Universidad de Salamanca
Departamento de
Microbiología y Genética

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE CÁNCER

REGULACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ATF2 Y c-JUN POR LA QUINASA HUMANA VRK1

TESIS DOCTORAL

ANA SEVILLA HERNÁNDEZ

2006

D. PEDRO A. LAZO-ZBIKOWSKI, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (C.S.I.C.)

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Regulación de los factores de transcripción ATF2 y c-Jun por la quinasa humana VRK1” presentada por la licenciada Dña. ANA SEVILLA HERNÁNDEZ 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 14 de Diciembre 2005.

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski

Esta memoria ha sido realizada siendo **Ana Sevilla Hernández** beneficiaria de una beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C) del **Programa I3P** para la realización de la tesis doctoral (2001-2005).

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

- Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2000-0169, SAF2004-2900)
- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-PI02-0585)
- Fundación de Investigación Médica MM
- Junta de Castilla y León (CSI18-03, CSI0A05, SAN-SA01/04 y SAN-SA04/05)
- Fundación Memoria Samuel Solórzano Barruso.

INTRODUCCIÓN

1.- RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR. SEÑALES DE ESTRÉS CELULAR.

Las células presentan gran capacidad para responder a cambios físicos como variaciones en la osmolaridad, temperatura, pH, condiciones redox, radiaciones, estrés mecánico y también a cambios químicos del medio que las rodea entre los que se incluyen variaciones en la disponibilidad de nutrientes, presencia de factores de crecimiento, citoquinas y factores de adhesión a la matriz celular, etc. Todos estos cambios físicos y químicos controlan múltiples aspectos de la función celular como son la migración, proliferación, diferenciación y la muerte celular (Posas et al. 1998; Widmann et al. 1999; Chang et al. 2001; Kyriakis et al. 2001). La decisión que las células toman para llevar una respuesta adecuada frente a un determinado estímulo es crucial para su funcionamiento. Muchas rutas de transducción de señales cooperan en estos procesos favoreciendo una mejor adaptación al medio así como la supervivencia celular. Estudios recientes han reconocido que las proteínas quinasas activadas por señales mitogénicas (MAPKs-Mitogen Activated Protein Kinases) desempeñan una función reguladora importante ya que constituye uno de los mecanismos principales para controlar la transcripción génica en eucariotas en respuesta a diferentes tipos de señales (Seger et al. 1995).

2.- MAPKs EN MAMÍFEROS

Las quinasas activadas por mitógenos son componentes de rutas de señalización que se caracterizan por formar una agrupación de tres quinasas que se fosforilan de forma secuencial en una cascada de señalización (English et al. 1999). En concreto las MAPK en mamíferos son activadas por MAPKK específicas como son: MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 para las JNKs, y MEK5 para ERK5 mediante una doble fosforilación en un motivo

tripeptídico (Thr-Xaa-Tyr) localizado en el bucle de activación. Cada MAPKK, sin embargo, puede ser activada por más de una MAPKKK mediante una doble fosforilación en un motivo tripeptídico (Ser-Xaa-Thr), aumentando así la complejidad y diversidad de la señalización de las MAPKs. Éstas pueden activarse mediante mecanismos muy variados como pueden ser pequeñas proteínas de unión al GTP de las familias Ras y Rho o bien por otras quinasas relacionadas con la quinasa de levaduras Ste20 (Lewis et al. 1998; Kyriakis et al. 2001).

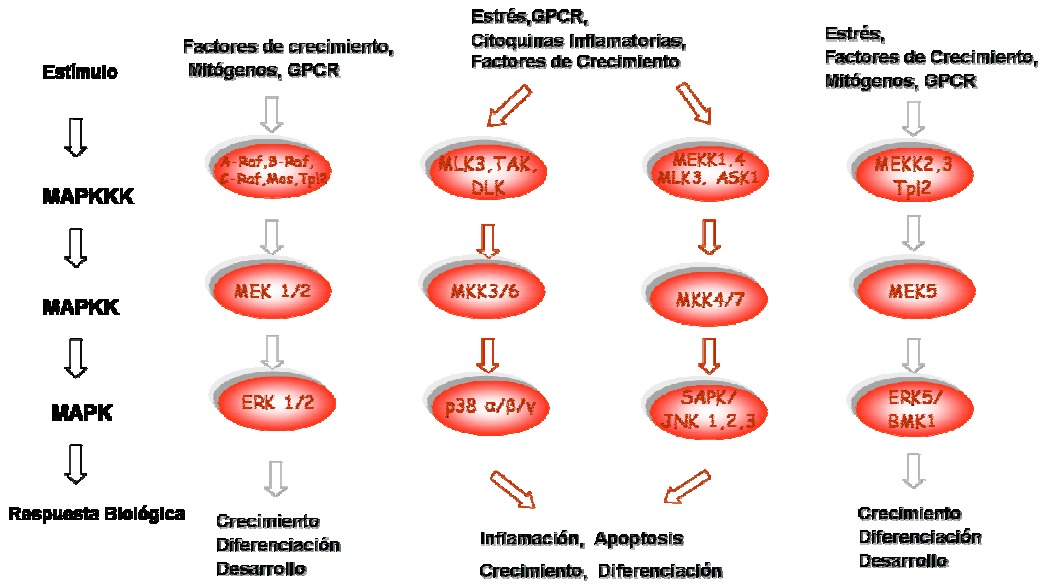


Figura 1: Cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.

En mamíferos se expresan al menos cuatro grupos de MAPK, éstas son las quinasas menos específicas del conjunto, siendo capaces de fosforilar a un gran número de proteínas (Jacobs et al. 1999). Cada grupo se regula de forma diferente: encontramos un primer grupo de quinasas reguladas por señales

extracelulares (ERK1 y ERK2) que son fundamentalmente activadas por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y hormonas. Dentro de las quinasas activadas por estímulos de estrés destacan los grupos de las quinasas de la familia p38 (p38α, p38β, p38γ, p38δ) y las quinasas amino terminales de c-Jun (JNK1, JNK2, JNK3) también conocidas como MAPK activadas por estrés (SAPKs) (Lewis et al. 1998; Kyriakis et al. 2001). Y finalmente el grupo de quinasas ERK5 el más recientemente identificado que van a estar activadas tanto por estímulos de estrés como por factores de crecimiento (Lewis et al. 1998; Kyriakis et al. 2001) (Figura 1).

La situación es bastante compleja con las cascadas de JNK y p38, las cuales responden a estímulos de estrés celular que pueden ser muy variados, pudiendo ser activadas por la sobreexpresión de al menos una docena de MAPKKK, cuyas funciones fisiológicas y especificidad aún se desconocen. Además en dicha cascada de señalización las quinasas no funcionan solas, ya que las proteínas fosfatasas representan una importante fuerza contraria controlando los niveles de proteínas fosforiladas en su estado estacionario. Existen varias proteínas fosfatasas, algunas como las MAPK fosfatasas que son específicas para ciertas MAPK (Keyse 1999; Camps et al. 2000; Keyse 2000).

Cuando se produce la activación de las MAPK, éstas pueden directamente fosforilar a otras proteínas que contengan un motivo fosfoaceptor en serina/treonina-prolina. La fosforilación puede tener lugar tanto en el citoplasma como en el núcleo siendo algunas de sus dianas factores de transcripción o co-rreguladores transcripcionales. Además las MAPK fosforilan y activan otras proteínas quinasas que están por debajo en la ruta de señalización. Entre estas proteínas se incluyen la quinasa ribosomal S6 (RSK), la quinasa que interacciona con las MAPK (MNK), la proteína quinasa activada por MAPK (MAPKAP) y la proteína quinasa activada por estrés y mitógenos (MSK). Algunas de estas quinasas también regulan la expresión de genes a través de la fosforilación de

histonas y proteínas reguladoras de la transcripción (Lewis et al. 1998; Kyriakis et al. 2001).

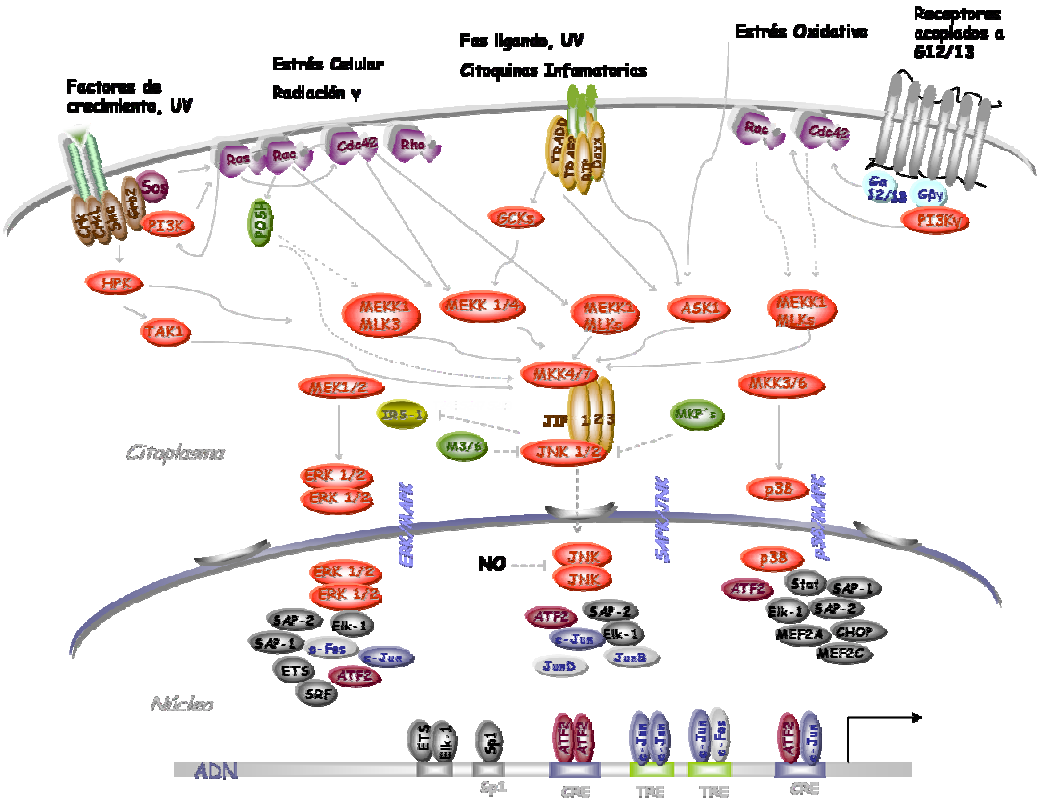


Figura 2: Rutas de señalización de las MAPKs. Las quinasas activadas por estrés activan complejas rutas de señalización que concluyen en el núcleo regulando la actividad transcripcional de diversos factores de transcripción como c-Jun, ATF2 y p53.

3.- ESPECIFICIDAD EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPKs Y SU FUNCIÓN

El control de los diversos procesos celulares en respuesta a una inmensa variedad de estímulos extracelulares por unas relativamente pocas MAPKs implica una considerable especificidad en la función y activación de las MAPKs.

Existen algunos mecanismos diferentes, aunque no exclusivos, que aseguran la especificidad en la activación de las MAPKs.

En levaduras, la proteína Ste funciona como una proteína de anclaje que organiza los tres componentes de la cascada de MAPKs que responden a feromona y sus activadores que están aguas arriba (Herskowitz 1995). Buscando proteínas de anclaje análogas en mamíferos encontramos la proteína JIP1, que organiza a JNK1/2, MKK7 y MLK1 en un complejo de señalización específico (Figura 3a) (Whitmarsh et al. 1998). Estas interacciones proteína-proteína juegan un papel crítico en la ruta de señalización de JNK. Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos visto que la quinasa VRK2A es capaz de fosforilar la parte carboxilo terminal de JIP1 mientras que la interacción proteína-proteína se produce por la región amino terminal (Blanco.S et al, enviado).

Un segundo mecanismo que asegura la activación específica de las MAPKs depende de interacciones físicas secuenciales entre los miembros de una cascada determinada (Xia et al. 1998). Por ejemplo, JNK1/2 está unida por su extremo amino terminal a MKK4, la cual a su vez también interacciona con el dominio catalítico de MEKK1. Cada una de estas interacciones está impedida por la activación de la quinasa que está aguas abajo (Figura 3b). Mientras que en las proteínas del complejo hay un aumento de la especificidad sacrificando la amplificación de la señal, las interacciones secuenciales proporcionan una amplificación de la señal sin sacrificar la especificidad (Xia et al. 1998). Ambos mecanismos pueden funcionar a la vez, conduciendo a una activación diferencial de la misma MAPK en respuesta a distintos estímulos.

Un tercer y más complejo mecanismo para la amplificación de la señal es el basado en la capacidad de las MAPKs de regular indirectamente la expresión, tanto de ligandos como de inhibidores, para los receptores de la superficie celular que interaccionan con las cascadas de las MAPKs (Wasserman et al. 1998). Estos bucles, tanto positivos como negativos, pueden generar patrones espaciales específicos en la activación de las MAPKs (Figura 3c).

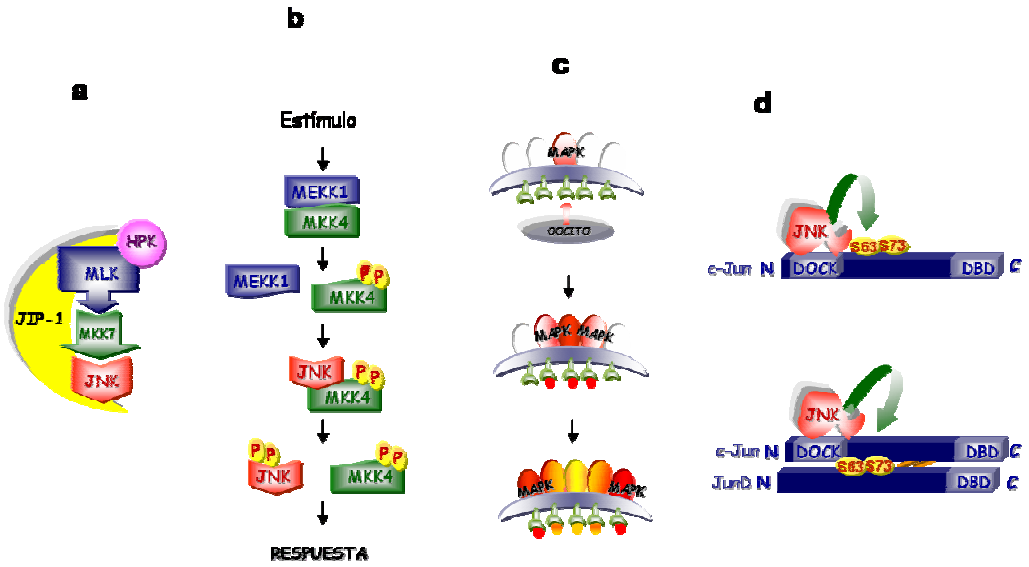


Figura 3: Mecanismos para generar especificidad en la activación y función de las MAPKs a) JIP actúa como una proteína de anclaje para la quinasa HPK-1, MLK1, MKK7 y JNK en un módulo de señalización específico. **b)** Interacción secuencial y específica entre los miembros de la cascada de las MAPKs. MEKK1 interacciona con la forma inactiva de MKK4 para formar el complejo MEKK1-MKK4. MEKK1 fosforila y activa MKK4 produciéndose la disociación del complejo. La quinasa MKK4 activa y libre, interacciona de forma específica con JNK. Una vez que JNK está activada, el complejo MKK4-JNK es disociado y JNK activa queda de nuevo libre para fosforilar a nuevos efectores. **c)** Patrón espacial específico de activación de MAPK mediante regulación autocrina positiva y negativa en los oocitos de *Drosophila*. **d)** La región de acoplamiento de c-Jun que interacciona con JNK determina la fosforilación específica en Ser 63 y Ser 73 por JNK. Un substrato carente de esta región, como es JunD, puede ser fosforilado por JNK mediante la unión por el dominio de unión al ADN de otra molécula de c-Jun.

Una vez activas, las MAPK necesitan encontrar sus dianas. Aunque es necesario limitar las fosforilaciones a substratos irrelevantes, también es importante que cada MAPK reconozca un número suficiente de substratos que le permita regular varios procesos. La completa especificidad está asegurada a través de un sitio de acoplamiento entre la quinasa y el substrato que favorece el reconocimiento del sitio fosfoaceptor por el bolsillo catalítico de la enzima. Como en un principio se describió para c-Jun, existe una pequeña secuencia que precede a los dos principales sitios fosfoaceptores, serina 63 y serina 73, que interacciona con JNK fuera de su bolsillo catalítico (Kallunki et al. 1996). Esta interacción determina la eficiencia en la fosforilación de c-Jun y la elección de los

sitios fosfoaceptores (Figura 3d). Interacciones similares implicando distintos sitios fosfoaceptores y sitios de acoplamiento determinan el reconocimiento de substrato por otras quinasas MAPK (Tanoue et al. 2000).

Además de estos cuatro mecanismos no debemos olvidar que la localización espacial de las moléculas de señalización condiciona considerablemente la especificidad en la transducción de la señal.

4.- FUNCIONES GENERALES DE LAS CASCADAS DE LAS MAPKs

4A.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

Una de las funciones más estudiadas de la señalización de las MAPKs es la regulación de la expresión génica en respuesta a estímulos extracelulares (Treisman 1996). Tal es el caso de JNK que fosforila fundamentalmente a c-Jun y así aumenta su actividad transcripcional sin que se afecte la unión al ADN (Kallunki et al. 1996). La proteína p38 también fosforila y aumenta la actividad de MEF2C y miembros relacionados con la familia (Han et al. 1997). En todos estos casos, las MAPKs funcionan dentro del núcleo y actúan sobre factores de transcripción que están previamente unidos al ADN. La mayoría de los factores de transcripción que están regulados por MAPKs son dímeros, y análisis estructurales indican que algunas MAPKs dimerizan para favorecer su activación (English et al. 1999).

4B.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL

Aunque los factores de transcripción son importantes dianas para las MAPKs, sólo parte del conjunto de MAPKs se transloca al núcleo mientras que la mayoría permanece en el citoplasma y otros compartimentos subcelulares. Por

consiguiente, las MAPKs también regulan la expresión de genes a través de mecanismos post-transcripcionales actuando sobre dianas citoplasmáticas. JNK por ejemplo, está implicada en la estabilización del ARN mensajero de IL-2 en células T activadas (Chen et al. 2000). También se han encontrado otras moléculas de ARN mensajero que se estabilizan en respuesta a la activación de p38 (Winzen et al. 1999; Lasa et al. 2000).

4C.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRADUCCIONAL

Las MAPKs también están implicadas en el control de la traducción de proteínas, pero en este caso al igual que en algunos casos de estabilización del ARN mensajero su acción está mediada por los efectores de quinasas MAPKAPK-2 y MNK1 (Kotlyarov et al. 1999; Winzen et al. 1999).

MNK1 fosforila el factor iniciador de la traducción 4e (eIF-4e), aumentando la interacción con el complejo cap unido al ARN mensajero, favoreciendo el ensamblaje en el polisoma (Pyronnet et al. 1999).

4D.- REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Las MAPKs también regulan la proliferación celular. ERK1/2 estimula la síntesis del ADN mediante la fosforilación de la carbamoil fosfatasa sintasa II, una enzima limitante en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina (Graves et al. 2000). Además, las proteínas ERK, probablemente a través de las MAPKAPKs como la RSK, promueven la progresión del ciclo celular mediante la inactivación de MYT1, una quinasa inhibidora del ciclo celular (Palmer et al. 1998). En las células T también se ha visto que, la ruta de señalización de JNK puede estimular proliferación mediante la inducción de la expresión de la interleucina-2 (Sabapathy et al. 1999).

4E.- CONTROL DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Desde hace tiempo, la activación de ERK1/2 se ha relacionado con la supervivencia celular, mientras que JNK y p38 se han relacionado con la inducción de la apoptosis (Xia et al. 1995). Esta dicotomía, sin embargo, es una simplificación, y el papel actual de cada cascada de señalización de las MAPKs está altamente relacionado con el tipo y el contexto celular. JNK1 y JNK2 son necesarias para la apoptosis inducida por luz ultravioleta en fibroblastos, en los cuales se ha sugerido que dichas quinasas activan vía c-Jun la maquinaria de apoptosis (Shaulian et al. 2000; Tournier et al. 2000). Por otro lado, en células expuestas a dosis fisiológicamente relevantes de radiación ultravioleta, c-Jun inducido por JNK estimula la reentrada al ciclo celular más que los procesos de apoptosis (Shaulian et al. 2000).

5.- INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE p53 Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPKs

La proteína p53 es una de las muchas proteínas susceptible de fosforilación por las MAPKs procedentes de varias cascadas de señalización.

La proteína supresora de tumores p53 es una proteína nuclear con una vida media muy corta que está regulada principalmente por modificaciones post-traduccionales. Tras un estímulo de estrés, como el daño al ADN y la activación oncogénica, la proteína p53 es modificada a través de múltiples modificaciones post-traduccionales, incluyéndose la fosforilación y la acetilación (Kastan et al. 1991; el-Deiry 1998; Vogelstein et al. 2000). Estas modificaciones estabilizan y activan la proteína. Una vez que p53 es activado, funciona como un factor de transcripción de varios genes que contienen los sitios de unión consenso para p53 en sus promotores (el-Deiry et al. 1992). La activación transcripcional de p53

desencadena la activación de un gran número de rutas de señalización en la célula que conducen a la parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN y angiogénesis.

5.1.- FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE p53 POR MAPK

La proteína humana p53 es una proteína de 393 aminoácidos que presenta cuatro dominios funcionales: un dominio de transactivación amino terminal, un dominio rico en prolinas, un dominio de unión al ADN y un dominio carboxilo terminal de tetramerización donde se encuentra la secuencia de localización nuclear (Figura 4).

Tras la exposición a estímulos de estrés se han descrito un gran número de quinasas capaces de fosforilar a p53 en varios residuos, entre ellas se incluyen, DNA-PK, Caseína quinasa I y II (CKI y CKII), quinasa activada por CDK (CAK), cdc2, cdk2 y la proteína quinasa C (PKC) (Bischoff et al. 1990; Baudier et al. 1992; Milne et al. 1992; Price et al. 1995; Knippschild et al. 1997; Shieh et al. 1997). Además de las quinasas ATM y ATR en respuesta a daño genotóxico (Lakin et al. 1999; Tibbetts et al. 1999).

Pero lo que resulta más interesante, es que las MAPKs, entre las que se incluyen ERKs, p38 y JNK también son capaces de fosforilar a p53 en respuesta a diferentes estímulos de estrés, y tal fosforilación puede desencadenar una respuesta mediada por p53 conduciendo a la parada del ciclo celular y apoptosis.

ERK1/2. La fosforilación de p53 por ERK ha sido caracterizada en numerosos sistemas experimentales. En células de ovario, ERK1/2 se ha visto que se requiere para la fosforilación de p53 en serina 15 y en la apoptosis inducida por cisplatino (Persons et al. 2000). Además en el sistema murino, ERK fosforila a p53 en las treoninas 73 y 83, una región rica en prolinas que contiene el dominio de transactivación de p53 (Milne et al. 1994).

p38. Un gran número de estudios avalan que p38 desempeña una función importante en la activación de p53. En queratinocitos humanos normales, el tratamiento con luz ultravioleta activa a p38, que a su vez fosforila a p53 en serina 15. Esta fosforilación conduce a una acumulación de p53 en el citoplasma y de esta forma se evita la entrada de p53 en el núcleo, proporcionando un mecanismo protector contra la muerte celular inducida por luz ultravioleta (Chouinard et al. 2002).

La proteína p38 también es capaz de fosforilar a p53 en muchos otros sitios adicionales entre los que se incluye las serinas 20, 33, 37 y 46. Por ejemplo, tras un choque osmótico, p38 fosforila a p53 en serina 33 con la subsiguiente parada del ciclo celular en G_1 (Kishi et al. 2001). Curiosamente, la fosforilación de p53 en serina 33 por p38 también está relacionada con la respuesta de apoptosis inducida por drogas anticancerígenas (Sanchez-Prieto et al. 2000). Finalmente, se ha visto que p38 fosforila a p53 en la serina 389 en respuesta a la radiación de luz ultravioleta (Huang et al. 1999).

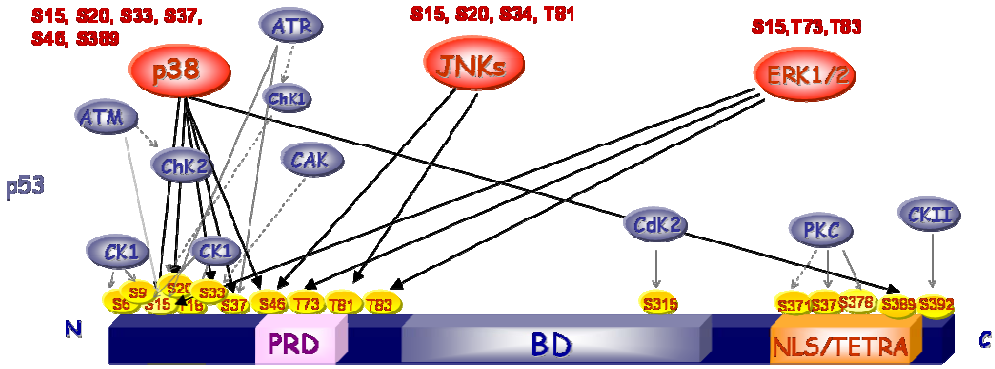


Figura 4: Estructura de la proteína p53. Dominios, sitios de fosforilación y quinasas reguladoras de su actividad. PRD (Dominio rico en prolinas), BD (Dominio de unión al ADN), NLS (Secuencia de localización nuclear), TETRA (Dominio de tetramerización).

JNK. Las proteínas JNK están codificadas por tres genes. El gen *Jnk1* y el gen *Jnk2* se expresan de forma ubicua. Por el contrario, el gen *Jnk3* presenta un patrón de expresión más limitado y está en buena parte restringido al cerebro, corazón y testículos. Los transcritos derivados de estos tres genes codifican proteínas dando lugar a las isoformas de 46kDa y 55kDa (Gupta et al. 1996). El significado funcional de las vías, fruto del procesamiento alternativo, condiciona la especificidad de substrato de las diferentes isoformas de JNK mediante la modificación en la capacidad de JNK para interaccionar con el sitio de acoplamiento presente en los substratos (Gupta et al. 1996). Por ejemplo, c-Jun es preferentemente unido y fosforilado por JNK1, mientras que ATF2 es preferentemente unido y fosforilado por JNK2 (Kallunki et al. 1994; Sluss et al. 1994).

JNK una vez activada, fosforila un gran número de substratos, conduciendo a la activación de numerosas rutas de señalización (Pearson et al. 2001) entre las que se incluye la vía de p53. Tras la radiación de luz ultravioleta, JNK está directamente relacionada con la fosforilación de p53 en la serina 20, resultando un aumento en la actividad transcripcional dependiente de p53 (She et al. 2002).En condiciones de estrés oxidativo, las JNKs pueden fosforilar a p53 en serina 15 (Cheng et al. 2003). En respuesta a daño al ADN y agentes inductores de estrés, JNK fosforila a p53 en treonina 81

Además de la fosforilación de p53 por daño al ADN, JNK ha sido propuesta como quinasa que regula la estabilidad de p53 en células no sometidas a estrés, mediante un mecanismo independiente de Mdm-2 en el cual MEKK1, el regulador aguas arriba de JNK, es capaz de regular la estabilidad de p53 (Fuchs et al. 1998b). Por tanto, al igual que p38, las JNKs funcionan como quinasas aguas arriba de p53 y son capaces de fosforilarlo en varios residuos en respuesta a estrés celular. Como consecuencia de esta acción se estabiliza p53 y se activa su actividad transcripcional. Este efecto también lo hemos observado con nuestra quinasa VRK1 objeto de estudio. Experimentos *in vitro* demuestran que VRK1

fosforila a p53 en el residuo de treonina 18 impidiendo la unión con Mdm2. La estabilización de p53 por VRK1 aumenta la actividad transcripcional dependiente de p53 (Vega et al. 2004).

Estos datos fueron el punto de partida hacia la búsqueda de nuevos substratos para la quinasa VRK1. Como VRK1 parecía estar implicada en respuesta a estrés celular ya que era capaz de fosforilar a p53 aumentando su actividad transcripcional, decidimos realizar un estudio más exhaustivo de diversos factores de transcripción relacionados con la respuesta a estrés celular, así como profundizar en las características de la quinasa VRK1.

6.- El QUINOMA HUMANO. FAMILIA DE QUINASAS VRK.

Tras la secuenciación del genoma humano, el grupo de Manning decidió realizar un estudio de todas las quinasas humanas a partir de las bases de datos genómicas disponibles, los ADNc y las EST (Expressed Sequence Tags) introducidas en el "GenBank". El fruto de su trabajo dió lugar al famoso "Quinoma humano" en el cual se encuentran 518 putativas quinasas clasificadas filogenéticamente en 8 grupos en función de la similitud de secuencia de sus dominios catalíticos (Manning et al. 2002). Cada uno de estos grupos se encuentra a su vez dividido en varias subfamilias (Figura 5A).

En esta clasificación, dentro del grupo de las caseína quinasas de tipo I (CKI) se encuentra la familia de quinasas VRK (Figura 5B). Ésta, es una familia distantemente relacionada en secuencia con las caseína quinasas, sin embargo en su dominio catalítico comparte un gran parecido con ellas (Lopez-Borges et al. 2000).

La familia VRK en humanos está constituida por tres miembros: VRK1, VRK2 (con dos isoformas distintas A y B, generadas por maduración alternativa de su ARN mensajero) y VRK3, además de un pseudo gen de VRK3 del que no se ha detectado expresión alguna (Manning et al. 2002; Nichols et al. 2004).

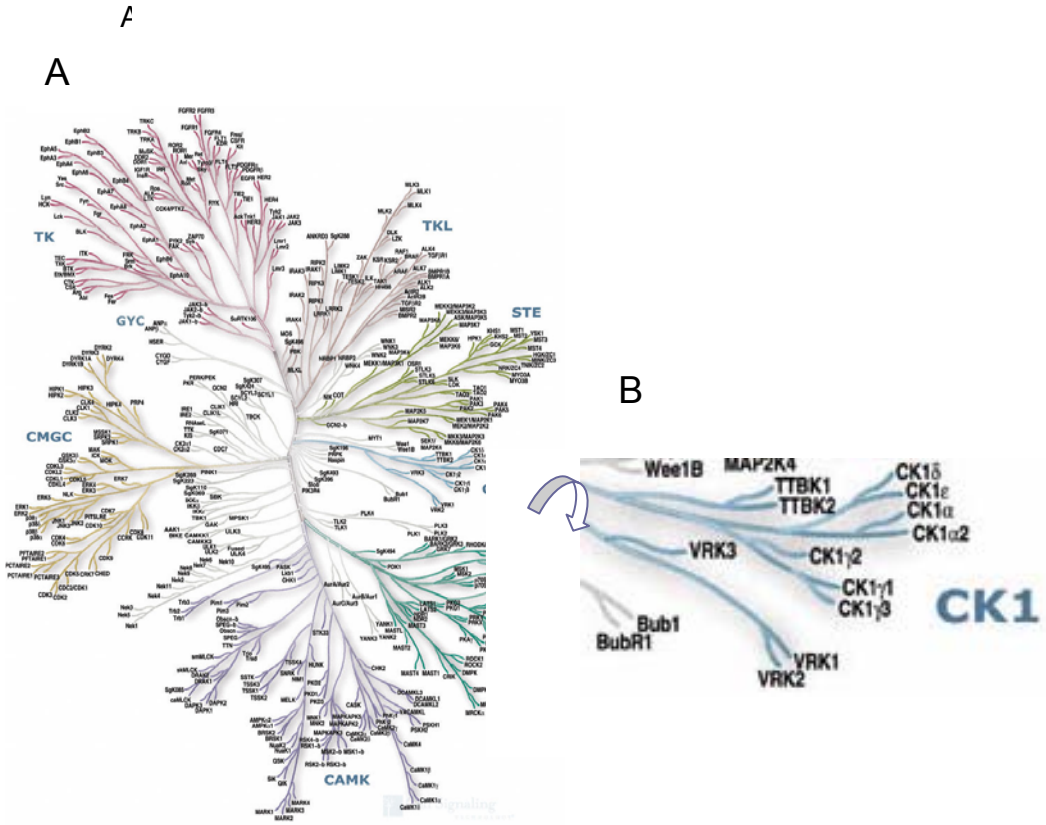


Figura 5: VRK1 en el quinoma humano. A) Clasificación en grupos de las quinasas humanas (Manning et al. 2002). **B)** Familia de las caseína quinasa tipo I dentro del quinoma humano.

En 1997, el grupo de Nezu aisló 2 cDNA humanos cuya secuencia de aminoácidos compartía un 39% y un 36% de similitud respectivamente con la secuencia de la quinasa del virus *Vaccinia* B1R y de ahí surgió la denominación de VRK1 y VRK2 del inglés (*Vaccinia-Related Kinase*) (Nezu et al. 1997).

La proteína B1R es una quinasa de expresión temprana durante la infección viral y con un papel esencial en la replicación vírica (Banham et al. 1992; Lin et al. 1992).

Las proteínas VRK1 y VRK2 contienen un dominio carboxilo terminal que determina su localización intracelular. VRK1 posee una región básica de localización nuclear (NLS), que hace que la proteína sea mayoritariamente

nuclear. En el extremo carboxilo terminal de VRK2 (isoforma A) hemos encontrado una región que es altamente hidrofóbica haciendo que esta proteína esté asociada a la membrana nuclear y que colocalice con marcadores del retículo endoplasmático. Por el contrario la isoforma VRK2B carece de esta región transmembrana y presenta una localización dispersa por toda la célula (Blanco.S et al, enviado). Finalmente en relación a VRK3, en su extremo amino terminal, contiene una secuencia de localización nuclear bipartita que dirige la proteína hacia el núcleo (Nichols et al. 2004) (Figura 6).

