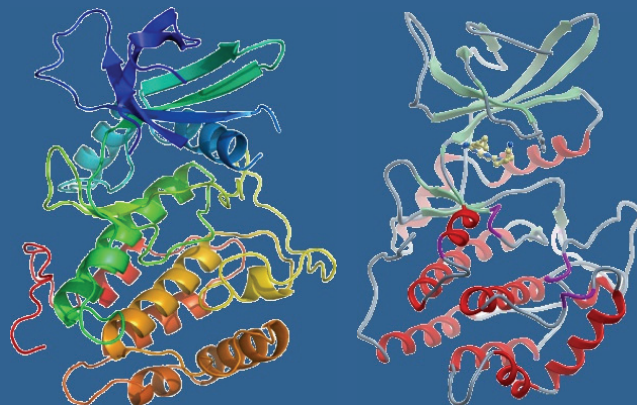




UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

CAMPUS DE LUGO



**Efecto de diferentes inhibidores y metales
sobre las quinasas humanas VRK y la
proteína viral B1R.**

Iria Barcia Sanjurjo

Lugo, 2012



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

CAMPUS DE LUGO

**Efecto de diferentes inhibidores y metales
sobre las quinasas humanas VRK y la
proteína viral B1R.**

Iria Barcia Sanjurjo

Lugo, 2012



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Santiago de Compostela

D. Ramiro Barcia Vieitez, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela y, **D. Pedro A. Lazo-Zbikowski**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C)

INFORMAN:

Que la presente memoria con título "**Efecto de diferentes inhibidores y metales sobre las quinasas humanas VRK y la proteína viral B1R.**" elaborada por la Graduada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Dña. Iria Barcia Sanjurjo**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, y autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Lugo, septiembre de 2012.

Fdo. R. Barcia Vieitez

Fdo. Pedro A. Lazo-Zbikowski

Fdo. Iria Barcia Sanjurjo

- *Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del Proyecto de Investigación Zimofeed: 08MMA003CT financiado por la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia.*

- *Doña Iria Barcia Sanjurjo ha disfrutado de un contrato predoctoral financiado por la Vicerrectoría de Investigación e Innovación junto con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.*

La investigación en el laboratorio del Centro de Investigación del Cáncer (CIC-C.S.I.C) ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- *Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-02900; SAF2007-60242; CDS-2007-0017 y SAF2010-14935)*
- *Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad (SAN/673/SA05/08; BOCyL N° 170)*
- *Junta de Castilla y León, Consejería de Educación (CSI14A08; CSI006A11-2 y grupo de excelencia GR-15)*
- *Kutxa-Fundación INBIOMED*

Parte del trabajo mostrado en esta Tesis Doctoral ha originado la siguiente publicación:

Vázquez-Cedeira, M., Barcia-Sanjurjo, I., Sanz-García, M., Barcia, R. & Lazo, P.A. (2011). Differential Inhibitor Sensitivity between Human Kinases VRK1 and VRK2. PLoS ONE 6: e23235.

Además, también como resultado de este trabajo, se ha enviado recientemente para su publicación el siguiente artículo:

Barcia-Sanjurjo, I., Vázquez-Cedeira, M., Barcia, R. & Lazo, P.A. "Sensitivity of the kinase activity of human VRK proteins to toxic metals".

“Las condiciones para la conquista son siempre sencillas. Sólo debemos trabajar un tiempo, soportar un tiempo, creer siempre y retroceder jamás”

Séneca

“Para que pueda surgir lo posible, es preciso intentar una y otra vez lo imposible”

Hermann Hesse

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

À mi madre

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

	1
1.1. Cáncer y señalización en cáncer	3
1.1.1. Señalización en cáncer	4
1.1.1.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento	6
1.1.1.2. Evasión de señales inhibitorias	7
1.1.1.3. Evasión a la muerte celular (apoptosis)	7
1.1.1.4. Potencial replicativo ilimitado	8
1.1.1.5. Inducción de la angiogénesis	8
1.1.1.6. Activación de la invasión y metástasis	9
1.2. Quinasas y cáncer	10
1.2.1. El “quinoma humano”	11
1.2.2. La familia de quinasas VRK (Vaccinia-related Kinase)	12
1.2.2.1. VRK1 (Vaccinia-related Kinase 1)	19
1.2.2.1.1. Sustratos de VRK1	20
1.2.2.1.1.1. Supresor de tumores p53	21
1.2.2.1.1.2. ATF2	24
1.2.2.1.1.3. c-Jun	25
1.2.2.1.1.4. Otros sustratos	26
1.2.2.1.2. Regulación de VRK1	27
1.2.2.2. VRK2 (Vaccinia-related Kinase 2)	28
1.2.2.3. VRK3 (Vaccinia-related Kinase 3)	32
1.2.3. El virus Vaccinia y la quinasa B1 del virus Vaccinia	33

1.3. Cáncer y metales	36
1.3.1. Cadmio	38
1.3.2. Cobalto	42
1.3.3. Cobre	44
1.3.4. Mercurio	46
1.3.5. Plomo	48
1.3.6. Litio	50
1.3.7. Zinc	52
1.4. Cáncer e inhibidores	55
1.4.1. IC261	57
1.4.2. PP1	58
1.4.3. Indirubín-3-monoxima	58
1.4.4. Roscovitina	60
1.4.5. SB203580	61
1.4.6. SP600125	62
1.4.7. TDZD-8 y TDZD-20	63
1.4.8. Estaurosporina	64
1.4.9. RO-31-8220	65
1.4.10. Inhibidor de Cdk1	66
1.4.11. Oxindol 1	66
1.4.12. AZD-7762	67
1.4.13. VX-680	68
1.4.14. PLX-4720	68
1.4.15. GDC-0879	69

2. OBJETIVOS	71
3. MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1. Material	77
3.1.1. Reactivos	77
3.1.2. Equipos y aparatos	77
3.2. Métodos	78
3.2.1. Expresión y bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST	78
3.2.2. Tinción con Coomassie	81
3.2.3. Ensayos de actividad quinasa <i>in vitro</i>	82
3.2.4. Determinación de la concentración proteica	83
3.2.5. Electroforesis para proteínas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	84
3.2.6. Cálculos de constantes cinéticas	87
4. RESULTADOS	89
4.1. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST	91
4.1.1. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK1	91
4.1.2. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK2A	93
4.1.3. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK2B	94
4.1.4. Expresión en bacterias y purificación de GST-B1R	94
4.1.5. Expresión en bacterias y purificación de GST-p53	95

4.2. Estudio de la sensibilidad a diferentes inhibidores comerciales de la familia de quinasas VRK y B1R	96
4.2.1. Inhibidores comerciales y H3 como sustrato	96
4.2.2. Inhibidores comerciales y p53 como sustrato	101
4.2.3. Inhibidores comerciales frente a B1R con H3 y p53 como sustratos	107
4.3. Estudio de la sensibilidad a diferentes metales de la familia de quinasas VRK y B1R	108
4.3.1. Ambientales y ocupacionales	108
4.3.2. Litio	125
4.3.3. Zinc	127
4.4. Combinaciones de inhibidores con metales	129
4.4.1. Cadmio	129
4.4.2. Litio	132
4.5. Estudio cinético de VRK1	138
4.5.1. Magnesio	139
4.5.2. Manganeso	140
4.5.3. Zinc	141
5. DISCUSIÓN	143
6. CONCLUSIONES	155
7. BIBLIOGRAFÍA	158
8. ABREVIATURAS	197
9. ANEXO	203

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer y señalización en cáncer

El cáncer es una enfermedad multigénica y multicelular que puede surgir en todos los tipos celulares y órganos con una etiología multifactorial. Hay evidencias que indican que la tumorigénesis en humanos es un proceso de varias fases que reflejan alteraciones genéticas que provocan la progresiva transformación de células humanas normales en líneas malignas. Las células cancerosas tienen defectos en los circuitos de regulación que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. El extenso catálogo de los genotipos de las células cancerosas sería una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología de las células que colectivamente dictaminarían un crecimiento maligno: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). El progreso conceptual en la pasada década ha añadido 2 alteraciones emergentes que son la reprogramación del metabolismo de la energía y la evasión de la destrucción inmune. Además, los tumores presentan otra dimensión de complejidad, que es la capacidad de reclutar células aparentemente normales que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos creando el “microambiente del tumor” (Hanahan y Weinberg, 2011). Si hay un crecimiento celular incontrolado o metástasis extendidas, esto causará la muerte del individuo (Chaffer y Weinberg, 2011). La pasada década se ha presenciado un considerable progreso hacia el tratamiento y entendimiento de los mecanismos propuestos por Hanahan y Weinberg y junto con los avances en la detección temprana y en las diversas modalidades de tratamiento, muchos cánceres se han convertido en curables (Pollack et al., 2009).

El cáncer puede ser visto como la pérdida de comportamientos cooperativos de la célula que normalmente facilitan multicelularidad, incluyendo la

formación de tejidos y órganos (Abbott et al., 2006). Numerosas alteraciones en las secuencias del DNA subyacen en el desarrollo de cada neoplasma y un objetivo central de la investigación en el cáncer ha sido identificar los genes mutados que están implicados en oncogénesis, denominados como oncogenes. Las proteínas que están codificadas por dichos genes normalmente regulan la proliferación, diferenciación y muerte celular (Futreal et al., 2004). Las alteraciones del ADN que llevan a propiedades asociadas a tumores son favorecidas por la selección natural que a la larga conducen a la adquisición de propiedades neoplásicas (Vogelstein y Kinzler, 1993). Inicialmente, esto supone la desregulación de la proliferación y resistencia a la apoptosis. Posteriormente, algunas células cancerosas adquieren la habilidad de invadir y colonizar otros tejidos dando lugar a metástasis que son las principales responsables de la mortalidad asociada al cáncer.

1.1.1. Señalización en cáncer

El proceso mediante el cual la actividad celular se coordina con cambios en el ambiente a través de diversas vías que reciben y procesan señales tanto del ambiente externo como de diferentes regiones del interior celular es lo que llamamos señalización. Esas vías no son lineales, sino que forman parte de una red resultante de la interconexión entre diferentes rutas de señalización y esto es posible porque un mismo compuesto de señalización es capaz de recibir señales de múltiples entradas (Jordan et al., 2000).

Diversas rutas de señalización se interrelacionan para regular el crecimiento, proliferación y supervivencia celulares. La alteración en esas rutas puede traer como consecuencia la aparición de un proceso tumoral. El proceso de transformación maligna de un grupo de células hasta dar lugar a un tumor se produce en pasos discretos, la mayoría de los cuales se corresponden con la alteración de un gen específico. Hay evidencias de que existen un número limitado

de rutas moleculares cuya alteración da lugar a la mayoría de los cánceres (Hahn y Weinberg, 2002).

A continuación se detallan las seis alteraciones esenciales en la fisiología de las células que colectivamente dictaminarían un crecimiento maligno descritas por Hanahan y Weinberg en el año 2000 (Figura 1.1), así como algunas de las vías de señalización afectadas en cada caso:

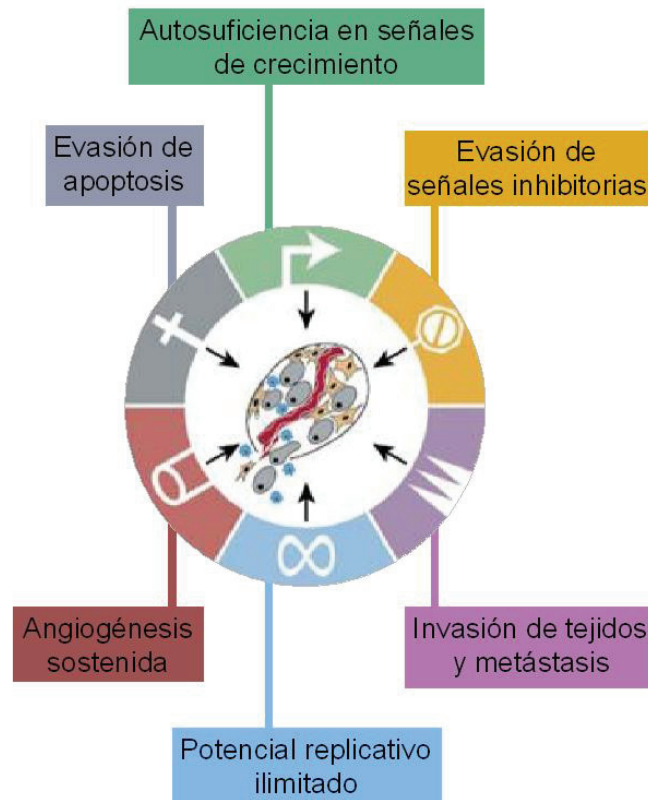


Figura 1.1. Las características del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000).

