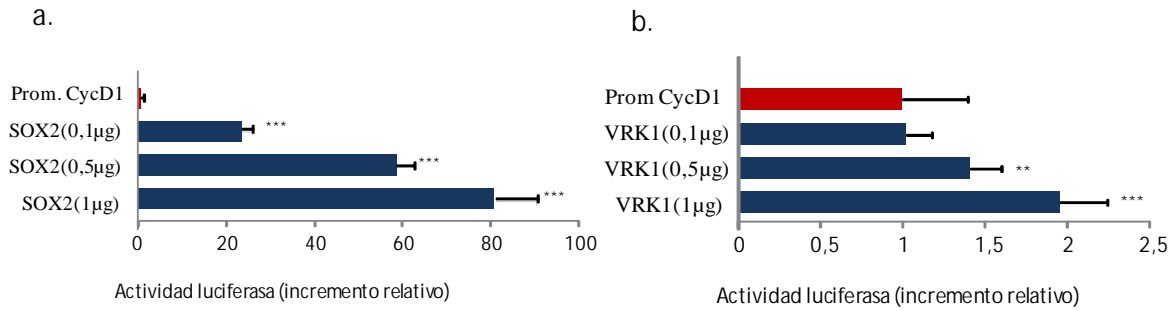
### *Regulación positiva de ciclina D1 inducida por VRK1 y SOX2*

#### 4.2 VRK1 y SOX2 activan al promotor de ciclina D1 individualmente

Como ya se ha explicado en la introducción de este trabajo, VRK1 y SOX2 están implicadas en la inducción del promotor de ciclina D1.

Para verificar estos datos, se cotransfectaron células MDA-MB-321 con 0.5µg del promotor de ciclina D1 (clonado en un vector reportero de luciferasa) junto a diferentes cantidades de VRK1 o SOX2 (0.1 µg, 0.5 µg y 1 µg), para posteriormente medir la actividad luciferasa y observar si tenían o no efecto sobre la expresión de *CCDN1*.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Fig. 6) concluimos que efectivamente tanto VRK1 como SOX2 activan el promotor de *CCDN1* en una manera dosis dependiente.



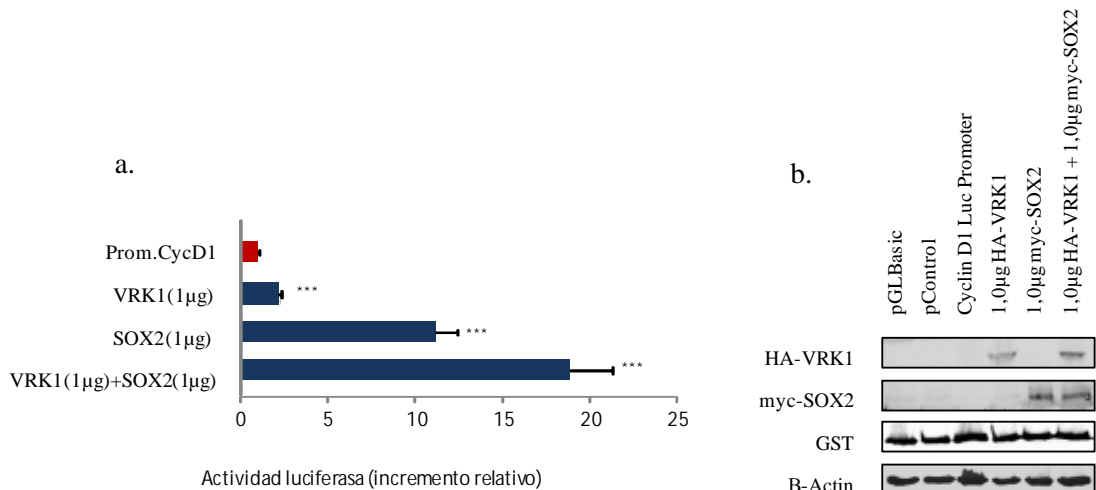
**Figura 6. Activación del promotor de ciclina D1 de manera dosis dependiente por el factor de transcripción SOX2 y VRK1.** Se transfirieron células MDA-MB-231 con 0,5 µg del promotor de ciclina D1 y diferentes cantidades (0,1 µg, 0,5 µg y 1 µg) de (a) SOX2 y (b) VRK1 y se cuantificó la actividad luciferasa. Análisis estadístico test-t de Student; pvalor < 0.50 (\*), < 0.005(\*\*) y < 0.0005 (\*\*\*)