Figura 6: Estructura de las quinasas VRK. Se muestran alineadas según homología de secuencia de aminoácidos. ATP (Sitio de unión al ATP), KD (Dominio quinasa activo), KDD (Dominio quinasa degenerado), TR (Región transmembrana), NLS (Secuencia de localización nuclear).

Los datos de expresión de los ARN mensajeros tanto de VRK1 como de VRK2 reflejaron niveles de expresión especialmente altos en tejidos con alta tasa de proliferación celular como hígado fetal, testículos y timo fetal para VRK1 además del páncreas, músculo esquelético, corazón y leucocitos de sangre periférica para VRK2. También se encontraron niveles de expresión altos en varias líneas celulares cancerosas como la de carcinoma de pulmón A549,

adenocarcinoma colorectal SW480, carcinoma de Burkitt Raji, leucemia promielocítica HL-60 o el carcinoma de cérvix HeLa S3 (Nezu et al. 1997). Por todas estas características se postuló que las quinasas VRK pudieran estar involucradas en la regulación del crecimiento celular con un posible papel en tumorigénesis. Posteriormente el grupo de Traktman realizó un análisis comparativo de todas las proteínas de la familia VRK de mamíferos (Nichols et al. 2004). Tanto VRK1, VRK2 como VRK3 se expresan en todos los tejidos analizados en humanos y en ratón pero, sin embargo, sólo las dos primeras parecen tener actividad enzimática, puesto que VRK3 posee sustituciones de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de estas proteínas (Nichols et al. 2004).

Existen homólogos de los genes VRK en organismos modelo. En el nematodo *Cahenorabditis elegans* existe un homólogo a VRK1 que es el gen *F28B12.3*, localizado en el cromosoma 2, cuyo ortólogo en el también nematodo modelo *Cahenorabditis briggsae* es el gen *CBG02540* y que codifica para una proteína quinasa de 610 aminoácidos. Su función es desconocida hasta el momento pero los datos de inhibición por ARN de interferencia muestran un fenotipo letal embrionario con diversos fallos en las divisiones celulares del embrión temprano (Kamath et al. 2003) y el fenotipo postembrionario es de crecimiento lento (Simmer et al. 2003). Estos datos nos hacen pensar que posiblemente esté involucrado en procesos esenciales de la división celular.

En *Drosophila melanogaster* existe un gen relacionado con la familia de las VRK, es el gen *CG6386* que codifica para dos transcritos diferentes: *CG6386-RA*, *CG6386-RB* (Morrison et al. 2000). También existen homólogos para los tres miembros de la familia en el anfibio *Xenopus laveis,* mientras que en el pez cebra *Danio rerio* sólo se han encontrado homólogos de VRK1 y VRK2.

La teoría propuesta es que esta familia de proteínas apareció en organismos tan simples como los nematodos y de ahí se expandió en la evolución hasta organismos de organización superior desde la mosca a los

humanos. No se han descrito miembros homólogos de la familia en levaduras, pero sí se encuentran proteínas relacionadas, posiblemente ancestros de las actuales VRK, de las que pudieran derivar éstas. Este es el caso del gen *hrr25/YPL204W* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para una isoforma de caseína quinasa de tipo I implicada hipotéticamente en daño al ADN y división celular (Ho et al. 1997). El mutante nulo para esta proteína muestra también un crecimiento lento además de otras anormalidades en el ciclo celular e hipersensibilidad al daño en el ADN. Su ortólogo en *Schizosaccharomyces pombe* es el gen *hhp1*, un gen implicado en reparación del ADN tras irradiación gamma (Dhillon et al. 1994).

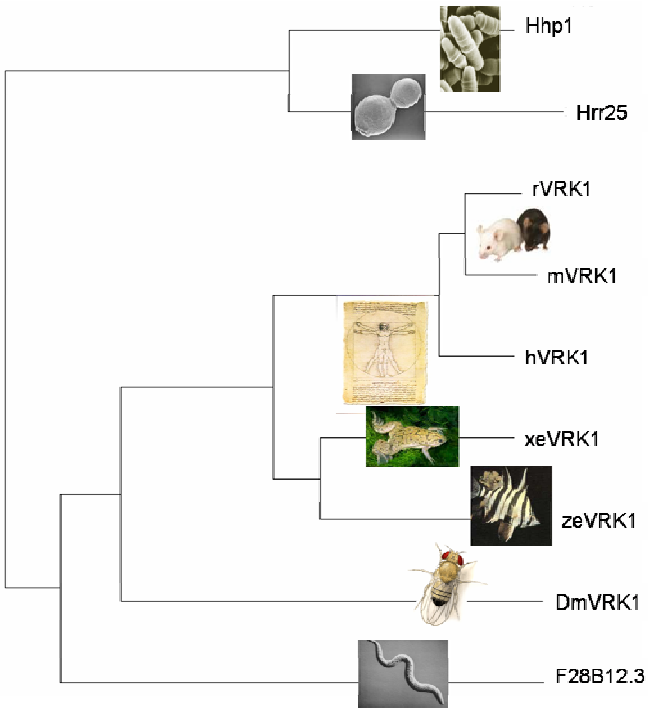


Figura 7: Relaciones filogenéticas entre las proteínas VRK1. humana (hVRK1), de ratón (mVRK1), de rata (rVRK1), de pez cebra *Danio rerio* (zeVRK1), de *Xenopus lavéis* (XeVRK1), *Drosophila melanogaster* (DmVRK1), su homólogo en *Cahenorabditis elegans* F28B12.3. y proteínas relacionadas en levaduras Hrr25 de *Saccharomyces cerevisiae y* Hhp1 de *Schizosaccharomyces pombe.*

También hay homólogos de estas quinasas en rata y ratón. En rata (*Rattus norvegicus*) existen homólogos para los tres miembros de la familia. Para VRK1 el gen es el *LOC362779*. En ratón (*Mus musculus*) también existen VRK1, 2 y 3 (Nichols et al. 2004).

6.1.-CARACTERÍSTICAS DE VRK1 (*Vaccinia-related kinase 1*)

La quinasa VRK1 fue descrita originariamente, junto con VRK2, por su similitud con la quinasa viral B1R (Nezu et al. 1997). La expresión ectópica de VRK1 es capaz de complementar parcialmente la deficiencia en la replicación del ADN del virus *Vaccinia* mutante termosensible ts2 afectado en la quinasa B1R (Boyle et al. 2004). La parte amino terminal de VRK1, en la que se encuentra su dominio catalítico, tiene similitud con el dominio catalítico de la caseína quinasa de tipo 1δ, mientras el dominio carboxilo terminal no presenta homología con ninguna otra proteína conocida, e incluso difiere bastante de la parte carboxilo terminal de las otras quinasas de la familia (Lopez-Borges et al. 2000). Teniendo en cuenta la secuencia transcrita completa, VRK1 posee una identidad de secuencia del 44% con VRK2 mientras que con VRK3 es del 33%. Si atendemos sólo al dominio catalítico las identidades de secuencia son del 53% entre VRK1 y VRK2 y del 32 % entre VRK1 y VRK3 (Figura 8).

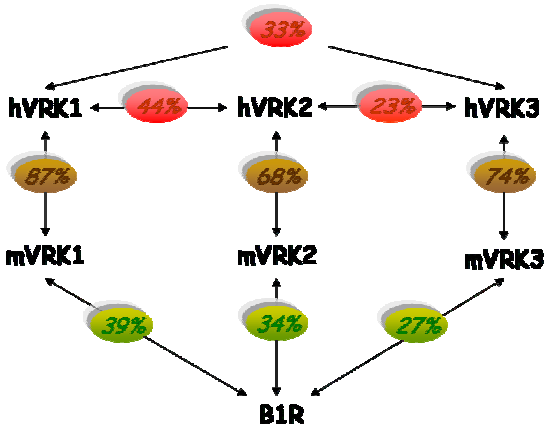


Figura 8: Esquema de los porcentajes de identidad entre las secuencias codificantes completas o el dominio catalítico de B1R con las familia de quinasas VRK.

VRK1 presenta una alta auto-fosforilación tanto en residuos de serina como de treonina, propiedad que comparte con las caseína quinasas (Flotow et al. 1990). Aunque hay que destacar que VRK1 presenta una actividad quinasa propia, ya que fosforila tanto a proteínas ácidas (fosvitína y caseína) como básicas (proteína básica de mielina "MBP" e histona 2b). En cuanto a su actividad bioquímica, presenta una dependencia por cationes divalentes como Mn^{+2}, Mg^{+2} y Zn^{+2} y una mayor afinidad por el $MnCl_2$ (K_m de 0.6 mM) que por el $MgCl_2$ (K_m de 2.8 mM). Otra diferencia con las caseína quinasas es que, al contrario que éstas, VRK1 es capaz de usar GTP como donador de fosfato aunque con una K_m de 220 μM frente a una K_m de 50 μM para el ATP (Barcia et al. 2002).

La proteína VRK1 de ratón fue descrita con anterioridad como 51PK en referencia a su peso molecular (Zelko et al. 1998). Posee una homología con la proteína VRK1 humana del 87% (92% entre sus dominios catalíticos). Esta es una quinasa exclusivamente nuclear que muestra una extensa auto-fosforilación en residuos de serina. Su ARN mensajero se ha encontrado expresado en tres formas alternativas (carentes dos de ellas de uno o dos exones finales respectivamente) y en varios tejidos distintos, con altos niveles en testículos, bazo, pulmón e hígado (Zelko et al. 1998; Nichols et al. 2004).

VRK1 también tiene una homología del 86% con la secuencia de ADN de VRK1 de rata y 41% y 33% con la secuencia de aminoácidos de las proteínas homologas en *D. melanogaster* y *C. elegans* respectivamente (según "GenCard for gene VRK1", Weizmann Institute of Science, 2003).

Como substratos de VRK1 *in vitro* se han encontrado hasta ahora diversos factores de transcripción como p53, ATF2 (Sevilla et al. 2004b) y c-Jun (Sevilla et al. 2004a) todos ellos involucrados en la respuesta a estés celular. VRK1 fosforila a p53 específicamente en el residuo treonina 18, en el dominio amino terminal de la molécula (Lopez-Borges et al. 2000). De la fosforilación de ATF2 y c-Jun por la quinasa VRK1 hablaremos más en detalle en apartados posteriores ya que constituye el tema central del presente trabajo.

Hasta el momento nada es conocido en cuanto a la regulación de la actividad de la quinasa o su posible estimulación. Tan sólo disponemos de datos de activación transcripcional a través de “arrays” de ADN. Así, se ha descrito a VRK1 como un gen regulado positivamente por el factor de transcripción E2F y negativamente por p16 y pRB, situándolo como un gen diana en la vía $p16^{INK4A}$-pRB-E2F (van Dam et al. 2001). También se ha encontrado sobre-expresado en respuesta a la expresión del proto-oncogén *c-myc* en linfocitos B (Schuhmacher et al. 2001; Shiio et al. 2003).

Existen datos en la bibliografía sobre pérdidas de heterocigosidad en marcadores anónimos flanqueando al gen de VRK1 por tanto sugiriendo la posible presencia de un supresor de tumores. Éstos se han encontrado en neuroblastomas (Hagmeyer et al. 1995), carcinomas nasofaríngeos y colorectales (Mutirangura et al. 1998; Bando et al. 1999) y en la crisis blástica de leucemias mielocíticas agudas (Sercan et al. 2000).

7.- REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

En respuesta a alteraciones en el entorno extracelular, las rutas de transducción de señales por medio de fosforilaciones y desfosforilaciones terminan actuando sobre factores de transcripción, co-rreguladores transcripcionales y factores que modifican la cromatina para favorecer la programación de la expresión de genes que dan como resultado cambios apropiados en el comportamiento celular (Whitmarsh et al. 2000; Yang et al. 2003). La fosforilación y desfosforilación de proteínas puede directamente regular diferentes aspectos de la funcion de los factores de transcripción, incluyéndose la localización celular, la estabilidad de la proteína, las interacciones proteína-proteína o proteína-ADN.

7.1.- LOCALIZACIÓN INTRACELULAR

Muchos factores de transcripción residen permanentemente en el núcleo pero otros transitan entre el citoplasma y el núcleo. Las rutas de señalización de las MAPK pueden tanto estimular la translocación de los factores de transcripción del citoplasma al núcleo para favorecer su función o contrariamente, estimular la salida del factor de transcripción del núcleo favoreciendo su inactivación. El mecanismo por el cual se modula esta función es por fosforilación o desfosforilación del factor de transcripción que puede directamente regular el acceso a las secuencias de localización nuclear (NLS) o las secuencias de exportación nuclear (NES) mediante el enmascaramiento o desenmascaramiento de las secuencias en los factores de transcripción (Hood et al. 1999) (Figura 9).

7.2.- CONTROL DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Un segundo mecanismo importante para regular las funciones de los factores de transcripción es controlar la cantidad de factor de transcripción. Esto puede conseguirse tanto controlando la expresión transcripcional del factor como regulando la estabilidad de las proteínas. Las MAPK regulan la expresión de algunos factores de transcripción, como es el caso de los genes que codifican para los factores de transcripción c-Jun y c-Fos que forman el factor AP-1 (Whitmarsh et al. 1996). Por ejemplo, JNK, ERK5 e isoformas de p38 se ha visto que están implicadas en la regulación del promotor de *c-jun* dependiendo del estímulo (Han et al. 1997; Kato et al. 1997; Marinissen et al. 1999; Marinissen et al. 2001). C-Jun también se une a su propio promotor formando heterodímeros con ATF2, formando así un bucle de autorregulación positivo (Whitmarsh et al. 1996).

La fosforilación de los factores de transcripción puede también afectar a su estabilidad regulando la unión covalente de la ubiquitina a los residuos de lisina. La ubiquitina marca a las proteínas mediante un complejo enzimático formado por tres proteínas (E1, E2 y E3) y las proteínas ubiquitinadas son degradadas por el complejo 26S del proteosoma. Se ha demostrado que la unión de JNK inactivada a varios de los factores de transcripción entre los que se incluye c-Jun, JunB, ATF2 y p53 marca a los mismos para su ubiquitinación y degradación (Fuchs et al. 1997; Musti et al. 1997; Fuchs et al. 1998a). Por el contrario cuando JNK está activada fosforila a estos factores de transcripción protegiéndoles de su degradación y con ello contribuye a promover su actividad transcripcional (Fuchs et al. 1997; Musti et al. 1997; Fuchs et al. 1998a). El mecanismo exacto por el cual JNK inactivada favorece la ubiquitinación aún no está claro.

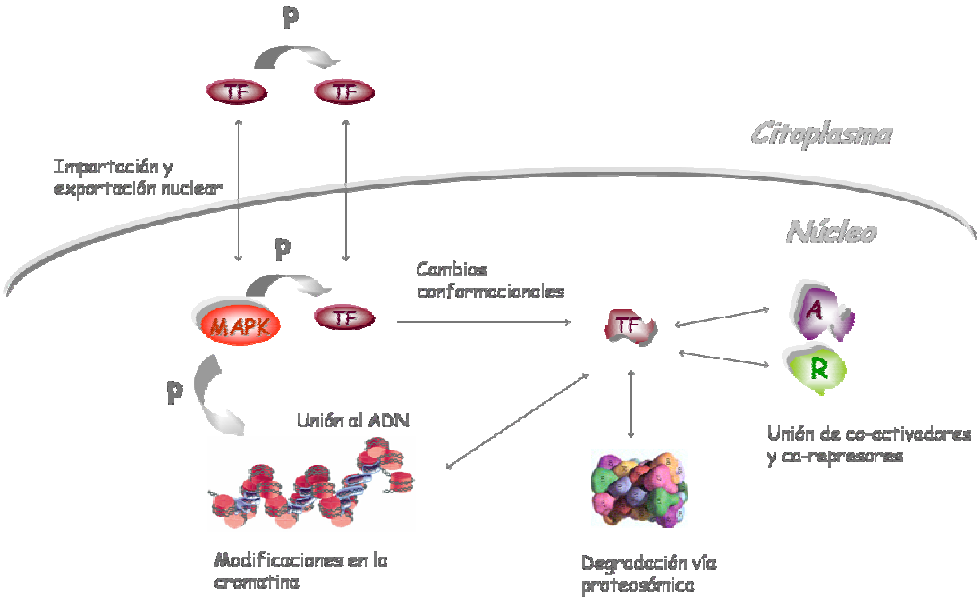


Figura 9: Las rutas de señalización de las MAPKs pueden regular múltiples aspectos de la transcripción. Las MAPKs pueden fosforilar a los factores de transcripción y regular su entrada o salida del núcleo. Una vez fosforilados, los factores pueden cambiar su conformación condicionando su capacidad de unión al ADN o bien las interacciones con co-activadores o co-represores. Estos co-activadores y co-represores así como componentes que modelan la cromatina, pueden también estar regulados por las cascadas de las MAPKs. En algunos casos la fosforilación del factor de transcripción modula su estabilidad. Las MAPKs pueden por tanto regular múltiples aspectos en un mismo promotor de un gen.

7.3.- REGULACIÓN DEL LA UNIÓN AL ADN

La unión de los factores de transcripción a los promotores de los genes mediante fosforilación puede ser una regulación tanto positiva como negativa. Por ejemplo, el dominio POU del factor de transcripcion TCFβ1 es fosforilado por JNK conduciendo a un aumento en la unión al ADN (Kasibhatla et al. 1999) mientras que en respuesta a factores de crecimiento el factor de transcripción ribosomal UBF es fosforilado en el dominio de unión al ADN por la quinasa ERK impidiendo su interacción con el ADN (Stefanovsky et al. 2001). Existe otra alternativa por la cual la fosforilación estaría favoreciendo de forma indirecta la unión al ADN. La fosforilación en el dominio de transactivación (amino terminal) de c-Jun por JNK aumenta la unión al ADN porque favorece la desfosforilación en las sitios próximos al extremo carboxilo terminal del dominio de unión al ADN, que cuando están fosforilados impiden la unión al ADN (Papavassiliou et al. 1995).

7.4.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

La mayoría de los factores de transcripción presentan dominios de transactivación dependientes de fosforilación TAD (Transcriptional Activation Domain), y en muy pocos casos, dominios que repriman la actividad transcripcional dependientes de fosforilación. El mecanismo exacto por el cual la fosforilación de estos dominios regula la actividad transcripcional no se conoce mucho, pero es muy probable que la fosforilación module diversos aspectos de la actividad intrínseca del factor como su afinidad por co-activadores, co-rrepresores o la maquinaria general de transcripción. Esto puede ocurrir por la fosforilación directa de residuos que bloqueen interacciones o indirectamente que la fosforilación induzca un cambio conformacional que desenmascare o enmascare superficies de unión.

El ejemplo mejor estudiado en el que una fosforilación favorece la interacción del factor de transcripción con un cofactor ocurre con CREB. Donde CREB fosforilado recluta a CBP y p300 que pueden actuar como puente para la ARN polimerasa II en la formación del complejo de iniciación de la transcripción.

Además, otro factor a tener en cuenta es la capacidad de las cascadas de las MAPKs para actuar sobre proteínas nucleosomales en genes inducibles. Un caso ilustrativo es la fosforilación de la histona H3 y HMG4 de forma concomitante con la inducción de genes tempranos (IE) a través de las cascadas de señalización de ERK y p38 (Thomson et al. 1999). El descubrimiento de la fosforilación de proteínas nucleosomales por las quinasas MSK1 y MSK2 proporciona el primer punto de enlace entre las cascadas de fosforilación y las modificaciones de la cromatina durante la inducción de genes (Thomson et al. 1999; Clayton et al. 2003). Sin embargo, también existen otras rutas por las cuales las cascadas de las MAPK indirectamente pueden causar modificaciones nucleosomales en los genes inducidos, por ejemplo promoviendo la asociación de histona acetil transferasas (HATs) con factores de transcripción de forma dependiente de fosforilación (Mayr et al. 2001a; Yang et al. 2003). Como es el caso de ATF2, donde la actividad intrínseca HAT de ATF2 sobre las histonas H2B y H4 está aumentada en respuesta a la luz ultravioleta debido a la fosforilación en el dominio de transactivación de ATF2 por las quinasas JNK y/o p38 (Kawasaki et al. 2000).

8.- EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AP-1.

El factor de transcripción AP-1 (Activator protein 1) es un complejo dimérico que comprende miembros de las familias de proteínas JUN, FOS, ATF (Activating Transcription Factor) y MAF (Musculoaponeurotic fibrosarcoma). El complejo puede por ello formarse a partir de diferentes combinaciones de heterodímeros y

homodímeros, y va a ser dicha combinación la que determine el conjunto de genes regulados por AP-1 (Chinenov et al. 2001; Vogt 2002).

Las proteínas AP-1 se conocen como proteínas básicas de cremalleras de leucina (bZip) porque dimerizan a través de un motivo de cremalleras de leucina y contienen un dominio básico para la interacción con el esqueleto del ADN. La estructura canónica del dímero consiste en dos hélices α paralelas que forman una espiral dentro de otra espiral. La característica típica de esta estructura es la repetición periódica de una leucina cada siete residuos en cada una de las hélices α. En el dímero las leucinas de ambas proteínas se alinean e interaccionan mediante puentes hidrofóbicos y los puentes salinos son los que estabilizan la interacción (Gentz et al. 1989; O'Shea et al. 1989; O'Shea et al. 1992).

Las proteínas AP-1 más importantes en mamíferos son c-Jun y c-Fos. Éstas proteínas, fueron en un principio identificadas como oncoproteínas virales v-Jun y v-Fos en el virus del sarcoma aviar 17 y en el virus del osteosarcoma Finkel-Biskis-Jinkis, respectivamente (Vogt 2002). C-Jun presenta un homólogo en levaduras, la proteína Gcn4, que puede también formar dímeros para regular la expresión génica en este caso de enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos. La secuencia a la que se une AP-1 es TGA(C/G)TCA, muy similar a la de GCN4, ATGA(C/G)TCAT. Gcn4 y AP-1 reconocen el mismo elemento de respuesta en el ADN, el elemento TRE (**T**PA **R**esponse **E**lement) llamado así porque su expresión es fuertemente inducida por el promotor de tumores 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Este elemento se identificó por primera vez en el promotor del gen de la *metalotioneína I* y en el virus de mono 40 (*SV40*) (Angel et al. 1991). Pero además de los promotores de tumores, la unión del complejo AP-1 a la secuencia TRE del ADN también va a estar inducida por factores de crecimiento, citoquinas y oncoproteínas, los cuales están relacionados con procesos de proliferación, supervivencia, diferenciación y transformación celular (Angel et al. 1991).

Con respecto a c-Fos, aunque ya en 1984 se había descrito que la expresión de *c-fos* era inducida de manera rápida y transitoria por factores de crecimiento, no fue incluida en la familia hasta 1988 cuando varios laboratorios demostraron que la proteína c-Fos se unía a secuencias reguladoras que coincidían con las del factor AP-1, y posteriormente que c-Fos y otras proteínas relacionadas se unían de hecho formando dímeros con Jun, JunB y JunD. Así, se pudo comprobar la existencia de dos familias de genes: la familia *jun,* formada por *c-jun*, *jun*B y *jun*D; y la familia *fos*, que incluye a *c-fos*, *fosB*, *fra*-1 y *fra*-2. El factor AP-1 está compuesto por homodímeros formados por dos moléculas de la familia Jun o heterodímeros formados por una proteína de la familia Fos y otra de la familia de Jun. No se forman dímeros entre proteínas de la familia Fos (O'Shea et al. 1989).

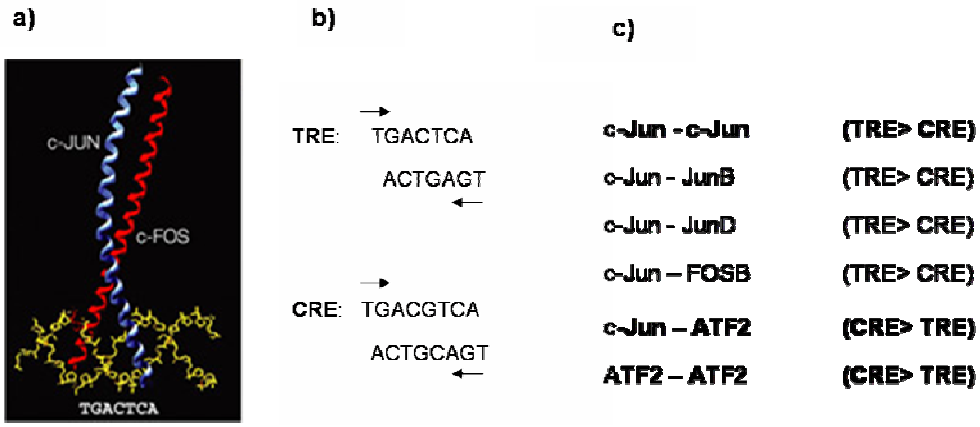


Figura 10: El factor de transcripción AP-1. a) El dominio de cremalleras de leucina y el dominio básico adyacente forman una X entre las dos hélices α en el complejo AP-1, uniéndose al esqueleto de ADN (Glover et al. 1995) **b)** Secuencias de los elementos de respuesta TRE (Elemento de Respuesta a TPA) y CRE (Elemento de Respuesta a AMPc. **c)** Combinación de homo y heterodímeros y elementos de respuesta a los que se une.

Además de unirse a las secuencias ya mencionadas, existe un heterodímero entre c-Jun y otro factor de transcripción llamado ATF2 que es

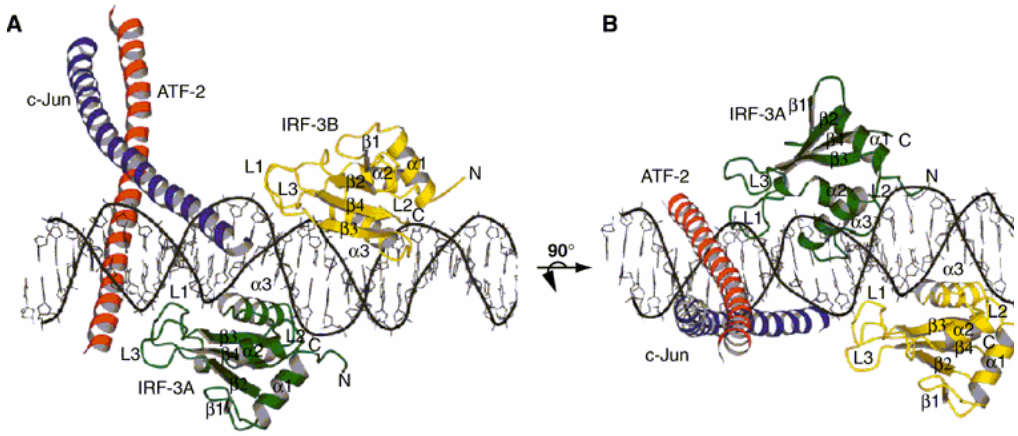
capaz de unirse a otra secuencia muy similar, TGACGTCA, análoga al elemento de respuesta que media la inducción de genes por el AMP cíclico denominado CRE (**C**yclic AMP **R**esponse **E**lement). Esto relaciona a c-Jun con la acción de múltiples hormonas que actúan elevando los niveles de este segundo mensajero en las células (Benbrook et al. 1990; Ivashkiv et al. 1990; Hai et al. 1991).

8.1.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEJO AP-1

En relación con el complejo AP-1 estudiado en apartados anteriores vemos que curiosamente, JNK presenta la capacidad de fosforilar a varias proteínas de la familia AP-1 entre las que se incluyen c-Jun, JunB, JunD y ATF2 (Gupta et al. 1995; Livingstone et al. 1995; van Dam et al. 1995; Ip et al. 1998). En cada uno de los casos los sitios de fosforilación corresponden a motivos de serina/treonina-prolina localizados en el dominio de activación del factor de transcripción en cuestión. El mecanismo que explica la regulación de la transcripción de AP-1 dependiente de JNK aún no está totalmente claro, pero se ha propuesto que CBP y p300 pudieran ejercer una función como cofactores (Arias et al. 1994). Procesos dependientes de JNK adicionales pudieran también estar contribuyendo a la regulación de AP-1. De modo, que JNK pudiera regular la actividad intrínseca histona acetil transferasa de ATF2 (Kawasaki et al. 2000) y también pudiera regular la degradación mediada por la ubiquitina de las proteínas AP-1 (Fuchs et al. 1998c).

En cualquier caso JNK parece estar jugando un papel crítico en la regulación transcripcional de AP-1. Esta conclusión está avalada por análisis genéticos de c-Jun y JNK en *Drosophila* y por el análisis de la actividad transcripcional de AP-1 en células de ratón que presentan alterados genes que codifican para componentes de la vía de señalización de JNK (Ip et al. 1998). JNK parece ser esencial para la actividad de AP-1 en respuesta a estrés y

algunas citoquinas, pero no se precisa para la activación de AP-1 en respuesta de otros estímulos (Yang et al. 1997).



ATF-2 [335] MKRRKFLERN RAAASRSRQK RKVWVQSLEK KAEDLSSLNG QLQSEVTLLR NEVAQLKQLL LAH [397]

C-Jun [253] MKAERKRMRN RIAASKSRKR KLERIARLEE KVKTLKAQNS ELASTANMLR EQVAQLKQKV MNH [315]

Figura 11: A Unión del heterodímero ATF2/c-Jun al ADN. **B** Vista del complejo girado 90º **C** Secuencia de aminoácidos de ATF2, c-Jun donde se repite una leucina cada siete residuos.

Dentro del conjunto de genes regulados por AP-1 destacan, los de proteínas fundamentales para el crecimiento celular como oncogenes (los mismos genes c-*jun* y c-*fos*), genes supresores de tumores, genes de proteasas implicadas en invasividad y en la respuesta inflamatoria (*colagenasa I, estromelisinas*) y genes de factores angiogénicos (*VEGF*), citoquinas y otros factores reguladores del sistema inmune, lo que hace que AP-1 sea un factor clave en la aparición y/o progresión de cánceres.

9.- FAMILIA DE PROTEÍNAS JUN

La familia de factores de transcripción Jun se compone de tres miembros; c-Jun, JunB y JunD (Vogt et al. 1990). Dichas proteínas a pesar de compartir una fuerte homología presentan patrones de expresión diferentes; a ambos genes *junB* y *c-Jun,* se los considera como genes de respuesta temprana, basándose en su rápida y amplia inducción de la transcripción ante un estímulo celular; por otro lado, el gen *junD* se expresa predominantemente en células quiescentes (Wang et al. 1996), y su sobreexpresión en células proliferativas disminuye la tasa de proliferación de las mismas (Minden et al. 1997). Igualmente se ha encontrado que las propiedades de estos factores de transcripción son distintas. Por ejemplo la capacidad de transformar fibroblastos de c-Jun (Schutte et al. 1989a) contrasta con la capacidad de JunB y JunD de inhibir dicha transformación (Schutte et al. 1989; Pfarr et al. 1994). De entre los tres miembros de la familia de proteínas Jun, sólamente c-Jun es substrato de fosforilación de JNK.

9.1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Las proteínas de la familia Jun comparten ciertas homologías estructurales, presentando un dominio responsable de activar la transcripción y otro de unión al ADN. Éste último contiene dos subregiones: una región rica en aminoácidos básicos, que interacciona con el ADN, y otra región con un motivo de cremallera de leucinas necesario para la dimerización, y requisito imprescindible para unirse al ADN (Figura12).

La proteína v-Jun difiere de c-Jun por la existencia de una deleción de 27 aminoácidos (la región δ) en el dominio amino terminal responsable de la activación transcripcional, además de varias mutaciones puntuales. Estudios sobre la fosforilación de c-Jun han demostrado que la unión de JNK a la subregión δ del dominio de transactivación amino terminal es necesaria para la

fosforilación de c-Jun en los residuos de serina 63 y serina 73 (Adler et al. 1992; Hibi et al. 1993; Davis 1994; Derijard et al. 1994; Kallunki et al. 1994; Sluss et al. 1994). Por el contrario, JunB contiene un sitio de acoplamiento para JNK pero carece de los sitios de fosforilación consenso de c-Jun. Justamente al contrario de lo que ocurre en JunD, que posee los sitios de fosforilación apropiados pero carece del sitio de acoplamiento para JNK. Sin embargo, combinaciones entre las proteínas Jun pudieran generar heterodímeros que respondan a la señal de JNK y activen la transcripción (Kallunki et al. 1996) (Figura 3d).

9.2.- LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE c-JUN SE REGULA POR FOSFORILACIÓN

Por una parte, la fosforilación de las Ser 63 y Ser 73 en la región amino terminal de c-Jun activa su acción sobre la transcripción génica (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991). Esta fosforilación se lleva a cabo por la quinasa JNK, que es activada por distintos factores. Entre ellos, ciertas citoquinas como el TNF-α, que activan a JNK a través de la quinasa MEKK-1, por agentes mitogénicos y factores de estrés celular, como la luz ultravioleta, mediante una vía aún desconocida que parece implicar a Src y a otras quinasas (Kyriakis et al. 1996; Minden et al. 1997) (Figura 2). Por otra parte, otros residuos de c-Jun de la región carboxilo terminal, la Thr 231 y la Ser 249, pueden también ser fosforilados por la caseína quinasa II (CKII), lo que conlleva a una reducción en la unión al ADN, y por tanto, de su actividad transcripcional. Esta fosforilación de c-Jun por caseína quinasa II es inhibida a su vez por acción de la PKC, probablemente de forma indirecta mediante la activación de una fosfatasa. Así, promotores tumorales como el TPA que actúan activando a PKC causan la activación de AP-1. Recientemente, se ha propuesto que la fosforilación por JNK induce un cambio conformacional en la molécula que impide las fosforilaciones de las Thr 231 y Ser

249. De esta manera, la acción de la quinasa JNK tendría un papel clave en la regulación de la actividad de c-Jun. Por otro lado también se ha postulado que dicha fosforilación pudiera indirectamente estar protegiendo a c-Jun de su degradación por ubiquitinación, prolongando así la vida media de la proteína (Fuchs et al. 1996; Fuchs et al. 1997). Otra posibilidad es que esta fosforilación pudiera estar induciendo la desfosforilación en los residuos de Thr 231, Ser 243 y Ser 249 y como consecuencia aumentar la capacidad de unión de c-Jun al ADN (Papavassiliou et al. 1995).