1.1.1.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento

Podría decirse que la característica fundamental de las células cancerosas es su capacidad para la proliferación crónica sostenida. Los tejidos normales controlan la producción y liberación de factores de crecimiento que ordenan la entrada y progresión del ciclo de división y crecimiento celular, de ese modo garantizan la homeostasis celular, el mantenimiento de la arquitectura normal y las funciones de los tejidos. Las células cancerosas, mediante desregulación de estas señales, se convierten en dueñas de sus propios destinos. La mayoría de estas señales son factores de crecimiento que se unen a los receptores de superficie de las células, que normalmente contienen dominios con actividad tirosina quinasa. Sorprendentemente, las identidades y fuentes de las señales proliferativas que operan en los tejidos normales todavía son pobremente entendidas. Sin embargo, la señalización mitogénica en células cancerosas sí está mejor comprendida (Lemmon y Schlessinger, 2010; Witsh et al., 2010; Hynes y MacDonald, 2009; Perona, 2006). Las células cancerosas adquieren la capacidad de señalización proliferativa sostenida con numerosas vías alternativas. Pueden producir ligandos de factores de crecimiento por si mismas originando una estimulación proliferativa autocrina. Alternativamente, pueden enviar señales para estimular células normales que sostienen la matriz extracelular asociada al tumor y así suministrar a las células cancerosas diversos factores de crecimiento (Cheng et al., 2008; Bhowmick et al., 2004). Los receptores de señales pueden también ser desregulados por la elevación de los niveles de proteínas receptoras expuestas en las células cancerosas.

1.1.1.2. Evasión de señales inhibitorias

Las células cancerosas evitan los programas que regulan negativamente la proliferación celular, la mayoría dependientes de las acciones de los genes supresores de tumores. Los dos prototipos mejor conocidos de supresores de tumores codifican las proteínas RB (asociadas al retinoblastoma) y TP53, operando como núcleos centrales de control mediante dos claves complementarias en la regulación celular, las decisiones de proliferar o bien, de activar los programas de senescencia y apoptosis.

1.1.1.3. Evasión a la muerte celular (apoptosis).

El concepto de la muerte celular programada o apoptosis como barrera natural para el desarrollo del cáncer ha sido establecido por estudios funcionales desarrollados las dos últimas décadas (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004; Evan y Littlewood, 1998).

La maquinaria apoptótica está compuesta de componentes reguladores y efectores (Adams y Cory, 2007). Los reguladores, a su vez, están divididos en dos circuitos principales, uno recibiendo y procesando señales extracelulares que inducen la muerte (el programa apoptótico extrínseco, involucrando por ejemplo el ligando Fas/receptor Fas), y el otro detectando e integrando diversas señales de origen intracelular (el programa intrínseco). Esto culmina en la activación de una proteasa normalmente latente (caspasas 8 y 9, respectivamente), que proceden a iniciar la cascada de proteólisis implicando a las caspasas efectoras responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, en la que la célula es progresivamente desensamblada y después consumida, por sus células vecinas y por células fagocitarias.

1.1.1.4. Potencial replicativo ilimitado

En el año 2000, fue ampliamente aceptado que las células cancerosas requieren potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad contrasta con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes celulares, que son capaces de realizar sólo un número limitado de sucesivos ciclos de división y crecimiento. Esta limitación se ha asociado con dos barreras bien definidas a la proliferación: senescencia, una entrada irreversible a un estado no proliferativo pero viable, y crisis, que implica la muerte celular.

Hay evidencias que indican que los telómeros protegen los finales de los cromosomas, implicados en la capacidad de la proliferación ilimitada (Blasco, 2005; Shay y Wright, 2000). En humanos, el mantenimiento de los telómeros sirve como control del número de divisiones celulares, regulando así la vida de la célula. La alteración de este mecanismo, impidiendo el acortamiento normal de los telómeros tras cada división celular, es un fenómeno común en las células cancerosas (Blasco, 2003).

1.1.1.5. Inducción de la angiogénesis

La formación de nuevos vasos sanguíneos es necesaria para que los tumores puedan alcanzar cierto tamaño. Para ello se ha de adquirir la capacidad de atraer células endoteliales (Hanahan y Folkman, 1996). Este proceso es gobernado por factores compensatorios que inducen o se oponen a la angiogénesis (Baeriswyl y Christofori, 2009; Bergers y Benjamin, 2003). Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores superficiales celulares, estimuladores o inhibitorios, expuestos por células endoteliales vasculares. Los prototipos mejor conocidos de inductores e inhibidores de la

angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEFG-A) y trombospondin-1 (TSP-1), respectivamente.

1.1.1.6. Activación de la invasión y metástasis.

La alteración mejor caracterizada implica la pérdida en las células de carcinomas de la E-cadherina, una molécula clave en la adhesión célula a célula. Un aumento en la expresión de E-cadherina dificulta la invasión y metástasis, mientras que la reducción de su expresión potencia dichos fenotipos. La frecuente observación de la downregulation e inactivación mutacional ocasional de E-cadherina en carcinomas humanos proporciona gran apoyo para su papel como supresor clave de esta capacidad alternativa (Berx y van Roy, 2009; Carvallaro y Christofori, 2004).

El proceso de invasión y metástasis ha sido esquematizado como una secuencia de pasos discretos, frecuentemente denominados cascada de invasión-metástasis (Talmadge y Fidler, 2010; Fidler, 2003). Esta descripción prevee una sucesión de cambios celulares-biológicos, empezando por la invasión local, luego la intravasación de células cancerosas en vasos sanguíneos y linfáticos adyacentes, tránsito de células cancerosas a través del sistema linfático y hematógenos, seguido de la fuga de células cancerosas desde el lumen de tales vasos al parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y finalmente el crecimiento de las lesiones micrometásticas en tumores macroscópicos, este último paso denominado “colonización”.

1.2. Quinasas y cáncer

La mayoría de los procesos biológicos son regulados por reacciones de fosforilación reversible mediadas por quinasas y fosfatasa (Hunter 1987; Karin y Hunter 1995).

Las quinasas son enzimas que catalizan la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina (aminoácidos susceptibles de ser fosforilados ya que contienen un grupo hidroxilo) en proteínas diana. Estas enzimas se caracterizan por una elevada homología en el dominio quinasa o dominio catalítico, consistente en una secuencia de 250-300 aminoácidos (Hanks y Hunter, 1995; Hanks et al., 1988). Hay tres subgrupos principales de quinasas en función del tipo de residuos que son capaces de fosforilar: las serina/treonina quinasas, las tirosina quinasas y las quinasas duales que fosforilan los tres tipos de residuos. Las fosforilaciones son modificaciones covalentes reversibles que a nivel celular son contrarrestadas por otras enzimas denominadas fosfatasa, encargadas de eliminar enzimáticamente el grupo fosfato añadido previamente por una quinasa. Las fosforilaciones pueden controlar propiedades como la actividad enzimática del sustrato, su localización celular, su interacción con otras proteínas o su degradación (Hanks y Hunter, 1995; Hanks et al., 1988; Johnson y Lapadat, 2002; Yaffe y Elia, 2001). Las proteínas quinasas median la mayor parte de las rutas de señalización intracelular en las células eucariotas, siendo la fosforilación de proteínas la modificación transduccional más utilizada para las situaciones donde se necesita una rápida modulación de la actividad de factores de transcripción en respuesta a señales procedentes de receptores de la superficie celular (Karin y Hunter, 1995). Estas enzimas controlan procesos como transcripción génica, progresión del ciclo celular, metabolismo, reorganizaciones del citoesqueleto y movimiento celular, apoptosis o diferenciación (Hunter, 1995).

La fosforilación de proteínas también juega un papel esencial en la comunicación intercelular durante el desarrollo embrionario, las respuestas fisiológicas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis y el funcionamiento de los sistemas nervioso e inmune (Kostich et al., 2002; Manning, et al., 2002a; 2002b).

Es por ello que la alteración y desregulación de proteínas quinasas claves juega un papel fundamental en desordenes fisiológicos generando múltiples enfermedades incluyendo el cáncer (Colucci-D'Amato et al., 2003; Hunter, 1987). Así por ejemplo, muchas de las proteínas oncogénicas conocidas son quinasas (Blume-Jensen y Hunter, 2001; Futreal et al., 2004; Hunter, 1997; Yang et al., 2003).

1.2.1. El “quinoma humano”

Manning y colaboradores han catalogado filogenéticamente todas las quinasas humanas en lo que se ha denominado el “Quinoma humano”, haciendo uso de las bases de datos genómicas disponibles, los ADN codificantes y las EST (“expressed sequence tags”) introducidas en el “GenBank”. De este modo han identificado 518 genes que codifican para presuntas quinasas, de los cuales 71 no habían sido descritos hasta ese momento. Y se han clasificado en 8 grupos, cada uno de ellos divididos en varias subfamilias (Manning et al., 2002a; 2002b). Dentro del mismo grupo que evolucionó a las caseína quinasas I, en una rama temprana se encuentra la familia de quinasas VRK (*vaccinia*-related kinases), con las que comparten un gran parecido en el dominio catalítico (López-Borges y Lazo, 2000) (Figura 1.2).

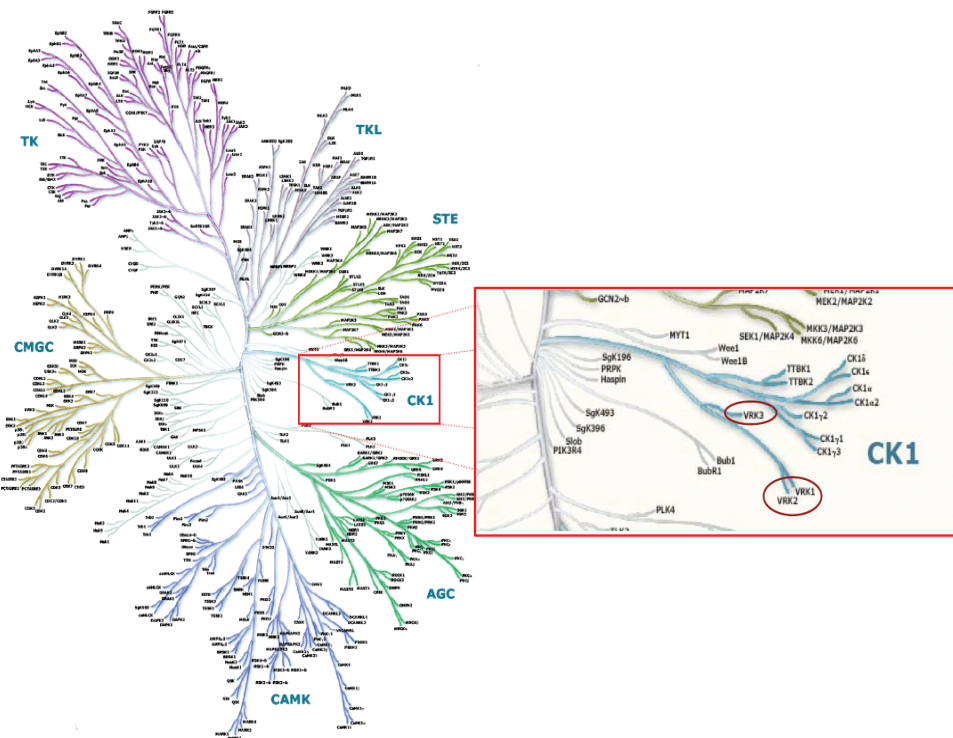


Figura 1.2. VRK1 en el quimoma humano. VRK1 forma parte de la familia de las VRK que divergieron pronto en la evolución a partir de la rama de las caseína quinasas tipo 1 (CK1) (Manning et al. 2002).

1.2.2. La familia de quinasas VRK (Vaccinia-related kinase)

La familia de quinasas VRK consta de tres miembros en humanos: VRK1, VRK2 (con dos isoformas distintas A y B) y VRK3 (Nezu et al., 1997) (Figura 1.3).

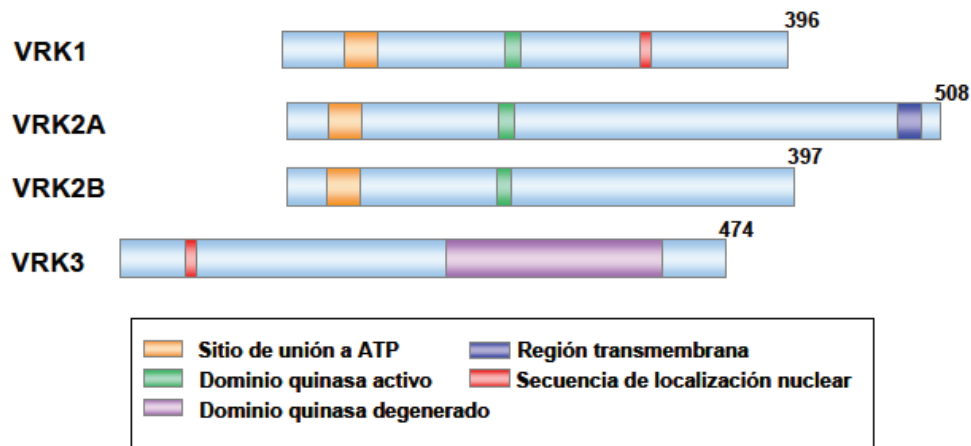


Figura 1.3. Estructura de las quinasas humanas de la familia VRK. Las proteínas están alineadas según identidad de secuencia de aminoácidos.