### 4.3 VRK1 y SOX2 cooperan positivamente potenciando la activación del promotor de ciclina D1

Habiendo observado mediante los resultados previos que tanto VRK1 como SOX2 activan de forma individual el promotor de ciclina D1 y que ambas se expresan en epitelio escamoso y colocalizan en el núcleo, se pensó que podría existir una cooperación entre ellas que potenciaría la activación del promotor de ciclina D1.

Para comprobar dicha hipótesis se realizó otro ensayo de actividad luciferasa en el que junto al promotor de ciclina D1 se transfiría 1 µg de VRK1 o 1 µg de SOX2 por separado o de forma conjunta y se comparaba en los diferentes casos la actividad luciferasa cuantificada.

Efectivamente los resultados confirmaban nuestra hipótesis al observarse una mayor activación del promotor de ciclina D1 cuando ambas proteínas eran transfiridas de forma conjunta que cuando se encontraban solas (Fig.7)



**Figura 7. Activación del promotor de ciclina D1 de manera dosis dependiente por el factor de transcripción SOX2 y VRK1.** Se transfectaron células MDA-MB-231 con 0,5 µg del promotor de ciclina D1 y VRK1 (1µg), SOX2 ( 1µg) y ambos en combinación para comprobar si cooperaban en la inducción de ciclina D1. (a) Cuantificación de actividad luciferasa. Análisis estadístico *test-t de Student*; pvalor < 0.50 (\*), <0.005(\*\*) y <0.0005(\*\*\*) (b) *Western Blot* para comprobar que se la transfección se ha realizado correctamente.

### ***Regulación negativa de ciclina D1 y VRK1 por macrohistonas***

#### **4.4 mH2A1.2 y mH2A2 inactivan a los promotores de ciclina D1 y VRK1**

El intercambio de la histona H2A por alguna de sus variantes macrohistona es una alteración epigenética asociada a represión transcripcional. Se sabe, sin embargo, que estas variantes de histonas son esenciales para una correcta activación de la transcripción de genes implicados en diferenciación. La necesidad de las macrohistonas para una correcta inducción de los genes de diferenciación se asocia a la acción represiva que ejercen sobre factores de transcripción y proteínas implicadas en proliferación celular.

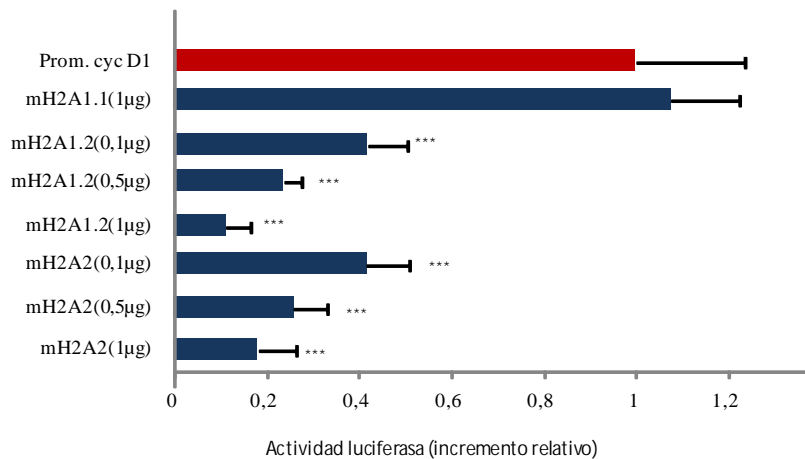
Para comprobar esta hipótesis, se decidió estudiar el papel que tenían las tres variantes macrohistona de H2A en la activación del promotor de ciclina D1 y del promotor de VRK1, ya que ambas proteínas se asocian a proliferación celular.

Para ello, se transfectaron células con macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2 junto con vectores que contenían el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de VRK1 o de ciclina D1.