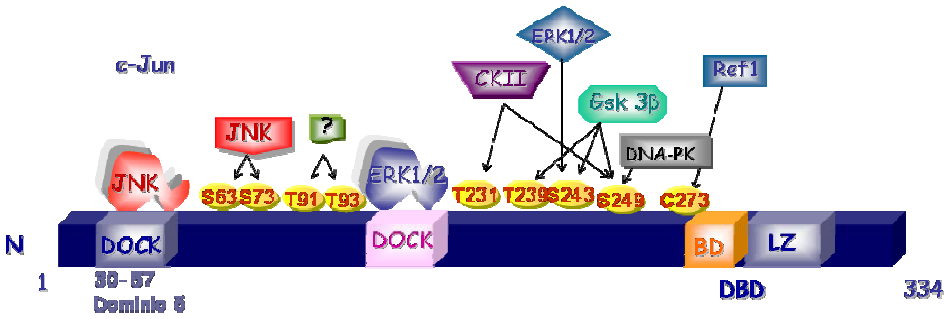


Figura 12: Esquema de la proteínas c-Jun: Dominios, sitios de fosforilación y quinasas reguladoras de su actividad. DOCK (Sitios de anclaje), BD (Dominio básico) LZ (Dominio de cremallera de leucina) DBD (Dominio de unión al ADN)

La proteína oncogénica v-Jun presenta alteraciones en su molécula que impiden la regulación de su actividad. Por una parte, la deleción de la región δ aminoterminal, aunque no comprende las Ser 63 y Ser 73, elimina la zona de unión de la JNK, lo que impide su acción. Además, la fosforilación en la región carboxilo terminal de v-Jun está también alterada debido al cambio en la Ser 243 por una Phe 243. La presencia de esta Phe evita la fosforilación por la CKII de las Thr 231 y Ser 249 adyacentes (Lin et al. 1992). El resultado es que v-Jun está siempre activa transcripcionalmente, sin ser regulada por fosforilación.

10.- FAMILIA DE PROTEÍNAS ATF/CREB

La familia de factores de transcripción ATF/CREB representa un amplio grupo de proteínas con una característica común, la de poseer una región básica con un dominio de cremallera de leucina. Dicha familia fue originariamente definida en los años 80 por su habilidad para unirse a la secuencia consenso "TGACGTCA" denominada como sitio ATF/CRE (Montminy et al. 1987).

Aunque originariamente a estos factores se les nombró como Activadores de Transducción de Señales (ATF) también es cierto que algunos miembros de la familia actúan como represores, tal es el caso del homodímero de ATF3 y el caso del homodímero de ATF4 que puede funcionar tanto de activador como de represor (Hai et al. 2001).

A pesar de la gran cantidad de funciones de estas proteínas, una característica común de todas ellas es que están implicadas en respuestas a señales extracelulares, demostrando un papel importante en homeostasis.

Con el paso del tiempo se fueron aislando clones de ADNc que codificaban para diferentes proteínas capaces de unirse al sitio ATF/CRE. Todos ellos se caracterizaban por presentar un dominio de unión al ADN llamado bZIP, permitiendo agrupar a dichas proteínas en subgrupos en función de su homología de secuencia dando lugar a los siguientes subgrupos: CREB/CREM, CRE-BP1 (también llamado ATF2), ATF3, ATF4, ATF6 y B-ATF (Hai et al. 2001). En concreto para ATF2 existen varias isoformas (CRE-BP1, 2 y 3) generadas por un procesamiento alternativo, originándo diferentes transcritos (Georgopoulos et al. 1992).

Las proteínas ATF/CREB forman selectivos homodímeros entre ellas o bien heterodímeros con otras proteínas con dominio bZIP como son las de la familia C/EBP (CCAAT/ proteína que aumenta la unión) y la familia AP-1, donde se incluyen c-Jun y c-Fos (Chinenov et al. 2001; Hai et al. 2001). Las múltiples combinaciones en la formación de heterodímeros constituye un punto

importante en la regulación de la transcripción génica ya que condicionan la especificidad de unión a determinadas secuencias del ADN y por tanto a la actividad transcripcional de determinados genes (van Dam et al. 2001). En concreto ATF2 puede unirse a secuencias CRE como homodímero o como heterodímero con c-Jun o con otros miembros de su propia familia (Hai et al. 1989; Benbrook et al. 1990; Ivashkiv et al. 1990; Macgregor et al. 1990; Lee 1992).

Subgrupo	Miembro	Nombres alternativos
CREB	CREB CREM ATF1	ATF47 TREB36, TCRATF1, ATF-43
CRE-BP1	CRE-BP1 ATFa CRE-BPa	ATF2, HB16, TREB, TCR-ATF2, mXBP
ATF3	ATF3 JDP-2	LRF-1, LRG-21, CRG-5, TI-241
ATF4	ATF4 ATFx	CREB2, TAXREB67, mATF4, C/ATF, mTR67 hATF5
ATF6	ATF6 CREB-RP	ATF6α G13,ATF6β
B-ATF	B-ATF JDP-1	

Figura 13: Familia de factores de transcripción ATF/CREB. Las proteínas de cada subgrupo presentan una homología altamente significativa tanto dentro del dominio bZIP como fuera del mismo. Sin embargo las proteínas de los diferentes subgrupos tan solo comparten el dominio o motivo bZIP en común.

El nivel de su ARN mensajero es bastante abundante en el cerebro, especialmente en el hipocampo, lóbulo frontal y el lóbulo parietal y también se ha visto que se induce su expresión en la regeneración del hígado.Por otro lado muestras de tejidos de tumores humanos también demostraron niveles de ARNm superiores a los presentes en tejidos normales (Takeda et al. 1991). Todos estos

resultados sugieren que ATF2 es importante tanto en los procesos de proliferación celular así como en la transmisión de señales en el cerebro.

10.1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE ATF2

Todos los miembros de la familia ATF/CREB entre los que se incluye ATF2 presentan un dominio bZIP que consiste en dos subdominios funcionalmente distintos: un dominio básico que es la región de unión al ADN y un dominio de cremallera de leucina que es el que favorece la dimerización necesaria para la unión al ADN (Johnson et al. 1989). Un hecho significativo es que las proteínas reguladoras como la proteína del adenovirus E1a (Liu et al. 1990), la proteína pX del virus de la hepatitis (Maguire et al. 1991; Williams et al. 1995), el activador Tax del virus de la leucemia de células T humanas (HTLV-I) (Franklin et al. 1993; Wagner et al. 1993), la proteína pRb (Kim et al. 1992) y proteínas del grupo de alta movilidad HMGI (Y) (Du et al. 1993) interaccionan en este dominio. Estudios moleculares y estructurales han determinado que el dominio de cremallera de leucina presenta una repetición de una leucina cada siete aminoácidos formando una hélice α que permite la dimerización formando una espiral dentro de otra espiral (Ellenberger et al. 1992; Konig et al. 1993). Este tipo de interacción crea un interior hidrofóbico para la estabilidad del dímero (Thompson et al. 1993). ATF2 además presenta una región rica en prolinas entre los aminoácidos 240-250, una región con actividad histona acetil transferasa (HAT) entre los aminoácidos 289-314 y una región de unión con motivos de dedos de Zinc donde existe un átomo de Zinc coordinado tetrahédricamente con dos histidinas y dos residuos de cisteína.

Una consideración a tener en cuenta con respecto a ATF2 es que permanece inactivo en ausencia de inductor (Georgopoulos et al. 1992; Ivashkiv et al. 1992). En ausencia de estrés celular muestra unos niveles de

transactivación relativamente bajos. Esto es debido a una interacción intramolecular inhibitoria en la que el dominio bZIP está unido al dominio de transactivación amino terminal (Zu et al. 1992; Boudreaux et al. 1996; Li et al. 1996; Xu et al. 1996). Datos experimentales demuestran que el efecto inhibitorio está mediado tanto por la región básica como por el dominio de cremalleras de leucina (Li et al. 1996).

Pero la unión de oncoproteínas virales como la proteína viral E1A (Liu et al. 1990; Flint et al. 1991; Chatton et al. 1994; Li et al. 1996), o bien la fosforilación en el dominio amino terminal en respuesta a señales de estrés celular o daño al ADN activan a las quinasas de estrés JNK y p38 resolviendo la inhibición intramolecular (Abdel-Hafiz et al. 1992; Fuchs et al. 2000) y aumentando la activación transcripcional de ATF2 (Derijard et al. 1994; Gupta et al. 1995; Livingstone et al. 1995; van Dam et al. 1995; Tsai et al. 1996; Bender et al. 1997).

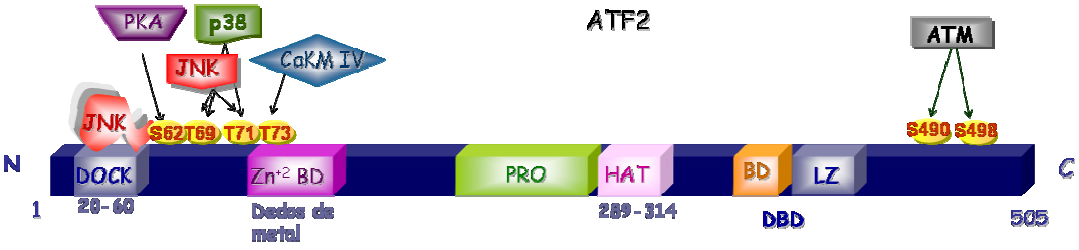


Figura 14: Estructura del factor de transcripción ATF2. Dominios, sitios de fosforilación y quinasas reguladoras de su actividad. DOCK (Sitios de anclaje) PRO (Región rica en prolinas) HAT (Región con actividad histona acetil transferasa) BD (Dominio básico) LZ (Dominio de cremallera de leucina) DBD (Dominio de unión al ADN).

La actividad transcripcional de ATF2 puede estar regulada tanto por activadores transcripcionales, como acabamos de ver, como por represores. Un ejemplo de represor transcripcional es la proteína ICER que bloquea la unión al ADN de ATF2 ó de otros miembros de la familia como CREB, ΔCREB, y CREM (Hai et al. 1988; Gonzalez et al. 1989; Maekawa et al. 1989; Ishii et al. 1990). Otro regulador negativo en respuesta a estrés y daño al ADN es la proteína

Tip49b. Tip 49b es un componente del complejo INO80 que modela la cromatina. La unión de Tip49b con ATF2 es dependiente de fosforilación y requiere la región de aminoácidos del 150 al 248, los cuales están implicados en la inhibición intramolecular de la actividad transcripcional. Por tanto deben existir otros mecanismos celulares que regulen la disociación del complejo (Cho et al. 2001).

10.2.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATF2 POR FOSFORILACIÓN

La fosforilación de factores de transcripción constituye uno de los mecanismos más importantes para regular la expresión de genes en respuesta a diferentes tipos de estrés celular (Karin et al. 1995). Algunos de estos factores de transcripción pertenecientes a la familia descrita anteriormente ATF/cAMP se unen de forma específica como homodímeros o como heterodímeros a elementos de respuesta a AMP cíclico o sitios CRE (cAMP Response Element) (Chinenov et al. 2001) y van a estar regulados por quinasas de estrés como JNK (Shaulian et al. 2001; Shaulian et al. 2002) o p38 (Fuchs et al. 2000; Ouwens et al. 2002). Tanto JNK (van Dam et al. 1995; Tsai et al. 1996) como p38 (Raingeaud et al. 1996) fosforilan a ATF2 en los residuos de treonina 69 y treonina 71, estimulando su actividad transcripcional (Gupta et al. 1995; Clerk et al. 1997; Clerk et al. 1999). El reconocimiento del substrato por JNK requiere de un sitio de acoplamiento para anclar la quinasa al substrato (Hibi et al. 1993). En concreto para ATF2 la región de anclaje de JNK se localiza en la región de aminoácidos que va del 20 al 60 (Gupta et al. 1995; Livingstone et al. 1995).

La fosforilación en estos mismos residuos también estabiliza a ATF2 (Fuchs et al. 2000) y también modula su actividad acetiltransferasa (Kawasaki et al. 2000). Se sabe que ATF2 presenta actividad histona acetil transferasa (HAT) acetilando *in vitro* de forma específica las histonas H2B y H4. El motivo A, localizado en el dominio HAT es el responsable de la activación transcripcional dependiente de CRE (Figura 14). Además, en respuesta a radiación ultravioleta

se produce la fosforilación de ATF2 aumentando la actividad HAT dando como resultado un aumento de la transcripción. Por tanto ATF2 sería capaz de activar la transcripción actuando directamente sobre los componentes de la cromatina. Concretamente la fosforilación en el residuo de serina 121 permite la asociación de ATF2 con p300/CBP el cual se une al complejo de transcripción basal (Kawasaki et al. 1998).

Más recientemente una nueva fosforilación en ATF2 ha sido identificada en el residuo de treonina 73 en combinación con la treonina 69 y la treonina 71 (Ban et al. 2000). En concreto esta fosforilación está llevada a cabo por la proteína quinasa IV dependiente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaM kinase IV), necesaria para la regulación positiva del gen de la *insulina* dependiente de ATF2 (Ban et al. 2000). Además igualmente hemos encontrado que la proteína quinasa A (PKA) también fosforila a ATF2 en el residuo de serina 62 en respuesta AMP cíclico (Sakurai et al. 1991). E incluso recientemente Bhoumik ha demostrado que ATM también fosforila a ATF2 en los residuos de serina 490 y serina 498 en varias líneas celulares humanas tras el tratamiento con radiación ionizante. Es más, dicha fosforilación posibilita la colocalización de ATF2 con la histona γH2AX y con el complejo MRE11-Rad50-NBS1 el los focos de reparación del daño (Bhoumik et al. 2005). Luego la función de ATF2 en la reparación de daño al ADN no está ligada a su actividad transcripcional. Esto pudiera estar relacionado con la proteína TIP49b un inhibidor tanscripcional de ATF2 que favorece la actuación de ATF2 en los procesos de reparación y de control del ciclo celular (Cho et al. 2001).

10.3.- FUNCIONES DE ATF2

Las proteínas que responden a AMP cíclico reconocen secuencias específicas en una gran variedad de promotores de genes que están relacionados dentro de un contexto celular (Lee et al. 1987; Mayr et al. 2001a;

Mayr et al. 2001b). Dichas secuencias CRE regulan respuestas celulares dependientes de los niveles de AMP cíclico intracelular (Mayr et al. 2001a) así como de los niveles de calcio intracelular (Matthews et al. 1994). ATF2 reconoce este tipo de secuencias contribuyendo a la regulación de varios procesos celulares. Entre los genes diana de ATF2 se incluyen el *factor de necrosis tumoral* (TNFα) (Newell et al. 1994; Tsai et al. 1996), el *interferón β* (Du et al. 1993), el *factor de crecimiento transformante β* (Kim et al. 1992), la *ciclina A* (Shimizu et al. 1998), la *E-selectina* (Read et al. 1997), el gen de la *DNA polimerasa β* (Narayan et al. 1994), el de la *colagenasa* (Steinmuller et al. 2001) y *c-Jun* (van Dam et al. 1993; van Dam et al. 1995) los cuales son genes que se sabe que juegan un importante papel en respuestas de estrés celular, crecimiento celular y diferenciación y respuesta inmune (Livingstone et al. 1995; van Dam et al. 1995). Aunque estos genes diana de ATF2 han sido implicados en la contribución de procesos neoplásicos e inflamatorios, el papel fisiológico de ATF2 aún permanece sin caracterizar.

11.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE c-JUN y ATF2. ESTABILIDAD PROTEICA.

Estudios realizados por Ronai demostraron que la ubiquitinación *in vitro* de ATF2 así como de c-Jun, Jun B y p53 estaba relacionada con la participación de JNK (Fuchs et al. 1996; Fuchs et al. 1997; Firestein et al. 1998; Fuchs et al. 1998c; Fuchs et al. 1999). La degradación de dichos factores por la vía del proteosoma constituye un importante modo de regular su actividad. JNK marca aquellas proteínas que van a ser degradadas para que puedan ser identificadas por ubiquitín ligasas. Concretamente, se ha visto que la heterodimerización por el dominio de cremallera de leucina con c-Jun, favorece la ubiquitinación de ATF2 y su degradación (Fuchs et al. 1999). Del mismo modo que la sobreexpresión de c-

Jun aumenta la ubiquitinación de ATF2 disminuyendo su vida media (Fuchs et al. 1999).

Por tanto existen dos mecanismos posibles sobre el efecto de la fosforilación de ATF2 en el fragmento amino terminal y su regulación de la actividad transcripcional. En primer lugar, la fosforilación media cambios conformacionales favoreciendo el desplegamiento intramolecular que lo libera de su forma inactiva promoviendo la formación de dímeros y la unión al ADN (Abdel-Hafiz et al. 1992) pero tras una rápida activación de la transcripción, los homo y heterodímeros son rápidamente ubiquitinados y degradados por la vía del proteosoma (Fuchs et al. 1999).

Por tanto sus resultados nos sugieren que el mantenimiento de un estatus de fosforilación tanto de c-Jun como de ATF2 pudiera ser crucial en determinar la duración del tiempo en que dichos factores son transcripcionalmente activos. Ya que la fosforilación en el extremo amino-terminal tanto de c-Jun como de ATF2 por JNK impide la ubiquitinación (Fuchs et al. 1996; Fuchs et al. 1997; Musti et al. 1997).

12.- PROMOTORES A LOS QUE SE UNEN LOS HETERODÍMEROS DE c-JUN y ATF2.

Recientemente, un estudio relacionado con señales de estrés genotóxico, ha identificado unos 269 genes cuyos promotores presentaban heterodímeros de ATF2 y c-Jun previamente fosforilados (Hayakawa et al. 2004). Concretamente, de los 89 genes relacionados con reparación al ADN representados en el “array”, 23 eran específicamente activados por tratamiento con cisplatino. Por tanto, en respuesta a estrés genotóxico se produce una activación, al menos parcial de los factores de transcripción ATF2 y c-Jun, que está mediada por JNK

produciéndose una activación temprana y coordinada de genes relacionados con la reparación del ADN en respuesta a la supervivencia celular.

Algunos de los genes activados por heterodímeros de c-Jun y ATF2 en respuesta a daño genotóxico se recogen en la siguiente tabla (Figura 15).

Genes con dímeros ATF2/c-Jun en sus promotores

ERCC1	***(excision repair cros-complementing rodent repair deficiency group I)***
ERCC3	***(excision repair cros-complementing rodent repair deficiency group 3)***
XPA	***(xeroderma pigmentosum, complementación grupo A)***
RAD23B	***(Rad 23B homologo S.Cerevisiae)***
MSH2	***(mutS homolog2, cáncer de colon no poliposo I)***
MSH6	***(mutS homolog6, E. coli)***
CDK4	***(cyclin-dependent kinase 4)***
MMP1	***(matrix metaloproteinasa I) (colagenasa intestinal)***
TNF-α	***(Factor de necrosis tumoral)***
ATM	***(Ataxia Telangiectasia mutated)***
FOXD1	***(Forhead Box D1)***
c-Jun	
JUNB	***(Jun B pro-oncogene)***
C-Fos	

Figura 15: Tabla de genes activados por dímeros ATF2/c-Jun en respuesta a daño al ADN.

OBJETIVOS

- **Caracterizar funcionalmente a la quinasa VRK1.**

- **Establecer y caracterizar la relación entre VRK1 y ATF2**

- **Establecer y caracterizar la relación entre VRK1 y c-Jun.**

RESULTADOS

1.- CARACTERÍSTICAS DE VRK1 Y LA FAMILIA DE QUINASAS VRK.

1.1.- ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE VRK1.

Nuestro estudio se ha centrado fundamentalmente en la caracterización de la quinasa VRK1 y su participación en las rutas de señalización. En primer lugar decidimos determinar la localización subcelular de dicha proteína, para ello se utilizó una construcción que contenía la región codificante completa de la proteína VRK1 fusionada a la proteína verde fluorescente EGFP (VRK1-EGFP) y como control negativo (vector pEGFP). Se transfectaron de forma transitoria células HeLa (Carcinoma de cérvix) con estas construcciones y 36 horas post-transfección se visualizaron las células en el microscopio de fluorescencia para identificar la localización subcelular de la proteína VRK1. Como se puede observar en la figura 16, en las células transfectadas con la proteína EGFP usada como control negativo, ésta presenta una distribución difusa dentro de la célula, mientras que VRK1-EGFP presenta una localización claramente nuclear.

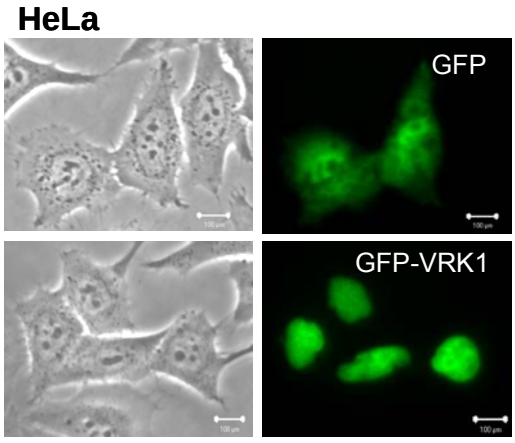


Figura 16: Localización nuclear de VRK1 en células HeLa. Las células fueron transfectadas con pEGFP como plásmido control o con pEGFP-VRK1. El análisis se realizó 36 horas post-transfección. La proteína VRK1 unida a la proteína verde fluorescente GFP presenta una localización preferentemente nuclear, mientras que el control GFP presenta una localización dispersa por la célula.

Puesto que se había propuesto a la familia de quinasas VRK, y en concreto a VRK1 y VRK2, como quinasas involucradas en los procesos de control del crecimiento y proliferación celular, quisimos analizar la localización de la proteína

VRK1 en distintos momentos del ciclo celular. Con esta finalidad realizamos inmunofluorescencias con anticuerpos específicos en líneas celulares en cultivo (Figura 17). VRK1 se localiza principalmente en el núcleo durante la interfase y dispersa por toda la célula en mitosis, cuando la envuelta nuclear está desorganizada. En esta fase VRK1 no parece asociarse con los cromosomas condensados, ni tener una localización específica. VRK1 se vuelve a localizar rápidamente en el núcleo una vez que la envuelta nuclear se organiza de nuevo en la telofase, antes de la citocinesis.

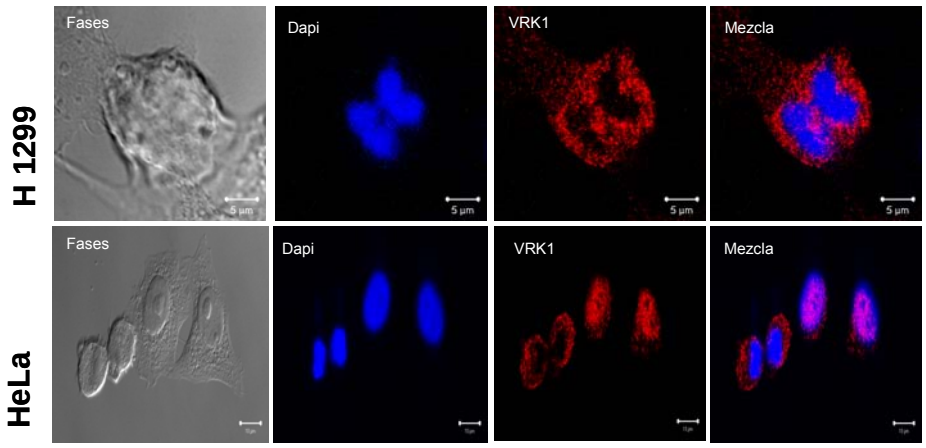


Figura 17: Localización de VRK1 endógena en la línea celular H1299 durante la mitosis. Localización de VRK1 endógena en la línea celular HeLa durante la mitosis y en interfase. Tinción nuclear con DAPI (azul) y localización de VRK1endógena (α-VC1 rojo).

Con respecto a la localización de VRK1 hemos encontrado algunas diferencias en función de la línea celular en la que realicemos el estudio. Por ejemplo, en la línea celular MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) la quinasa presenta una localización preferentemente citosólica, mientras que en la línea celular HeLa (Carcinoma de cérvix) la quinasa es indudablemente nuclear tal y como cabría esperar si analizamos los motivos estructurales de su secuencia

donde entre los aminoácidos 356 al 360 existe una secuencia de localización nuclear (NLS). Hasta el momento no conocemos el mecanismo que regula este cambio en la localización de la quinasa.

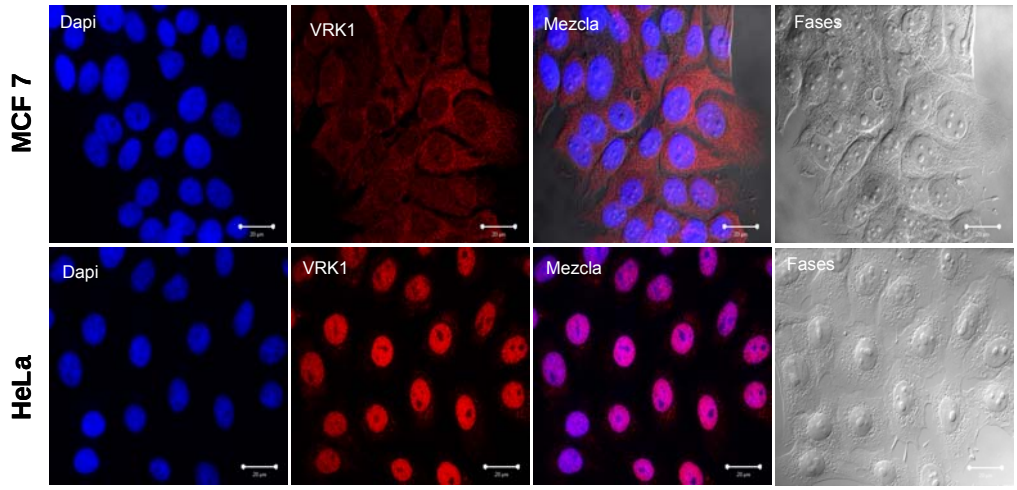


Figura 18: Localización de VRK1 en las líneas celulares MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) y HeLa (Carcinoma de cérvix). Tinción nuclear con DAPI (azul) y localización de VRK1 endógena (α-VC1 rojo).

1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FAMILIA DE QUINASAS VRK1.

Para el estudio de la autofosforilación de las diferentes proteínas de la familia de quinasas VRK realizamos ensayos quinasa *in vitro* con ATP radiactivo como donador de grupos fosfato.

Aunque previamente sabíamos que VRK3 presentaba un dominio quinasa degenerado según datos bibliográficos aportados por Nichols.R (Nichols et al. 2004) se nos ocurrió pensar que tal vez VRK3 necesitaba de la presencia bien de VRK1 o de VRK2 para su posible regulación. Como se puede observar en la figura 19 tanto VRK1 como VRK2 presentan una fuerte autofosforilación, sin embargo VRK3 carece de autofosforilación y es más, ninguna de las otras dos

quinasas, ni VRK1 ni VRK2 son capaces de fosforilarla. Parece ser que la conservación de ciertos aminoácidos en el dominio catalítico es esencial para su actividad quinasa.

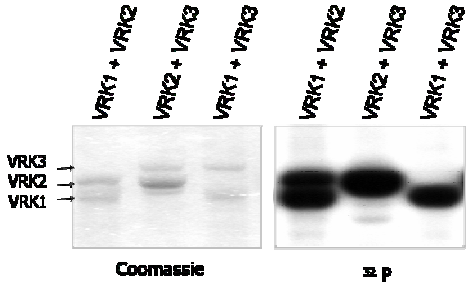


Figura 19: Estudio de la actividad quinasa de la familia de proteínas VRK. Ensayo quinasa *in vitro* con las proteínas de fusión GST-VRK1, GST-VRK2 y GST-VRK3.

1.3.- VRK1 PRESENTA UNA ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO EN SU ACTIVIDAD QUINASA.

La mayoría de las proteínas conocidas implicadas en el control transcripcional están reguladas por fosforilación reversible (Karin et al. 1995). Debido a que VRK1 estaba relacionada, aunque de manera lejana, con algunas quinasas de señalización como ERK o MEK1/3, decidimos realizar un ensayo quinasa con varios factores de transcripción regulados por fosforilación como posibles substratos para VRK1.

Por otro lado la fosforilación de p53 en el residuo de treonina 18 por la quinasa humana VRK1 (Lopez-Borges et al. 2000) nos sugirió que tal vez VRK1 también pudiera fosforilar a otros factores de transcripción relacionados con señales de respuesta a estrés celular que a su vez eran fosforilados por otras quinasas, tales como JNK y p38.

En una exhaustiva búsqueda de substratos para esta serina treonina quinasa nuclear probamos diferentes proteínas de localización nuclear tales como la familia de proteínas Smad (Smad 1,2,3,4), Cdc25 A,B y C, proteínas implicadas en la reparación de doble cadena del DNA como 53BP1 y BRCA1 y

finalmente factores de transcripción como ATF2 y c-Jun. Puesto que ATF2 y c-Jun eran proteínas implicadas en respuesta a estrés celular y p53 era el único substrato conocido hasta el momento para VRK1 relacionado con respuesta a estrés celular, decidimos centrarnos en un estudio más en detalle de la fosforilación de VRK1 sobre estos factores de transcripción.

2.- VRK1 y ATF2

2.1.- VRK1 y ATF2 COLOCALIZAN EN EL NÚCLEO

Nuestra primera cuestión a resolver fue determinar si existía una colocalización del factor de transcripción ATF2 y la quinasa VRK1 para que existiera la posibilidad de fosforilarlo. Para ello transfectamos células HeLa con pVRK1-Myc y pHA-ATF2 y se determinó la localización subcelular de ambas proteínas utilizando anticuerpos específicos frente a los epítopos Myc y HA respectivamente. Como se puede observar en la figura 20, ATF2 transfectado se localiza en el núcleo y comparte el mismo compartimento celular que VRK1.

Pequeñas fracciones de las dos proteínas emiten una señal de fluorescencia nuclear que se solapa, generando una tonalidad amarilla, indicando que tal vez en el núcleo VRK1 y ATF2 presentan localizaciones próximas.

Posteriormente para afianzar la existencia de dicha colocalización nuclear entre VRK1 y ATF2 se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas. Se cotransfectaron células HeLa con los siguientes plásmidos pVRK1-Myc y pHA-ATF2. Los extractos de las células transfectadas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA (epítopo de ATF2) seguido de la detección por inmunoblot tanto de HA-ATF2 (como control de la proteína inmunoprecipitada) como de VRK1. El resultado se muestra en la figura 21. Donde en el inmunoprecipitado de ATF2 se detecta claramente la presencia de la

proteína VRK1 (Figura 21, panel de la derecha) sugiriendo que al menos una proporción de las moléculas forma un complejo en el núcleo.

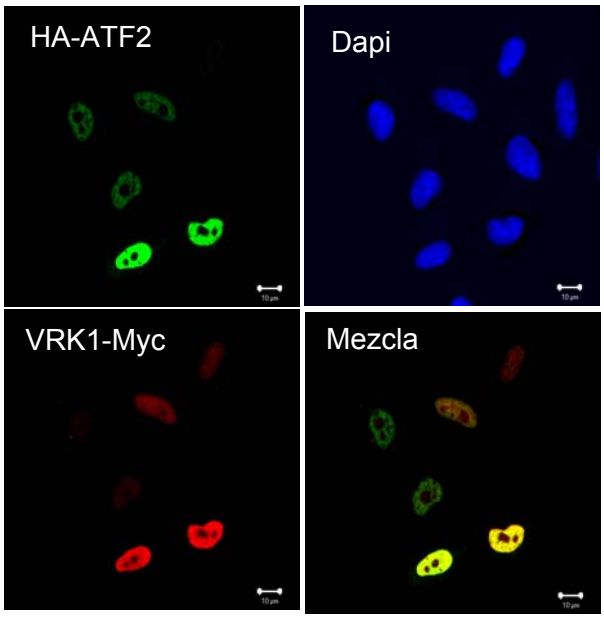


Figura 20 Localización nuclear de VRK1 y ATF2. Células HeLa transfectadas con pVRK1-Myc y pHA-ATF2. VRK1 se detectó con un anticuerpo policlonal específico para el epítopo Myc (rojo), y ATF2 se detectó con el anticuerpo monoclonal anti HA (verde). En azul tinción nuclear con DAPI (4´,6´-diamidina-2-fenilindol).

De forma paralela, para descartar la posible existencia de una unión no específica del anticuerpo usado en la inmunoprecipitación, se realizó un experimento control con los extractos celulares transfectados con pVRK1-Myc y pHA-ATF2. De modo similar al anterior, los extractos se inmunoprecipitaron esta vez con otro anticuerpo monoclonal que presentaba el mismo isotipo (IgG 1), en concreto frente al epítopo AU5, que no estaba presente en el extracto de partida. En ese caso VRK1 se detectó sólo cuando ATF2 fue inmunoprecipitado, pero no en el carril control con el anticuerpo no específico (Figura 22).