Nezu y colaboradores describen inicialmente la quinasa humana VRK1, mediante el empleo de una librería de ADNc (ADN complementario al ARNm), proveniente de tejidos fetales con alta tasa de proliferación celular, diseñada para la búsqueda de quinasas implicadas en la regulación de la división y crecimiento celular (Nezu et al., 1997). La secuencia completa de este gen se empleó, a través de una búsqueda en bases de datos de EST, para identificar otro gen con un 62% de homología con el anterior que codifica la quinasa humana VRK2 (Nezu et al., 1997). Ambas proteínas presentan una importante homología de secuencia con la serín/treonín quinasa B1R del virus Vaccinia, una quinasa de expresión temprana durante la infección viral y con un papel esencial para la replicación del ADN viral (Banham y Smith, 1992; Lin et al., 1992; Rempel et al., 1990; Rempel y Traktman, 1992). VRK1 tiene un 40% de identidad sobre 305 aminoácidos de B1R y VRK2 un 38,7% sobre 300 aminoácidos. 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 1.4). Además, la expresión ectópica de VRK1 es capaz de complementar parcialmente la deficiencia de B1R en la replicación del ADN viral que presenta el mutante sensible a temperatura *ts2* del virus *Vaccinia*, aunque no se recupera totalmente la producción de virus (Boyle y Traktman, 2004).

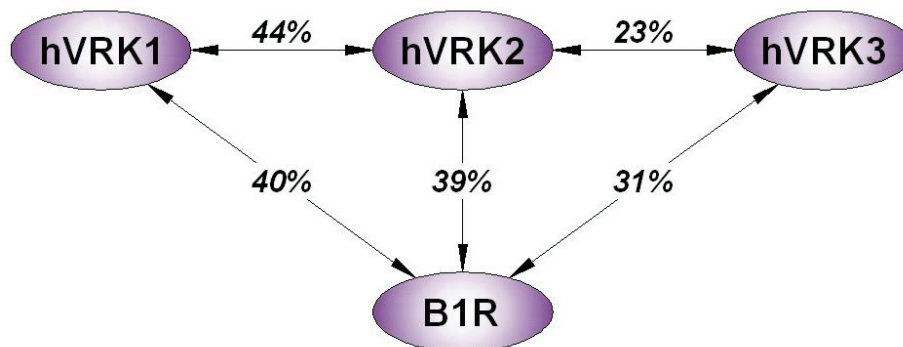


Figura 1.4. Porcentajes de identidad entre las secuencias de B1R con la familia de quinasas humanas VRK.

Los ARN mensajeros de VRK1 y VRK2 se detectaron mediante northern blot en todos los tejidos examinados, con niveles de expresión especialmente altos en tejidos como hígado fetal, testículos y timo para VRK1; y páncreas, músculo esquelético, corazón y leucocitos de sangre periférica para VRK2. También se encontraron altos niveles de expresión en varias líneas celulares tumorales como A549 (adenocarcinoma de pulmón), SW480 (adenocarcinoma colorrectal), Raji (linfoma de Burkitt), MOLT-4 (leucemia linfoblástica), K-562 (leucemia mielógena crónica), HL-60 (leucemia promielocítica) o Hela S3 (adenocarcinoma

de cérvix). Por sus altos niveles de expresión en líneas tumorales y en tejidos altamente proliferativos como testículos, timo e hígado fetal se postuló que las quinasas VRK podrían estar involucradas en la regulación del crecimiento celular con un posible papel en tumorigénesis (Nezu et al., 1997).

Posteriormente se ha identificado un tercer miembro de la familia, denominado VRK3, además de un pseudo gen de VRK3 del que no se ha detectado expresión. Recientemente se ha llevado a cabo un análisis comparativo de las proteínas de la familia VRK de mamíferos. Tanto VRK1 y VRK2 como VRK3 se expresan en todos los tejidos analizados en humanos y ratón pero, sin embargo, solo las dos primeras parecen tener actividad enzimática, puesto que VRK3 posee sustituciones de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de estas proteínas (Nichols y Traktman, 2004).

La familia de quinasas VRK se relaciona de forma distante con las caseín quinasas de tipo 1 (CKI), pero la conservación del dominio quinasa es débil presentando sustituciones en residuos clave (Manning et al., 2002a; Scheeff et al., 2009). Se cree que un único gen ancestral para las proteínas VRKs se duplicó dos veces a lo largo de la evolución de la rama de los vertebrados generando tres genes de la familia VRK, mientras que los invertebrados han mantenido un único gen (Figura 1.5)

Familia CKI

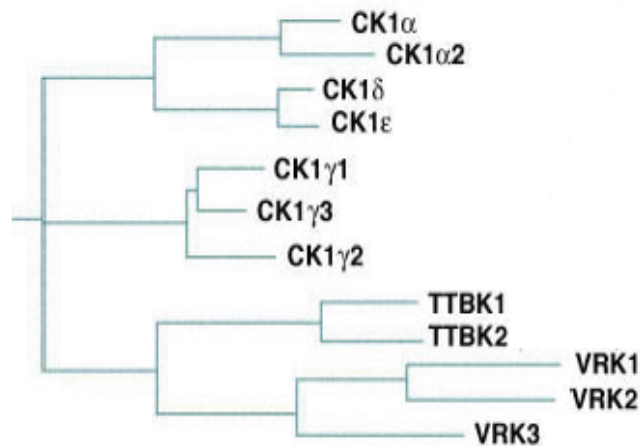


Figura 1.5. Familia de las caseína quinasa tipo I dentro del quinoma humano (Manning et al., 2002)

Existen homólogos de los genes VRK en organismos modelo. En el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* existe un homólogo a VRK1 que es el gen F28B12.3, localizado en el cromosoma 2, cuyo ortólogo en el también nematodo modelo *Caenorhabditis briggsae* es el gen CBG02540 y que codifica una proteína quinasa de 610 aminoácidos. Los datos de inhibición por ARN de interferencia muestran un fenotipo letal embrionario con defectos en las divisiones celulares y la formación del huso mitótico (Gorjanacz et al., 2007; Kamath et al., 2003) y fenotipo post-embrionario de crecimiento lento (Simmer et al., 2003). Estos datos lo sitúan como posiblemente involucrado en eventos esenciales de la división celular. Recientemente se ha descrito que VRK1 es requerido para la proliferación normal de células germinales y regula, en parte, la actividad de CEP1 (ortólogo de p53) (Waters et al., 2010).

En *Drosophila melanogaster* existe un gen de la familia, el gen CG6386 que codifica dos transcritos diferentes: CG6386-RA y CG6386-RB (Morrison et al., 2000). También tiene homólogos para VRK1 y VRK2 el pez cebra *Dario rerio* y el anfibio *Xenopus laevis* para los tres miembros de la familia.

No se han descrito miembros homólogos de la familia en levaduras, pero si se encuentran proteínas posiblemente ancestros de las actuales VRK, de las que podrían derivar éstas. Este es el caso del gen Hrr25/YPL204W de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica 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 anomalías en el ciclo celular e hipersensibilidad al daño en el ADN. Su ortólogo en *Schizosaccharomyces pombe* es el gen HHP1 (Dhillon y Hoekstra, 1994), un gen implicado en reparación del ADN tras irradiación gamma.

En el ratón *Mus musculus*, la proteína VRK1, anteriormente descrita como 51PK (Zelko et al. 1998), posee una homología del 87% con la proteína humana y es una quinasa exclusivamente nuclear que presenta una alta autofosforilación en residuos de serina. Se han encontrado tres formas distintas de su ARN mensajero, que se expresan en varios tejidos, con altos niveles en testículos, bazo, pulmón e hígado (Zelko et al. 1998; Nichols y Traktman 2004), órganos que experimentan una alta tasa de proliferación celular durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, los niveles de expresión de VRK2 son muy inferiores (unas diez veces) a los de VRK1 y VRK3 (Vega et al., 2003). En los tejidos adultos de ratón el nivel de expresión de las tres quinastas es dependiente del tejido celular (Kang y Kim, 2008; Vega et al., 2003; Zelko et al., 1998).

También se sabe que existen homólogos de VRK1 en el mosquito *Anopheles gambiae*, el pez cebra *Dario rerio*, el anfibio *Xenopus laevis*, el ave *Gallus gallus*, en mamíferos como el mono africano verde *Cercopithecus aethiops*,

el chimpancé *Pan troglodytes*, el perro *Canis familiares* y la rata *Rattus norvegicus* (Hoffmann y Valencia, 2004).

La teoría propuesta es que esta familia de proteínas apareciera en organismos tan simples como los gusanos nematodos y de ahí se expandiera en la evolución hasta organismos de organización superior desde la mosca a humanos.

La figura 1.6 representa las relaciones filogenéticas entre VRK y sus homólogos en otros organismos así como con proteínas relacionadas con levaduras.

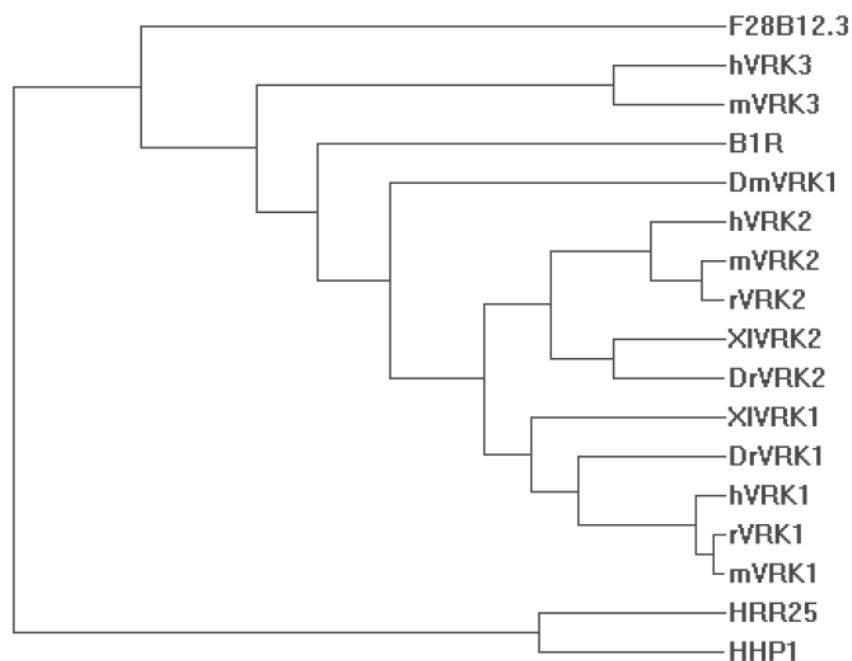


Figura 1.6. Relaciones filogenéticas entre las proteínas VRKs. VRK1, VRK2 y VRK3 humanas (hVRK), de ratón (mVRK), rata (rVRK), pez cebra (DrVRK), *Xenopus* (XlVRK1), *Drosophila* (DmVRK1), *C. elegans* (F28B12.3), *Vaccinia* (B1R), *S. cerevisiae* (HRR25) y *S. pombe* (HHP1).

1.2.2.1. VRK1 (“*Vaccinia-related kinase 1*”)

La VRK1 humana es una proteína de 396 aminoácidos cuyo gen se localiza en la región cromosómica 14q32. El extremo amino, en el cual se encuentra el sitio de unión a ATP entre los residuos 43-71 y el sitio serina-treonina quinasa activo entre los residuos 173-185, presenta una elevada similitud con el dominio catalítico de la caseína quinasa de tipo I δ (López-Borges y Lazo, 2000), mientras que el dominio carboxilo contiene una secuencia de localización nuclear (residuos 356-360) y no presenta homología con ninguna otra proteína conocida, incluso difiere bastante de la parte carboxilo terminal de las otras quinasas de la familia, VRK2 y sobre todo VRK3, y se cree que constituye el dominio regulador de la proteína (López-Borges y Lazo, 2000; Nichols y Traktman, 2004). VRK1 presenta una alta autofosforilación en residuos de serina y de treonina (López-Borges y Lazo, 2000). Las caseína quinasas también presentan esta característica aunque con un patrón diferente, y se ha descrito que en ellas la autofosforilación de su carboxilo terminal inhibe su actividad (Knippschild et al., 2005). En relación con éstas, que es el grupo con el que está próximamente relacionada, VRK1 presenta una actividad quinasa característica, ya que al igual que éstas, fosforila proteínas ácidas (fosvitina y caseína) pero a diferencia de ellas también fosforila proteínas básicas (proteína básica de mielina “MBP” e histona 2B) (López-Borges y Lazo, 2000).

A pesar de tener una señal de localización nuclear en su secuencia (López-Borges y Lazo, 2000), la localización subcelular de la quinasa humana VRK1 endógena varía dependiendo del tipo celular y las condiciones de crecimiento. Lo más común es que se encuentre en el núcleo de las células, siendo capaz de asociarse a la cromatina, pero presente también en el nucleoplasma. En algunos casos también se encuentra en el citoplasma y a veces dentro del aparato de Golgi (Kang et al., 2007; Lazo et al., 2007; Valbuena et al., 2007a), y aunque

normalmente está excluida del nucleolo, en alguna ocasión ha sido descrita como quinasa nucleolar (Andersen et al., 2005).