En ambos casos los resultados obtenidos fueron idénticos. La actividad luciferasa cuantificada en células que habían sido transfectadas con la variante macroH2A1.1 era la misma que en aquellas células que únicamente habían sido transfectadas con el promotor de VRK1 o con el promotor de ciclina D1 indicando que esta macrohistona no tendría ningún efecto sobre VRK1 o ciclina D1.

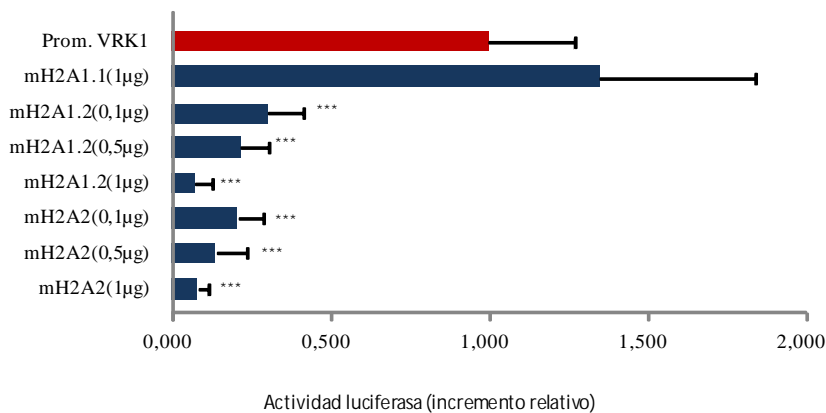
Por el contrario, las otras dos macrohistonas estudiadas, macroH2A1.2 y macroH2A2, sí que tuvieron efecto sobre VRK1 y ciclina D1 al observar una disminución de los niveles de luciferasa respecto a los promotores (Fig.8). Con estos resultados estaríamos confirmando la hipótesis inicial, otorgándoles a ambas macrohistonas un rol inhibitorio en proliferación celular que podría entenderse como el paso previo necesario para que se iniciase el proceso de diferenciación.

a.



**Figura 8. Inhibición del promotor de ciclina D1 (a) y del promotor de VRK1 (b) por mH2A1. y mH2A2.** Se transfectaron células HEK-293T con (a) 0,5 µg del promotor de ciclina y mH2A1.1, mH2A1.2 y mH2A2 y (b) 0,5 µg del promotor de VRK1 y mH2A1.1, mH2A1.2 y mH2A2. Análisis estadístico *test-t de Student*; pvalor < 0.50 (\*), <0.005(\*\*) y <0.0005 (\*\*\*)

b.



#### 4.5 Inhibición del promotor de VRK1 por macroH2A1.2 y macroH2A2 estando presente el factor de transcripción SOX2

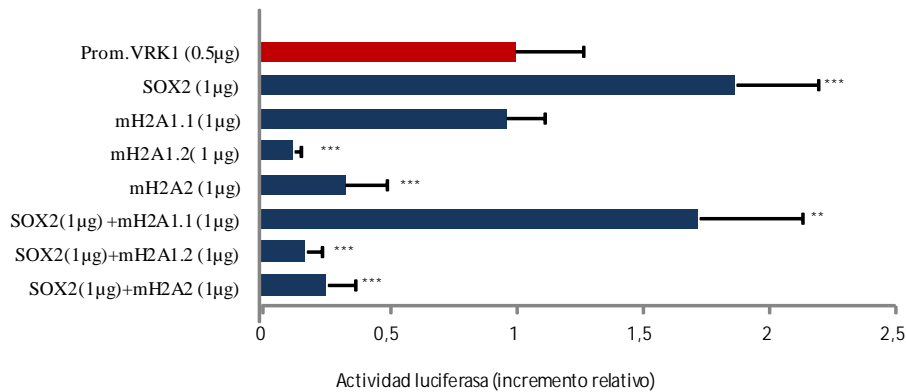
Como se ha demostrado en los resultados previos, SOX2 y las macrohistonas mH2A1.2 y mH2A2 tienen efectos antagónicos respecto a la activación del ciclo celular. SOX2 tendría un papel importante en proliferación debido a la inducción del promotor de VRK1 y ciclina D1, ambas implicadas en la progresión del ciclo celular. Por el contrario, las macrohistonas jugarían un papel represor en proliferación.