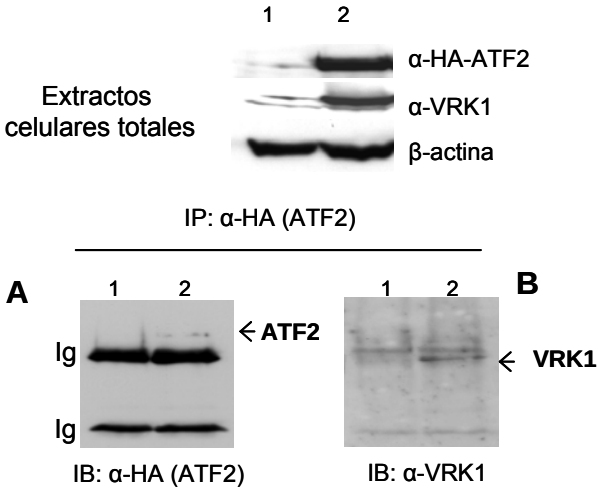


Figura 21: Panel superior control de la presencia de ambas proteínas en los extractos celulares totales de células HeLa transfectadas con el vector vacío como control (1) o con los plásmidos pVRK1-Myc (3µg) y HA-ATF2 (3µg) (2). Inmunoprecipitación con anti-HA de los extractos celulares totales. Con la mitad del inmunoprecipitado se detectó la presencia de ATF2 (panel inferior de la izquierda) mediante inmunoblot anti-HA. Con la otra mitad del inmunoprecipitado de realizó un inmunoblot con el anticuerpo policlonal específico para VRK1 (α-VC1) (panel inferior de la derecha). Las bandas inespecíficas corresponden a las inmunoglobulinas (Ig).

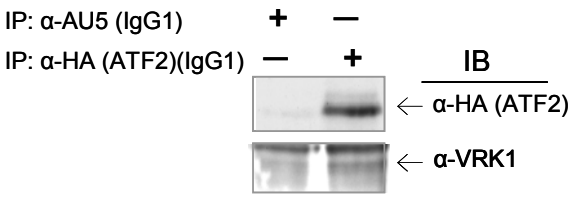


Figura 22: Extractos celulares de células HeLa transfectadas con pHA-ATF2 (3µg) y pVRK1-Myc (3µg) (condiciones similares al carril 2 de la figura anterior) fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal (IgG1) contra el epítopo (AU5) no presente en estas células y con el anticuerpo monoclonal (IgG1) anti HA. Inmunoprecipitación de ATF2 con el anticuerpo monoclonal anti-HA seguido de la detección de VRK1 con el anticuerpo policlonal anti-VRK1 (α-VC1). VRK1 sólo fue detectada cuando ATF2 era inmunoprecipitado.

2.2.- FOSFORILACIÓN DE ATF2 POR LA QUINASA VRK1

Puesto que VRK1 parecía ser una serina treonina quinasa activa capaz de fosforilar diversos substratos celulares, decidimos estudiar la capacidad de fosforilación de la misma sobre el factor de transcripción ATF2.

Para determinar si VRK1 era capaz de fosforilar la proteína humana ATF2, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro*. Se clonó la proteína humana de VRK1 fusionada a GST y se expresó como proteína de fusión GST-VRK1 (Lopez-Borges et al. 2000). El ensayo quinasa *in vitro* se llevó a cabo usando como substrato la proteína de fusión GST-ATF2 (1-109) que comprende el dominio amino terminal de ATF2 que es regulado por diversas quinasas como JNK (van Dam et al. 1995; Tsai et al. 1996) y p38 (Raingeaud et al. 1996) (Figura 23) .

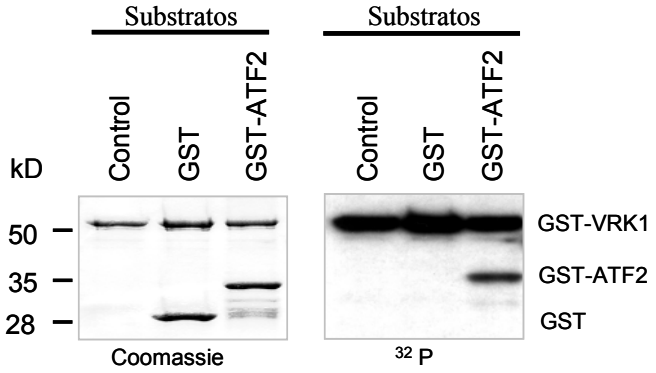


Figura 23: Identificación de ATF2 como substrato de fosforilación de VRK1. En el panel de la izquierda se muestra el control de carga mediante la tinción de las proteínas en el gel con el colorante azul de Coomassie, y en el panel de la derecha se muestra la incorporación de radiactividad tanto del substrato ATF2 como de la quinasa VRK1.

Efectivamente como se puede apreciar la fosforilación tiene lugar dentro del dominio regulador aminoterminal de ATF2 y no en la fracción de GST, como se muestra con la incorporación de radiactividad en la fracción que contiene la

proteína ATF2. En este gel se muestra también la fuerte autofosforilación de la proteína VRK1 (Lopez-Borges et al. 2000).

Posteriormente para confirmar la fosforilación de ATF2 en extractos celulares, la proteína endógena VRK1 procedente de células HEK293 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo policlonal específico (α-VC1) para la proteína VRK1 (Figura 24, carril izq.).

De modo similar, se transfectaron células HEK293 con una construcción pHA-VRK1 que expresaba para la proteína HA-VRK1 y con el extracto se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA (Figura 24, carril dcho).

Con cada uno de los inmunoprecipitados se realizó un ensayo quinasa usando como substrato GST-ATF2 (1-109). Las dos quinasas tanto la endógena como la transfectada fosforilan a ATF2 (Figura 24). De estos experimentos se puede concluir que la proteína endógena humana VRK1 también es capaz de fosforilar a ATF2 en su región amino terminal.

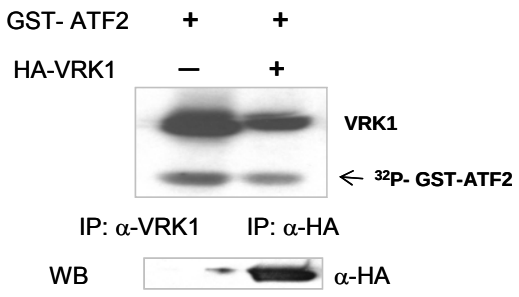


Figura 24: Fosforilación de GST-ATF2 (1-109) por VRK1 endógena inmunoprecitada con el anticuerpo policlonal específico par VRK1 a partir de extractos celulales de HEK293 (carril izq) o transfectada con pHA-VRK1 e inmunoprecipitada con el anticuerpo monoclonal anti-HA (carril dcho). La actividad quinasa fue probada mediante ensayo quinasa *in vitro* con los inmunoprecipitados y GST-ATF2 como substrato.

2.3.- VRK1 FOSFORILA CONCRETAMENTE A ATF2 EN LA SERINA 62 Y EN LA TREONINA 73.

Con el fin de identificar las dianas de fosforilación del fragmento regulador amino terminal de la proteína ATF2, se crearon mutantes individuales en todos y

cada uno de los residuos de serina y treonina los cuales eran potencialemente dianas para la fosforilación por la quinasa VRK1. Los mutantes de ATF2 realizados por mutagénesis dirigida tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos fueron los siguientes: Ser 9 Ala, Ser 20 Ile, Thr 28 Ala, Thr 37 Ala, Thr 52 Ala, Ser 62 Ile, Thr 69 Ala, Thr 71 Ala, Thr 73 Ala y Ser 90 Ile. En una sola dimensión mediante el uso de geles de poliacrilamida, no detectamos una pérdida completa de fosforilación en ninguno de los mutantes puntuales, tanto la proteína silvestre como los mutantes simples se fosforilaron. Aunque es preciso señalar que en algunas sustituciones, tales como el residuo de Thr 73 Ala, vimos un notable descenso en la incorporación de la radiactividad, por tanto la información que pudimos deducir de este resultado es que parecía ser que la fosforilación se estaba produciendo en más de un único residuo.

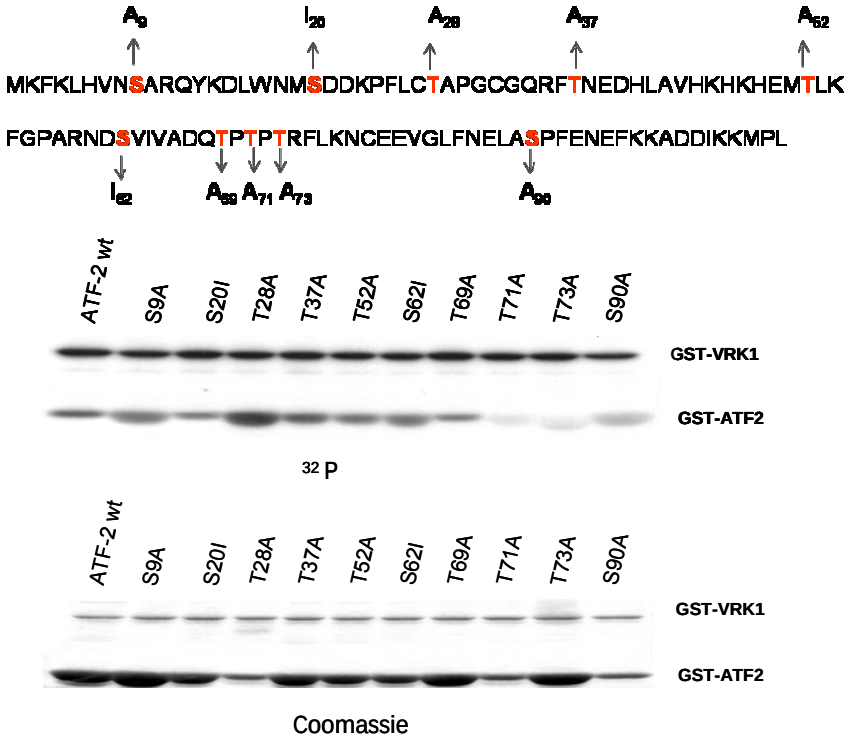


Figura 25: Ensayo quinasa *in vitro* con GST-ATF2 (1-109) proteína silvestre y los diferentes mutantes puntuales creados en la región amino terminal.

Para tomar certeza de ello realizamos seguidamente un análisis de fosfoaminoácidos y detectamos la señal de fosforilación tanto para los residuos de serina como para los residuos de treonina confirmando así que existían al menos dos tipos de aminoácidos susceptibles de fosforilación en la molécula de ATF2 por la quinasa VRK1.

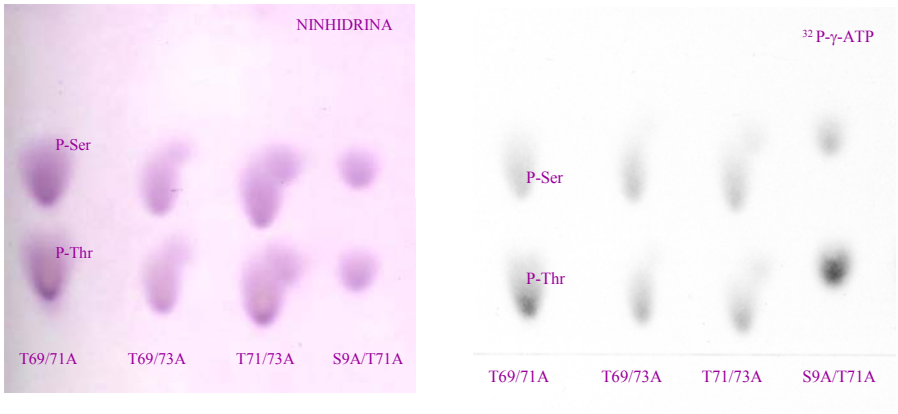


Figura 26: Análisis de fosfopéptidos con determinados mutantes de GST-ATF2.

A continuación, realizamos el mapa de fosfopéptidos de las construcciones de GST-ATF2; tanto de la proteína silvestre como de los diferentes mutantes puntuales. El patrón de fosforilación para la proteína ATF2 silvestre está formado principalmente por cuatro fosfopéptidos; dos débiles y dos relativamente más fuertes, y éste se mantuvo prácticamente igual en la mayoría de los mutantes de ATF2. Fruto de este análisis claramente pudimos identificar a los residuos de serina 62 y treonina 73 como las principales dianas de fosforilación de VRK1 en el factor de transcripción ATF2 (Figura 27). Ya que en cada una de estas sustituciones, serina 62 isoleucina y treonina 73 alanina, desaparecían dos de los péptidos. La marca correspondiente a la posición de treonina 73 demostró ser el residuo que incorporaba la mayor cantidad de radiactividad. También en las cromatoplacas y tras largas exposiciones, aparecían péptidos que se fosforilaban

más débilmente, probablemente representando una actividad marginal de la quinasa porque individualmente la intensidad de los mismos era al menos de un orden de magnitud menor.

Otra consideración a tener en cuenta es que las sustituciones de los residuos diana de fosforilación para JNK y p38, treonina 69 y treonina 71 no eran dianas de fosforilación para VRK1 (Figura 27). Cuando mutamos el residuo de treonina 71 y el de treonina 73, debe producirse un cambio en la conformación de la proteína porque se genera un nuevo fosfopéptido que se fosforila fuertemente y se detecta como un punto de rápida migración sugiriendo que estas sustituciones inducen un cambio en la conformación en la proteína que genera nuevos residuos accesibles para la quinasa.

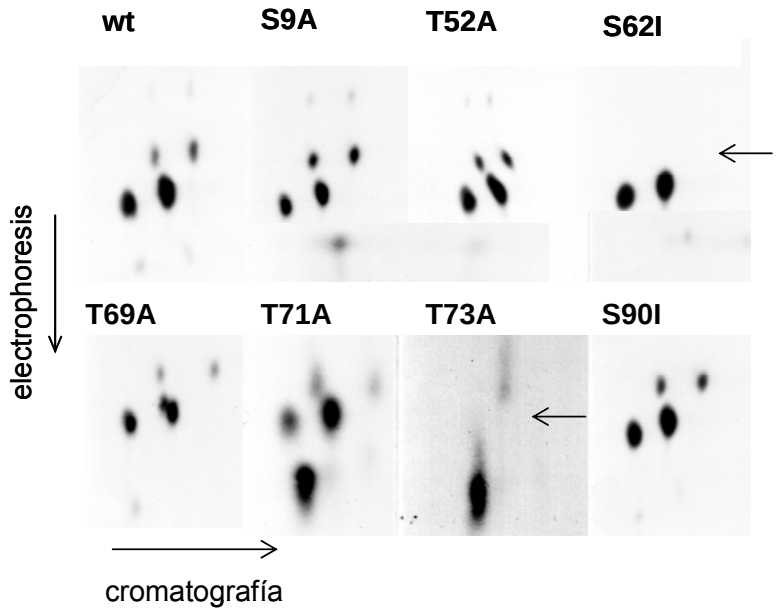


Figura 27: Análisis de fosfopéptidos de la proteína GST-ATF2 (1-109) silvestre y de varios mutantes mediante electroforesis de alto voltaje y cromatografía en capa fina. Los mutantes específicos se indican en la parte superior de cada cromatoplaca. Las flechas indican la pérdida de fosfopéptidos en cada mutante individual.

Finalmente los resultados del análisis de fosfopéptidos corroboraron que en efecto la fosforilación se estaba produciendo tanto en residuos de treonina como de serina, y es más cuando mutábamos el residuo de treonina 73 se apreciaba un descenso muy acusado de la incorporación de la radiactividad.

2.4.- VRK1 INDUCE UNA ACUMULACIÓN DE ATF2 EN LA CÉLULA.

La fosforilación de ATF2 por otras quinasas tales como JNK conduce a un aumento considerable de la estabilidad de la proteína y consecuentemente se produce un aumento de los niveles intracelulares de ATF2 debido a que las moléculas fosforiladas pueden dimerizar evitando así su unión con la ubiquitina ligasa (Fuchs et al. 2000). Por esta razón, nosotros decidimos comprobar si VRK1 podía también inducir dicha acumulación de ATF2 como consecuencia de la fosforilación en la región amino terminal.

Para ello transfectamos células HEK293 con cantidades crecientes de pHA-VRK1 o de su mutante inactivo pHA-VRK1(K179E) y las cotransfectamos con una cantidad fija de pHA-ATF2 (1µg).

Los niveles de proteína tanto de ATF2 como de VRK1 fueron determinados por inmunoblot. Los niveles de proteína de ATF2 fueron detectados con un anticuerpo anti–HA donde se observó una acumulación de ATF2 a medida que aumentábamos la cantidad de quinasa VRK1 (Figura 28A). Pero por el contrario no existía acumulación alguna cuando usábamos dosis crecientes de la construcción que expresaba el mutante inactivo VRK1(K179E) (Figura 28B). La cuantificación del efecto acumulativo inducido por la quinasa activa o inactiva se muestra en la gráfica a la derecha de los inmunoblots.

Como experimento control se transfectaron las células con otro gen cuya expresión dependía del mismo promotor CMV, usando la construcción pCMV-EGFP y la proteína fue detectada usando el anticuerpo específico anti-EGFP. Como era de esperar los niveles de EGFP no se afectaron aumentando la

cantidad de la quinasa VRK1 transfectada (Figura 28A). Ni tampoco los niveles de la proteína control β-actina que no se vió afectada por el aumento en la concentración de la proteína VRK1.

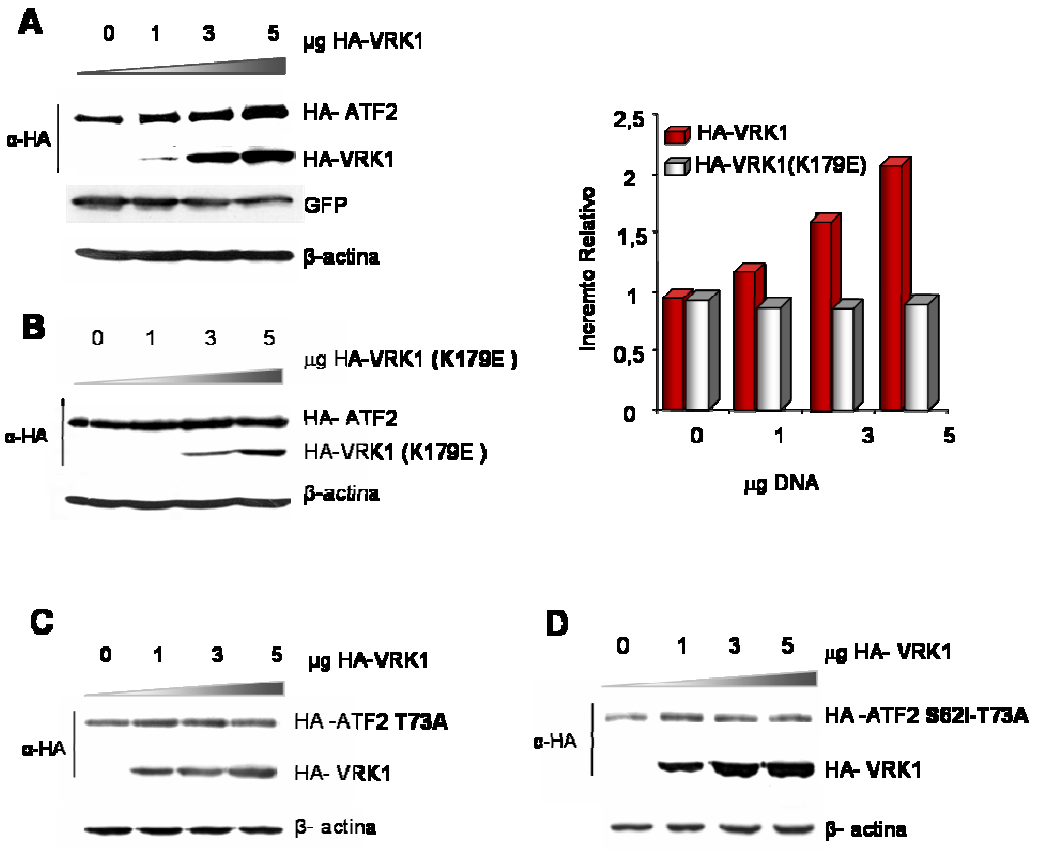


Figura 28: Acumulación de la proteína ATF2 inducida por VRK1. A. VRK1 puede inducir una acumulación de ATF2 que es dependiente de las concentraciones de VRK1. La línea celular HEK293 fue tansfectada con una cantidad fija de pHA-ATF2 (1µg) y cantidades crecientes de pHA-VRK1 como se indica en la figura. Control de los niveles de la proteina EGFP expresada bajo el mismo promotor que VRK1 en la construcción pCMV-EGFP. **B.** Experimento similar al anterior pero usando la quinasa VRK1 inactiva pHA-VRK1(K179E). Representación de la acumulación inducida por la quinasa activa (barras rojas) y la quinasa inactiva (barras grises). **C.** Ausencia de acumulación de ATF2 en la construcción en la que el residuo de treonina 73 es sustituido por una alanina (T73A). **D.** Ausencia de acumulación de ATF2 en la construcción que contiene la doble mutación S62I-T73A.

Por tanto, la acumulación de ATF2 por VRK1 requiere de la fosforilación del residuo de treonina 73 en ATF2 ya que cuando usamos una construcción de ATF2 que contiene la mutación treonina 73 alanina no se observa dicho fenómeno (Figura 28C). Tampoco con el doble mutante (S62I/T73A) es capaz de acumularse la proteína en respuesta a VRK1 (Figura 28D).

2.5.- VRK1 ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE ATF2

La localización de las dianas de fosforilación en los residuos de Ser 62 y Thr 73 dentro del dominio de activación amino terminal nos sugirió que tal vez VRK1 pudiera estar regulando la actividad transcripcional dependiente de ATF2 al igual que ocurre con la fosforilación de los residuos de Thr 69 y Thr 71 por la quinasa JNK que conducen a un aumento en la actividad transcripcional (Gupta et al. 1995). Es por ello que examinamos el efecto de estas mutaciones sobre la actividad transcripcional de ATF2 mediante el sistema de la luciferasa. Este ensayo es dependiente de la dimerización de ATF2 fosforilado y se basa en el uso de una construcción que contiene la región amino terminal de ATF2 fusionada al dominio GAL4 de unión al ADN. Para que exista activación se precisa de la formación de un dímero en el sitio de unión GAL4 en el promotor del reportero. Dicho dímero se forma previa fosforilación del factor de transcripción. De ahí que el ensayo sea dependiente de la dimerización de ATF2.

Con el fin de ver si VRK1 podía activar la transcripción de ATF2 como otras muchas quinasas (Derijard et al. 1994; Gupta et al. 1995; Raingeaud et al. 1995) comenzamos realizando una curva dosis-respuesta en la línea celular HEK293. Se transfectaron $5x10^5$ células/placa con las construcciones pGAL4-ATF2 (1-109), p5XGAL4-Luc, phRL-tk como control interno que codifica para la luciferasa de *Renilla* y cantidades crecientes del plásmido pHA-VRK1. Como podemos apreciar en la gráfica a medida que aumentamos la cantidad de VRK1

transfectada se observa un incremento del mismo modo en la actividad transcripcional de ATF2 (Figura 29A).

Este mismo fenómeno también se pudo observar en la línea celular NIH3T3. Donde obtuvimos niveles de activación de la transcripción de ATF2 con VRK1 muy similares a los obtenidos con JNK (control positivo del experimento). Por tanto dicho efecto es mas general y no está solamente restringido a un sólo tipo celular (Figura 29B).

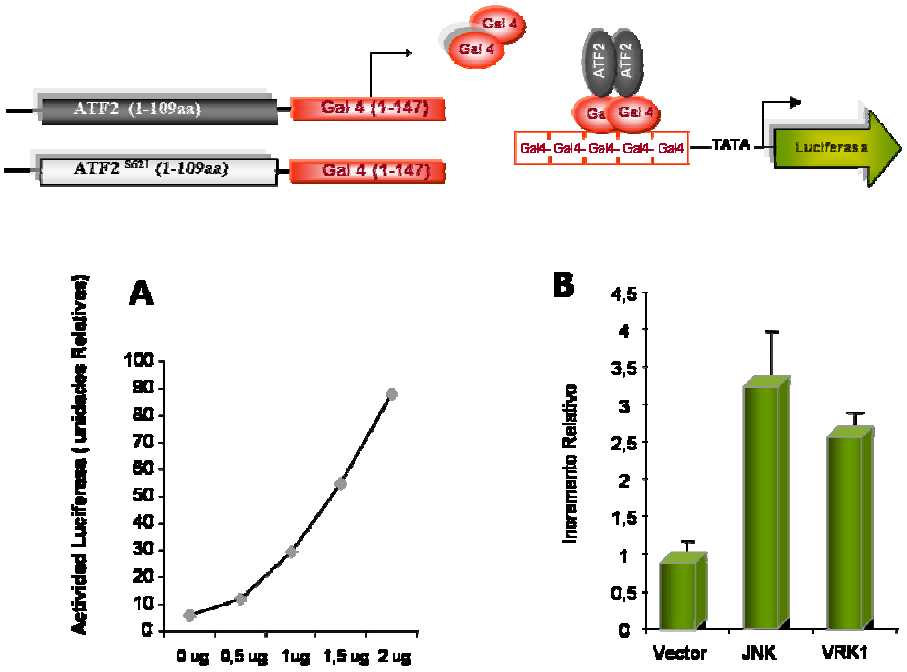


Figura 29: Curva dosis-respuesta de la activación de la transcripción de ATF2 por VRK1 usando el sistema de transactivación GAL4 en células HEK293 transfectadas ($5x10^5$ células/placa). Activación de la actividad transcripcional de ATF2 por la quinasa VRK1 en fibroblastos de ratón NIH3T3. En ambas líneas celulares la actividad transcripcional fue determinada con el gen reportero de la luciferasa basado en la dimerización de ATF2 usando las construcciones GAL4-ATF2 (1-109) y GAL4-Luc. Las medidas de luciferasa fueron normalizadas con respecto a un control interno con phRL-tk que codifica para la luciferasa de *Renilla* . Los resultados se expresan como la media ± SD de diferentes experimentos por triplicado. *, $p< 0.05$; **, $p< 0.001$

A continuación usamos construcciones con el reportero de la luciferasa en las que los residuos de serina 62 y treonina 73 de ATF2 habían sido mutados con

el fin de determinar si dichos residuos eran importantes en la modulación de la actividad transcripcional. Transfectamos en un principio células HEK293 con el dominio de transactivación amino terminal de ATF2 tanto en presencia de VRK1 como de JNK (control positivo). De forma simultánea también se transfectaron otros puntos que contenían la quinasa VRK1 pero con el dominio amino terminal de ATF2 mutado en los residuos que previamente habíamos identificado como dianas de fosforilación para VRK1; residuos Ser 62 Ile, Thr 73 Ala y Ser 62 Ile/Thr 73 Ala con objeto de estudiar estas mutaciones en la actividad transcripcional del factor.

El incremento en la actividad transcripcional inducido por VRK1 fue muy similar al inducido por JNK (Figura 30, barras verdes). Si bien las mutaciones puntuales de ATF2 en los residuos de serina 62 y treonina 73 condujeron a una pérdida en la actividad transcripcional de ATF2 mediada por VRK1 (Figura 30, barras grises).

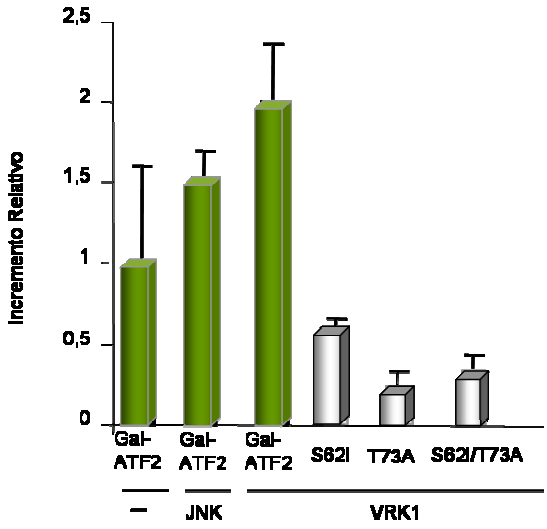


Figura 30: La activación de la actividad transcripcional de ATF2 mediada por VRK1 requiere de la fosforilación en el residuo de T73. Afecto de diversas mutaciones específicas en el dominio de transactivación de ATF2. La línea celular HEK293 fue tansfectada con 1.5 µg de pHA-VRK1 ó pHA-JNK y con 0.5 µg de cada uno de los plásmidos que componen el sistema incluyéndose GAL4-ATF2 silvestre y los mutantes GAL4-ATF2 S62I y/o T73A.

2.5.- VRK1 ACTIVA EL PROMOTOR DE LA COLAGENASA

El promotor de la colagenasa es conocido por ser dependiente de la actividad transcripcional de ATF2. Dicha activación es llevada a cabo por un sitio AP-1 en la región proximal que requiere de la unión de la proteína completa de ATF2 (Steinmuller et al. 2001). Este sitio AP-1 en el promotor de la colagenasa fue usado para el estudio de su posible regulación por la quinasa VRK1.

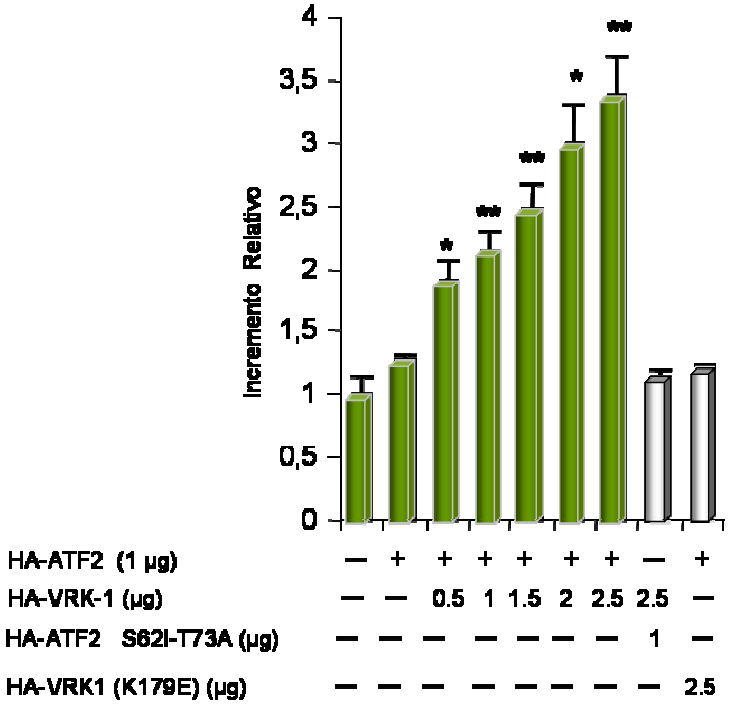


Figura 31: Activación del promotor de la collagenasa MMP1 por VRK1 mediante ATF2. En este ensayo el gen reportero responde a la proteína completa de ATF2 cuando es fosforilado mediante un elemento de respuesta AP-1localizado en el promotor de la colagenasa que a su vez está unido a el gen reportero de la luciferasa pColl(-510/+63) Luc. La línea celular HeLa fue cotransfectada con los plásmidos que se detallan en la figura, y 48 horas post-transfección se midió la actividad luciferasa. La actividad luciferasa fue normalizada con respecto a un control interno phRL-tk que codifica para la luciferasa de *Renilla*. La actividad del gen reportero de la luciferasa se representa en función de las células transfectadas con plásmido control. En la gráfica se representa la media ± SD de diferentes experimentos por triplicado. *, $p< 0.05$; **, $p< 0.001$.

Con este fin transfectamos la línea celular HeLa con una construcción que contenía el promotor de la colagenasa unido al gen reportero de la luciferasa pColl(-510/+63) Luc y cantidades crecientes del plásmido pHA-VRK1 en presencia de HA-ATF2 (para que no fuera el factor limitante). La sobreexpresión de la proteína completa pHA-ATF2 por sí misma produce algo de activación del promotor de la colagenasa. Sin embargo, la activación de la transcripción cuando cotransfectamos con pHA-VRK1 aumenta de forma creciente y dependiente de la cantidad de VRK1. El uso de tanto una construcción que exprese la quinasa inactiva pHA-VRK1(K179E) o de una construcción que exprese la molécula de ATF2 con las dianas de fosforilación de VRK1 mutadas HA-ATF2 S62I-T73A conduce a una pérdida de la activación transcripcional del factor así como del gen dependiente de dicho factor. Estos resultados confirman la función que desempeñan estos residuos en la activación transcripcional.

2.6.- VRK1 PUEDE COOPERAR CON JNK EN LA ACTIVACIÓN DE ATF2

Como JNK y VRK1 fosforilan a ATF2 en residuos diferentes dentro de la misma región del factor de transcripción, es posible que bajo condiciones en las cuales ninguna de las dos quinasas tenga un efecto máximo, su actividad pudiera ser cooperativa y el efecto de ambas quinasas pudiera ser aditivo.

En un intento de reproducir esta posible hipótesis, transfectamos células HEK293 usando dosis subóptimas de cada una de las quinasas, así como la combinación de ambas quinasas. Como se muestra en la figura 32, la actuación de ambas quinasas parece tener un efecto aditivo similar al que presentan cada una de las quinasas de forma individual en una dosis equivalente (0.8 µg) las cuales estarían fosforilando un único par de los residuos y no su combinación.

Esta observación sugiere que ATF2 puede responder por tanto a dos señales diferentes.