En cuanto a su actividad bioquímica, muestra una dependencia por cationes divalentes como Mn^{+2} , Mg^{+2} y Zn^{+2} y mayor afinidad por el $MnCl_2$ (Km de 0.6 mM) que por el $MgCl_2$ (Km de 2.8 mM). Otra diferencia con las caseína quinasa es que, al contrario que estas, VRK1 es capaz de usar GTP como donador de fosfato aunque con una Km de 220 μM frente a 50 μM para el ATP (Barcia et al., 2002).

Se desconocen los mecanismos de estimulación y modulación de la actividad de esta quinasa, aunque recientemente se ha descrito, mediante estudios de expresión génica de ADN, que el gen *VRK1* está regulado positivamente por el factor de transcripción E2F y negativamente por p16 y Retinoblastoma (Rb), situándolo como gen diana en la vía p16^{INK4A}-Rb-E2F (Vernell et al., 2003). También se ha encontrado sobre-expresado en respuesta a la expresión del protooncogén c-Myc en linfocitos B (Vernell et al., 2003; Shiiio et al., 2003; Schuhmacher et al., 2001).

1.2.2.1.1. Sustratos de VRK1

La fosforilación de factores de transcripción es un extendido mecanismo para la regulación de la señalización celular y la expresión génica (Karin y Hunter 1995). En lo que respecta a posibles sustratos, hasta la fecha se ha descrito que VRK1 fosforila y activa varios factores de transcripción, como son p53 (López-Borges y Lazo, 2000; Barcia et al., 2002; Vega et al., 2004; Kwon et al., 2005; Toledo y Wahl, 2006), ATF2 (Sevilla et al., 2004b), c-Jun (Sevilla et al., 2004a) y CREB (Kang et al., 2008) y a BAF (Nichols et al., 2006) e Histona H3 (Kang et al., 2007) (Figura 1.7).

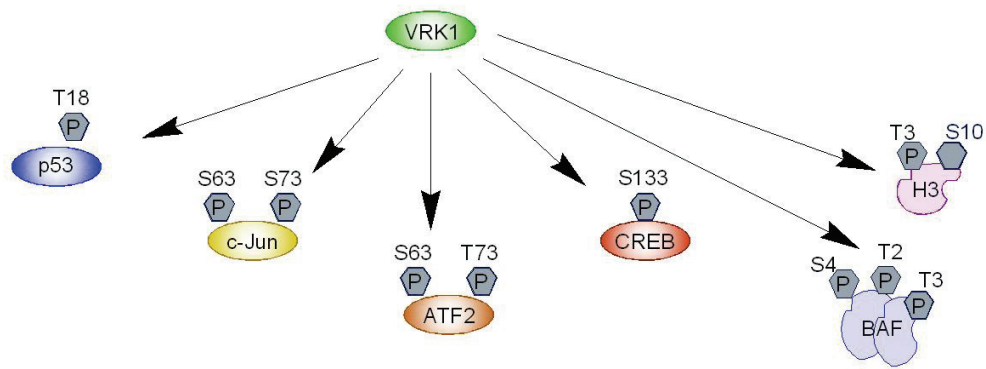


Figura 1.7. Diagrama mostrando las principales dianas de fosforilación de VRK1.

1.2.2.1.1.1. Supresor de tumores p53

El supresor de tumores p53, es una proteína de 396 aminoácidos y con un peso molecular de 53 kDa. Es un factor de transcripción (Kern et al., 1991; el-Deiry et al., 1993) que se encuentra inactivado en cerca de un 50% de los tumores (Hollstein et al., 1994) bien a consecuencia de mutaciones o deleciones en el gen TP53, bien por defectos en mecanismos que activan p53. Este supresor regula la expresión de genes relacionados con reparación de ADN y mantenimiento de la integridad genómica, parada de ciclo celular, apoptosis, diferenciación y senescencia (Vogelstein et al., 2000; Vousden y Lu, 2002.) en respuesta a diversos tipos de estrés como daño al ADN, activación de oncogenes, hipoxia, acortamiento de telómeros o depleción de ribonucleótidos (Figura 1.8).

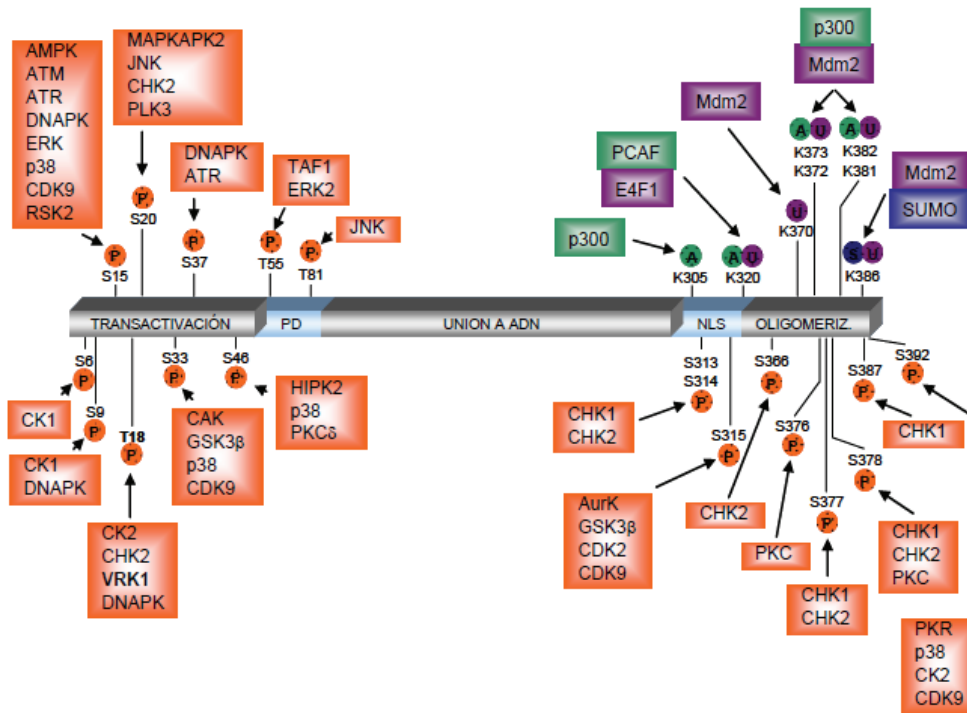


Figura 1.8. Estructura y principales modificaciones postraduccionales de p53. Se indican los residuos que sufren modificaciones postraduccionales (fosforilación (P), acetilación (A), ubiquitinación (U) y sumoilación (S)) y las proteínas responsables (Toledo y Wahl, 2006).

De esta forma p53 evita que se acumulen daños en el ADN y la proliferación de células con mutaciones en el genoma, deteniendo el ciclo celular hasta que se reparen los daños o induciendo muerte celular en el caso de que éstos no se puedan reparar (Figura 1.9).

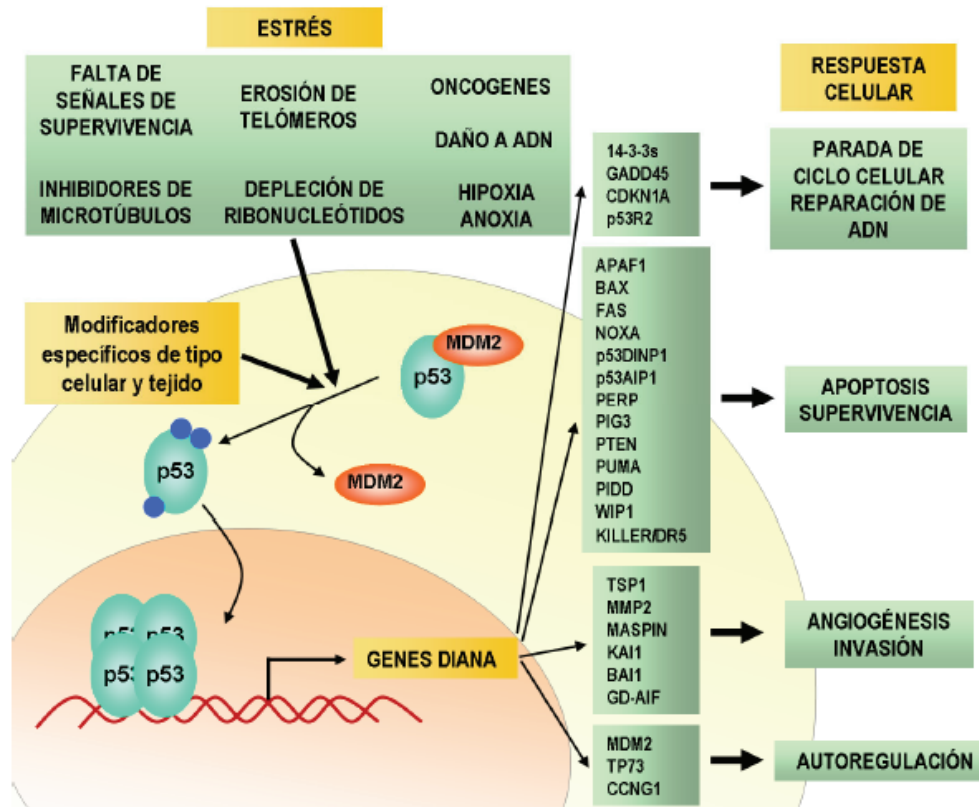


Figura 1.9. Activación de p53 y respuesta celular.

VRK1 fosforila específicamente a p53 en el residuo treonina 18 aumentando su estabilidad mediante un mecanismo postraduccional que no depende totalmente de la inhibición de la interacción de p53 con su regulador negativo Mdm2, aumentando también la actividad transcripcional y la acetilación de la enzima dependiente de p300 (Vega et al, 2004). VRK1 tiene una K_m por p53 de $1\mu M$, concentración que es consistente con los niveles de proteína p53 intracelulares (Barcia et al. 2002).

Las células en las que se ha inhibido la expresión de VRK1 por ARN de interferencia específico tienen defectos en proliferación, son incapaces de

completar la división celular correctamente, provocando en ocasiones la inducción de la muerte de la célula. Basándose en estas observaciones, en los datos de expresión de VRK1 en tejidos altamente proliferativos y en el fenotipo de las células deficientes en VRK1, se ha propuesto que esta quinasa podría tener un papel en el mantenimiento de los niveles basales de p53 necesarios para que se produzca la división celular en condiciones normales de proliferación o para inducir una activación completa de p53 en caso de estrés o daño severo (Vega et al., 2004). Por otro lado, p53 establece un loop auto-regulatorio por el cual induce la degradación de su regulador positivo VRK1, a través de la vía lisosomal (Valbuena et al., 2006). Esta degradación de VRK1 parece ser dependiente de un gen desconocido, regulado por p53, dado que mutantes en los dominios de unión al ADN y oligomerización de p53 son incapaces de inducir la degradación de VRK1 (Valbuena et al., 2006). Esta hipótesis se apoya también en la observación de que la degradación de VRK1 por p53 se evita al sobreexpresar las acetiltransferasas p300 y pCAF, probablemente debido a que son capaces de dirigir la transcripción mediada por p53 hacia dianas muy específicas (Valbuena et al., 2008a).

1.2.2.1.1.2. ATF2

VRK1 también fosforila al factor de transcripción ATF2 (Figura 1.10), que es un regulador de genes implicados en crecimiento celular, diferenciación, respuesta inmune y respuesta a estrés (Livingstone et al. 1995; van Dam et al. 1995), y que también ha sido implicado en proliferación celular y oncogénesis (van Dam y Castellazzi 2001). VRK1 fosforila a ATF2 en sus residuos serina-62 y treonina-73 y es capaz de activar la transcripción dependiente de ATF2, convirtiéndose así en una quinasa que regula la transcripción génica (Sevilla et al. 2004 b).

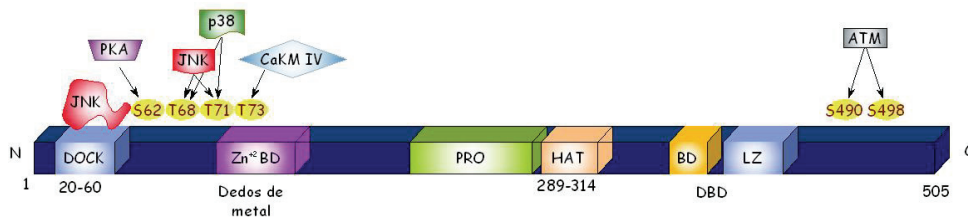


Figura 1.10. Estructura del factor de transcripción ATF2. Dominios, sitios de fosforilación y quinasas reguladoras de su actividad. DOCK (Sitios de anclaje), PRO (región rica en prolinas), HAT (Región con actividad histona acetil transferasa), BD (Dominio básico); LZ (Dominio de cremallera de leucina) y DBD (Dominio de unión al ADN).