Con el siguiente experimento lo que se quería observar era que ocurría cuando SOX2 se encontraba en la célula junto a alguna de estas dos macrohistonas represoras y ver si era capaz de conservar su efecto activador sobre la transcripción.

Para ello se transfectaron células con SOX2 y mH2A1.2 o mH2A2 junto con el vector reportero que contiene el promotor de VRK1 y se comparó la actividad luciferasa cuando SOX2 y las macrohistonas eran transfectadas juntas o por separado.

Se transfectó también SOX2 junto a macroH2A1.1, la variante que no afectaba a los promotores de VRK1 y ciclina D1, para comprobar si SOX2 en presencia de esta macrohistona seguía manteniendo su actividad.

Igualmente a lo visto en los resultados anteriores SOX2 activaba al promotor de VRK1, sin embargo cuando se transfectaba junto a alguna de las macrohistonas este efecto desaparecía y se seguía manteniendo la inactivación provocada por las mismas (Figura 9).



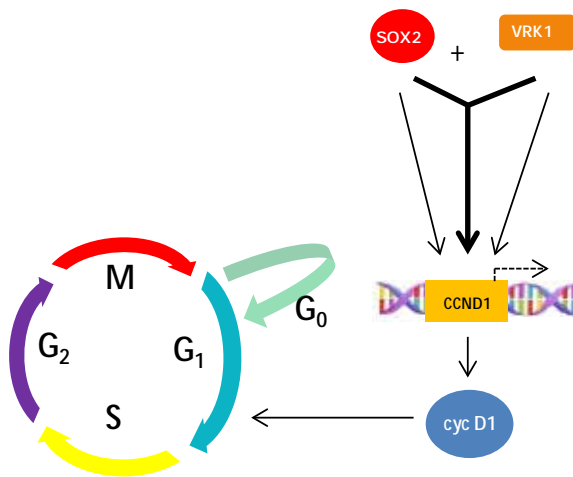
**Figura 9. Inhibición del promotor de VRK1 por macroH2A1.2 y macroH2A2 incluso cuando está presente el factor de transcripción SOX2.** Se transfectaron células HEK-293T con (a) 0,5 µg del promotor de VRK1 junto a SOX2 combinados con macrohistonas. Análisis estadístico *test-t de Student*; pvalor < 0.50 (\*), <0.005(\*\*) y <0.0005 (\*\*\*)

Algunos autores han sugerido dos mecanismos por los cuales las macroH2A estarían envueltas en represión transcripcional. El primero de ellos y el más directo postula la posibilidad de que el macrodominio pueda interactuar con deacetilasas de histonas o ciertas subunidades del complejo Polycomb[24] y así participe en el reclutamiento o estabilización de complejos represores en ciertas localizaciones genómicas. La segunda opción envolvería un mecanismo más pasivo por el cual el macrodominio físicamente impediría el acceso de factores de transcripción a la cromatina[25].

De acuerdo con lo anterior, lo que se propone en el presente trabajo es que la presencia de las macrohistonas macroH2A1.2 y macroH2A2 en el nucleosoma impediría el acceso del factor de transcripción SOX2 a las regiones promotoras de VRK1 impidiendo que dicho factor activara su transcripción.

## 5. DISCUSIÓN

En el compartimento de amplificación de epitelios normales así como en líneas celulares tumorales como es el caso de MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), VRK1 colocaliza con SOX2. Dado que ambas proteínas están implicadas en proliferación celular debido a la activación transcripcional que provocan del promotor de ciclina D1, se ha estudiado si existe una cooperación entre ellas que potencie dicha transcripción. En este trabajo se ha comprobado mediante ensayos de actividad luciferasa que efectivamente esto es así. Por lo tanto VRK1 y SOX2, además de actuar de forma individual en la progresión del ciclo celular, también actuarían de forma conjunta incrementando esta activación transcripcional (Fig.10).