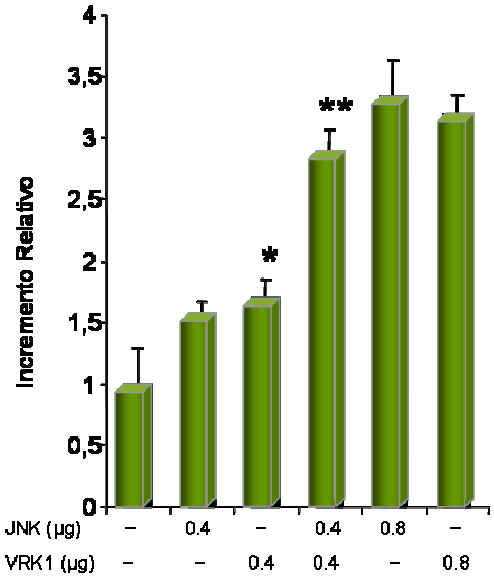


Figura 32: Cooperación entre las quinasas JNK y VRK1 en la activación de la actividad transcripcional de ATF2 en células HEK293. VRK1 presenta un efecto aditivo con JNK en la activación de la transcripcion. Las células fueron transfectadas con las cantidades que se indican de las diferentes quinasas, y 48 horas post-transfección se determinó la actividad luciferasa. Los plásmidos usados fueron pGAL4-ATF2 (1-109) como substrato de la quinasa y p5xGAL4-Luc como plásmido reportero. La actividad luciferasa fue normalizada con respecto a un control interno con phRL-tk que codifica para la luciferasa de *Renilla*. En la gráfica se representa la media $\pm$ SD de diferentes experimentos por triplicado. *, $p< 0.05$; **, $p< 0.001$.

3.- VRK1 y c-JUN

3.1.- VRK1 y c-JUN COLOCALIZAN EN EL NÚCLEO

Otro de los factores de transcripción implicado en respuesta a estrés es c-Jun el cual puede formar heterodímeros con ATF2 activando la transcripción de genes dependientes de sitios CRE (Benbrook et al. 1990; Ivashkiv et al. 1990;Hai

et al. 1991). Así que decidimos determinar si c-Jun también era un posible substrato para nuestra quinasa VRK1.

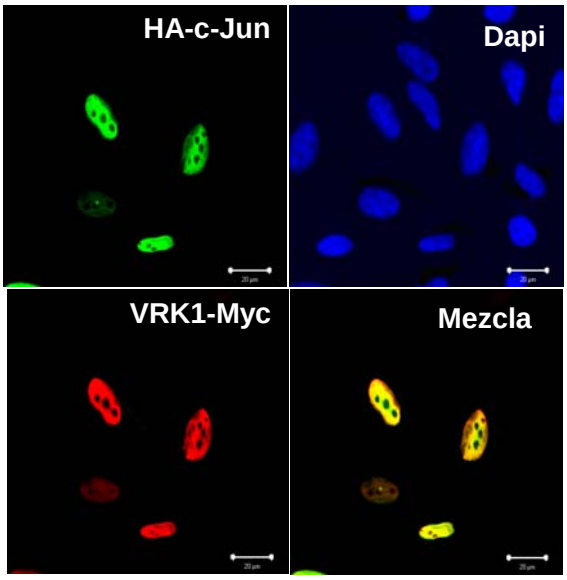


Figura 33: Colocalización nuclear de VRK1 y c-Jun en células HeLa. Las células fueron transfectadas con las construcciones pVRK1-Myc y pHA-c-Jun, posteriormente fueron fijadas y tratadas para la inmunodetección. VRK1 se detectó con un anticuerpo policlonal específico para el epítopo Myc (Cy3-rojo) y c-Jun con un anticuerpo monoclonal específico para el epítopo HA (Cy2-verde). En azul se observa la tinción nuclear con Dapi (4´,6´-diamida-2-fenilindol).

Para que una proteína pueda interaccionar con otra, ambas han de localizarse en el mismo compartimento subcelular, por eso comenzamos estudiando la localización tanto de VRK1 como de c-Jun en células HeLa. Con este fin, transfectamos las construcciones pVRK1-Myc y pHA-c-Jun y determinamos su localización mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. Como se muestra en la figura 33, tanto VRK1 como c-Jun se localizan en el núcleo, pero fuera del nucleolo. Por tanto cuando sobreexpresamos ambas proteínas éstas se localizan en el mismo

compartimento nuclear que es donde presumiblemente van a llevar a cabo su función.

3.2.- VRK1 FOSFORILA A c-JUN *IN VITRO* Y ES INSENSIBLE AL INHIBIDOR DE JNK SP600125

Como bien es sabido, el factor de transcripción c-Jun está regulado por fosforilaciones reversibles llevadas a cabo por diferentes quinasas entre las que se incluyen ERK y JNK dependiendo del tipo de señal extracelular (Leppa et al. 1999; Davis 2000; Chang et al. 2001).

Por esta razón consideramos a c-Jun como un posible substrato para la quinasa nuclear VRK1. Para comprobarlo realizamos un ensayo quinasa *in vitro* con la proteína VRK1 completa unida a GST y la parte amino terminal de c-Jun, GST-c-Jun (1-223) usando ATP radiactivo como donador de grupos fosfato. Como se puede observar en la figura 34, VRK1 fosforila a c-Jun pero no a la proteína GST.

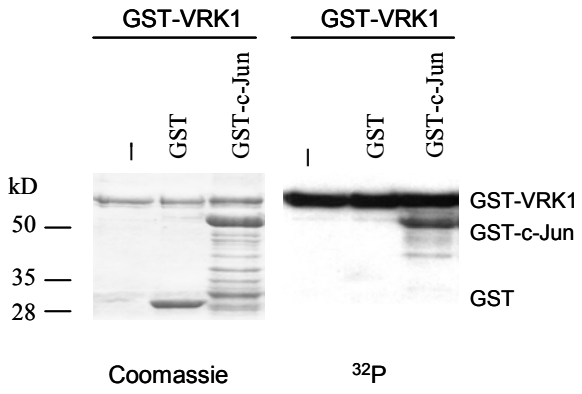


Figura 34: Fosforilación de la región amino terminal de c-Jun por la quinasa humana VRK1. Ensayo quinasa *in vitro* con las proteínas de fusión GST-c-Jun y GST-VRK1. En el panel de la izquierda se muestra la tinción de las proteínas con azul de Coomassie y en el panel de la derecha se muestra la incorporación de radiactividad tanto del substrato c-Jun como de la quinasa VRK1.

A continuación para analizar más en detalle la cinética de esta fosforilación de VRK1 sobre c-Jun, se realizó un ensayo quinasa *in vitro* con concentraciones crecientes de c-Jun para una determinada concentración de VRK1. Cuantificando la concentración de radiactividad incorporada se calculó la constante de Michaelis-Menten Km que nos da una idea de la afinidad del enzima por el substrato. La Km de VRK1 para c-Jun es de 0.4 µM lo cual se ajusta bien a las concentraciones intracelulares de c-Jun.

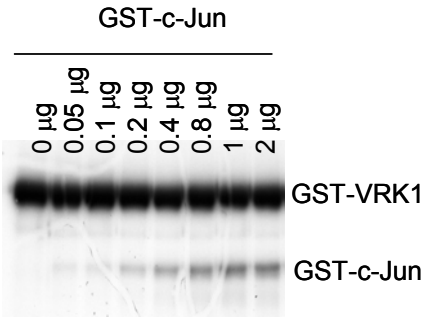


Figura 35: Cinética de fosforilación de c-Jun por VRK1. Como substrato se utilizó la proteína de fusión GST-c-Jun (1-223), 2,5 mM de $MgCl_2$ y 5 µM de ATP en un volumen final de 50 µL. La actividad relativa se determinó mediante la representación de Lineweaver-Burk cuantificando la intensidad de la señal radioactiva durante la fase de respuesta lineal y sus valores se representaron como unidades arbitrarias.

Seguidamente determinamos si la actividad de la quinasa se veía afectada por la presencia del inhibidor de JNK SP600125 que se une al sitio de unión al ATP de todas las isoformas de JNK inhibiendo por tanto la subsiguiente activación de c-Jun (Bennett et al. 2001).

Realizamos un ensayo quinasa *in vitro* con un amplio rango de concentraciones de SP600125. Como se puede observar en la figura 36, la actividad quinasa de VRK1 no se ve afectada en ningún caso incluso usando

concentraciones dos órdenes superiores a la IC_{50}= 0.09 µM concentración mínima inhibitoria para JNK (Bennett et al. 2001; Han et al. 2001).

Por eso podemos concluir que la quinasa VRK1 no es sensible al inhibidor SP600125 puesto que no se afecta su capacidad de autofosforilación ni la capacidad de fosforilación de c-Jun. Por el contrario la actividad quinasa sí que se vió afectada cuando creamos una mutación puntual en la secuencia de VRK1 en la posición de la lisina 179 que fue sustituida por un ácido glutámico, (VRK1 K179E). Ya que éste es un aminoácido esencial para la funcionalidad del sitio catalítico al ser necesario para la reacción de fosfotransferencia en las proteínas quinasas (Hanks et al. 1995).

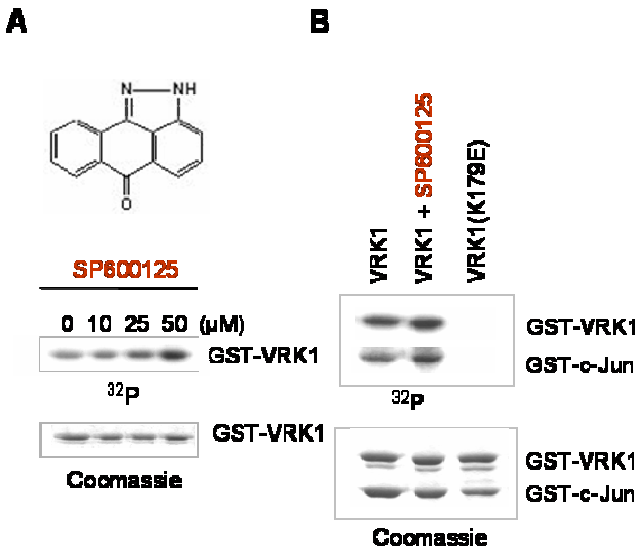


Figura 36: A. Efecto de diferentes concentraciones (µM) del inhibidor SP600125 sobre la propia autofosforilación de VRK1. **B**. Ausencia de efecto del inhibidor SP600125 sobre la quinasa VRK1 en la capacidad de fosforilación del factor de transcripción GST-c-Jun a una concentración de uso de 25 µM SP600125. Actividad quinasa nula del mutante inactivo de VRK1(K179E) tanto en la propia autofosforilación como en la capacidad para fosforilar al sustrato.

Con este mutante puntual se puede observar que tras realizar el correspondiente ensayo quinasa *in vitro* con ATP radiactivo la proteína no tenía actividad quinasa para fosforilar a otros substratos ni tampoco era capaz de autofosforilarse.

3.3.- c-JUN ES FOSFORILADO EN LOS RESIDUOS DE SERINA 63 Y SERINA 73 POR LA QUINASA VRK1.

Con el fin de identificar los residuos que son fosforilados por VRK1 en la molécula de c-Jun, se realizó el siguiente análisis de fosfoaminoácidos usando como substratos tanto la proteína silvestre GST-c-Jun (1-223) como el doble mutante GST c-Jun Ser 63,73 Ala, residuos descritos previamente como dianas de fosforilación de JNK (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991; Smeal et al. 1992).

Nuestro análisis reveló que VRK1 fosforila tanto residuos de serina como de treonina ya que aparecen los dos tipos de fosfoaminoácidos (Figura 37). Aunque sin embargo, la incorporación de radiactividad disminuye en más de un 80% cuando se usa el doble mutante Ser 63,73 Ala, hecho que sugiere que dichos residuos son también, al igual que para JNK, las principales dianas de fosforilación aparte de que existan otros residuos susceptibles de fosforilación.

Por tanto la realización del mapa de fosfopéptidos nos confirmó de nuevo que cuando usábamos la construcción de c-Jun con el doble mutante Ser 63,73 Ala había una pérdida importante de un péptido (Figura 37), sin embargo existen aún otros péptidos fosforilados, lo cual explica que no haya una pérdida total de señal en el análisis de fosfoaminoácidos. Estos péptidos adicionales pudieran ser el resultado de la fosforilación en residuos de treonina aunque no podemos descartar fosforilaciones adicionales en otros residuos de serina.

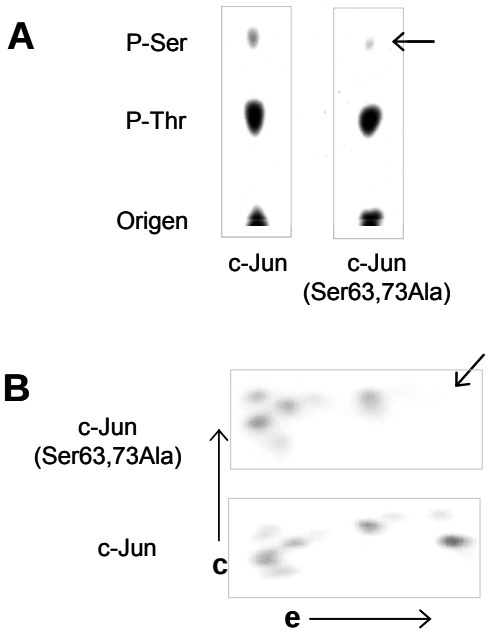


Figura 37: A. Análisis de fosfoaminoácidos de GST-c-Jun silvestre y GST-c-Jun (Ser 63,73 Ala). Las intensidades de las marcas radiactivas se cuantificaron mediante el programa "FX molecular imagen system". La flecha indica la pérdida de fosforilación en los residuos de serina en el doble mutante. **B.** Análisis de fosfopéptidos de GST-c-Jun y el mutante GST-c-Jun (Ser 63,73 Ala), la primera dimensión es una electroforesis de alto voltaje pH 1.9 y la segunda dimensión es una cromatografía de capa fina (TLC). La flecha indica la ausencia de marca radiactiva en la construcción que lleva la doble mutación.

3.4.- LA SOBREEXPRESIÓN DE VRK1 PROVOCA LA ESTABILIZACIÓN DE c-JUN TANTO EXÓGENO COMO ENDÓGENO.

Anteriormente ya se había descrito que la fosforilación de c-Jun por otras quinasas, entre ellas JNK, producía un aumento en la estabilidad de la proteína y como consecuencia de ello un aumento en los niveles intracelulares del factor de transcripción.

Este fenómeno es consecuencia directa de un proceso de fosforilación ya que las moléculas fosforiladas pueden dimerizar evitando así la unión con la ubiquitín ligasa (Fuchs et al. 1996; Fuchs et al. 1997). En nuestro caso, quisimos ver si la sobreexpresión de VRK1 podía también inducir una acumulación de c-Jun como resultado de la fosforilación. Para obtener una primera aproximación transfectamos células HEK293 con cantidades crecientes de pHA-VRK1 y una concentración fija de pHA-c-Jun (1µg). El análisis de los lisados celulares por inmunoblot nos permitió ver que se producía un aumento en los niveles de c-Jun tras la sobreexpresión de VRK1 en comparación con la expresión de c-Jun por sí sola (Figura 38A). Y es más dicho efecto no sólo depende de la presencia ó ausencia de VRK1 sino que también es dependiente de la cantidad de VRK1 expresada. Como control adicional de este experimento, se transfectó con una construcción que expresa para la proteína EGFP la cual se expresa bajo el mismo promotor CMV que la construcción de la quinasa VRK1, corroborando que el efecto que nosotros observamos está realizado por la quinasa y no por un posible efecto sobre el promotor.

Una vez más, para demostrar que la estabilización de c-Jun requiere que la proteína VRK1 esté activa se utilizó una construcción HA-VRK1(K179E) que lleva una mutación puntual en el residuo de lisina 179 dentro del dominio catalítico el cual es esencial para las reacciones de fosfotransferencia. La cotransfección de HA-c-Jun y HA-VRK1(K179E) proteína catalíticamente inactiva, no produce acumulación alguna de c-Jun, resultado que sugiere que la acumulación es consecuencia de la fosforilación de VRK1 (Figura 38B).

Igualmente pudimos determinar la fosforilación endógena de c-Jun sobre el residuo Ser 63 usando un anticuerpo fosfoespecífico en células HEK293 transfectadas con cantidades crecientes de HA-VRK1. Lo que se observó es que a medida que aumentamos las cantidades de HA-VRK1 también se produce un incremento en paralelo de los niveles endógenos de c-Jun fosforilado en Ser 63 (Figura 39).

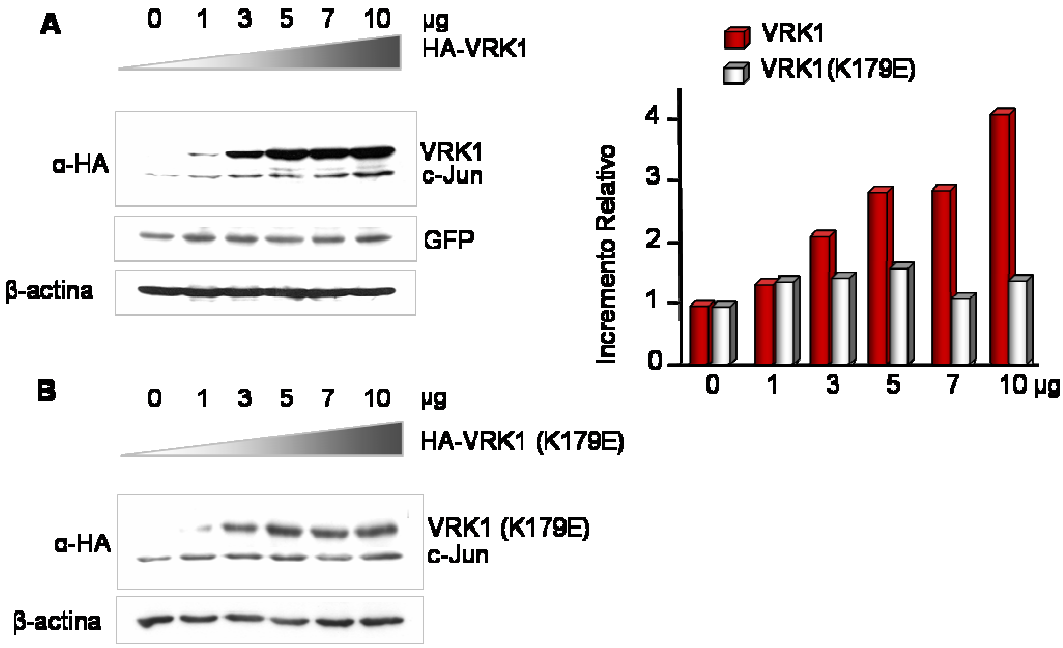


Figura 38: Estabilización de c-Jun tras la sobreexpresión de VRK1.

A. Se transfectaron en la línea celular HEK293 los vectores de expresión correspondientes a las construcciones HA-c-Jun (1µg) y cantidades crecientes de HA-VRK1. 48 horas post-transfección se detectaron los niveles de c-Jun a partir de los lisados celulares. Control de los niveles de la proteína EGFP expresada bajo el mismo promotor que VRK1 en la construcción pCMV-EGFP. **B.** La quinasa inactiva VRK1(K179E) no induce la acumulación de c-Jun. En la gráfica se representa el incremento relativo en la acumulación de c-Jun por la quinasa silvestre con respecto al mutante inactivo VRK1(K179E). En ambos casos se muestra la actina como control de carga.

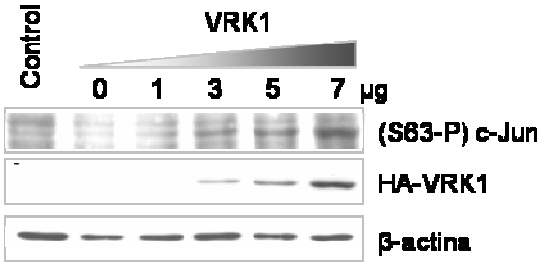


Figura 39: La fosforilación de c-Jun endógeno en el residuo de Ser 63 aumenta en la medida en que aumentamos la cantidad de VRK1 transfectada. Como control se han usado células transfectadas con el vector vacío.

Por tanto este aumento observado en los niveles de proteína fosforilada es consecuente con un aumento en los niveles de proteína VRK1.

3.5.- VRK1 ESTIMULA LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE c-JUN

Puesto que VRK1 fosforila a la molécula de c-Jun en los residuos de Ser 63 y Ser 73, los cuales son idénticos a los fosforilados por la quinasa JNK, es muy probable que la actividad quinasa de VRK1 también module la transcripción dependiente de c-Jun. Para estudiar el efecto de VRK1 sobre la transcripción de c-Jun, utilizamos el sistema reportero formado por una combinación de dos plásmidos; uno de ellos GAL4-c-Jun, que contiene el dominio amino terminal de c-Jun unido al dominio GAL de unión al ADN y el otro es un plásmido que expresa la proteína GAL4 unida al gen de la luciferasa p5xGAL4-Luc. Dicha construcción con el gen reportero de la luciferasa es activada por dímeros previamente formados que tienen la capacidad de unirse al dominio GAL4 de unión al ADN.

En un principio, y de forma semejante al estudio realizado con el otro factor de transcripción ATF2 comenzamos realizando una curva dosis-respuesta. Transfectamos células HEK293 ($5x10^5$ células/placa) con las construcciones pGAL4-c-Jun (1-257), p5xGAL4-Luc, phRL-tk como control interno que codifica para la luciferasa de *Renilla* y cantidades crecientes del plásmido pHA-VRK1. Lo que pudimos observar fue que a medida que aumentábamos las cantidades de quinasa VRK1 así aumentaba la actividad transcripcional c-Jun (Figura 40A).

Seguidamente, dicho efecto también fue estudiado en fibroblastos de ratón NIH3T3 y pudimos comparar el efecto sobre la transcripción con la quinasa JNK. Como se puede observar en la (Figura 40B) en las células transfectadas con pHA-JNK como control positivo, se produce un importante aumento en la actividad transcripcional el cual es comparable al obtenido cuando tansfectamos con nuestra quinasa HA-VRK1. Por el contrario la actividad transcripcional se

bloquea completamente tanto por JNK como por VRK1 cuando las células han sido transfectadas con una construcción en la que los residuos se serina 63 y serina 73, que son las dianas de fosforilación para ambas quinasas han sido sustituidas por alanina (Figura 40B).

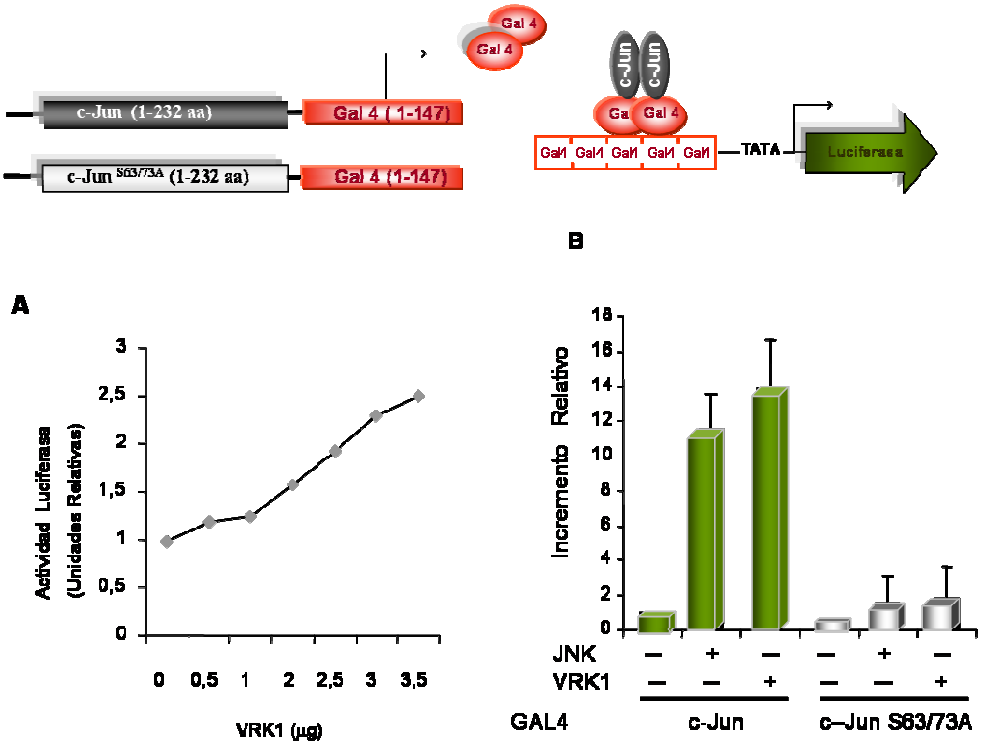


Figura 40: A. Activación de la actividad transcripcional de c-Jun en presencia de VRK1 mediante el sistema dependiente de dimerización en células HEK293 transfectadas ($5x10^5$ células/placa)**.** Curva dosis respuesta **B.** La fosforilación de VRK1 en c-Jun induce un aumento de la actividad transcripcional. Fibroblastos de ratón fueron transfectados con el plásmido control, con HA-JNK (3 µg) o con HA-VRK1 (3 µg). Para el sistema reportero se utilizaron los siguientes plásmidos p5x GAL4-Luc (1 µg), pGAL4-c-Jun (1-257) (1 µg) o pGAL4-c-Jun (1-257).S63/73A (1 µg). Para normalizar la eficiencia de la transfección se utilizó el plásmido pRL-tk (0.5 µg) que codifica para la luciferasa de *Renilla*. La cantidad total de ADN se mantuvo constante en cada transfección mediante la adición de vector vacío. En la gráfica se representa la media ± SD de tres experimentos independientes por triplicado.

Por ello, podemos concluir que VRK1 actúa como un potente activador de la actividad transcripcional de c-Jun mediante la fosforilación en los mismos residuos que la quinasa JNK

3.6.- VRK1 INTERACCIONA CON c-JUN PERO NO CON JNK

La interacción entre JNK y la región δ de c-Jun ya se había descrito anteriormente (Hibi et al. 1993; Davis 1994; Derijard et al. 1994). Hasta el momento nosotros sólo conocíamos que VRK1 ejercía un efecto sobre c-Jun y su actividad transcripcional. Pero este hecho podía estar mediado directamente por una interacción entre VRK1 y c-Jun o bien indirectamente vía JNK. Para probar esta posibilidad transfectamos células HEK293 ($1.5x10^6$ células/placa) con la construcción pHA-c-Jun y la quinasa pHA-JNK o bien la combinación pHA-c-Jun con nuestra quinasa objeto de estudio en el plásmido de expresión pVRK1-Myc. 48 horas post-transfección recogimos los extractos y comprobamos la expresión de cada una de las proteínas por inmunoblot (Figura 41).

Estos extractos se usaron para realizar inmunoprecipitaciones recíprocas. En las células transfectadas con HA-c-Jun y VRK1-Myc, la inmunoprecipitación con anti-HA donde nos bajamos c-Jun también trae consigo a la quinasa VRK1 como se detecta en el inmunoblot. Del mismo modo, en la situación inversa, en la que inmunoprecipitamos VRK1 con el anticuerpo anti-Myc también conseguimos ver c-Jun en el inmunoblot anti-HA (Figura 41A). Sin embargo, cuando tenemos la combinación de ambas quinasas e inmunoprecipitamos cualquiera de ellas, no conseguimos ver la otra quinasa (Figura 41B). Estos resultados sugieren que VRK1 puede interaccionar con c-Jun pero no con JNK. Sin embargo, dicho complejo VRK1 y c-Jun es más factible que sea una pequeña fracción de la proteína total expresada en las células, ya que tan sólo la fracción de c-Jun localizada en el núcleo es la que interacciona con VRK1.

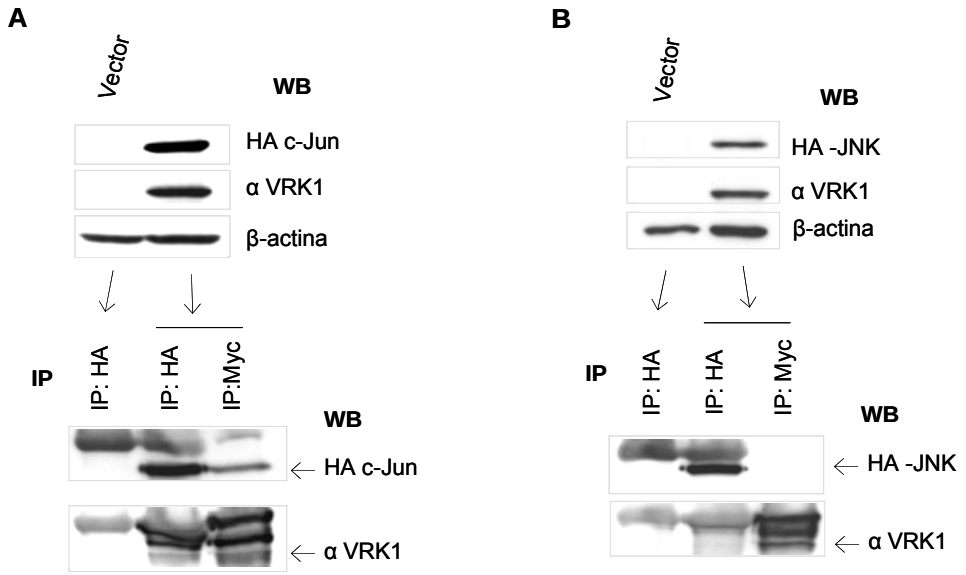


Figura 41: Interacción de VRK1 con c-Jun A. o JNK B. En la parte superior, se muestra el inmunoblot de los extractos celulares totales de células HEK293 ($1.5x10^6$ células/placa) transfectadas bien con pVRK1-Myc (4µg) y pHA-c-Jun (4µg) o con pVRK1-Myc (4µg) y pHA-JNK (4µg). Los extractos de pVRK1-Myc y pHA-c-Jun fueron utilizados para inmunoprecipitaciones recíprocas y en ambos casos se detectó por inmunoblot la otra proteína, mientras que en los extractos de pVRK1-Myc y pHA-JNK tras realizar la inmunoprecipitación no conseguimos ver la otra proteína por inmunoblot. Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas con anticuerpos comerciales específicos para los epítopos HA y Myc, y los inmunoblots fueron realizados con el anticuerpo monoclonal HA o con el anticuerpo policlonal específico para VRK1 (α-VC1).

3.7.- VRK1 COOPERA CON JNK EN LA ACTIVACIÓN DE c-JUN

El hecho de que tanto VRK1 como JNK compartan los mismos residuos como dianas de fosforilación sobre c-Jun nos sugirió que quizás ambas quinasas pudieran cooperar en la regulación de su actividad transcripcional. Para comprobar si la actividad de JNK y VRK1 presentaban un efecto aditivo, seleccionamos concentraciones subóptimas de JNK y VRK1 como 0.4 µg o 0.8 µg de cada plásmido de expresión de las respectivas quinasas y se co-

transfectaron en la línea celular HEK293 junto con el sistema de reporteros pGAL4-c-Jun (1-257) y p5xGAL4-Luc junto con el plásmido phRL-tk como control interno de la transfección.

Como se muestra en la figura 42, una concentración subóptima de cada una de las quinasas por sí misma induce un aumento en la transcripción de c-Jun moderado. No obstante, la combinación de las dos quinasas induce un efecto aditivo, el cual es dependiente de la cantidad de quinasa transfectada. Es por ello, que concluimos que ambas quinasas son capaces de activar c-Jun de forma aditiva en una situación en la que no hayamos alcanzado la activación transcripcional máxima para c-Jun.

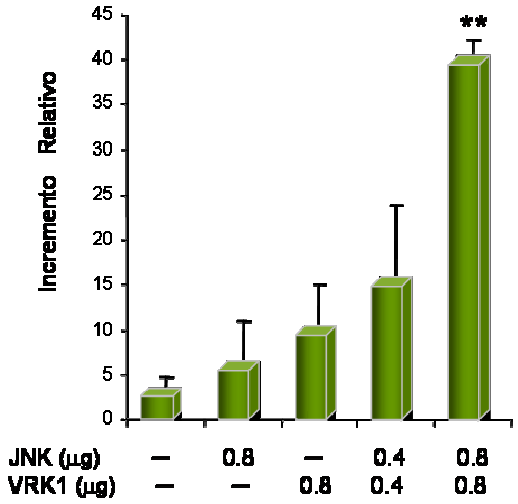


Figura 42: Cooperación entre JNK y VRK1 en la activación de c-Jun.
Se transfectaron células HEK293 con diferentes concentraciones de pHA-JNK o pHA-VRK1 bien de forma aislada cada una de ellas ó de forma conjunta en combinación con el sistema reportero pGAL4 c-Jun (1 µg), p5xGAL4-Luc (1 µg) y pRL-tk (0.5 µg). Se observa una activación de la actividad transcripcional de c-Jun tanto con JNK como con VRK1, además de un efecto aditivo cuando usamos una combinación de ambas quinasas a concentraciones subóptimas. Representación de la Media ± SD de tres experimentos independientes. **p< 0.01.

DISCUSIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS DE VRK1 Y LA FAMILIA DE QUINASAS VRK.

1.1.- LOCALIZACIÓN NUCLEAR

En numerosas ocasiones la localización subcelular de una proteína determina el tipo de substratos con los que puede interaccionar, así como su posible función. Además dicha localización puede estar regulada por otras proteínas en función de las necesidades celulares. Por esta razón decidimos determinar en primer lugar la localización subcelular de la proteína VRK1. Para ello realizamos una inmunofluorescencia indirecta marcando las células previamente transfectadas con anticuerpos específicos. Estudios anteriores en ratones realizados por Zelko y colaboradores encontraron a la proteína mVRK1 en la fracción nuclear de lisados celulares y postularon que la secuencia básica entre los aminoácidos 356 al 360 pudiera funcionar como una secuencia de localización nuclear (Zelko et al. 1998). Posteriormente en nuestro laboratorio hemos demostrado que la proteína humana VRK1 también contiene esa secuencia de localización nuclear y que en determinadas líneas celulares como H1299 y HeLa así como la línea BSC40 (células epiteliales de riñón de mono verde) línea celular con la que ha realizado sus estudios sobre la familia de quinasas VRK el grupo de Nichols.R (Nichols et al. 2004). VRK1 endógena presenta una localización preferentemente nuclear mientras que en la línea celular MCF-7 la localización es sorprendentemente citosólica, por tanto postulamos que debe de existir algún mecanismo hasta el momento no caracterizado que module la entrada y salida al núcleo de la quinasa.