1.2.2.1.1.3. *c-Jun*

VRK1 induce la estabilización y acumulación del factor de transcripción *c-Jun* (Figura 1.11), implicado en diferentes funciones celulares en respuesta a diversos estímulos, mediante fosforilación en sus residuos de serina-63 y treonina-73, lo que puede estimular la transcripción dependiente de dicho factor de transcripción. Además, VRK1 coopera con JNK en la activación de *c-Jun* (Sevilla et al. 2004 a).

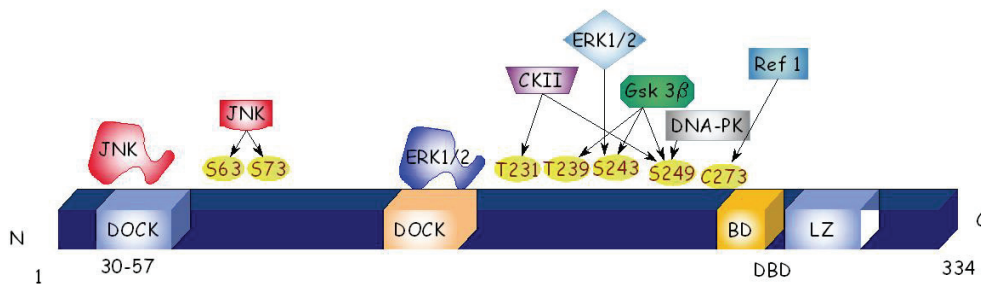


Figura 1.11. Estructura del factor de transcripción *c-Jun*. Dominios, sitios de fosforilación y quinasas reguladoras de su actividad. DOCK (Sitios de anclaje), BD (Dominio básico); LZ (Dominio de cremallera de leucina) y DBD (Dominio de unión al ADN).

1.2.2.1.1.4. Otros sustratos

VRK1 también fosforila al factor de transcripción CREB (cAMP response element binding) en la serina 133 provocando su activación (Kang et al., 2008). A través de la activación de CREB y ATF2, VRK1 incrementa la unión de estos factores al promotor de la ciclina D1, induciéndose la expresión de esta ciclina que resulta un factor clave en la transición de fase G1 a fase S del ciclo celular. Además, el factor de transcripción Myc, promueve la expresión de VRK1 a nivel de su promotor, induciéndose así la expresión de ciclina D1 (Kang et al., 2008).

Aparte de la fosforilación de factores de transcripción, VRK1 es capaz de fosforilar a BAF, un factor necesario para la formación de la envuelta nuclear después de la mitosis, así podría regular la asociación de BAF con diferentes componentes nucleares como la matriz nuclear y la cromatina. Por todo ello se ha implicado a VRK1 en el correcto mantenimiento de la arquitectura nuclear (Nichols et al., 2006).

Y por último, se ha demostrado que VRK1 es capaz de fosforilar a la histona H3, que tiene un papel en la condensación de la cromatina (Kang et al., 2007). Las histonas son objeto de numerosas modificaciones postraduccionales, como la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinización y sumoilación. La mayoría de estas modificaciones ocurren en los extremos amino y carboxilo terminales de las principales histonas (H2A, H2B, H3, H4) (Berger, 2007). De esta manera se controlan múltiples procesos celulares como la transcripción o la condensación de la cromatina en cromosomas durante la mitosis para la segregación del material genético. VRK1 se localiza en la cromatina y fosforila a la histona H3 en los residuos treonina 3 y serina 10. Estas fosforilaciones ocurren tanto *in vivo* como *in vitro*, de manera que en el caso de la fosforilación en el residuo serina 10, VRK1 coopera con la quinasa Aurora B (Kang et al., 2007). Además, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de VRK1 es

capaz de inducir la condensación de la cromatina. Se cree que la fosforilación de la histona H3 en su región amino terminal es importante para la condensación de la cromatina mitótica, si bien también se observa en la cromatina laxa de determinados genes transcripcionalmente activos en interfase (Johansen y Johansen, 2006). Las histonas H2A, H2B y H4 son también fosforiladas por VRK1 pero muy débilmente. Probablemente, VRK1 contribuye a la condensación de los cromosomas en la transición G2/M a través de la fosforilación de histonas (Kang et al., 2007).

1.2.2.1.2. Regulación de VRK1

En cuanto a la regulación de VRK1, existen hasta el momento múltiples datos acerca del papel biológico de la quinasa humana VRK1 y, sin embargo, son pocos los datos referentes a su regulación. La adición o eliminación de suero del medio de cultivo celular (con los mitógenos y factores que este contiene) es capaz de regular la expresión de VRK1. La eliminación del suero del medio de cultivo se traduce en una disminución de la expresión de VRK1 mediada por mecanismos transcripcionales, a nivel de su promotor (Valbuena et al., 2008b). Por otro lado, se han descrito dos factores de transcripción capaces de promover la expresión de VRK1 a nivel de su promotor: E2F1 y Myc (Kang et al., 2008; Santos et al., 2006; Vernell et al., 2003). Además, la irradiación de células con luz ultravioleta induce un rápido incremento en los niveles de VRK1, paralelo a la inducción de p53 (Valbuena et al., 2006). En cuanto a la regulación de los niveles de VRK1 por mecanismos postraduccionales, tal y como se ha citado con anterioridad, el supresor de tumores p53 es capaz de inducir la degradación de VRK1 a través de la vía lisosomal (Valbuena et al., 2006; 2008a). Finalmente, en cuanto a la regulación de la actividad quinasa de VRK1, a través de técnicas proteómicas se ha

identificado a la GTPasa Ran (*Ras-related nuclear*) como un inhibidor de la actividad quinasa de VRK1, VRK2A y VRK2B (Sanz-García et al., 2008).

Esta quinasa se expresa mayoritariamente en células y tejidos altamente proliferativos. Esto explica que su expresión se muestre alterada en determinados tipos tumorales. Así, en carcinomas de pulmón la expresión de VRK1 varía en función del subtipo de carcinoma de pulmón, existiendo en los carcinomas de pulmón de célula escamosa una correlación entre elevados niveles de VRK1 y estado mutacional de p53 (Valbuena et al., 2007b). VRK1 se encuentra sobreexpresada en sarcomas de tejidos blandos (Nishijo et al., 2009). Además, bajos niveles de VRK1, junto con bajos niveles de otros genes relacionados con proliferación, ciclo celular y mitosis, podría ser un marcador de buen pronóstico en tumores de mama con respecto a los que tienen VRK1 sobreexpresada (Fournier et al., 2006). La única enfermedad, no tumoral, descrita hasta el momento asociada a una mutación en el gen VRK1 es el síndrome de atrofia muscular espinal con hipoplasia pontocerebelosa (SMA-PCH), en el cual un codón prematuro de parada en la secuencia de localización nuclear de VRK1 es el responsable de la enfermedad, probablemente debido a que se expresa una proteína incapaz de trasladarse al núcleo, o bien es inestable o es incapaz de interactuar con determinados sustratos (Renbaum et al., 2009).

1.2.2.2. VRK2 (“*Vaccinia-related kinase 2*”).

El gen *VRK2* se localiza en el cromosoma 2p16, contiene 13 exones y codifica una proteína de 508 aminoácidos, la cual posee un sitio serina-treonina quinasa activo entre los residuos 162-174, sin embargo, no se ha encontrado ningún sitio consenso de unión a ATP, sino una secuencia degenerada en los residuos 35-61, que es activa (Nezu et al., 1997). El dominio carboxi-terminal difiere bastante de VRK1 y sobre todo de VRK3. Si comparamos las secuencias de VRK2 con

VRK1, la homología es del 44% y del 23% con VRK3, si tenemos en cuenta solamente el dominio catalítico la identidad es del 60% con VRK1 y del 34% con VRK3. Esto sugiere que la región C-terminal es clave para la regulación de la actividad y localización de la quinasa (Nichols y Traktman, 2004).

VRK2, consta de dos isoformas distintas, A y B, generadas por maduración alternativa de su ARNm (Blanco et al., 2006), localizándose VRK2A en el retículo endoplásmico y en la envuelta nuclear (Nichols y Traktman 2004; Blanco et al. 2006) y VRK2B en el núcleo (Blanco et al., 2006).

La isoforma VRK2A (de 508 aminoácidos) se localiza anclada de forma integral a membranas del retículo endoplasmático, mitocondrias y probablemente envoltura nuclear, debido a la región hidrofóbica presente en su extremo carboxilo terminal. La isoforma VRK2B (de 397 aminoácidos) carece de la región hidrofóbica, encontrándose libre predominantemente en el núcleo celular (Blanco et al., 2006; Nichols y Traktman, 2004).

Por otro lado, estudios de expresión génica indican que el gen *VRK2* está regulado positivamente en células T de sangre periférica estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 o con fitohematoglutina (PHA), el ionóforo ionomicina o forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) (Diehn et al, 2002) y se regula negativamente en células mononucleares de sangre periférica estimuladas por lipopolisacárido o ionomicina y PMA (Boldrick et al, 2002).

VRK2A se expresa en todas las líneas celulares estudiadas hasta el momento. Por el contrario, VRK2B se expresa sólo en determinados tipos celulares (Blanco et al., 2006).

Ambas isoformas son serina/treonina quinasa con intensa capacidad de autofosforilación principalmente en residuos de treonina. Cuando se estudia su capacidad de fosforilar un panel de sustratos comúnmente empleados para la caracterización de quinasa relacionadas con la caseína quinasa tipo I, se observa que son capaces de fosforilar *in vitro* a sustratos como la caseína, la histona H2B,

la histona H3 o la proteína básica de mielina (MBP) (Blanco et al., 2006; Nichols y Traktman, 2004; Sanz-García et al., 2008).

Con posterioridad se ha descrito como VRK2 es capaz de fosforilar *in vitro* a p53 en el residuo treonina 18 y a BAF en los residuos de serina 4 y treonina 2 y 3 (Blanco et al., 2006; Nichols et al., 2006).

Dada la absoluta similitud de VRK2A y VRK2B, en su extremo catalítico hasta el aminoácido 394, ambas isoformas tienden a compartir sustratos de fosforilación *in vitro* entre sí y con VRK1. Sin embargo, debido a las enormes diferencias en su región carboxilo, responsable de su localización subcelular y regulación, es probable que difieran en su capacidad para fosforilar a estos sustratos *in vivo* (Blanco et al., 2006).

Así, aunque ambas isoformas fosforilan a p53 *in vitro*, tan sólo la isoforma nuclear VRK2B lleva a cabo esta función *in vivo*, dado que es la única capaz de mediar la estabilización y acumulación de p53 al reducir su ubiquitinación y promover su acetilación por el cofactor p300 (Blanco et al., 2006).

Al igual que ocurría con VRK1, p53 es capaz de inducir la degradación de VRK2A y VRK2B (Valbuena et al., 2008a). Además, se ha propuesto que VRK2B puede tener una función parcialmente redundante con VRK1, pudiendo reemplazar funcionalmente a VRK1 en el núcleo en aquellas líneas celulares en las que VRK1 es citosólica (Blanco et al., 2006).

La mayor parte de los datos referentes al papel biológico desempeñado por las quinasas VRK2 provienen del estudio de su implicación en respuestas a estrés celular. La respuesta a estrés celular ante condiciones de hipoxia contribuye a decidir la supervivencia o entrada en apoptosis de la célula hipóxica. Se sabe que en esta respuesta a hipoxia participa, la MAPK, JNK que es estimulada induciendo la transcripción de genes con sitios de respuesta a AP1. Otra de las proteínas necesarias para mediar la respuesta a hipoxia es la proteína JIP1 (JNKinteracting proteín) (Whitmarsh et al., 2001), encargada de ensamblar los complejos de

MAPKs que incluyen a MLK, MKK7 y JNK, la cual fosforila al factor de transcripción c-jun. Además, en esta respuesta a hipoxia participa también, la MAPKKK, TAK1 (TGF- β activated kinase) (Blanco et al., 2007). Las señales de hipoxia activan a TAK1 y promueven el ensamblaje de un complejo oligomérico que incluye TAK1, MKK7, JNK y JIP1. VRK2A y VRK2B interfieren con la respuesta a hipoxia mediada por TAK1, de forma independiente de su actividad quinasa, a través de su incorporación a dichos complejos de señalización (Figura 1.12).