**Figura 10. Activación de la transcripción del gen de ciclina D1 (CCND1) por SOX2 y VRK1.** El factor de transcripción SOX2 y la quinasa humana VRK1 inducen tanto por separado como de manera conjunta la expresión de ciclina D1, proteína que se expresa en la fase tardía de G1 y que es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular.

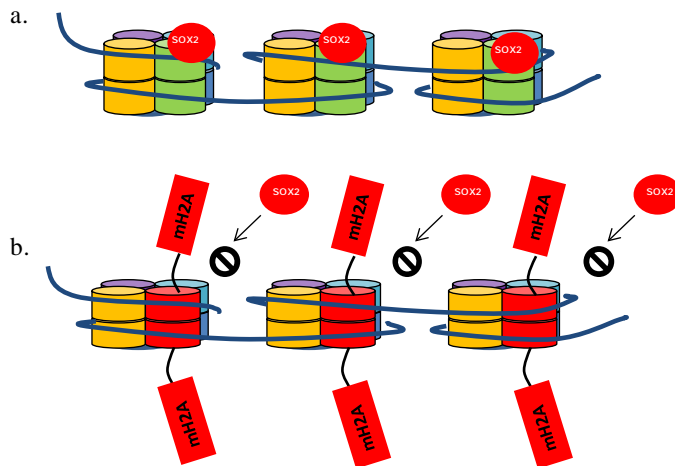
Por otro lado, se han realizado ensayos de actividad luciferasa con las macrohistonas sobre el promotor de VRK1.

Como se ha explicado en la introducción, las macrohistonas son proteínas variantes de histonas que se caracterizan por un mayor tamaño respecto a éstas debido a la presencia de un dominio extra en su estructura que recibe el nombre de macrodominio.

Para la histona canónica H2A se conocen tres variantes; macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2, las cuales han sido objeto de estudio de este trabajo.

MacroH2A1.1 parece no tener efecto sobre el promotor de VRK1 sin embargo las otras dos macrohistonas, macroH2A1.2 y macroH2A2 actúan inhibiendo su transcripción. Estos resultados concuerdan con artículos previos que presentan a las macrohistonas como represores transcripcionales[21] y supresores de la proteína quinasa VRK1 durante la interfase[26].

Posteriormente, se comprobó que cuando SOX2 y las macrohistonas se transfectaban juntas, predominaba el efecto inhibitorio de las macrohistonas frente al efecto activador de SOX2. La explicación que se propone para este suceso sería que cuando se produce una alteración epigenética en la que ocurre el intercambio de la histona H2A por macroH2A1.2 o macroH2A2, el macrodominio de éstas impediría la interacción física del factor de transcripción SOX2 con su región promotora diana, en este caso la de VRK1, dando lugar a una inhibición de la transcripción del gen de VRK1.



**Figura 11. Modelo propuesto para explicar la inhibición del efecto de SOX2 sobre el promotor de VRK1 en presencia de macrohistonas.**

Nuestros resultados demuestran que las macrohistonas mH2A1.2 y mH2A2 reprimen la acción que ejerce el factor de transcripción SOX2 sobre VRK1 impidiendo una correcta activación de genes implicados en proliferación. Además, la retirada de suero en cultivos de fibroblastos (que llevaría consigo parada de ciclo celular) reduce la actividad quinasa de VRK1[14]

La observación conjunta de todos estos datos nos lleva a pensar en la idea de que para que cese el proceso de proliferación y comience a darse diferenciación, sería necesaria de forma simultánea una bajada de los niveles de SOX2 y VRK1 y una subida en los niveles de mH2A1.2 y/o mH2A2 (Fig.11).

Además de una bajada en los niveles de SOX2 mediante mecanismos no conocidos hasta el momento (posiblemente a través de vías de degradación proteolítica como el proteasoma) la acción del factor de transcripción sobre sus genes diana se vería impedida por las macrohistonas cuyos niveles aparecen incrementados en procesos de diferenciación.





**Figura 11. Regulación de la proliferación y diferenciación mediada por niveles de SOX2, VRK1 y macrohistonas.** Hipótesis elaborada como resultado de este trabajo según la cual un descenso en los niveles de SOX y VRK1 junto a un aumento de los niveles de macrohistonas serían necesarios para que ocurra una correcta disminución del proceso de proliferación, paso previo al inicio de la diferenciación.