1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FAMILIA DE QUINASAS VRK

En el análisis de secuencias de estas proteínas, hemos encontrado que VRK3 presenta un 27% de identidad con B1R y un 33% de identidad con VRK1.

Fuera de la región del dominio catalítico, la proteína VRK3 contiene una secuencia de localización nuclear en su región aminoterminal que es funcional (Nichols et al. 2004). También presenta 5 repeticiones de la secuencia (K/R)XSPQXT(K/R) la cual presenta un sitio consenso para CDK5 dependiente de fosforilación que pudiera funcionar como un sitio regulador de la proteína ya que como hemos podido observar en nuestros resultados ni VRK1 ni VRK2 son capaces de activar la proteína. El que VRK3 no presente actividad quinasa es comprensible tras el análisis estructural de su dominio catalítico en el cual podemos observar la existencia de varios cambios en aminoácidos importantes que catalizan la transferencia de grupos fosfato. La proteína humana VRK3 es una de las 50 quinasas humanas carentes de un dominio catalítico (Manning et al. 2002). Por esta razón existe la hipótesis de que tal vez pudiera funcionar como una proteína de anclaje dentro de la célula particularmente teniendo en cuenta su tamaño de 474 aminoácidos.

2.- VRK1 y ATF2

La expresión del gen de VRK1 es aparentemente ubicua, estando presente en todas las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, existen grandes diferencias cuando las células están en proliferación, hecho que hay que tener en consideración. VRK1 aparece sobreexpresada en líneas celulares tumorales así como en células con una alta tasa de proliferación, como en la regeneración del hígado (Nezu et al. 1997) y en fases proliferativas durante el desarrollo hematopoyético del embrión murino (Vega et al. 2003). Todos estos datos sugieren que VRK1 pudiera estar participando en mecanismos protectores que son necesitados en un determinado momento cuando la acumulación de daño génico es elevada. En este sentido es importante señalar que VRK1 es capaz de fosforilar a p53, fomentando la acción protectora de esta proteína supresora de tumores, que juega un papel destacado en respuesta a diferentes tipos de estrés

celular (Lopez-Borges et al. 2000). ATF2 es un factor de transcripción que participa en respuestas mediadas por AMP cíclico pero también está relacionado con algunas respuestas de estrés. ATF2 comparte con VRK1 el mismo compartimento celular, pero lo que es más importante es que ambas proteínas pueden formar un complejo estable en el núcleo ya que VRK1 y ATF2 pueden ser co-inmunoprecipitadas. Dicho complejo, sin embargo, representa una pequeña subpoblación de ambas proteínas cuya relevancia se desconoce hasta el momento. Ya que VRK1 presenta una actividad relacionada con la caseína quinasa I, las interacciones con sus sustratos se esperaría que fueran transitorias y no estables.

Por otro lado, los aminoácidos diana de fosforilación de VRK1 sobre ATF2 son diferentes de las dianas de fosforilación de las quinasas de estrés. Las quinasas de estrés como JNK y p38, fosforilan a los residuos de treonina 69 y treonina 71 en el extremo amino terminal de ATF2. Sin embargo, los sitios de fosforilación en ATF2 por VRK1 se localizan en la misma región de la molécula pero son principalmente el residuo de treonina 73 y en menor medida la serina 62, como se demuestra por la incorporación de la mayoría de radiactividad en el residuo de treonina 73. Aunque estos dos residuos han recibido una menor importancia, se sabe que son dianas de fosforilación para otras quinasas. El residuo de serina 62 es diana de fosforilación de la proteína quinasa A (PKA), una quinasa dependiente de AMP cíclico (Sakurai et al. 1991) y el residuo de treonina 73 es también fosforilado por la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina IV (CaMK IV) (Ban et al. 2000). Como consecuencia de esta fosforilación de VRK1 en ATF2 se produce una acumulación de los niveles intracelulares de la proteína, detectados por inmunoblot. Sin embargo, esta acumulación no se produce cuando las células son transfectadas con la quinasa VRK1(K179E) catalíticamente inactiva o bien cuando la diana de fosforilación en ATF2, el residuo de treonina 73 ha sido sustituido por una alanina. Esta estabilización puede ser explicada como consecuencia de un desplegamiento de

la molécula de ATF2 una vez fosforilado que favorezca la homo o heterodimerización evitando así la interacción por su región amino terminal con la ubiquitin ligasa. Por lo tanto mediante este mecanismo, podríamos regular la magnitud y el tiempo en el que el factor de transcripción es transcripcionalmente activo. De este modo, los sustratos son protegidos de su degradación en la medida en que permanecen fosforilados, siendo el periodo de tiempo en el que el factor es transcripcionalmente activo.

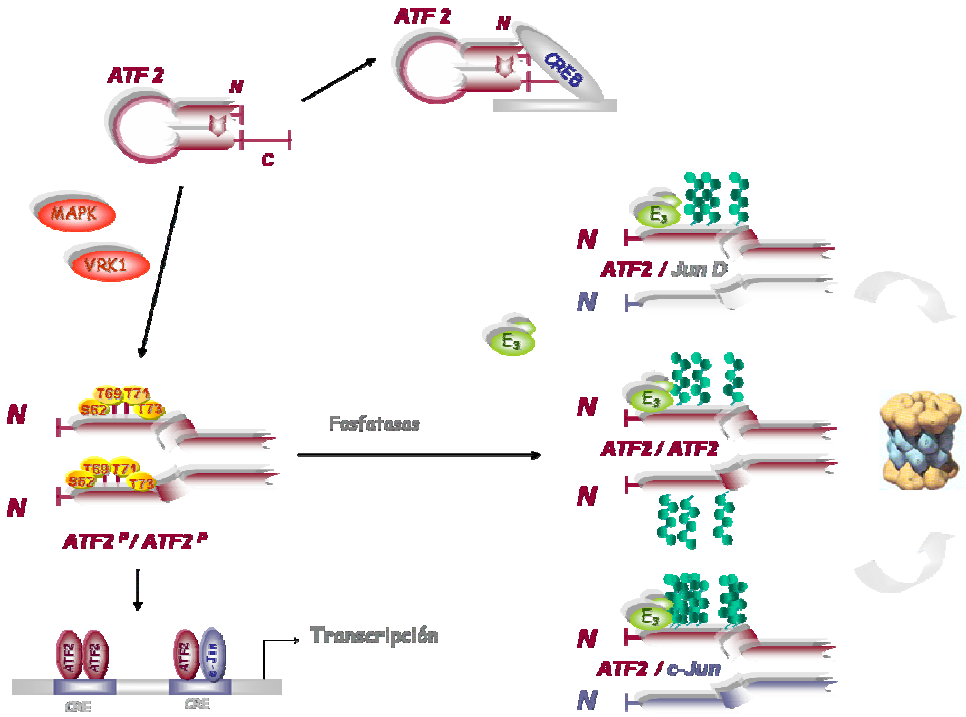


Figura 43: Modelo propuesto que explicaría la regulación de la actividad de ATF2. En forma de monómero ATF2 permanece inactivo. La formación de homo-heterodímeros por la acción de MAPK y/o VRK1 activa la actividad transcripcional. Posteriormente la formación de los homo-heterodímeros permite la degradación del factor por la vía del proteosoma previa desfosforilación por proteínas fosfatasas.

El efecto de esta acumulación de ATF2 que nosotros hemos conseguido transfectando con cantidades crecientes de VRK1, nos sugiere que la fracción fosforilada de ATF2 es mayoritaria y por tanto no se está degradando.

Esta fosforilación constituye un mecanismo de respuesta rápida, permitiendo que el factor actúe de forma inmediata y por tanto el efecto conseguido es más rápido que la acumulación de ATF2 como consecuencia de la síntesis de novo. Así que la fosforilación de ATF2 por VRK1 podría potenciar sus efectos biológicos una vez que se consigan mantener los niveles de proteína.

Por tanto la fosforilación de ATF2 en los residuos de serina 62 y treonina 73 también son importantes en la regulación de la estabilidad de la proteína pudiendo desencadenar el mismo efecto que la fosforilación de los residuos de treonina 69 y treonina 71 por JNK según el modelo propuesto por Ronai.

Posteriormente, mediante la participación de proteínas fosfatasas, los dímeros se desfosforilan pudiendo así interaccionar las ubiquitín ligasas marcando al factor para su degradación por la vía del proteosoma (Firestein et al. 1998; Fuchs et al. 1999; Fuchs et al. 2000).

Como consecuencia de esta acumulación de ATF2 fosforilado se produce un aumento de las posibilidades de dimerización y por tanto un aumento de la actividad transcripcional. Este hecho se ha demostrado mediante dos sistemas. Uno basado en el uso de un dominio de transactivación de ATF2 unido al dominio GAL de unión al ADN. Este ensayo refleja la consecuencia de la homodimerización de ATF2. Y mediante un segundo sistema, utilizando un promotor específico, como es el promotor de la colagenasa que presenta un sitio de unión AP-1 (Steinmuller et al. 2001). Este segundo mecanismo confirma la activación de la transcripción de ATF2 en presencia de VRK1. La magnitud de la activación no es muy elevada de 2 a 3 veces, pero es sabido que la activación de ATF2 por sí mismo no es muy elevada y que normalmente ésta aumenta mediante la cooperación de otros factores de transcripción presentes en el promotor diana. La fosforilación de diferentes residuos en la molécula de ATF2

permite la posibilidad de que diferentes señales a dosis subóptimas cooperen en la activación de ATF2, como se demuestra cuando transfectamos con ambas quinasas a la vez, VRK1 y JNK.

La regulación de ATF2 por fosforilación es muy compleja porque es llevada a cabo por varias quinasas respondiendo a diferentes tipos de estímulos muy heterogéneos (Mayr et al. 2001a; Mayr et al. 2001b). Entre todas esas quinasas están la proteína quinasa A, CaMK IV, JNK y p38 a cuyo grupo tendremos que añadir VRK1, como se muestra en el diagrama (Figura 44). Curiosamente estas fosforilaciones no se han estudiado anteriormente bajo condiciones fisiológicas, pero este tipo de estudio pudiera proporcionar más datos sobre la combinación de actuación de las diferentes rutas de transducción de señales culminando en la activación de un mismo factor de transcripción. Además, aún no se sabe si las fosforilaciones en diferentes residuos de la molécula de ATF2 pudieran estar afectando a las condiciones de dimerización, si tal fuera el caso esta fosforilación en residuos específicos pudiera favorecer la unión de forma preferente a determinadas moléculas y no a otras (Shuman et al. 1997). Si este resultara ser nuestro caso, nuestros resultados representarían un mecanismo adicional por el cual se estaría produciendo una selección de los promotores ya que cada combinación de dímeros pudiera tener diferente especificidad por el promotor. Por tanto estaríamos ante un doble efecto, por un lado estaríamos afectando a la formación de los dímeros y por otro la selección de los promotores.

Por otro lado, el hecho de que existan diferentes sitios de fosforilación nos hace pensar en la posibilidad de una cooperatividad entre diferentes quinasas. ATF2 es muy probable que integre diferentes tipos de señales celulares que convergen en el factor a través de diferentes quinasas, cada una de ellas fosforilado en sus residuos específicos, aunque todos se encuentren en la región amino terminal de la molécula. Recientemente se ha demostrado que existe una interacción directa entre diferentes rutas de señalización de MAPKs sobre el factor de transcripción ATF2 (Ouwens et al. 2002). En este caso concreto, los

factores de crecimiento conducen a una doble fosforilación de ATF2 mediante un mecanismo que transcurre en dos pasos en el que participa primero la quinasa ERK seguida de otra fosforilación llevada a cabo por la quinasa p38. Por tanto diferentes rutas de señalización de las MAPKs pueden bien fosforilar los mismos residuos en el factor de transcripción de forma mutuamente excluyente, fosforilar los mismos residuos para dar un resultado distinto, o actuar de forma sinérgica para provocar una doble fosforilación que origine una respuesta conjunta.

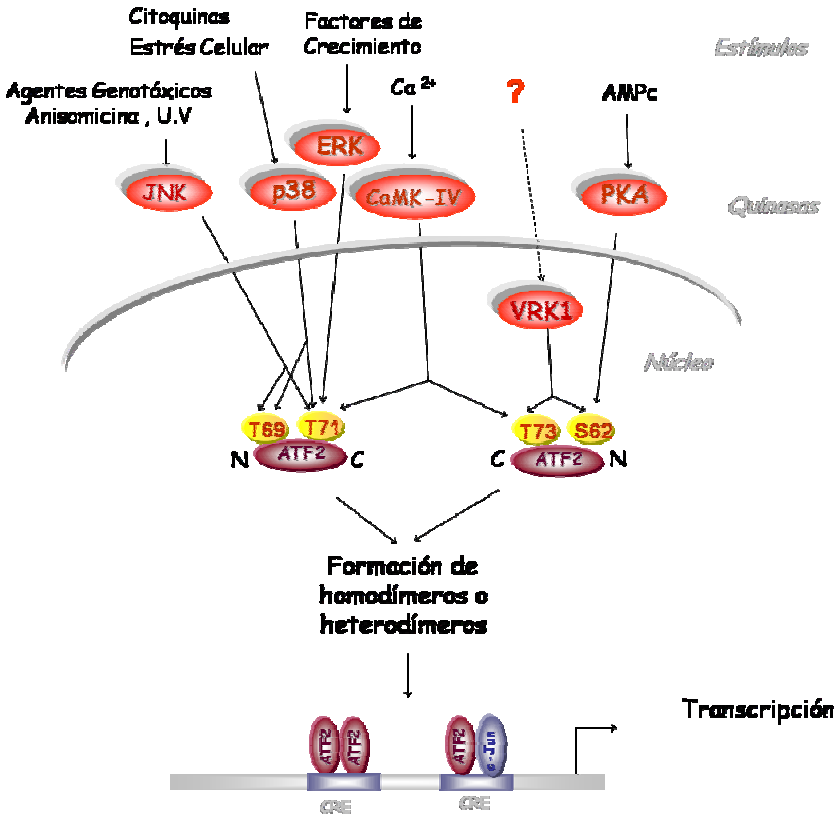


Figura 44: Activación de la actividad transcripcional de ATF2 por diferentes serina treonina quinasas. Diagrama ilustrativo de las diferentes señales que culminan en el factor de transcipción ATF2 reflejando la complejidad de su regulación. CaMK-IV (quinasa dependiente de calcio-calmodulina), PKA (proteína quinasa A) P (Fosforilación), C (región carboxilo terminal), N (región amino terminal).

En este trabajo nosotros hemos demostrado que es posible la fosforilación de dos quinasas, VRK1 y JNK, cada una de ellas fosforilando diferentes residuos proporcionando un efecto aditivo en la activación de la actividad transcripcional. Esta activación, dependiendo de su nivel, pudiera producirse en cooperación con otras señales si todas ellas estuvieran actuando a dosis subóptimas o bien ser exclusiva si alguna de ellas alcanzase el efecto máximo. Se puede concluir que VRK1 representa el principio de una nueva ruta de señalización en la cual faltarían muchos componentes por descubrir.

3.- VRK1 y c-Jun

La fosforilación del factor de transcripción c-Jun por la quinasa nuclear VRK1 pudiera también representar un nuevo mecanismo para regular a c-Jun. La quinasa VRK1 hasta el momento no está integrada en ninguna de las rutas de señalización descritas en la literatura. Aunque comparte varios de los substratos capaces de ser fosforilados por las MAPKs activadas por estrés, aún quedan por determinar los estímulos que activan a la quinasa. Suponemos que debido a su localización nuclear, VRK1 pudiera activarse fundamentalmente en respuesta a procesos nucleares actuando por ejemplo como sensor frente a daño al ADN ya que es también capaz de fosforilar a p53 en el residuo de treonina 18 aumentando la estabilidad de la proteína (Vega et al. 2004). Sin embargo, de los elementos reguladores de la ruta que están aguas arriba aún no se sabe nada. En este sentido, sería interesante resaltar que VRK1 presenta una gran afinidad para fosforilar proteínas como p53, c-Jun y ATF2 todas ellas componentes de mecanismos celulares implicados con las respuestas de estrés (Figura 2).

Quinasas que juegan un papel regulador en rutas de señalización deben tener sus propiedades cinéticas adaptadas a las concentraciones intracelulares de sus proteínas diana. Cambios o fluctuaciones en los estados de fosforilación de las proteínas pueden repercutir en los niveles de las proteínas substrato, tales

como c-Jun. La proteína VRK1 tiene una Km para c-Jun de 0.4 μM, una concentración que está acorde con los niveles de c-Jun intracelulares. La afinidad de VRK1 por la proteína c-Jun está condicionada en cierto modo por la concentración intracelular de la proteína. Por ello, si por algún estímulo aumentan los niveles nucleares de la proteína, ésta será fosforilada y comenzará a ser transcripcionalmente activa.

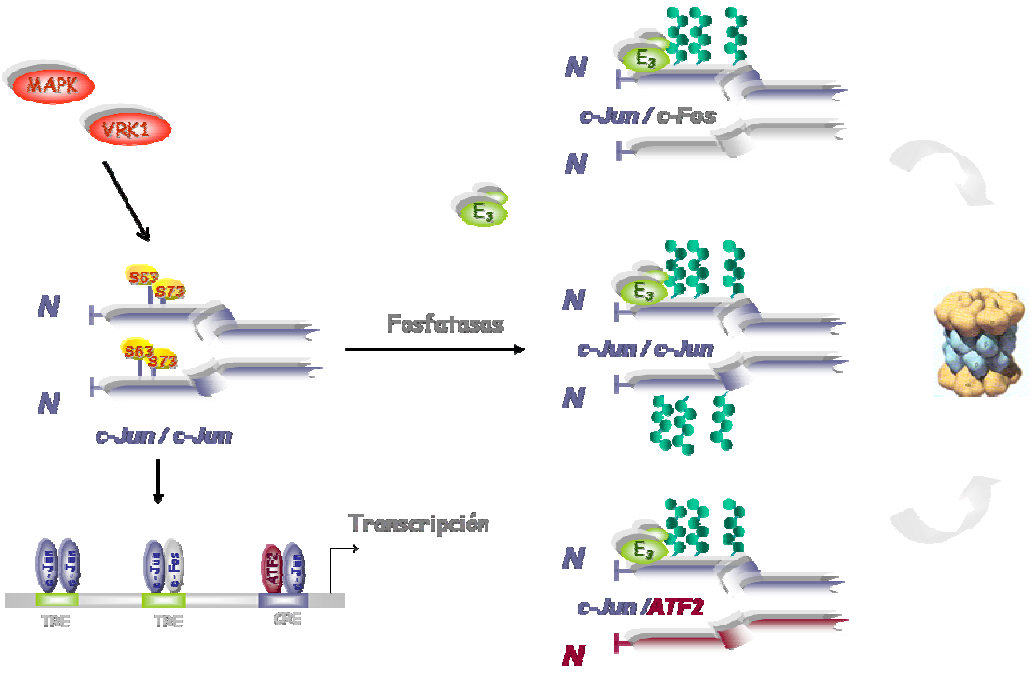


Figura 45: Modelo propuesto para explicar la regulación de la actividad de c-Jun. Formación de homo-heterodímeros por la acción de MAPK o VRK1 y activación de la actividad transcripcional. La formación de los homo-heterodímeros permite la degradación del factor por la vía del proteosoma previa actuación de proteínas fosfatasas.

Como podemos observar en función de nuestros resultados, la regulación de la estabilidad de c-Jun parece regirse por el mismo mecanismo al descrito para ATF2. Ya que como consecuencia de la sobreexpresión de VRK1 se produce una acumulación del factor de transcripción c-Jun. Sin embargo, esta

acumulación no se produce cuando las células son transfectadas con la quinasa VRK1(K179E) catalíticamente inactiva. Con nuestros resultados observamos que VRK1 al igual que JNK es capaz de estabilizar a la proteína c-Jun *in vivo,* ya que a medida que transfectamos cantidades crecientes de VRK1 se aprecia un aumento en los niveles de c-Jun fosforilado en serina 63 confirmando que dicha fosforilación está contribuyendo a la estabilidad de la proteína, aumentando su vida media y favoreciendo la activación de genes dependientes de c-Jun (Musti et al. 1997).

La fosforilación de c-Jun en los residuos de serina 63 y serina 73 sugiere que estos residuos pueden ser fosforilados independientemente de la activación de c-Jun por la quinasa JNK, como se muestra con la gráfica del efecto aditivo en la activación transcripcional de c-Jun por JNK y VRK1. Además, ambas quinasas pueden alcanzar un nivel similar en la activación transcripcional de c-Jun, indicando que la ruta de señalización de VRK1 es probable que sea independiente de la de JNK, ya que pudieran estar activadas por diferentes estímulos, aunque al menos parte de los efectos transcripcionales pudieran ser los mismos. El efecto aditivo en la fosforilación de c-Jun por VRK1 y JNK sugiere dos posibles consecuencias sobre dicha fosforilación. Una es que los dos caminos pueden activar a c-Jun de una manera aditiva si la activación ocurre a dosis subóptimas. Por el contrario, la otra alternativa pudiera darse que la máxima activación por una de las rutas evitara la activación de la otra ruta de señalización. En este último caso, las diferencias biológicas estarían determinadas por la diferente especificidad de substrato de las quinasas implicadas.

La mayoría de los estudios sobre la regulación de c-Jun han sido llevados a cabo en condiciones de estrés masivo que no representan las condiciones biológicas de selección a lo largo de la evolución, ya que son dosis altas de irradiación o la exposición a drogas quimioterapeúticas. La magnitud del daño que sufren las células en condiciones normales a lo largo de la evolución es muy

inferior, por eso c-Jun debe tener un mecanismo de regulación más preciso y sofisticado, y VRK1 pudiera ser uno de esos elementos reguladores. C-Jun es necesario para la proliferación celular, y bajo condiciones de estrés severo se desencadena una respuesta de apoptosis (Dunn et al. 2002).

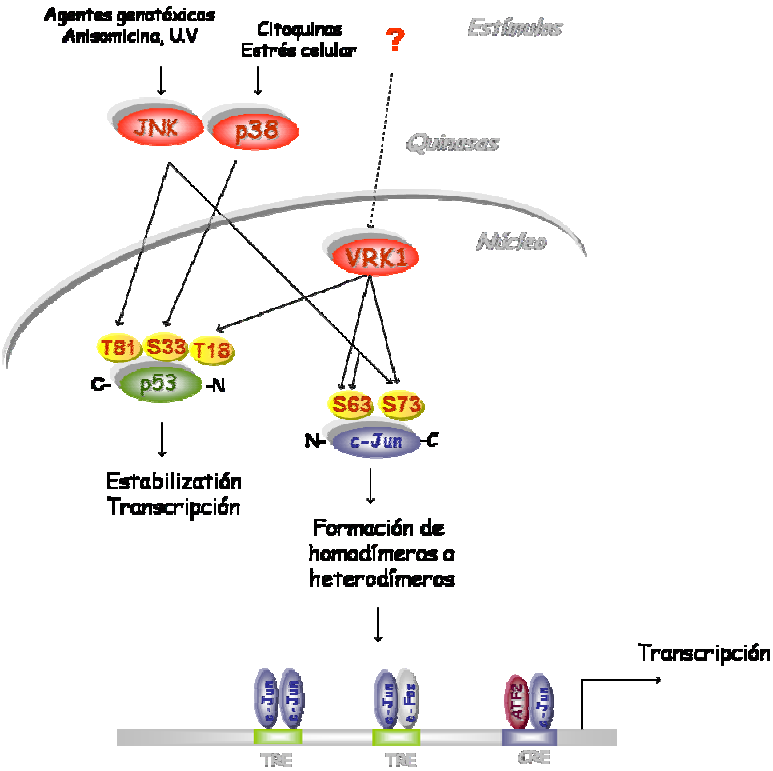


Figura 46: Diagrama ilustrativo de las rutas de señalización que convergen en c-Jun. Dianas de fosforilación de VRK1. VRK1 comparte con JNK la capacidad de interaccionar con c-Jun, fosforilarlo y potenciar su actividad transcripcional.

En ausencia de estímulos de estrés, quizás la función que desempeña VRK1 es la de mantener una actividad de transcripción basal para el complejo AP-1 que requiere del factor c-Jun como parte del dímero. Sin embargo, las

explicaciones exactas de este mecanismo y su implicación en oncogénesis son aún muy difíciles de determinar, sugiriendo que la regulación de c-Jun es más compleja de la que en un principio se pensó (Kennedy et al. 2003).

Por otro lado también, se han detectado alteraciones en los niveles de c-Jun en varios tipos de tumores, estos cambios pudieran modificar el patrón de expresión de otros genes y ser oncogénicos (Wodrich et al. 1993; Tiniakos et al. 1994; Neyns et al. 1996; Szabo et al. 1996; Aoyagi et al. 1998; Antonyak et al. 2002; Volm et al. 2002; Meggiato et al. 2003).

Por tanto, con este estudio hemos aportado nuevos datos a la compleja red de señalización celular. Hasta el momento sabemos que VRK1 es capaz de fosforilar a tres factores de transcripción p53, ATF2 y c-Jun que son a su vez activados en respuesta a señales de estrés mediante diferentes rutas de señalización donde participan diversas quinasas.

Como consecuencia de dicha fosforilación tanto en ATF2 como en c-Jun se produce un aumento de la estabilidad de la proteína, aumentando así el tiempo en el que los factores permanecen transcripcionalmente activos.

Hasta el momento hemos podido comprobar que la fosforilación de VRK1 en ambos factores aumenta su actividad transcripcional, sin embargo aún no sabemos si se están afectando las condiciones de dimerización ya que en tal caso con la activación de VRK1 se estaría favoreciendo una selección sobre la formación de unos determinados homodímeros o heterodímeros, con la consiguiente selección de los promotores.

Finalmente aunque aún no sabemos cómo se modula la actividad de la quinasa VRK1, un hecho significativo es que un gran número de genes que se activan en respuesta a daño genotóxico son dependientes de heterodímeros c-Jun /ATF2.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES DE ATF2

- **VRK1 fosforila al factor de transcripción ATF2. La fosforilación se produce en los residuos de serina 62 y principalmente en el residuo de treonina 73. Esta fosforilación pudiera estar condicionando el proceso de dimerización**

- **La fosforilación en dichos residuos aumenta la actividad transcripcional del factor.**

- **La sobreexpresión de VRK1 y fosforilación de ATF2 por la quinasa VRK1 provoca la estabilización del factor aumentando el tiempo en el que es transcripcionalmente activo**

- **La fosforilación de ATF2 por diferentes quinasas sugiere una posible cooperación entre ellas en la activación del factor de transcripción**

CONCLUSIONES DE c-JUN

- **VRK1 fosforila al factor de transcripción c-Jun en los mismos residuos que JNK en serina 63 y serina 73.**

- **La fosforilación en dichos residuos aumenta la actividad transcripcional del factor.**

- **La sobreexpresión de VRK1 y fosforilación de c-Jun por la quinasa VRK1 provoca la estabilización del factor aumentando el tiempo en el que es transcripcionalmente activo**

- **El efecto aditivo en la fosforilación de c-Jun nos sugiere dos posibles consecuencias:**

  - Dos rutas de señalización pueden activar c-Jun de forma aditiva (dosis subóptimas)

  - La máxima activación por una de las rutas puede prevenir la activación por la otra ruta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

1.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE *E.COLI*

El método utilizado con mayor frecuencia para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala, a partir de *E.coli*, fue el método de la lisis alcalina descrito por Birboim y Doly (1979) (Birboim 1979). La obtención de ADN plasmídico de alta calidad a pequeña escala se realizó utilizando el sistema comercial (*High Pure Plasmid Isolation kit)* (Roche Mannheim Germany). Para la obtención de ADN a gran escala se usó el sistema comercial de (CONCERT ™ *High Purity Plasmid Maxiprep System*) de GIBCO-BRL. En todos los casos se siguieron las especificaciones del fabricante.

1.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

La concentración de ADN (tanto de doble cadena, como de cadena sencilla) se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Gene Quant (Amersham, Pharmacia Biotech) y considerando la relación de absorbancia 260/280 nm. Para corroborar los resultados en el método anterior, se analizó la fluorescencia emitida por la muestra tras la electroforesis en un gel de agarosa.

1.3.-DIGESTIÓN DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

La digestión con enzimas de restricción nos permitió comprobar los plásmidos de partida mediante la caracterización fÍsica de fragmentos de ADN además de su secuenciación. Roche, Bio-Labs y Promega fueron las casas comerciales que nos suministraron las enzimas de restricción.

1.4.-ELECTROFORESIS DE FRAGMENTOS DE ADN

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 al tamaño de los fragmentos a separar (entre 0.7 y 1.5%, según los casos). Los fragmentos migraron a voltaje constante (60-100 V). El tampón de carrera usado en todos los casos fue TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Como marcador de tamaño se utilizó bien ADN Ladder 1 kb (Gibco- BRL) o ADN de fago λ cortado con la endonucleasa Hind III (Gibco-BRL).

Para monitorizar la migración del ADN en el gel utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xylenocianol, que en un gel de agarosa al 0.8% migra aproximadamente con los fragmentos de 5 kb, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 kb. En la preparación del gel se incluyó bromuro de etidio (0.5 µg/mL), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta, para poder visualizar así los fragmentos digeridos. Las imágenes se captaron con una cámara digital acoplada al analizador de imagen Gel Doc ™ 2000 (Bio-Rad) e impresas en papel térmico.

2.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la inserción de mutaciones puntuales en construcciones de ADN se utilizó el sistema comercial “QuikChange Site-Direct Mutagenesis” de (Stratagene San Diego, California). Para ello se utilizó un vector de ADN de doble cadena con el inserto de interés y dos oligonucleótidos sintéticos complementarios a cada una de las cadenas del vector, conteniendo la mutación deseada. La reacción de PCR (Polimerase Chain Reaction) tuvo lugar en un volumen final de 50 µL, conteniendo 50 ng de ADN patrón, 5µL de tampón 10x de PCR (KCl 100 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 100 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8.8), $MgSO_4$ 20 mM, Tritón ® X-100 1%,

BSA 1mg/mL), 125 ng de cada oligonucleótido, 1μL de mezcla de dNTP y 1μL de ADN polimerasa *Pfu Turbo*. Para la mutación en una base determinada, las condiciones de la reacción consistieron en un ciclo de desnaturalización a 95ºC durante 30 seg, seguido de 16 ciclos consistentes en 95ºC 30 segundos, 55ºC 1 minuto y 68ºC 15 minutos. Tras la reacción de PCR con la ADN polimerasa *Pfu-Turbo* se obtuvieron plásmidos mutantes con la nueva sustitución junto con copias parentales. Estas últimas fueron eliminadas tratando la muestra con la endonucleasa *DpnI,* con acción específica sobre secuencias metiladas y hemimetiladas, resultando así seleccionadas las copias mutantes. El producto de PCR así tratado se analizó mediante electroforesis en geles de azarosa y se transformó en cepas bacterianas DH5α F´ competentes seleccionando las colonias transformantes con la resistencia específica para cada vector. De esta forma a partir de los plásmidos pGEX-ATF2 (1-109), pHA-ATF2 y pGAL4 ATF2 (1-109) se incorporaron las mutaciones que se muestran en la Tabla 2 Tabla 3 y en la Tabla 4.

Los oligonucleótidos fueron servidos por la empresa ISOGEN Bioscience BV (Utrecht, Holanda). En la Tabla 5 se detallan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados donde el triplete afectado aparece en subrayado y en negrita el nucleótido mutado.

3.- TRANSFORMACIÓN

Tras la reacción de mutagénesis, el producto de PCR se añadió a 100 μL de bacterias DH5αF´ o BL21E3 competentes de *E.coli* según la finalidad, incubándolas durante 10 min. a 4ºC, después de los cuales se les sometió a un choque térmico de 37ºC durante 5 min. Se volvieron a enfriar 20 min. a 4ºC y se les añadió 1 mL de medio LB, incubándose 1h a 37ºC en agitación (tiempo de expresión de la resistencia al antibiótico) y finalmente se sembraron diferentes volúmenes de cultivo en placas Petri de LB-agar con el antibiótico

correspondiente (50 µg/mL de ampicilina). Las placas se incubaron a 37ºC durante toda la noche.

4.-SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo de forma automática utilizando un secuenciador ABI Prism 377^{TM} de Perkin-Elmer. La reacción de extensión del ADN que se desea secuenciar tiene lugar mediante un marcaje de fluorescencia incorporada a los diferentes di-deoxinucleótidos. Cuatro colores diferentes de fluorescencia identificaron a cada uno de los nucleótidos (A,T,C o G). Todas las mutaciones generadas en este trabajo así como los plásmidos de partida han sido confirmados mediante secuenciación.

5.- EXPRESIÓN EN BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

Las proteínas de fusión se obtuvieron mediante la expresión de los vectores de expresión pGEX unidos a GST (Glutatión-S-Transferasa). Dichos vectores presentan un promotor *tac* para poder ser inducidos químicamente con lactosa o un análogo como es el isopropil β-D- tiogalactosido (IPTG), el gen *lac* I^4 para poder ser usados en cualquier cepa hospedadora de *E.coli* y un sitio de corte reconocido por la Trombina para poder separar la proteína clonada del producto de fusión.