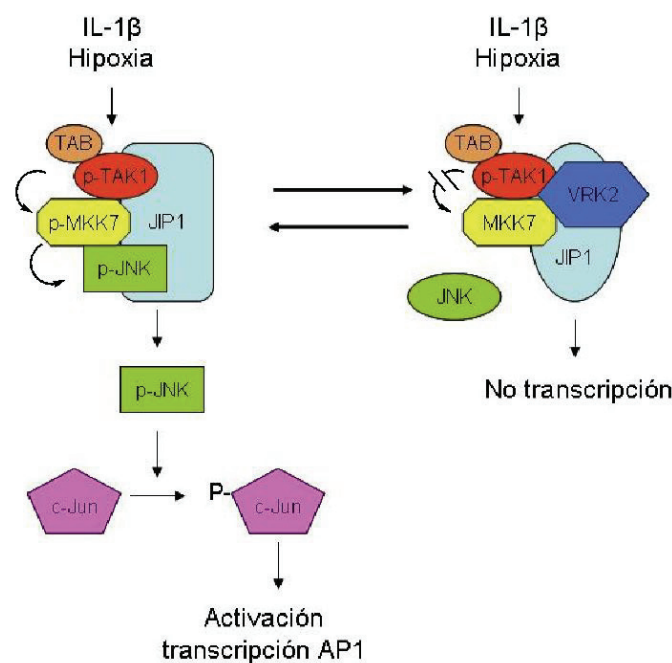


Figura 1.12. Esquema del mecanismo de modulación de la respuesta a interleuquina 1 e hipoxia por VRK2. VRK2A y VRK2B inhiben la señalización a través del módulo JIP1/TAK1/MKK7/JNK (Blanco et al., 2008).

Tanto VRK2A como VRK2B, interactúan de forma estable con JIP1. Sin embargo, sólo VRK2A interactúa de forma directa con TAK1 y MKK7, mientras que la interacción de VRK2B con éstas es indirecta a través de su interacción con

JIP1 (Blanco et al., 2007). De forma similar, VRK2A y en menor medida VRK2B regulan negativamente la respuesta a IL-1 β que se transmite vía TAK1-JNK. La modulación, tanto de la respuesta a hipoxia como a IL-1 β , ocurre de forma independiente de la actividad quinasa de VRK2 e implica una menor incorporación y activación de JNK en los complejos de señalización ensamblados por JIP1 (Figura 1.12) (Blanco et al., 2008).

1.2.2.3. VRK3 (“*Vaccinia-related kinase 3*”)

El gen que codifica la quinasa humana VRK3 se localiza en el cromosoma 19q.13. VRK3 es el miembro más distante de la familia, posee el dominio catalítico en el extremo C-terminal, el cual contiene varias sustituciones en residuos de lisina claves y de hecho no presenta actividad quinasa (Nichols y Traktman, 2004) y es posible que, como ocurre con otras 50 proteínas que se asemejan a quinasas por su secuencia pero no presentan actividad enzimática, pueda ser un sustrato para otras quinasas o tener una función de proteína de anclaje para la formación de complejos de señalización (Manning et al., 2002). Además contiene una secuencia de localización nuclear (residuos 49-64). También contiene posibles sitios de fosforilación por CDK5 (Nichols y Traktman, 2004).

La expresión de esta quinasa se ha estudiado en tejidos murinos, resultando ser ubicua con niveles elevados en testículos, riñón e hígado. A nivel subcelular, VRK3 muestra una localización nuclear (Kang y Kim, 2008; Nichols y Traktman, 2004; Vega et al., 2003).

Los únicos datos existentes acerca de la función biológica de esta quinasa hacen referencia a su capacidad para regular negativamente la ruta de señalización de ERK1/2, a través de la interacción y activación de la fosfatasa VHR (*vaccinia H1 related*) (Kang y Kim, 2006). VHR/DUSP3 es una fosfatasa de expresión ubicua. Se localiza tanto en el citosol como en el núcleo y su expresión se regula a

lo largo del ciclo celular (Rahmouni et al., 2006). Se han descrito los siguientes sustratos para esta fosfatasa: p38, STAT5, ERK1/2 y JNK. A pesar de su capacidad para regular la ruta de señalización de ERK, VRK3 no parece estar relacionada directamente con procesos de proliferación celular, dado que su expresión es elevada tanto en tejidos con alta tasa de proliferación como en otros de baja tasa proliferativa (Kang y Kim, 2008).

1.2.3. El virus Vaccinia y la quinasa B1 del virus Vaccinia

El virus Vaccinia tiene un gran genoma de 200 kb que se replica en el citoplasma y es miembro del género *Orthopoxvirus* de la familia *Poxviridae* (Moss y Shisler, 2001). Esta familia también incluye *Variola virus (VAR)*, *Cowpox virus (CPV)*, *Monkeypox virus (MPV)*, *Ectromelia virus (ECT)*...

En los últimos 30 años el uso del virus Vaccinia se extendió mas allá de su papel en la vacunación de la viruela, convirtiéndose en una útil herramienta de investigación como vector para expresión de genes exógenos en células diana y un medio de estudio de la respuesta inmune de los mamíferos a la infección viral. También se está explorando su potencial en la terapia contra el cáncer, principalmente de tres formas: como vector para la expresión de genes terapéuticos de forma específica en los tumores; como vector de expresión de antígenos tumorales y/o moléculas estimuladoras del sistema inmune con el fin de desarrollar vacunas contra el cáncer; y, finalmente, como virus oncolítico, específico para células altamente replicativas.

Hay tres formas de partículas infecciosas de *Vaccinia*: las IMV (intracellular mature virus), las CEV (cell-associated enveloped virus) y las EEV (extracellular enveloped virus). Las IMV son partículas de aproximadamente 300x240x120 nm de tamaño, con una protección de lipoproteínas que rodean una estructura central compleja. En esta estructura central se encuentran el genoma y

enzimas de “capping”, metilación y poliadenilación de ARN y un factor de transcripción. Estas proteínas son empaquetadas en el virus para permitir la síntesis de proteínas virales tempranas tras la entrada en las células (Moss y Shisler, 2001). Las CEV y las EEV son IMV con un capa lipídica (principalmente fosfolípidos y colesterol) y una menor densidad que las IMV (Smith et al., 2002). Los principales componentes del virus son proteínas (90% del peso seco), lípidos (5%) y ADN (3.2%). En la figura 1.13 se puede observar una representación esquemática del mismo.

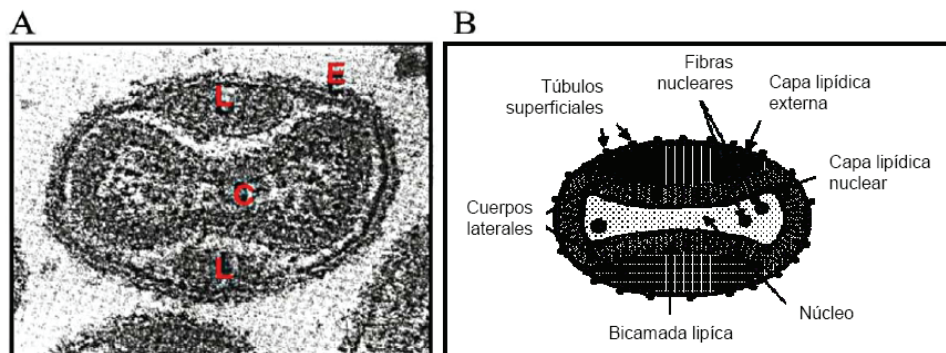


Figura 1.13. Estructura del virus *Vaccinia*. (A) Imagen de microscopía electrónica de una sección fina de *Vaccinia*, en la cual se puede observar el núcleo (C), los cuerpos laterales (L) y la capa lipídica externa (E). (B) Representación esquemática del virus *Vaccinia*. (Moss, 1996)

El hecho de que se produzcan distintos tipos de partículas virales en el ciclo de replicación de *Vaccinia* representa una ventaja evolutiva, puesto que es una estrategia que le permite al virus aprovecharse de la biología de la célula y evadir la respuesta inmune del hospedador y la apoptosis. Por todo esto, la interacción de una proteína temprana con señales hospedadoras puede ser un importante componente de las estrategias para conseguir la supervivencia viral.

Entre las proteínas virales tempranas se encuentra B1R, una serin-treonin quinasa de aproximadamente 300 aminoácidos y 34 kDa, que usa ATP como dador

de grupos fosfato y necesita cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) para su actividad (Figura 1.14).

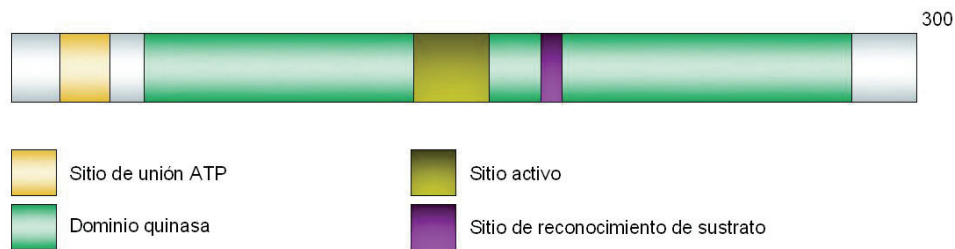


Figura 1.14. Representación de la estructura de B1R. B1R posee un dominio de unión al ADN en su terminal amino, mientras que el dominio quinasa corresponde casi a la totalidad de la proteína. En este se puede señalar el sitio activo y el sitio de reconocimiento de sustrato.

Esta quinasa está presente en viriones y es requerida para la síntesis de DNA viral, como se demuestra con los dos fenotipos de dos mutantes sensibles a la temperatura que expresan una proteína B1R sin actividad quinasa (Banham et al., 1993; Lin et al., 1992). De todos modos, B1R debe de estar involucrada en otros procesos virales ya que, en condiciones permisivas (ciclo de vida normal a una temperatura permisiva de 32°C), mutantes de B1R muestran un 60% de la replicación de DNA viral pero solo un 15 % de producción viral (Banham y Smith, 1992). También, es imposible generar un virus deficiente en ORF (“open reading frame”) de Vaccinia, lo que demuestra que es un gen esencial incluso sin actividad quinasa (Banham y Smith, 1992), probablemente por su capacidad para modular otras proteínas mediante una interacción directa.

Hasta el momento, la identificación de sustratos de B1R, tanto virales como celulares, es muy limitada; entre sus proteínas virales sustrato se encuentra H5R (Beaud et al., 1995), y entre los sustratos celulares están proteínas ribosomales (Banham et al., 1993; Beaud et al., 1994), BAF (Nichols et al, 2006), y p53, que es hiperfosforilado, provocando una downregulation de las señales

apoptóticas (Santos et al., 2004), que podría contribuir a la supervivencia de células infectadas, por una interferencia transitoria con la respuesta celular al estrés y permitiendo de esta manera seguir el curso de la progresión de la infección.

El posible papel de B1R en la prevención temprana de la apoptosis depende de 2 mecanismos diferentes: la fosforilación de factores de transcripción como p53 y c-Jun y la activación de la ruta de señalización JNK por interacción con JIP1 (Santos et al., 2004). La prevención podría explicarse porque un mutante del virus *Vaccinia* sin actividad quinasa B1R tiene una reducción significativa en la producción viral y porque no es posible aislar un virus deficiente en B1R (Banham y Smith, 1992) ya que estos virus probablemente inducen la apoptosis de células infectadas antes de que ocurra la producción viral (Santos et al., 2006).

En resumen, la quinasa B1R del virus *vaccinia*, presente durante la infección temprana, es capaz de modular la respuesta celular a c-Jun por dos mecanismos diferentes, fosforilación directa en residuos nuevos y modulación de complejos JIP1-MAPK. Por lo tanto, la activación de la transcripción de c-Jun se consigue por dos rutas de señalización cooperantes. Se sabe que la activación de JNK evita la apoptosis (Shaulian y Karin, 2001). B1R es capaz de activar JNK y estabilizar la transcripción activada por p53 (Huang et al., 2003), contribuyendo así a la supervivencia de la célula infectada el tiempo suficiente para permitir la terminación de su ciclo lítico (Santos et al., 2006).

1.3. Cáncer y metales

El cáncer es una de las principales causas de defunción en el mundo. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en 2008 estimó que se registraron 12,7 millones de casos nuevos y 7,6 millones de muertes por su causa. Globalmente, el cáncer de pulmón fue el más común. Los cánceres ocupacionales y

medioambientales son aproximadamente el 10% de todos los cánceres. La contaminación ambiental supone entre el 1 y el 4% de todos los cánceres a causa del agua de bebida, aire interior o ambiental, o alimentos. El 63% de las muertes por cáncer suceden en los países en vías de desarrollo (Boyle y Bernard, 2008; Eckhouse et al., 2008; IARC, 2010; Jemal et al., 2011; Ferlay et al., 2010) (Figura 1.15).

Los cánceres ocupacionales se concentran en grupos específicos de población de trabajadores en quienes el riesgo de desarrollar una particular forma de cáncer puede ser mucho mayor que en la población general (IARC/WHO, 2008). Además, los cánceres medioambientales están también fuertemente relacionados a la alta y frecuente exposición a carcinógenos específicos, los cuales están concentrados en regiones geográficas específicas, como cánceres relacionados con el arsénico en Bangladesh (Smith et al., 2000).

Las principales amenazas para la salud humana causadas por metales pesados están asociadas con la exposición al plomo, cadmio y mercurio. Las emisiones de los metales pesados al medioambiente se producen via un amplio rango de procesos y rutas, incluyendo el aire (por ejemplo, durante la combustión, extracción y procesamiento), la superficie acuosa (via residuos líquidos y emisiones de almacenamiento y transporte) y el suelo (cultivos y aguas subterráneas). Las emisiones atmosféricas tienden a ser la más importante preocupación en términos de salud humana, debido a las cantidades generadas y a su dispersión generalizada (Järup, 2003).