La correcta regulación de la proliferación y diferenciación celular es fundamental para evitar la aparición de enfermedades tales como el cáncer. Por lo tanto en este trabajo se propone la necesidad de profundizar en el estudio de estas macrohistonas junto a VRK1 y SOX2 considerándolas como posibles candidatas para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

## 6.CONCLUSIONES

1. VRK1 promueve la proliferación celular a través de la inducción de *CCDN1*.
2. SOX2 promueve la proliferación celular a través de la inducción de *CCDN1*.
3. VRK1 y SOX2 cooperan en la transcripción del gen *CCDN1* aumentando su expresión en comparación a los efectos provocados por ambas proteínas de forma aislada
4. MacroH2A1.2 y MacroH2A2 inhiben transcripcionalmente a los promotores de VRK1 y ciclina D1 provocando por lo tanto parada del ciclo celular.
5. La inhibición de la progresión del ciclo celular por parte de las macrohistonas podría deberse a que el macrodominio presente en su estructura estaría impidiendo físicamente la interacción de factores de transcripción, como SOX2, evitando que éstos realizaran sus funciones transcripcionales.

## 7.BIBLIOGRAFÍA

1. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
2. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 225-36.

3. Hunter, T., *Oncoprotein networks*. Cell, 1997. **88**(3): p. 333-46.
4. Nezu, J., et al., *Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase*. Genomics, 1997. **45**(2): p. 327-31.
5. Lazo PA, V.F., Sevilla A, Valbuena A, Sanz-García M, Lopez-Sanchez I, Blanco S. (2007). "VRK1 (Vaccinia related kinase 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/VRK1ID43556ch14q32.html>
6. Valbuena, A., et al., *Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations*. Arch Biochem Biophys, 2007. **465**(1): p. 219-26.
7. Lopez-Sanchez, I., et al., *VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage*. FEBS Lett, 2014. **588**(5): p. 692-700.
8. Kang, T.H., et al., *Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8533-46.
9. Nichols, R.J., M.S. Wiebe, and P. Traktman, *The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(5): p. 2451-64.
10. Lopez-Sanchez, I., M. Sanz-Garcia, and P.A. Lazo, *Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1189-201.
11. Sanz-Garcia, M., et al., *Substrate profiling of human vaccinia-related kinases identifies coilin, a Cajal body nuclear protein, as a phosphorylation target with neurological implications*. J Proteomics, 2011. **75**(2): p. 548-60.
12. Lomanto LD, Ortiz OL, Bretón CO, Gómez AI, Mesa Vm. El ciclo celular. MEDUNAB 2003;6(16):21-29
13. Johnson, D.G. and C.L. Walker, *Cyclins and cell cycle checkpoints*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 295-312.
14. Valbuena, A., I. Lopez-Sanchez, and P.A. Lazo, *Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1642.
15. Kang, T.H., et al., *VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 18): p. 3035-41.
16. Wilson, M. and P. Koopman, *Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(4): p. 441-6.
17. Chen, Y., et al., *The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 17969-78.
18. Rodriguez-Pinilla, S.M., et al., *Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(4): p. 474-81.
19. Graham, V., et al., *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron, 2003. **39**(5): p. 749-65.
20. Buschbeck, M. and L. Di Croce, *Approaching the molecular and physiological function of macroH2A variants*. Epigenetics, 2010. **5**(2): p. 118-23.
21. Gamble, M.J., et al., *The histone variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin, but protects a subset of its target genes from silencing*. Genes Dev, 2010. **24**(1): p. 21-32.
22. Creppe, C., et al., *MacroH2A1 regulates the balance between self-renewal and differentiation commitment in embryonic and adult stem cells*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(8): p. 1442-52.
23. Buschbeck, M., et al., *The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1074-9.
24. Chakravarthy, S., et al., *Structural characterization of the histone variant macroH2A*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7616-24.
25. Angelov, D., et al., *The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling*. Mol Cell, 2003. **11**(4): p. 1033-41.

26. Kim, W., et al., *Macro histone H2A1.2 (macroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase.* J Biol Chem, 2012. **287**(8): p. 5278-89.