La expresión y purificación de dichas proteínas de fusión, se llevó a cabo mediante el sistema de fusión con Glutatión-S-Transferasa (Amersham, Pharmacia Biotech) a partir de plásmidos transformados en la cepa BL21DE3 de *E.coli*. Se inoculó dicha cepa en medio selectivo (LB con ampicilina 50 µg/mL) y se dejó crecer a 37ºC durante toda la noche en agitación. Se diluyó ese inóculo

en medio selectivo fresco y se dejó crecer a 37ºC hasta alcanzar una densidad óptica a A_{600nm} de 0.6-0.8. En este punto se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG a una concentración final de 0.5 mM (Roche) y dejando crecer el cultivo a 37ºC durante 3 a 4 horas más en agitación. El cultivo bacteriano resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min. y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (PBS 1X frío, Triton X-100 al 1%, DTT 2 mM, Lisozima 0.2 μg/mL) al que se añadieron los inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, aprotinina 10 μg/mL y leupeptina 10 μg/mL). La suspensión se sonicó a baja potencia con 2 pulsos de 30 segundos cada uno a 4ºC y se dejó 30 min. de incubación a 4ºC. Se centrifugó a 30.000 x g 30 min. a 4ºC y recogimos el sobrenadante resultante que contiene las proteínas solubles, entre las que se encontraba de forma mayoritaria la proteína de fusión expresada. Esta fracción soluble se incubó con resina de Sefarosa-glutatión (*Glutathione Sepharose 4B beads)* (Amersham Pharmacia Biotech) durante 3 horas a 4ºC en agitación suave. Después de este tiempo se lavó la resina varias veces mediante centrifugación suave con PBS 1X con inhibidores de proteasas y se eluyó la proteína por varias veces con 20 mM de Glutatión reducido en Tris-HCl 50 mM pH 8 a temperatura ambiente durante 15 min. y en agitación suave. La pureza de la proteína eluida se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de Tinción con Azul de *Coomassie* o inmunoblot. Una vez comprobada, se dializó el eluido mediante membrana de diálisis (Serva) frente a tampón de diálisis (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 5% Glicerol) o PBS + 5% Glicerol y se concentró en centricón Amicon Ultra (Millipore Bedford MA) antes de cuantificarla con "BIO-RAD protein assay" (Bio-Rad).

6.- TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Los geles de poliacrilamida se tiñeron en solución de *Coomassie* (0.5% de Coomassie Brilliant Blue R250*,* 50% metanol, 10% ácido acético glacial) durante 10 min. en agitación y se destiñeron posteriormente en solución de destinción

(50% metanol, 10% ácido acético glacial) en agitación hasta correcta visualización de las bandas de proteína de interés.

7.- ENSAYOS KINASA DE VRK1

Los ensayos quinasa se realizaron en un volumen final de 25 μL de tampón quinasa (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, KCl 150 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 0.5 mM y ATP-Mg^{2+} 5 μM) con 2 a 5 μg de la proteína recombinante VRK1 correspondiente y 10 μg de proteína sustrato. A la mezcla de reacción anterior se añadió 5 μCi de [γ^{32}P] ATP y se incubó 30 min. a 30ºC como se detalla en la publicación (Lopez-Borges et al. 2000).

Para el estudio de la cinética de reacción se mantuvieron las mismas condiciones del ensayo pero se añadieron cantidades crecientes de substrato GST-c-Jun. En todos los casos la incorporación de radiactividad se realizó en un rango de respuesta lineal.

El inhibidor específico de JNK utilizado, SP600125 fue de Sigma.

Las proteínas fosforiladas, salvo indicación de lo contrario, se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida del 12%/0.1% SDS. El gel fue posteriormente teñido y desteñido con tinción de *Coomassie* para detectar todas las proteínas y secado en un secador de geles (Bio-Rad) durante 2 horas a 80ºC. La radiactividad incorporada se detectó por autorradiografía con películas Kodak y se analizó usando el programa "Quantity One" de Bio-Rad que permitió la cuantificación de las bandas por densitometría.

8.- HIDRÓLISIS ÁCIDA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA Y ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE FOSFOAMINOÁCIDOS.

Tras realizar el correspondiente ensayo quinasa *in vitro* con la proteína GST-VRK1 y GST-c-Jun, GST-c-Jun S63/73A, GST-ATF2, y resto de mutantes de ATF2 como substrato (Ver Tabla 2 y Tabla 3).

Cada banda respectiva de proteína substrato fue separada electroforéticamente por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida del 12% en cubetas grandes de electroforesis (Life Technologies.Inc) y transferida a membranas de Immobilón-P (Millipore Bedford MA) mediante transferencia húmeda según Towbin (Towbin et al. 1979) durante 3 horas a 450 mAmp usando el sistema Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratorios. Inc), se lavó abundantemente en metanol (Merck) y en agua, y se introdujo en un tubo eppendorf con 200 µL de HCl 6N, asegurándose que quedara completamente sumergida. Se gasearon los tubos con nitrógeno y se incubaron a 110ºC durante 2 horas. Después de la hidrólisis se centrifugaron a 9.300 x g en una centrífuga (Eppendorf 5415D) durante 1 min. Se recogió el sobrenadante y se liofilizó completamente en un concentrador de Speed-Vac (Savant Hicksville NY).

La muestra liofilizada se resuspendió en una mezcla que contenía 2 µL de marcadores de fosfoaminoácidos fríos (1 mg/mL de cada uno: fosfoserina (Sigma), fosfotreonina (Sigma) y fosfotirosina (Sigma) en agua), 1 µL de bromofenol (Merck) al 1% y 2 µL de tampón pH 1.9 (ácido fórmico: ácido acético: agua, 1:3.12:35.88).

Se aplicó en una cromatoplaca de celulosa (Merck Darmstadt Germany) de 20x20 cm de longitud y 0.1 mm de espesor, secando la muestra con N_2 después de cada aplicación. Para la separación electroforética usamos el sistema Multiphor II (Amersham Biosciences Uppsala Sweden).

La primera dimensión emplea tampón pH 1.9. Se humedece completamente la cromatoplaca con este tampón, evitando excesos de líquido, y se colocan unos puentes de papel Whatman 3MM de 13x20 cm. Las condiciones de electroforesis son 1.5 kV durante 90 min. A continuación se retira la placa y se deja secar a temperatura ambiente.

Los marcadores fríos de fosfoaminoácidos se visualizan incubando la cromatoplaca en una solución de 0.25% de ninhidrina (Sigma) en acetona durante 8 min. a temperatura ambiente y secando a continuación al aire. Los

fosfoaminoácidos se detectaron por autorradiografía con películas Kodak o analizando la radiactividad incorporada con el sistema de detección "FX molecular imager system" (Bio-Rad) y pantallas Fuji Bas 2040.

9.- DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA Y ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE PÉPTIDOS

Las proteínas fosforiladas GST-c-Jun, GST-c-Jun S63/73A, GST-ATF2, así como el resto de mutantes de ATF2 (Ver Tabla 2 y Tabla 3) se separaron electroforéticamente en SDS-PAGE al 12% en cubetas grandes de electroforesis (Life Technologies. Inc) y se transfirieron a membranas de Inmobilon-P (Millipore) mediante transferencia húmeda según Towbin (Towbin et al. 1979) usando el sistema Trans-Blot Cell (Bio-Rad laboratorios. Inc) durante 3 horas a 450 mAmp.

Las membranas se secaron a temperatura ambiente y las proteínas fosforiladas se visualizaron mediante autorradiografía con película Kodak. La banda de proteína de interés se recortó y se incubó en una solución de polivinil pirrolidona K25 (Merck) al 0.5% en ácido acético 100 mM (Merck), durante 30 min. a 37ºC para bloquear los sitios de unión inespecífica de la membrana. Se aspiró el líquido y la membrana se lavó abundantemente con agua y con NH_4HCO_3 50 mM recién preparado.

La membrana se incubó con 10 μg de Tripsina (Roche Diagnostics Mannheim Germany) durante 2 horas a 37ºC en NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 (preparado el día anterior para que se equilibrara al pH adecuado). El volumen de digestión fue suficiente para cubrir la membrana. Se repitió una nueva dosis de tripsina de 2 horas y una última dosis durante 18 horas. Al final de la digestión se añadió agua destilada estéril, se centrifugó a 9.300 x g en una centrífuga (Eppendorf 5415 D) durante 5 min. a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante y se lavó de nuevo la membrana con agua, reuniéndola con el sobrenadante anterior. La muestra se congeló en nieve carbónica y se liofilizó

completamente. A continuación se oxidó con ácido perfórmico durante 1 hora en hielo. El ácido perfórmico del 98-100% (Merck) con una parte de peróxido de hidrógeno al 30 % (Merck) se dejó preparado antes 1 hora a temperatura ambiente y luego se enfrió en hielo. Tras la oxidación se añadió agua destilada, se congeló en nieve carbónica y se liofilizó completamente.

Después de sucesivos pasos de limpieza por resuspensión en agua y liofilización, la muestra se disolvió en 5 μL de tampón pH 1.9. Posteriormente se aplicó en cromatoplacas de celulosa como en el caso del análisis bidimensional de fosfoaminoácidos y se realizó una cromatografía bidimensional. Para ello se empleó en la primera dimensión electroforesis en tampón pH 1.9 (el mismo que el utilizado en la separación de fosfoaminoácidos) a 1.5 kV durante 90 min., y en la segunda dimensión una cromatografía en tampón de fosfocromatografía (ácido acético: piridina: n-butanol: agua. 1: 3.33: 5: 4) durante 13 horas, en cubetas de cromatografía.

Finalizada la primera dimensión se dejó secar la placa a temperatura ambiente y posteriormente se giró la placa 90º para la segunda dimensión. Tras la cromatografía se secó la placa a temperatura ambiente y se visualizaron los péptidos mediante autorradiografía con películas Kodak o utilizando el sistema de detección “FX molecular imager system” (Bio-Rad) con pantallas Fuji Bas 2040.

10.- CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido HeLa, MCF-7, NIH3T3 y HEK293. HeLa, MCF-7 y HEK293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 1% de L-glutamina y 1% penicilina-streptomicina. La línea celular NIH3T3 se cultivó en el mismo medio, pero sustituyendo el suero bovino fetal por suero de ternera (Tabla 7).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en un incubador a 37ºC en una atmósfera conteniendo un 5% de CO_2 y un 98% de humedad relativa. Todos los medios, sueros y suplementos fueron obtenidos de GIBCO-Life Technologies.

11.- TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO

Para las transfecciones de ADN se sembraron las células en cultivo 24 horas antes de la transfección a una densidad de modo que estuvieran entre un 60-80% de confluencia en el momento de la transfección. En concreto para HEK293 se sembraron $1.5x10^6$ células en placas de 100 mm y $5x10^5$ células en placas de 60 mm, y en el caso de células HeLa y NIH3T3 se sembraron entre ($4x10^5$ y $3x10^5$ células) por placa de 60 mm. Las células se transfectaron con las construcciones de ADN indicadas en cada experimento mediante uno de los siguientes métodos:

Las líneas celulares HeLa y HEK293 se transfectaron usando "JetPEI Cationic polymer transfection reagent" (Polytransfection Illkirch France) según las instrucciones del fabricante en una proporción N/P (número de residuos de nitrógeno del reactivo por fosfato del ADN) de 5. El reactivo JetPEI compacta el ADN dentro de partículas cargadas positivamente capaces de interaccionar con los proteoglicanos aniónicos de la superficie celular permitiendo la entrada del ADN a la célula por endocitosis. Para ello diluimos tanto el ADN como el reactivo JetPEI en un volumen determinado de NaCl 150 mM. Se agitó cada una de las mezclas en vortex y se centrifugaron brevemente. A continuación se añadió la solución de JetPEI sobre la solución de ADN se mezcló bien y se centrifugó. Tras 30 min. de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió a las células moviendo suavemente las placas para que se homogeneizara con el medio de cultivo. Usamos este reactivo sobre todo en los ensayos de luciferasa donde se

necesitaba una buena eficiencia de transfección y homogeneidad en las diferentes transfecciones.

Y para la línea celular NIH3T3 usamos "Lipofectamine ™ 2000" (Invitrogene) según las instrucciones del fabricante y a una proporción ADN (en µg): Lipofectamine (en µL) de 1:3. Se diluyó el ADN en Opti-MEM ® I (Medio sin suero) y por otro lado se diluyó la Lipofectamine ™ 2000. Se mezcló suavemente y se dejó incubando 5 min. a temperatura ambiente. A continuación se añadió la dilución de Lipofectamine™ 2000 a la dilución de ADN, se mezcló suavemente y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 30 min. para que se formaran los complejos ADN-Lipofectamine ™ 2000. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla de los complejos se añadió a las células moviendo suavemente las placas para que se homogeneizara con el medio de cultivo. La transfección se realizó en medio libre de antibiótico. En todos los casos la cantidad total de ADN transfectado se mantuvo constante mediante la adición del correspondiente vector vacío. Como control de la eficiencia de transfección en todos los casos, fue introducido un vector para expresión eucariota constitutiva de la proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*) en cantidad y condiciones iguales a las de las construcciones transfectadas para el experimento. Tras la transfección, la expresión génica fue analizada entre las 48 horas.

12.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Para la obtención de extractos proteicos totales de células en cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío y se recogieron en tampón de lisis RIPA (Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, NaF 10 mM, Glicerol 10%, EDTA 4 mM, Tritón X-100 al 1%, SDS al 0.1%) mas inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina A 5 µg/mL) y de fosfatasas (Na_3VO_4 1 mM) añadidos en el momento de la lisis. Tras incubación de 30 min. en hielo, los extractos se centrifugaron 20 min. a 16.000 x

g a 4ºC. Se recuperó la fracción soluble y se midió la cantidad proteica total por colorimetría con "BIO-RAD protein assay" (Bio-Rad) empleando albúmina sérica bovina (BSA) para establecer una recta patrón.

Una cantidad igual de extracto de proteínas se resolvió mediante electroforesis vertical en gel SDS-PAGE, con distinto porcentaje de acrilamida según el tamaño de la proteína a analizar. Para ello se corrió el gel en condiciones desnaturalizantes añadiéndole a las muestras tampón de carga 5X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2.3%, azul de bromofenol 0.1%, DTT 10 mM) y corriendo el gel en tampón de carrera (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1.7 mM) según Laemmli (Laemmli 1970).

Las proteínas se transfirieron después a una membrana de Inmobilon-P (Millipore) mediante transferencia húmeda en el tampón de transferencia según Towbin (Towbin et al. 1979) (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo utilizando un aparato Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad laboratorios, Inc.) a 80 Voltios durante 45 a 60 min. en función del grosor del gel.

La membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4ºC en agitación en leche al 5% en el tampón TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 25 mM, NaCl 50 mM, KCl 2.5mM y Tween-20 al 0.1%).

Para la realización de los inmunoblot salvo indicación de lo contrario, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario a la dilución adecuada indistintamente durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4ºC. Tras varios lavados con el tampón TBS-T en agitación durante 30 min. la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa a la dilución adecuada durante 1 hora a temperatura ambiente. En algunos casos se utilizó un puente de biotina para mejorar la detección. Para ello la membrana se incubó tras el primario con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con biotina y seguidamente con Streptavidina-Peroxidasa. La membrana se lavó varias veces en agitación durante 30 min. al menos, antes de detectar la luminiscencia tras la incubación con el reactivo ECL

(Amersham Pharmacia Biotech). La luminiscencia emitida se detectó en exposición de película de rayos X.

13.- ESTUDIOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Para ello, se sembraron 1,5x10^6 células HeLa en placas de 100 mm de diámetro. Al día siguiente se cotransfectaron con las siguientes combinaciones de vectores de expresión: pCDNA-VRK1-Myc (4µg) y pHA-ATF2 (4µg) o bien pCDNA-VRK1-Myc (4µg) junto con pHA-c-Jun (4µg) o la combinación de pCDNA-VRK1-Myc (4µg) y pHA-JNK (4µg) utilizando JetPEI (Apartado 11). Transcurridas 48 horas, las células fueron lavadas con PBS1X frío y lisadas con tampón de lisis RIPA (Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, NaF 10 mM, Glicerol 10%, EDTA 4 mM, Tritón X-100 al 1%, SDS al 0.1%) mas inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina A 5 µg/mL) y de fosfatasas(Na_3VO_4 1 mM) añadidos en el momento de la lisis. Tras incubación de 30 min. en hielo, los extractos se centrifugaron 20 min. a 16.000 x g a 4ºC. Se recuperó la fracción soluble y se midió la cantidad proteica total por colorimetría con el reactivo “BIO-RAD Protein Assay” (Bio-Rad) empleando albúmina sérica bovina (BSA) para establecer una recta patrón.

Paso previo a la co-inmunoprecipitación se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales por inmunoblot. Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron a cabo a partir de 1-1.5 mg de extracto proteico total. Con el fin de eliminar posibles uniones inespecíficas, el extracto se incubó previamente con 30 µL de sefarosa “GammaBind G Sepharose” (Amersham, Pharmacia, Biotech) durante 30 min. a 4ºC con rotación. El extracto así preclareado se incubó con el anticuerpo concreto a la concentración adecuada (Tabla 6) durante toda la noche a 4ºC con rotación. Para precipitar los complejos de anticuerpo-proteína se añadieron 40 µL de “GammaBind G Sepharose” (Amersham). La matriz de sefarosa acoplada a proteína G se preparó

previamente: incubando la resina en una solución de bloqueo (tampón de lisis RIPA con BSA al 1%) a 4ºC en rotación durante 1 hora y, finalmente, se lavó tres veces con 1 mL de tampón de lisis RIPA. El extracto con el anticuerpo y la sefarosa se incubó durante 2 o 3 horas más a 4ºC con rotación. Los inmunoprecipitados se purificaron por centrifugación suave y se lavaron cinco veces con el tampón de lisis RIPA y con Tris 50mM pH 7,0. Finalmente, las muestras fueron hervidas en tampón de muestra Laemmli para separar los complejos proteicos asociados. Tanto los inmunoprecipitados como los lisados totales se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, seguido de inmunoblot. Para detectar la presencia de HA-ATF2, HA c-Jun y HA-JNK se utilizó en cada uno de los casos un anticuerpo monoclonal anti-HA (Babco, dilución 1:1.000) seguido de una incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa HRP (dilución 1:10.000). La detección de VRK1 se realizó sobre la misma membrana hibridando con un anticuerpo policlonal de VRK1 (VC1) (dilución 1:2.000) y con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa HRP (dilución 1:10.000) (Tabla 6)

En los casos en los que se probó la actividad kinasa de la proteína inmunoprecipitada, las muestras recibieron un último lavado con tampón kinasa 1X y el ensayo de fosforilación *in vitro* se realizó como se detalla en el apartado 7.

14.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La detección y localización *in vivo* de las proteínas de interés, en células HeLa previamente transfectadas y fijadas, se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta.

Se sembraron células HeLa ($1.5x10^5$ células/ placa) sobre cubreobjetos de vidrio estériles de 10 mm de diámetro (Menzel-Glaser) depositados en placas de 100 mm. Transcurridas 30 horas post-transfección con JetPEI (Polytransfection, France) las células fueron lavadas con tampón PBS1X frío y fijadas con

paraformaldehído al 3.7% en PBS1X durante 15 min. a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células fueron permeabilizadas en PBS1X frío con 0.5% de Triton X-100 durante 15 min. y después tratadas con Glicina 0.1 M en PBS1X durante 15 min. a temperatura ambiente. Tras la permeabilización, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las células se lavaron con solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 1% en PBS1X). La incubación con el anticuerpo primario frente al antígeno en cuestión se realizó en PBS1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las células tres veces con Triton X-100 al 0.1% en PBS1X, se incubaron con el anticuerpo secundario específico para cada primario marcado con un fluorocromo fluorescente anti-ratón acoplado al fluorocromo Cy2 (Sigma) (dilución 1:200) o anti-conejo acoplado al fluorocromo Cy3 (Sigma) (dilución 1:200). Tras otros 3 lavados en el mismo tampón, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) durante 10 min. en agua a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS1X y Tritón X-100 al 0.1% y un último lavado con agua destilada, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con Gelvatol (Monsanto). Para la localización subcelular de los antígenos así como la captura de las imágenes se utilizó un microscopio confocal modelo Zeiss LSM 510 con un objetivo de magnificación 63x. Los fluorocromos fueron excitados usando un láser de Argon ^{18} (longitud de onda de excitación de 488 nm) para Cy2 y un láser de He^{2}/Ne^{10} (longitud de onda de excitación de 543 nm) para Cy3.

15.- ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL CON GEN REPORTERO DE LUCIFERASA

La actividad transcripcional de los factores de transcripción ATF2 y c-Jun se determinó mediante sistema de transactivación basado en el sistema GAL4.

Dicho sistema consiste en los siguentes componentes: (a) un plásmido reportero de la luciferasa con cinco repeticiones consecutivas del sitio de unión a la secuencia de levaduras GAL4 justo delante del gen de la luciferasa; (b) una construcción que codifica para el sitio de unión al ADN de GAL4 fusionada al dominio de activación de bien de c-Jun o de ATF2. Como control interno de la eficiencia de la transfección se utilizó el plásmido phRL-tk *Renilla*. La cantidad total de ADN en cada transfección se mantuvo constante mediante la adición de vector vacío. La actividad luciferasa se determinó a partir de 20 µL de extracto total celular a las 36-48 horas de la transfección utilizando el sistema comercial (Dual-Luciferase reporter assay system) (Promega Madison WI, USA). La emisión de luminiscencia se detectó con un luminómetro OPTOCOM-1 (MGM Instruments, Inc, Hamden, CT, USA) La actividad luciferasa se expresó en relación al control transfectado con el vector vacío. Los resultados se obtuvieron de al menos tres ensayos independientes realizados por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el estudio comparativo del test de la "t" de Student no pareado. En las figuras se representa la media y la desviación Standard así como el valor de P.

16.- TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS Y PRESENTACIÓN DE DATOS

La búsqueda de secuencias de ADN o de proteínas se efectuó en las bases de datos EMBL, GenBank y SWISSPROT. Para la edición detallada de dichas secuencias, así como las comparaciones de las secuencias, se utilizaron los programas del DNA Star.

El procesamiento posterior de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se llevó a cabo con el software LSM5 Image Browser 2.8, Zeiss.

La búsqueda de referencias se realizó a través de la página web Medline (Nacional Library of Medicine) http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/. De la gestión de las citas bibliográficas se encargó la aplicación EndNote4 (Niles and associates).

Las imágenes que aparecen en esta memoria se adquirieron con un escáner Hewlett Packard ScanJet 3c (Hewlett Packard). Dichas imágenes se trataron con el programa Adobe Photoshop 5.0 (Adobe). El montaje y la composición final de las figuras se realizaron con el programa Microsoft Power Point (Microsoft Corporation).

Todo el análisis estadístico así como la representación gráfica de los datos se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

SOLUCIONES DE USO GENERAL EN BIOLOGÍA MOLECULAR

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 -8), 1 mM EDTA pH 8
TAE: 40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA
PBS: 137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2,5 mM Na_2HPO_4, 1 mM K_2HPO_4 pH 7.2
Medio LB: Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L.
Fenol: En todos los métodos que se describen el fenol se usó siempre equilibrado a pH 8, saturado con 10 mM Tris- HCl.
Fenol-Cloroformo: 50% de fenol equilibrado + 50% de cloroformo.
Cloroformo-Isoamílico: 99% de cloroformo + 1% de alcohol isoamílico.
10 x Colorante de bromofenol y xilencianol: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilencianol, 50% de glicerol en agua

TABLAS DE PLÁSMIDOS:

Los plásmidos utilizados para la realización del presente trabajo fueron amablemente cedidos por diferentes grupos de investigación o bien se generaron expresamente en nuestro laboratorio para la realización de este proyecto.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
pVRK1-Myc	pCDNA 3.1 (-) Myc	VRK1 (1196pb)	BamHI-KpnI	Expresión eucariota con epítopo Myc en carboxilo	(Lopez-Borges and Lazo 2000)
pHA-VRK1	pCEFL-HA	VRK1 (1196pb)	BglII-XbaI	Expresión eucariota con epítopo HA en amino	(Lopez-Borges and Lazo 2000)
pHA-VRK1 (K179E)	pCEFL-HA	VRK1 K179E (1196pb)	BglII-XbaI	Expresión eucariota con epítopo HA en amino	(Sevilla, Santos et al. 2004)
pHA-ATF2		HA-ATF2 (1-505aa)		Expresión eucariota con epítopo HA en amino	K.Yokoyama (Kawasaki, Schiltz et al. 2000)
pATF2 (1-109)	pSG424-GAL4	ATF2 (1-109aa)	BamHI-XbaI	Sistema de expresión de Luciferasa	R.Green (Li and Green 1996)
pMT 108-HA-c-Jun	BSSK -	HA-c-Jun	BamHI-HindIII	Expresión eucariota con epítopo HA en carboxilo	D.Bohmann (Treier, Staszewski et al. 1994)
pHA-JNK	pCEFL-HA	HA-JNK	BamHI-NotI	Expresión eucariota con Epítopo HA en amino	S.Gutkind
P GAL4 c-Jun (1-257)	pSG424-GAL4	c-Jun (1-257aa)	HindIII-SmaI	Sistema de expresión de Luciferasa	M.Karin
p GAL4 c-Jun (1-257) Ser63/73Ala	pSG424-GAL4	c-Jun (1-257aa) Ser63/73Ala	HindIII-SmaI	Sistema de expresión de Luciferasa	M.Karin
p5X GAL4-Luc		GAL4-Luc		Reportero de expresión con Luciferasa	S.Gutkind
phRL-tk		Luciferasa de Renilla		Plásmido control	Promega
pEGFP-C1	pEGFP-C1	GFP		Expresión eucariota con epítopoGFP	Clontech
pEGFP-VRK1	pEGFP-C1	GFP-VRK1	BamHI-XbaI	Expresión eucariota con epítopo GFP	(Lopez-Borges and Lazo 2000)

Tabla 1: Vectores de expresión en eucariotas, nomenclatura y procedencia.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
pGEX-ATF2 (1-109)		ATF2 (1-109)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	Green.R (Li et al. 1996)
pGEX-ATF2 (1-109) S9A		ATF2 (1-109) S9A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla., et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) S20I		ATF2 (1-109) S20I		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T23A		ATF2 (1-109) T23A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T37A		ATF2 (1-109) T37A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T52A		ATF2 (1-109) T52A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) S62I		ATF2 (1-109) S62I		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T69A		ATF2 (1-109) T69A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T71A		ATF2 (1-109) T71A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) T73A		ATF2 (1-109) T73A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109) S90I		ATF2 (1-109) S90I		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)

Tabla 2: Proteínas de fusión, nomenclatura y procedencia. Mutantes generados a partir de la construcción pGEX-ATF2 (1-109).

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
pGEX-ATF2 (1-109)S9A/T71A		ATF2 (1-109) S9A/T7A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109)T69/71A		ATF2 (1-109) T69/71A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109)T69/73A		ATF2 (1-109) T69/73A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-ATF2 (1-109)T71/73A		ATF2 (1-109) T71/73A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGEX-c-Jun (1-223)		c-Jun (1-223)		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	M.Karin (Minden et al. 1994)
pGEX-c-Jun (1-223) S63,73A		c-Jun (1-223) S63,73A		Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	M.Karin (Minden et al. 1994)

Tabla 3: Proteínas de fusión, nomenclatura y procedencia. Mutantes generados a partir de las construcciones silvestres.

CONSTRUCCIÓN	VECTOR	INSERTO	DIANAS DE RESTRICCIÓN	USO	PROCEDENCIA
pGEX-VRK1	pGEX -4T1	VRK1 (1196pb)	BamHI-SalI	Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Lopez-Borges et al. 2000)
pGEX-VRK1(K179E)	pGEX -4T1	VRK1 K179E (1196pb)	BamHI-SalI	Expresión proteína de fusión con GST en bacterias	(Sevilla et al. 2004)
pGAL4-ATF2 (1-109) S62I	pSG424-GAL4	ATF2 (1-109) S62I	BamHI-XbaI	Sistema de expresión de Luciferasa	(Sevilla, et al. 2004)
pGAL4-ATF2 (1-109) T73A	pSG424-GAL4	ATF2 (1-109) T73A	BamHI-XbaI	Sistema de expresión de Luciferasa	(Sevilla, et al. 2004)
pGAL4-ATF2 (1-109) S62I-T73A	pSG424-GAL4	ATF2 (1-109) S62I-T73A		Sistema de expresión de Luciferasa	(Sevilla, et al. 2004)
pHA-ATF2 S62I		ATF2 (1-505) S62I		Expresión Eucariota	(Sevilla, et al. 2004)
pHA-ATF2 T73A		ATF2 (1-505) T73A		Expresión Eucariota	(Sevilla, et al. 2004)
pHA-ATF2 S62I-T73A		ATF2 (1-505) S62I-T73A		Expresión Eucariota	(Sevilla, et al. 2004)

Tabla 4: Vectores de expresión, nomenclatura y procedencia. Mutantes generados a partir de las construcciones silvestres.

MUTACIÓN	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Ser 9 Ala	ATF-1	5'C AAG TTA CAT GTG AAT GCT GCC AGG CAA TAC AAG GAC C 3'
	ATF-2	5'G GTC CTT GTA TTG CCT GGC AGC ATT CAC ATG TAA CTT G 3'
Ser 20 Ile	ATF-3	5'C AAG GAC CTG TGG AAT ATG ATT GAT GAC AAA CCC TTT C 3'
	ATF-4	5'G AAA GGG TTT GTC ATC AAT CAT ATT CCA CAG GTC CTT G 3'
Thr 28 Ala	ATF-5	5'GAC AAA CCC TTT CTA TGT GCT GCG CCT GGA TGT GGC C 3'
	ATF-6	5'G GCC ACA TCC AGG CGC AGC ACA TAG AAA GGG TTT GTC 3'
Thr 37 Ala	ATF-7	5'GGA TGT GGC CAG CGT TTT GCC AAC GAG GAT CAT TTG GC 3'
	ATF-8	5'GC CAA ATG ATC CTC GTT GGC AAA ACG CTG GCC ACA TCC 3'
Thr 52 Ala	ATF-9	5'C CAT AAA CAT AAA CAT GAG ATG GCA CTG AAA TTT GGT CC 3'
	ATF-10	5'G G ACC AAA TTT CAG TGC CAT CTC ATG TTT ATG TTT ATG G 3'
Ser 62 Ile	ATF-11	5'GG TCC AGC ACG TAA TGA CAT TGT CAT TGT GGC TGA TCA G 3'
	ATF-12	5'C TGA TCA GCC ACA ATG ACA ATG TCA TTA CGT GCT GGA CC 3'
Thr 69 Ala	ATF-13	5'G TCA TTG TGG CTG ATC AGG GCC CAA CAC CAA CAA GAT TC 3'
	ATF-14	5'GAA TCT TGT TGG TGT TGG GGC GTG ATC AGC CAC AAT GAC 3'
Thr 71 Ala	ATF-15	5'G GCT GAT CAG ACC CCA GCA CCA ACA AGA TTC TTG 3'
	ATF-16	5'CAA GAA TCT TGT TGG TGC TGG GGT CTG ATC AGC C 3'
Thr 73 Ala	ATF-17	5'GCT GAT CAG ACC CCA ACA CCA GCA AGA TTC TTG AAA AAC TGT G 3'
	ATF-18	5'C ACA GTT TTT CAA GAA TCT TGC TGG TGT TGG GGT CTG ATC AGC 3'
Ser 90 Ile	ATF-19	5'C GGT TTG TTT AAT GAG TTG GCC ATT CCA TTT GAG AAT GAA TTC 3'
	ATF-20	5'G AAT TCA TTC TCA AAT GGA ATC GCC AAC TCA TTA AAC AAA CCC 3'
Thr 69/71 Ala	ATF-21	5'GTC ATT GTG GCT GAT CAG GCC CCA GCA CCA ACA AGA TTC TTG 3'
	ATF-22	5'CAA GAA TCT TGT TGG TGC TGG GGC CTG ATC AGC CAC AAT GAC 3'
Thr 69/73 Ala	ATF-23	5'GTC ATT GTG GCT GAT CAG GCC CCA ACA CCA GCA AGA TTC TTG AAA AAC 3'
	ATF-24	5'GTT TTT CAA GAA TCT TGC TGG TGT TGG GGC CTG ATC AGC CAC AAT GAC 3'
Thr 71/73 Ala	ATF-25	5'G GCT GAT CAG ACC CCA GCA CCA GCA AGA TTC TTG AAA AAC TGT G 3'
	ATF-26	5'CAA GAA TCT TGC TGG TGC TGG GGT CTG ATC AGC C 3'

Tabla 5: Listado de oligos utilizados para la creación de mutantes

ANTICUERPO	ANTíGENO	ESPECIE	DILUCIÓN DE USO APROX	CASA COMERCIAL
VC1	VRK1 (267-396aa)	policlonal conejo	WB: 1:2000 IF: 1:250	producción propia
VE1	VRK1	policlonal conejo	WB: 1:1000 IF: 1:100	producción propia
1F6/2E4	VRK1 (332-396aa)	monoclonal ratón	WB: 1:20000	producción propia
ATF2 (F2BR-1)	ATF2 (350-505aa)	monoclonal ratón	WB: 1:1000	Santa Cruz
HA11	epítopo HA	monoclonal ratón	WB: 1:1000 IF: 1:1000 IP: 1:150	Babco
α-Myc	epítopo myc	policlonal conejo	WB: 1:500 IF: 1:500 IP: 1:150	Upstate Biotech
α-AU5	AU5	monoclonal ratón	WB: 1:1000	Babco
AC-15	β-actina	monoclonal ratón	WB: 1:5000	Sigma
Phospho c-Jun (Ser 63)	Ser 63 c-Jun	policlonal conejo	WB. 1:1000	New England
GFP(B-2)	GFP	monoclonal ratón	WB: 1:1000	Santa Cruz

Tabla 6: Principales anticuerpos primarios usados en este estudio.