Las personas se exponen a agentes químicos, físicos y biológicos potencialmente perjudiciales a través del aire, alimentos, agua y suelo. Sin embargo, la clave de la exposición es el contacto entre el agente y el límite externo del cuerpo humano, como son las vías aéreas, la piel y la boca. La exposición se puede definir como una función de concentración y tiempo, un evento que ocurre cuando hay contacto entre el cuerpo humano, el ambiente y un contaminante con

una concentración específica durante un intervalo de tiempo (Berglund et al., 2001; NRC, 1991).

Los metales empleados en el presente trabajo son: cadmio, cobalto, cobre, mercurio, plomo, litio y zinc.

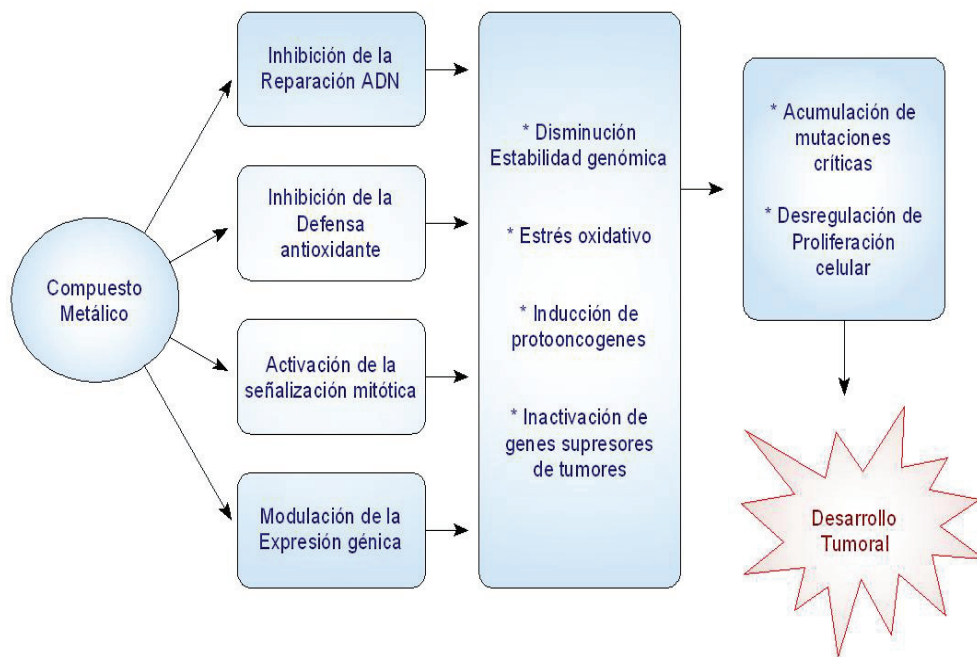


Figura 1.15. Mecanismo general de carcinogénesis por metales (Beyersmann y Hartwig, 2008).

1.3.1. Cadmio

El cadmio, un metal de transición tóxico perteneciente al grupo IIB de la tabla periódica se encuentra a concentraciones entre 0,1 y 1 ppm en la corteza terrestre (IARC, 1993). Cantidades significativas de cadmio son introducidas en el medioambiente por actividades naturales (actividad volcánica) o antropogénicas (combustión de combustibles fósiles, incendios forestales, usos en la agricultura y

usos industriales), siendo la contribución de estas últimas de 3 a 10 veces mayores que las actividades naturales. Trabajadores de ciertos sectores (galvanizados, pigmentos, estabilizantes de pinturas, soldaduras, baterías de cadmio-níquel...) están expuestos a niveles mucho mayores que la población general, principalmente por vía inhalatoria, pero también la población general se expone a dicho metal predominantemente vía alimentaria, humo de tabaco y aire ambiental (Schwartz y Reis, 2000).

La cantidad de cadmio absorbido en el cuerpo tras varias exposiciones depende de la vía de entrada. Aproximadamente el 3% del cadmio ingerido se absorbe en el sistema gastrointestinal, mientras que 50% se absorbe por inhalación (Sahmoun et al., 2005). Tras la absorción, el cadmio es rápidamente transportado por la sangre a diferentes órganos donde se estima que su vida media en humanos es de 15-20 años (Jin et al., 1998). La cantidad de cadmio almacenada en los órganos varía ampliamente debido a una pequeña proteína, metalotioneína (MT), que tiene una gran afinidad de unión por el cadmio. Los órganos donde se acumula el cadmio son el hígado, riñón, testículos, bazo, corazón, pulmones, timo, glándulas salivares y próstata. Sin embargo, aproximadamente el 50% del cadmio que se encuentra en el cuerpo se almacena en hígado y riñones debido a su alta concentración de MT (Waalkes y Klaassen, 1985).

El potencial del cadmio para causar toxicidad se ha demostrado en numerosos estudios experimentales y epidemiológicos. En general, la exposición de las células a concentraciones micromolares de cadmio causa una toxicidad significativa (Othumpangat et al., 2005; Badisa et al., 2008). Del mismo modo ha sido establecido el potencial del cadmio para causar toxicidad en experimentos con animales (Klaassen y Liu, 1998) y en humanos (ATSDR, 1999). Los órganos diana para la toxicidad de cadmio en animales incluyen el hígado (Koyuturk et al., 2007), riñón (Jamall et al., 1989), pulmones (Bondreau et al., 1988), testículos (Bonda et al., 2004), próstata (Alvarez et al., 2004), corazón (Jamall et al., 1989), sistema

esquelético (Blumenthal et al., 1995), sistema nervioso (Minami et al., 2001) y sistema inmunitario (Shippee et al., 1983).

La exposición humana al cadmio se ha asociado con el incremento de la incidencia de tumores pulmonares (IARC, 1993; 1997) y también con tumores en el hígado (DFG, 2006). Un reciente estudio de sustancias clasificadas como carcinógenos humanos por la IARC confirmó suficientes evidencias de los tumores pulmonares inducidos por el cadmio y evidencias limitadas de tumores en riñón (Pesch et al., 2000), próstata (Straif et al., 2009) y páncreas (Schwartz y Reis, 2000; Amaral et al., 2011). Además, nuevos datos indican que la exposición humana al cadmio puede también asociarse con cáncer de pecho y endometrio en mujeres, aunque las causas no están definitivamente establecidas (McElroy et al., 2006; Akesson et al., 2008). En animales, el cadmio induce carcinomas de pulmón tras inhalación y de próstata y testículos tras ingestión o inyección (Waalkes, 2003; Goyer y Waalkes, 2004).

Actualmente se cree que no hay una genotoxicidad directa, más bien múltiples mecanismos indirectos, incluyendo incremento del estrés oxidativo, interacciones con los sistemas que provocan daños en el ADN celular, incluyendo procesos de reparación del ADN e inhibición de la apoptosis, control del ciclo celular y apoptosis, además de alteraciones en el patrón de la expresión génica (Beyersmann y Hartwig, 2008; Joseph, 2009) (Figura 1.16).

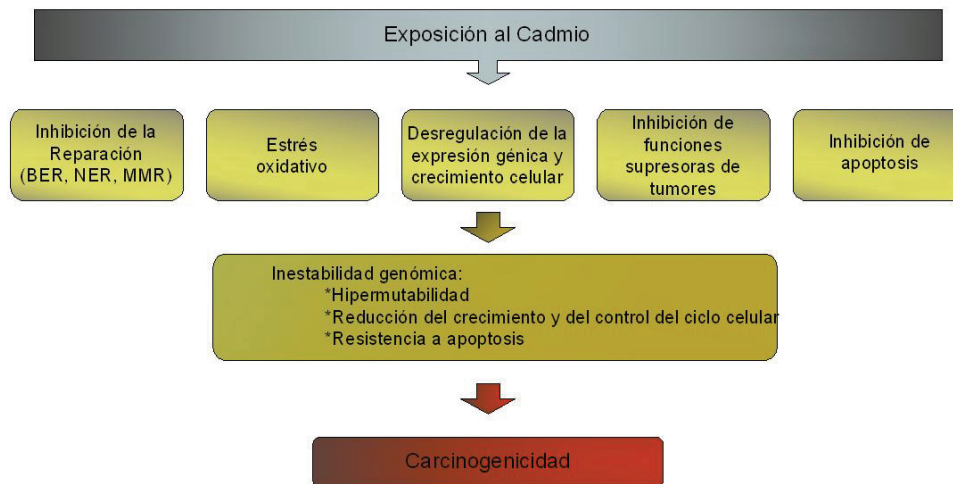


Figura 1.16. Mecanismos implicados en la carcinogenicidad inducida por Cd (Hartwig, 2010)

El cadmio puede penetrar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro (Manca et al., 1991; Gutierrez-Reyes et al., 1998). En cuanto a la neurotoxicidad del cadmio, se ha demostrado que el cadmio induce lesiones en varias regiones del cerebro y modifica la actividad espontánea después de la administración de una dosis subletal a ratas jóvenes (Wong y Klaassen, 1982). El cerebro es muy vulnerable a la peroxidación lipídica (LPO) debido a su alta tasa de utilización de oxígeno, una abundante demanda de ácidos grasos poliinsaturados, una deficiente defensa antioxidante y un elevado contenido en metales de transición como cobre y hierro en varias regiones (Calabrese et al., 2000).

Numerosos estudios mostraron que la actividad de sistemas de defensa antioxidante es inhibida o reducida en ratas expuestas a Cd (Gupta et al., 1995; El-Misiry y Shalaby, 2000).

La exposición a cadmio afecta las actividades de las enzimas ATP-*asas* (Na⁺, K⁺ y Mg²⁺-ATPasas) provocando alteraciones en las membranas y

funciones de los neurotransmisores (Rajanna et al., 1990; Carfagna et al., 1996; El-Missiry y Shalaby, 2000; Antonio et al., 2003)

1.3.2. Cobalto

El cobalto es un elemento esencial para los humanos ya que es un constituyente necesario para la formación de vitamina B12 (hidroxicobalamina). El cuerpo humano contiene sobre 1-2 mg de cobalto. La mayoría se encuentra en el hígado, riñón, corazón y bazo, y bajas concentraciones se detectan en el suero, cerebro y páncreas (Elinder y Friberg, 1986).

La deficiencia en la dieta de vitamina B12 es causa de anemia e incrementa el riesgo de desarrollo de anomalías y crecimiento deficiente en niños (Stabler y Allen, 2004). Sin embargo, niveles excesivos de cobalto pueden ser perjudiciales para el organismo. Las rutas de exposición más frecuentes son vía inhalación o epidérmica (Jensen y Tuchsén, 1990) y se produce mayoritariamente en refinamiento industrial, en la producción de aleaciones y en la industria metalúrgica del carburo de tungsteno.

El cobalto ha recibido poca atención, probablemente debido a que sus aplicaciones industriales y comerciales son más limitadas. De hecho, el conocimiento sobre sus propiedades genotóxicas y sus potenciales mecanismos de acción han sido investigadas en los últimos años. La toxicidad del cobalto incluye cardiomiopatías (Alexander, 1969; Kesteloot et al., 1968; Klastky, 2002; Morin y Daniel, 1967), efectos pulmonares adversos (Wehner et al., 1977) y carcinogenicidad (Heath, 1956). Este metal pesado también es sospechoso de causar efectos neurotóxicos, como se muestra en un estudio de déficit de memoria entre los trabajadores expuestos al metal (Jordan et al., 1997).

El potencial carcinogénico del cobalto y sus compuestos fue evaluado en 1991 por la IARC, que concluyó que no había suficientes evidencias sobre la

carcinogenicidad en humanos (cáncer de pulmón) pero sí en estudios con animales de experimentación. En la mayoría de los estudios considerados, las rutas de exposición fueron, sin embargo, de relevancia cuestionable para la valoración de riesgo de cáncer en humanos, por ejemplo sarcomas locales tras inyección intramuscular. A pesar de la controversia, la conclusión fue que el cobalto y sus compuestos son “posibles carcinógenos” en humanos (grupo 2B) (IARC, 1991).

Los datos disponibles en la bibliografía indican que el cobalto es citotóxico para muchos tipos celulares, incluyendo células neuronales (Wang et al., 2000; Olivieri et al., 2001; Yang et al., 2004), y puede inducir muerte celular mediante apoptosis y necrosis (Huk et al., 2004). El cobalto puede causar fragmentación del ADN (Zou et al., 2001; Araya et al., 2002; Graham et al., 2004), activación de caspasas (Zou et al., 2002), incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Olivieri et al., 2001; Zou et al., 2001; Chandel et al., 2000), aumento de la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Yang et al., 2004; Zou et al., 2002) y eleva los niveles de p53 (Chandel et al., 2000) (Figura 1.17).