DENOMINACIÓN	ORGANISMO	TEJIDO	PROPAGACIÓN	CARACTERÍSTICAS
HeLa	Homo Sapiens	Carcinoma de Cérvix (Epitelial)	DMEM + 10% FBS	Adherente
HEK293	Homo Sapiens	Embrionarias de riñón (Epitelial)	DMEM + 10% FBS	Adherente
NIH3T3	Ratón	Fifroblastos Fifroblastos	DMEM + 10% CS	Adherente
H1299	Homo Sapiens	Cáncer de pulmón de célula no pequeña	RPMI 1640 + 10% FBS	Adherente
MCF-7	Homo Sapiens	Adenocarcinoma de mama	DMEM + 10% FBS	Adherente

Tabla 7: Líneas celulares en las que se ha realizado el estudio

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Hafiz, H. A., L. E. Heasley, et al. (1992). "Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases." Mol Endocrinol **6**(12): 2079-89.

Adler, V., A. Polotskaya, et al. (1992). "Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity." J Biol Chem **267**(24): 17001-5.

Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-57.

Antonyak, M. A., L. C. Kenyon, et al. (2002). "Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors." Oncogene **21**(33): 5038-46.

Aoyagi, K., I. Shima, et al. (1998). "Specific transcription factors prognostic for prostate cancer progression." Clin Cancer Res **4**(9): 2153-60.

Arias, J., A. S. Alberts, et al. (1994). "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor." Nature **370**(6486): 226-9.

Ban, N., Y. Yamada, et al. (2000). "Activating transcription factor-2 is a positive regulator in CaM kinase IV-induced human insulin gene expression." Diabetes **49**(7): 1142-8.

Bando, T., Y. Kato, et al. (1999). "Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma." Cancer Genet Cytogenet **111**(2): 161-5.

Banham, A. H. and G. L. Smith (1992). "Vaccinia virus gene B1R encodes a 34-kDa serine/threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions." Virology **191**(2): 803-12.

Barcia, R., S. Lopez-Borges, et al. (2002). "Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1." Arch Biochem Biophys **399**(1): 1-5.

Baudier, J., C. Delphin, et al. (1992). "Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11627-31.

Benbrook, D. M. and N. C. Jones (1990). "Heterodimer formation between CREB and JUN proteins." Oncogene **5**(3): 295-302.

Bender, K., C. Blattner, et al. (1997). "UV-induced signal transduction." J Photochem Photobiol B **37**(1-2): 1-17.

Bennett, B. L., D. T. Sasaki, et al. (2001). "SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13681-6.

Bhoumik, A., S. Takahashi, et al. (2005). "ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response." Mol Cell **18**(5): 577-87.

Birboim, H. C. y. D., J (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids **Res.,7**: 1513-1523.

Bischoff, J. R., P. N. Friedman, et al. (1990). "Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4766-70.

Boudreaux, J. M. and D. A. Towler (1996). "Synergistic induction of osteocalcin gene expression: identification of a bipartite element conferring fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP responsiveness in the rat osteocalcin promoter." J Biol Chem **271**(13): 7508-15.

Boyle, K. A. and P. Traktman (2004). "Members of a novel family of mammalian protein kinases complement the DNA-negative phenotype of a vaccinia virus ts mutant defective in the B1 kinase." J Virol **78**(4): 1992-2005.

Camps, M., A. Nichols, et al. (2000). "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." Faseb J **14**(1): 6-16.

Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.

Chatton, B., J. L. Bocco, et al. (1994). "Jun and Fos heterodimerize with ATFa, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity." Oncogene **9**(2): 375-85.

Chen, C. Y., R. Gherzi, et al. (2000). "Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation." Genes Dev **14**(10): 1236-48.

Cheng, W. H., X. Zheng, et al. (2003). "Low levels of glutathione peroxidase 1 activity in selenium-deficient mouse liver affect c-Jun N-terminal kinase activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in pro-oxidant-induced aponecrosis." Biochem J **370**(Pt 3): 927-34.

Chinenov, Y. and T. K. Kerppola (2001). "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." Oncogene **20**(19): 2438-52.

Cho, S. G., A. Bhoumik, et al. (2001). "TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage." Mol Cell Biol **21**(24): 8398-413.

Chouinard, N., K. Valerie, et al. (2002). "UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53." Biochem J **365**(Pt 1): 133-45.

Clayton, A. L. and L. C. Mahadevan (2003). "MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation." FEBS Lett **546**(1): 51-8.

Clerk, A., J. G. Harrison, et al. (1999). "Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **31**(12): 2087-99.

Clerk, A. and P. H. Sugden (1997). "Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes." Biochem J **325 (Pt 3)**: 801-10.

Davis, R. J. (1994). "MAPKs: new JNK expands the group." Trends Biochem Sci **19**(11): 470-3.

Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**(2): 239-52.

Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-37.

Dhillon, N. and M. F. Hoekstra (1994). "Characterization of two protein kinases from Schizosaccharomyces pombe involved in the regulation of DNA repair." Embo J **13**(12): 2777-88.

Du, W., D. Thanos, et al. (1993). "Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements." Cell **74**(5): 887-98.

Dunn, C., C. Wiltshire, et al. (2002). "Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor." Cell Signal **14**(7): 585-93.

el-Deiry, W. S. (1998). "Regulation of p53 downstream genes." Semin Cancer Biol **8**(5): 345-57.

el-Deiry, W. S., S. E. Kern, et al. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." Nat Genet **1**(1): 45-9.

Ellenberger, T. E., C. J. Brandl, et al. (1992). "The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex." Cell **71**(7): 1223-37.

English, J., G. Pearson, et al. (1999). "New insights into the control of MAP kinase pathways." Exp Cell Res **253**(1): 255-70.

Firestein, R. and N. Feuerstein (1998). "Association of activating transcription factor 2 (ATF2) with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. Implication of the ubiquitin/proteasome pathway in regulation of ATF2 in T cells." J Biol Chem **273**(10): 5892-902.

Flint, K. J. and N. C. Jones (1991). "Differential regulation of three members of the ATF/CREB family of DNA-binding proteins." Oncogene **6**(11): 2019-26.

Flotow, H., P. R. Graves, et al. (1990). "Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action." J Biol Chem **265**(24): 14264-9.

Franklin, A. A., M. F. Kubik, et al. (1993). "Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB)." J Biol Chem **268**(28): 21225-31.

Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998a). "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells." Genes Dev **12**(17): 2658-63.

Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998b). "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10541-6.

Fuchs, S. Y., L. Dolan, et al. (1996). "Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase." Oncogene **13**(7): 1531-5.

Fuchs, S. Y., V. A. Fried, et al. (1998c). "Stress-activated kinases regulate protein stability." Oncogene **17**(11 Reviews): 1483-90.

Fuchs, S. Y. and Z. Ronai (1999). "Ubiquitination and degradation of ATF2 are dimerization dependent." Mol Cell Biol **19**(5): 3289-98.

Fuchs, S. Y., I. Tappin, et al. (2000). "Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation." J Biol Chem **275**(17): 12560-4.

Fuchs, S. Y., B. Xie, et al. (1997). "c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors." J Biol Chem **272**(51): 32163-8.

Gentz, R., F. J. Rauscher, 3rd, et al. (1989). "Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains." Science **243**(4899): 1695-9.

Georgopoulos, K., B. A. Morgan, et al. (1992). "Functionally distinct isoforms of the CRE-BP DNA-binding protein mediate activity of a T-cell-specific enhancer." Mol Cell Biol **12**(2): 747-57.

Glover, J. N. and S. C. Harrison (1995). "Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA." Nature **373**(6511): 257-61.

Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-80.

Graves, L. M., H. I. Guy, et al. (2000). "Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase." Nature **403**(6767): 328-32.

Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." Embo J **15**(11): 2760-70.

Gupta, S., D. Campbell, et al. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." Science **267**(5196): 389-93.

Hagmeyer, B. M., P. Angel, et al. (1995). "Modulation of AP-1/ATF transcription factor activity by the adenovirus-E1A oncogene products." Bioessays **17**(7): 621-9.

Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3720-4.

Hai, T. and M. G. Hartman (2001). "The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis." Gene **273**(1): 1-11.

Hai, T. W., M. Horikoshi, et al. (1988). "Analysis of the role of the transcription factor ATF in the assembly of a functional preinitiation complex." Cell **54**(7): 1043-51.

Hai, T. W., F. Liu, et al. (1989). "Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers." Genes Dev **3**(12B): 2083-90.

Han, J., Y. Jiang, et al. (1997). "Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation." Nature **386**(6622): 296-9.

Han, Z., D. L. Boyle, et al. (2001). "c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis." J Clin Invest **108**(1): 73-81.

Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." Faseb J **9**(8): 576-96.

Hayakawa, J., S. Mittal, et al. (2004). "Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress." Mol Cell **16**(4): 521-35.

Herskowitz, I. (1995). "MAP kinase pathways in yeast: for mating and more." Cell **80**(2): 187-97.

Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." Genes Dev **7**(11): 2135-48.

Ho, Y., S. Mason, et al. (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." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 581-6.

Hood, J. K. and P. A. Silver (1999). "In or out? Regulating nuclear transport." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 241-7.

Huang, C., W. Y. Ma, et al. (1999). "p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389." J Biol Chem **274**(18): 12229-35.

Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 205-19.

Ishii, S., T. Maekawa, et al. (1990). "Structure and function of the protein CRE-BP1: heterogeneity of the protein that binds to the cAMP-responsive element." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **24**: 335-9.

Ivashkiv, L. B., M. D. Fleming, et al. (1992). "Dominant negative mutants of transcription factor mXBP (CRE-BP1, ATF-2)." New Biol **4**(4): 360-8.

Ivashkiv, L. B., H. C. Liou, et al. (1990). "mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element." Mol Cell Biol **10**(4): 1609-21.

Jacobs, D., D. Glossip, et al. (1999). "Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase." Genes Dev **13**(2): 163-75.

Johnson, P. F. and S. L. McKnight (1989). "Eukaryotic transcriptional regulatory proteins." Annu Rev Biochem **58**: 799-839.

Kallunki, T., T. Deng, et al. (1996). "c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions." Cell **87**(5): 929-39.

Kallunki, T., B. Su, et al. (1994). "JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation." Genes Dev **8**(24): 2996-3007.

Kamath, R. S. and J. Ahringer (2003). "Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans." Methods **30**(4): 313-21.

Karin, M. and T. Hunter (1995). "Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus." Curr Biol **5**(7): 747-57.

Kasibhatla, S., P. Tailor, et al. (1999). "Jun kinase phosphorylates and regulates the DNA binding activity of an octamer binding protein, T-cell factor beta1." Mol Cell Biol **19**(3): 2021-31.

Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-11.

Kato, Y., V. V. Kravchenko, et al. (1997). "BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C." Embo J **16**(23): 7054-66.

Kawasaki, H., L. Schiltz, et al. (2000). "ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation." Nature **405**(6783): 195-200.

Kawasaki, H., J. Song, et al. (1998). "p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells." Genes Dev **12**(2): 233-45.

Kennedy, N. J. and R. J. Davis (2003). "Role of JNK in tumor development." Cell Cycle **2**(3): 199-201.

Keyse, S. M. (1999). "The role of protein phosphatases in the regulation of mitogen and stress-activated protein kinases." Free Radic Res **31**(4): 341-9.

Keyse, S. M. (2000). "Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 186-92.

Kim, S. J., S. Wagner, et al. (1992). "Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF-beta 2 gene through transcription factor ATF-2." Nature **358**(6384): 331-4.

Kishi, H., K. Nakagawa, et al. (2001). "Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20." J Biol Chem **276**(42): 39115-22.

Knippschild, U., D. M. Milne, et al. (1997). "p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs." Oncogene **15**(14): 1727-36.

Konig, P. and T. J. Richmond (1993). "The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility." J Mol Biol **233**(1): 139-54.

Kotlyarov, A., A. Neininger, et al. (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." Nat Cell Biol **1**(2): 94-7.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." Bioessays **18**(7): 567-77.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.

Lakin, N. D., B. C. Hann, et al. (1999). "The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53." Oncogene **18**(27): 3989-95.

Lasa, M., K. R. Mahtani, et al. (2000). "Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade." Mol Cell Biol **20**(12): 4265-74.

Lee, K. A. (1992). "Dimeric transcription factor families: it takes two to tango but who decides on partners and the venue?" J Cell Sci **103 (Pt 1)**: 9-14.

Lee, K. A., T. Y. Hai, et al. (1987). "A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8355-9.

Leppa, S. and D. Bohmann (1999). "Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis." Oncogene **18**(45): 6158-62.

Lewis, T. S., P. S. Shapiro, et al. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Adv Cancer Res **74**: 49-139.

Li, X. Y. and M. R. Green (1996). "Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain." Genes Dev **10**(5): 517-27.

Lin, A., J. Frost, et al. (1992). "Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity." Cell **70**(5): 777-89.

Lin, S., W. Chen, et al. (1992). "The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase." J Virol **66**(5): 2717-23.

Liu, F. and M. R. Green (1990). "A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein." Cell **61**(7): 1217-24.

Livingstone, C., G. Patel, et al. (1995). "ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain." Embo J **14**(8): 1785-97.

Lopez-Borges, S. and P. A. Lazo (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**(32): 3656-64.

Macgregor, P. F., C. Abate, et al. (1990). "Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1." Oncogene **5**(4): 451-8.

Maekawa, T., H. Sakura, et al. (1989). "Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain." Embo J **8**(7): 2023-8.

Maguire, H. F., J. P. Hoeffler, et al. (1991). "HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions." Science **252**(5007): 842-4.

Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-34.

Marinissen, M. J., M. Chiariello, et al. (2001). "Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway." Genes Dev **15**(5): 535-53.

Marinissen, M. J., M. Chiariello, et al. (1999). "A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5." Mol Cell Biol **19**(6): 4289-301.

Matthews, R. P., C. R. Guthrie, et al. (1994). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression." Mol Cell Biol **14**(9): 6107-16.

Mayr, B. and M. Montminy (2001a). "Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 599-609.

Mayr, B. M., G. Canettieri, et al. (2001b). "Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10936-41.

Meggiato, T., F. Calabrese, et al. (2003). "C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death." Pancreas **26**(1): 65-70.

Milne, D. M., D. G. Campbell, et al. (1994). "Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **269**(12): 9253-60.

Milne, D. M., R. H. Palmer, et al. (1992). "Mutation of the casein kinase II phosphorylation site abolishes the anti-proliferative activity of p53." Nucleic Acids Res **20**(21): 5565-70.

Minden, A. and M. Karin (1997). "Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F85-104.

Montminy, M. R. and L. M. Bilezikjian (1987). "Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene." Nature **328**(6126): 175-8.

Morrison, D. K., M. S. Murakami, et al. (2000). "Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome." J Cell Biol **150**(2): F57-62.

Musti, A. M., M. Treier, et al. (1997). "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases." Science **275**(5298): 400-2.

Mutirangura, A., W. Pornthanakasem, et al. (1998). "Loss of heterozygosity on chromosome 14 in nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **78**(2): 153-6.

Narayan, S., S. G. Widen, et al. (1994). "RNA polymerase II transcription. Rate of promoter clearance is enhanced by a purified activating transcription factor/cAMP response element-binding protein." J Biol Chem **269**(17): 12755-63.

Newell, C. L., A. B. Deisseroth, et al. (1994). "Interaction of nuclear proteins with an AP-1/CRE-like promoter sequence in the human TNF-alpha gene." J Leukoc Biol **56**(1): 27-35.

Neyns, B., Katesuwanasing, et al. (1996). "Expression of the jun family of genes in human ovarian cancer and normal ovarian surface epithelium." Oncogene **12**(6): 1247-57.

Nezu, J., A. Oku, et al. (1997). "Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase." Genomics **45**(2): 327-31.

Nichols, R. J. and P. Traktman (2004). "Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family." J Biol Chem **279**(9): 7934-46.

O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. (1992). "Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer." Cell **68**(4): 699-708.

O'Shea, E. K., R. Rutkowski, et al. (1989). "Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun." Science **245**(4918): 646-8.

Ouwens, D. M., N. D. de Ruiter, et al. (2002). "Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38." Embo J **21**(14): 3782-93.

Palmer, A., A. C. Gavin, et al. (1998). "A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1." Embo J **17**(17): 5037-47.

Papavassiliou, A. G., M. Treier, et al. (1995). "Intramolecular signal transduction in c-Jun." Embo J **14**(9): 2014-9.

Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.

Persons, D. L., E. M. Yazlovitskaya, et al. (2000). "Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin." J Biol Chem **275**(46): 35778-85.

Pfarr, C. M., F. Mechta, et al. (1994). "Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras." Cell **76**(4): 747-60.

Posas, F., M. Takekawa, et al. (1998). "Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast." Curr Opin Microbiol **1**(2): 175-82.

Price, B. D., L. Hughes-Davies, et al. (1995). "Cdk2 kinase phosphorylates serine 315 of human p53 in vitro." Oncogene **11**(1): 73-80.

Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, et al. (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." Nature **353**(6345): 670-4.

Pyronnet, S., H. Imataka, et al. (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." Embo J **18**(1): 270-9.

Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.

Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, et al. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." Mol Cell Biol **16**(3): 1247-55.

Read, M. A., M. Z. Whitley, et al. (1997). "Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen- activated protein kinase pathways." J Biol Chem **272**(5): 2753-61.

Sabapathy, K., Y. Hu, et al. (1999). "JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development." Curr Biol **9**(3): 116-25.

Sakurai, A., T. Maekawa, et al. (1991). "Phosphorylation of cAMP response element-binding protein, CRE-BP1, by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C." Biochem Biophys Res Commun **181**(2): 629-35.

Sanchez-Prieto, R., J. M. Rojas, et al. (2000). "A role for the p38 mitogen-acitvated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents." Cancer Res **60**(9): 2464-72.

Schuhmacher, M., F. Kohlhuber, et al. (2001). "The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc." Nucleic Acids Res **29**(2): 397-406.

Schutte, J., J. D. Minna, et al. (1989a). "Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2257-61.

Schutte, J., J. Viallet, et al. (1989). "jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun." Cell **59**(6): 987-97.

Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J **9**(9): 726-35.

Sercan, H. O., Z. Y. Sercan, et al. (2000). "Consistent loss of heterozygosity at 14Q32 in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia." Leuk Lymphoma **39**(3-4): 385-90.

Sevilla, A., C. R. Santos, et al. (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**(55): 8950-8.

Sevilla, A., C. R. Santos, et al. (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." J Biol Chem **279**(26): 27458-65.

Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene **20**(19): 2390-400.

Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-6.

Shaulian, E., M. Schreiber, et al. (2000). "The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest." Cell **103**(6): 897-907.

She, Q. B., W. Y. Ma, et al. (2002). "Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20." Oncogene **21**(10): 1580-9.

Shieh, S. Y., M. Ikeda, et al. (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." Cell **91**(3): 325-34.

Shiio, Y., R. N. Eisenman, et al. (2003). "Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors." J Am Soc Mass Spectrom **14**(7): 696-703.

Shimizu, M., Y. Nomura, et al. (1998). "Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4." Exp Cell Res **239**(1): 93-103.

Shuman, J. D., J. Cheong, et al. (1997). "ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation." J Biol Chem **272**(19): 12793-800.

Simmer, F., C. Moorman, et al. (2003). "Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions." PLoS Biol **1**(1): E12.

Sluss, H. K., T. Barrett, et al. (1994). "Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases." Mol Cell Biol **14**(12): 8376-84.

Smeal, T., B. Binetruy, et al. (1992). "Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73." Mol Cell Biol **12**(8): 3507-13.

Smeal, T., B. Binetruy, et al. (1991). "Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73." Nature **354**(6353): 494-6.

Stefanovsky, V. Y., G. Pelletier, et al. (2001). "An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF." Mol Cell **8**(5): 1063-73.

Steinmuller, L., G. Cibelli, et al. (2001). "Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities." Biochem J **360**(Pt 3): 599-607.

Szabo, E., M. E. Riffe, et al. (1996). "Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis." Cancer Res **56**(2): 305-15.

Takeda, J., T. Maekawa, et al. (1991). "Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors." Oncogene **6**(6): 1009-14.

Tanoue, T., M. Adachi, et al. (2000). "A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators." Nat Cell Biol **2**(2): 110-6.

Thompson, K. S., C. R. Vinson, et al. (1993). "Thermodynamic characterization of the structural stability of the coiled-coil region of the bZIP transcription factor GCN4." Biochemistry **32**(21): 5491-6.

Thomson, S., L. C. Mahadevan, et al. (1999). "MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction." Semin Cell Dev Biol **10**(2): 205-14.

Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, et al. (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-7.

Tiniakos, D. G., K. Mellon, et al. (1994). "c-jun oncogene expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder." Br J Urol **74**(6): 757-61.

Tournier, C., P. Hess, et al. (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-4.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 205-15.

Tsai, E. Y., J. Yie, et al. (1996). "Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN." Mol Cell Biol **16**(10): 5232-44.

van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis." Oncogene **20**(19): 2453-64.

van Dam, H., M. Duyndam, et al. (1993). "Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein." Embo J **12**(2): 479-87.

van Dam, H., D. Wilhelm, et al. (1995). "ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents." Embo J **14**(8): 1798-811.

Vega, F. M., P. Gonzalo, et al. (2003). "Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development." FEBS Lett **544**(1-3): 176-80.

Vega, F. M., A. Sevilla, et al. (2004). "p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1." Mol Cell Biol **24**(23): 10366-80.

Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.

Vogt, P. K. (2002). "Fortuitous convergences: the beginnings of JUN." Nat Rev Cancer **2**(6): 465-9.

Vogt, P. K. and T. J. Bos (1990). "jun: oncogene and transcription factor." Adv Cancer Res **55**: 1-35.

Volm, M., R. Koomagi, et al. (2002). "Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients." Clin Cancer Res **8**(6): 1843-8.

Wagner, S. and M. R. Green (1993). "HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization." Science **262**(5132): 395-9.

Wang, H., Z. Xie, et al. (1996). "JunD phosphorylation, and expression of AP-1 DNA binding activity modulated by serum growth factors in quiescent murine 3T3T cells." Oncogene **13**(12): 2639-47.

Wasserman, J. D. and M. Freeman (1998). "An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the Drosophila egg." Cell **95**(3): 355-64.

Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, et al. (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation." Science **281**(5383): 1671-4.

Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**(10): 589-607.

Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (2000). "Regulation of transcription factor function by phosphorylation." Cell Mol Life Sci **57**(8-9): 1172-83.

Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.

Williams, J. S. and O. M. Andrisani (1995). "The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3819-23.

Winzen, R., M. Kracht, et al. (1999). "The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism." Embo J **18**(18): 4969-80.

Wodrich, W. and M. Volm (1993). "Overexpression of oncoproteins in non-small cell lung carcinomas of smokers." Carcinogenesis **14**(6): 1121-4.

Xia, Y., Z. Wu, et al. (1998). "JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension." Genes Dev **12**(21): 3369-81.

Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31.

Xu, X., S. H. Kang, et al. (1996). "Sequence requirements of ATF2 and CREB binding to the human T-cell leukemia virus type 1 LTR R region." Virology **218**(2): 362-71.

Yang, D., C. Tournier, et al. (1997). "Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3004-9.

Yang, S. H., A. D. Sharrocks, et al. (2003). "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades." Gene **320**: 3-21.

Zelko, I., R. Kobayashi, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice." Arch Biochem Biophys **352**(1): 31-6.

Zu, Y. L., Y. Takamatsu, et al. (1992). "Transcriptional regulation by a point mutant of adenovirus-2 E1a product lacking DNA binding activity." J Biol Chem **267**(28): 20181-7.

Como resultado de este trabajo hemos conseguido las siguientes publicaciones de las cuales el doctorando es autor principal o coautor:

Sevilla, A., Santos. C. R., and Lazo. P.A. (2004). "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**(55): 8950-8.

Sevilla, A., Santos. C. R., and Lazo. P. A. (2004). "Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK." J Biol Chem **279**(26): 27458-65.

Vega, F. M., **Sevilla. A**, and Lazo, P. A. (2004). "p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1." Mol Cell Biol **24**(23): 10366-80.

Lazo. P.A., Vega, F.M and **Sevilla. A** (2005) “Vaccinia Related Kinase 1”. Afcs Nature Molecule Page. **doi: 10.1038/:** mp.a003025.003001.

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos
ADN: ácido desoxiribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADP: del inglés “Adenosine DiPhosphate”
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: del inglés “Adenosine TriPhosphate”
BSA: del inglés “bovine serum albumin”. albúmina sérica bovina
Chk: del inglés “checkpoint kinase”
CKII: del inglés “casein kinase II”
CS: del inglés “calf serum”. Suero de ternera.
DAPI: del inglés “4’,6’-DiAmidino-2-PhenilIndol”
D-MEM: del inglés “Dubelcoo’s modified- Minimum Essential Medium”
DTT: DiTioTreitol
EDTA: del inglés “EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid”
FBS: del inglés “Fetal Bovine Serum”. Suero fetal bovino
GFP: del inglés “Green Fluorescent Protein”
GST: Glutation-S-Transferasa
GTP: del inglés “Guanosine TriPhosfate”
h: hora
IPTG: IsoPropil-β-D-TioGalactopiranósido
K_m: Constante de “Michaelis Menten”
LB: medio “Luria bertani”
mAmp: miliamperios
MBP: del inglés “Myelin Basic Protein”. Proteína básica de mielina
Mdm2: del inglés “Mouse Double Minute-2”
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
ng: nanogramo
nm: nanometro
ºC: grado centígrado
PBS: del inglés “Phosphate Buffer Salinum”
PCR: del inglés “Polimerase Chain Reaction”
PMSF: del inglés “Phenil Methil Sulfonile Phuoride”. Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF: del inglés “PolyVinyliDene Fluoride”
RB: del inglés “RetinoBlastoma protein”
ROS: del inglés “Reactive Oxygen Species”. Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR: del inglés “Reverse Transcriptase PCR”
s: segundo
SDS: del inglés “Sodium Dodecyl Sulfate”
SDS-PAGE: del inglés “SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis”
UV: radiación ultravioleta
v/v: relación volumen/volumen
Wt: del inglés “wild type”. Tipo silvestre
x g: veces la fuerza de la gravedad
μCi: microcurio

μg : microgramo
μl: microlitro
μM: micromolar

Abreviaturas de aminoácidos

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	C	citosina
U	uracilo	G	guanina
T	timidina		

AGRADECIMIENTOS

Todo este trabajo no hubiera llegado a su fin sin la ayuda de un gran número de personas que de forma altruista me ayudaron brindándome su tiempo en discusiones científicas, proporcionándome enzimas y anticuerpos además de valiosas ideas que en ocasiones fueron muy acertadas. Para mí es una gran suerte haber podido contar con todos vosotros.

En primer lugar quiero dar mi más sincero agradecimiento a Pedro por su inmejorable labor en la dirección de este trabajo, y por transmitirme el entusiasmo de continuar con mi carrera científica.

A mis compañeros de laboratorio, porque me han demostrado ser un estupendo equipo: A Francisco y Mónica por su gran ayuda en mis comienzos en la Biología Molecular. A Alberto por su buena disponibilidad en todo momento y por su ojo crítico en este trabajo. A Sandra por ser una amiga de las que vale “su peso en oro”, por su incondicional apoyo tanto en lo personal como lo profesional. A Claúdio por su constante ayuda en mis bloqueos informáticos y por amenizar las tardes con sus bromas.

A Virginia por su incalculable ayuda en maxis y geles y por el día a día en el laboratorio.

Y a ese excepcional trío compuesto por Marta, Inma e Isabel que son la nueva promesa del Laboratorio 4 que espero que muy pronto nos den sorprendentes noticias de las VRKs

A los vecinos del Laboratorio 5 por su gran amistad y buenos consejos. A Jaime, Chelo y Almudena por vuestras donaciones de anticuerpos y fructíferas explicaciones. A Carlos por los infinitos favores y por amenizar nuestros descansos

A Antonio por estar siempre ahí y por esas preciosas inmunofluorescencias envueltas de carcajadas y risas de las que se hizo eco todo el pasillo.

A Inma, Jose, Antonio, Alberto, Sergio y Alicia porque además de estupendos científicos saben divertirse como los que más. A Nuria por ayudarme con mi Bioquímica y por todas esas noches en el Country, nuestra sede en la capital charra.

A mis compañeras de piso Toñi, Raquel, Katia, Maribel, Berta y Ximena con quienes compartí un montón de charletas y risas.

A mis amigas briviescanas por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A Gonzalus´s Wallace por ser una persona admirable que tuve la suerte de encontrar. Por todo su cariño, amistad y complicidad que espero que dure siempre.

A mis padres y hermana por todo vuestro apoyo incondicional y porque siempre me habeis demostrado ser los mejores. Infinitas gracias por estar cuando más os he necesitado.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN 1

1.- RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR. SEÑALES DE ESTRÉS CELULAR. 3

2.- MAPKs EN MAMÍFEROS 3

3.- ESPECIFICIDAD EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK Y SU FUNCIÓN 6

4.- FUNCIONES GENERALES DE LAS CASCADAS DE LAS MAPK 9

4A.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL 9

4B.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL 9

4C.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL TRADUCCIONAL 10

4D.- REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR 10

4E.- CONTROL DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR 11

5.- INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE p53 Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK QUINASAS 11

5.1.-FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE p53 POR MAPK 12

6.- EL QUINOMA HUMANO. FAMILIA DE QUINASAS VRK. 15

6.1.- CARACTERÍSTICAS DE VRK1 “Vaccinia-related kinase 1” 20

7.- REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN 22

7.1.- LOCALIZACIÓN INTRACELULAR 23

7.2.- CONTROL DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. 23

7.3.- REGULACIÓN DEL LA UNIÓN AL ADN 25

7.4.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL 25

8.- EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AP-1. 26

8.1.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL COMPLEJO AP-1 29

9.- FAMILIA DE PROTEÍNAS JUN 31

9.1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES 31

9.2.- LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE c-JUN SE REGULA POR FOSFORILACIÓN 32

10.- FAMILIA DE PROTEÍNAS ATF/CREB 34

10.1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE ATF2 36

10.2.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATF2 POR FOSFORILACIÓN 38

10.3.- FUNCIONES DE ATF2 39

11.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE c-JUN Y ATF2. ESTABILIDAD PROTEICA. 40

12.- PROMOTORES A LOS QUE SE UNEN LOS HETERODÍMEROS DE C-JUN Y ATF2. 41

OBJETIVOS 45

RESULTADOS 49

1.- CARACTERÍSTICAS DE VRK1 Y LA FAMILIA DE QUINASAS VRK. 49

1.1.- ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE VRK1. 49

1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FAMILIA DE QUINASAS VRK1. 51

1.3.- VRK1 PRESENTA ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO EN SU ACTIVIDAD QUINASA. 52

2.- VRK1 Y ATF2 53

2.1.- VRK1 y ATF2 COLOCALIZAN EN EL NÚCLEO 53

2.2.- FOSFORILACIÓN DE ATF2 POR LA QUINASA VRK1 56

2.3.- VRK1 FOSFORILA A ATF2 EN LA SERINA 62 Y EN LA TREONINA 73. 57

2.4.- VRK1 INDUCE UNA ACUMULACIÓN DE ATF2 EN LA CÉLULA. 61

2.5.- VRK1 ACTIVA LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE ATF2 63

2.5.- VRK1 ACTIVA EL PROMOTOR DE LA COLAGENASA. 66

2.6.- VRK1 PUEDE COOPERAR CON JNK EN LA ACTIVACIÓN DE ATF2 67

3.- C-JUN Y VRK1 68

3.1.- c-JUN y VRK1 COLOCALIZAN EN EL NÚCLEO 68

3.2.- VRK1 FOSFORILA A c-JUN Y ES INSENSIBLE AL INHIBIDOR DE JNK SP600125 70

3.3.- C-JUN SE FOSFORILA EN RESIDUOS DE Ser63 Y Ser73 POR LA QUINASA VRK1. 73

3.4.- LA SOBRE-EXPRESIÓN DE VRK1 PROVOCA LA ESTABILIZACIÓN DE C-JUN TANTO EXÓGENO COMO ENDÓGENO. 74

3.5.- VRK1 ESTIMULA LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE c-JUN 77

3.6.- VRK1 INTERACCIONA CON c-JUN PERO NO CON JNK 79

3.7.- VRK1 COOPERA CON JNK EN LA ACTIVACIÓN DE c-JUN 80

DISCUSIÓN 83

1.- CARACTERÍSTICAS DE VRK1 Y LA FAMILIA DE QUINASAS VRK. 85

1.1.- LOCALIZACIÓN NUCLEAR 85

1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FAMILIA DE QUINASAS VRK 85
2.- VRK1 Y ATF2 86
3.- VRK1 Y C-JUN 92

CONCLUSIONES 99

MATERIALES Y MÉTODOS 105

1.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS 107
1.1.- AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE *E.COLI* 107
1.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS 107
1.3.- DIGESTIÓN DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN 107
1.4.- ELECTROFORESIS DE FRAGMENTOS DE ADN 108
2.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA 108
3.- TRANSFORMACIÓN 109
4.- SECUENCIACIÓN DE ADN 110
5.- EXPRESIÓN EN BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST 110
6.-TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE 111
7.- ENSAYOS KINASA DE VRK1 112
8.- HIDRÓLISIS ÁCIDA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA Y ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE FOSFOAMINOÁCIDOS. 112
9.- DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA Y ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE PÉPTIDOS 114
10.-CULTIVO CELULAR 115
11.-TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE ADN EN CÉLULAS EUCARIOTAS EN CULTIVO 116
12.- ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT 117
13.- ESTUDIOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN 119
14.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA 120
15.- ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL CON GEN REPORTERO DE LUCIFERASA 121
16.- TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS 122

BIBLIOGRAFÍA 135