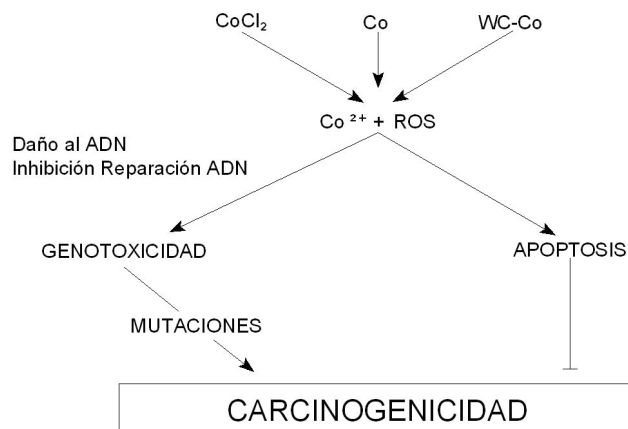


Figura 1.17. Posibles mecanismos involucrados en la carcinogenicidad inducida por compuestos del cobalto. (ROS: reactive oxygen species; WC-Co: tungsteno carbide-cobalt particle mixture) (De Boeck, M. et al., 2003).

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de los iones de cobalto (II) y cobalto metal y la inhibición de la reparación del ADN por parte de los iones de cobalto (II) se presentan como los modelos predominantes de acción en la actividad genotóxica del cobalto (Lison et al., 2001). Se sabe que el cobalto (II) provoca un estado de hipoxia *in vivo* e *in vitro* incluso en presencia de presión normal de oxígeno molecular. El mecanismo subyacente consiste en la estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), que normalmente se degrada cuando hay suficiente oxígeno. En estado de hipoxia, HIF-1 α actúa como una subunidad de un factor de transcripción induciendo a la expresión de genes que controlan la síntesis de eritropoyetina, absorción de glucosa, actividades enzimáticas glucolíticas, formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y otros procesos que permiten la supervivencia celular a bajas presiones de oxígeno. La hipoxia es un rasgo común de los tejidos tumorales, y el crecimiento de los tumores beneficia la activación de HIF-1 α , que permite el aumento de actividades glucolíticas y angiogénicas (Maxwell y Salnikow, 2004).

1.3.3. Cobre

El cobre, un metal de transición omnipresente en el medioambiente, es esencial para la vida ya que juega importantes papeles catalíticos como cofactor en muchas enzimas involucradas en respiración, transporte de hierro y procesos de protección del estrés oxidativo (Camakaris et al., 1999; Linder y Hazegh-Azam, 1996).

Sin embargo, un exceso de cobre es tóxico para la vida. Se ha demostrado en experimentación animal que varias formas de cobre son carcinogénicas, mutagénicas y/o teratogénicas. Otros estudios han demostrado que varios tipos de compuestos de cobre pueden causar toxicidad reproductiva, del desarrollo y

neurológica (Bondesteiner et al., 2004; Gerber et al., 2002; Holmes et al., 2001; Klinefelter et al., 2004; Moser et al., 2004).

Una de las importantes funciones fisiológicas del cobre es servir como cofactor en un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, denominado angiogénesis (Fox et al., 2001; Gourley y Williamson, 2000). Altos niveles de cobre en los tejidos se han encontrado en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo el de mama, próstata, colon, pulmón y cerebro (Ryan y Wilding, 2000; Huang et al., 1999; Nayak et al., 2003; Rizk y Sky-Peck, 1984; Turecky et al., 1984).

Los efectos tóxicos del cobre se han asociado con la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que dañan el ADN y otras biomoléculas (Gutteridge, 1985; Walling, 1975).

La apoptosis inducida por cobre se ha encontrado tanto *in vitro* como *in vivo*, pero las rutas de señalización subyacentes no han sido bien caracterizadas (Lundebye et al., 1999; Pang y Chau, 1999). Se ha demostrado que, la proteína supresora de tumores p53 es requerida en la apoptosis inducida por cobre (Tassabehji et al., 2005). En células epiteliales MCF-7 de cáncer de mama, la exposición al cobre facilitó la fosforilación de p53 e indujo la apoptosis dependiente de p53. Además, la expresión del tipo salvaje de p53 inducida por cobre redujo significativamente la fosforilación de ERK, la quinasa reguladora de señales extracelulares, en células MCF-7 (Ostrakhovitch y Cherian, 2005).

También se ha demostrado que la activación de cascadas de señalización de las MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógenos) juega un importante papel en la exposición al cobre. En células COS-7 y hepatocitos de trucha, se encontró que los niveles de fosforilación y activación de las rutas de JNK (quinasa N-terminal c-Jun) y p38 MAPK aumentaron tras la exposición a cobre (Mattie et al., 2008; Nawaz, 2006). La exposición de hepatocitos de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*) a la estimulación por cobre de una manera tiempo y dosis

dependiente provoca un incremento de la quinasa reguladora de señales extracelulares fosforilada (pERK) y por consiguiente la apoptosis (Ebner et al., 2007).

El cobre también puede aumentar el potencial carcinogénico de otros agentes (metales o no) cuando se presenta en concentraciones elevadas; esto sucede en parte, porque el cobre actúa como un catalizador a través del cual se producen reacciones redox (produciéndose especies reactivas del oxígeno que dañan el DNA como peróxido de hidrógeno y el anión superóxido) (Theophanides y Anastassopoulou, 2002) (Figura 1.18).

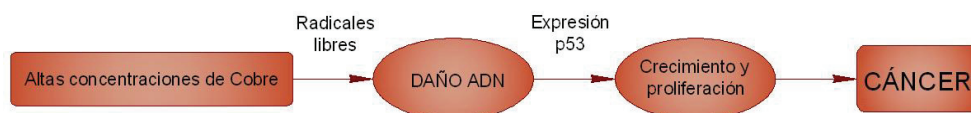


Figura 1.18. Altas concentraciones de cobre pueden producir proliferación celular y cáncer (Theophanides y Anastassopoulou, 2002).

1.3.4. Mercurio

El mercurio (Hg) es un importante tóxico medioambiental que causa trastornos neurológicos y del desarrollo en humanos y animales. En el medioambiente, el mercurio existe en 3 formas químicas diferentes (vapor de mercurio elemental, sales inorgánicas de mercurio y mercurio orgánico) que son todos importantes en la exposición humana (Clarkson, 1997).

La distribución, metabolismo, y toxicidad del mercurio depende en gran parte de su forma química. En este aspecto, es digno de mención que los organomercurios se han señalado como las especies más perjudiciales cuando son comparadas con compuestos de mercurio elemental o inorgánico (Sanfeliu et al,

2003). Este fenómeno parece estar relacionado, al menos en parte, con la capacidad de los organomercuriales de alcanzar altos niveles en el sistema nervioso central (Aschner y Clarkson, 1988; Clarkson et al., 2003).

El mercurio inorgánico es tóxico para el sistema renal, reproductivo y nervioso (Frumkin et al., 2001), y la exposición humana a mercurio inorgánico frecuentemente se relaciona con condiciones específicas de trabajo (Berlin, 1986; Bluhm et al., 1992; Wide, 1986) y acontecimientos accidentales (Moromisato et al., 1994; Shamley y Sack, 1989) e intencionados (Winship, 1985).

A pesar de que la neurotoxicidad del mercurio no es bien conocida, se ha demostrado que alteraciones en la homeostasis del calcio y glutamato (Aschner, 1994; Sirois y Atchison, 2000; Aschner, 2000; Farina et al., 2003), estrés oxidativo (Ou et al., 1999; Franco et al., 2006), y oxidación de grupos tioles proteicos (Hansen et al., 2006) representan importantes mecanismos moleculares mediante los cuales tanto el mercurio orgánico como inorgánico pueden causar neurotoxicidad.

Existen evidencias de que la exposición crónica a concentraciones bajas de metales pesados, como mercurio, puede ocasionar disfunción del sistema inmunitario (Clarkson, 1997; Pollard y Hultman, 1997; Zelikoff y Gardner, 1996) originando enfermedades inmunológicas (autoinmunidad) o promoviendo infección crónica (Silbergeld *et al.*, 1998). Además, esta disfunción puede influir en el desarrollo y la progresión del cáncer. Un ejemplo de esto sería el resultado de la reducción de linfocitos inducida por la toxicidad del mercurio y la exhibición de signos (funcionales y morfológicos) de muerte celular, tales como cambios en el núcleo y en las membranas, que conducen a la apoptosis de los linfocitos (Guo *et al.*, 1998; Shenker *et al.*, 1997) (Figura 1.19).

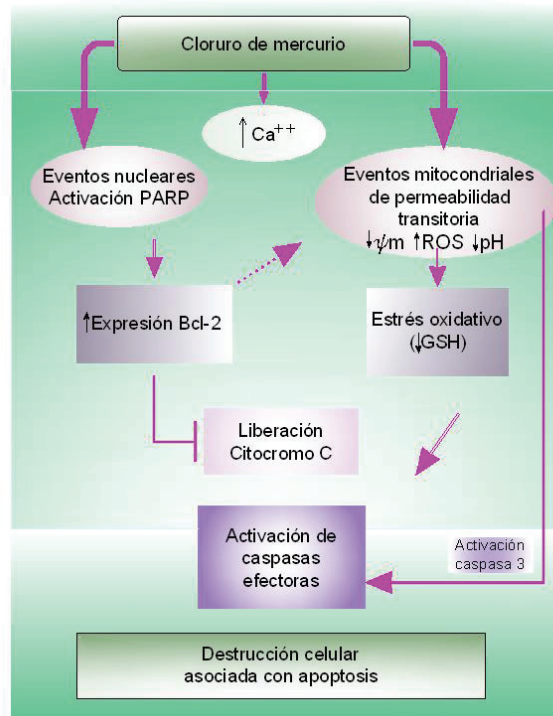


Figura 1.19. Apoptosis inducida por mercurio en linfocitos humanos. HgCl_2 induce la disfunción de la mitocondria permitiendo una disminución del $\Delta\Psi_m$, pH, y niveles intracelulares de GSH. Pero, el citocromo C no es liberado desde la mitocondria, probablemente como resultado de los altos niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Sin embargo, la cascada de caspasas es desencadenada por una ruta independiente del citocromo C que probablemente implica la activación de la cascada efectora y los hechos morfológicos y degradativos que constituyen la apoptosis (Shenker et al., 2000).

1.3.5. Plomo

La toxicidad del plomo y de sus compuestos es conocida desde hace siglos, con efectos adversos en sistema hematopoyético, gastrointestinal, urinario, cardiovascular, y nervioso (ATSDR, 1999). Durante los últimos años la investigación se focalizó en sus potenciales efectos carcinogénicos, destacando la

clasificación del plomo inorgánico como “probable carcinógeno para humanos” (Grupo 2A) (IARC, 2004). Estas clasificaciones están basadas principalmente en experimentos con animales, donde se observó el aumento de incidencia de tumor en múltiples órganos, incluyendo hígado y cerebro. No obstante, los mecanismos exactos todavía se desconocen, pero como con la mayoría de los metales y sus compuestos, su efecto parece ser causado por mecanismos indirectos como la inducción de estrés oxidativo y la interacción con procesos de reparación del ADN (Beyersmann y Hartwig, 2008).

Los efectos del plomo en cada sistema orgánico han sido bien caracterizados, incluyendo el sistema cardiovascular (Vaziri, 2002), renal (Gonick, 2002), inmune (Dietert y Piepenbrink, 2006), y reproductivo (Bellinger, 2005), además de en huesos y dientes (Hu et al., 1998). Pero el sistema nervioso es especialmente sensible a los efectos del plomo. Durante más de 200 años, han sido reconocidos sus efectos sobre la función cognitiva y del comportamiento. Recientemente se presentó una visión general de la neurotoxicidad del plomo desde el principio hasta el fin del siglo XX describiendo que niveles sanguíneos bajos de plomo fueron reconocidos como los causantes de efectos perjudiciales en el sistema nervioso, incluyendo disminución en el coeficiente intelectual, en el oído y visión, y daño en la función nerviosa periférica (Bellinger y Bellinger, 2006).

El tema de la carcinogenicidad del plomo es de gran interés actual en la ciencia y en la política de salud pública. Las exposiciones al plomo continúan siendo importantes en muchas poblaciones en todo el mundo, a pesar de las serias restricciones en ciertos usos del plomo, como aditivos en gasolina. Estas intervenciones se basaron en las importantes evidencias epidemiológicas, y en investigación, sobre los efectos tóxicos no cancerígenos del plomo, especialmente su neurotoxicidad en el desarrollo (Rice y Silbergeld, 1996). Además, datos epidemiológicos recientes proporcionan crecientes evidencias de que exposiciones al plomo medioambientales así como ocupacionales se pueden asociar con mayor

riesgo de cáncer (Fu y Boffetta, 1995; Silbergeld et al., 2000). El plomo puede actuar en los procesos de carcinogénesis por inhibición de la reparación del ADN (Hartwig y Schwerdtle, 2002) o por desplazamiento del zinc en proteínas de unión al ADN (Silbergeld et al., 2000) incrementando así la posibilidad de daños en el ADN. Estos dos acontecimientos son importantes en la protección del ADN de la mutagénesis. Estas hipótesis señalarían al plomo como un “facilitador” carcinógeno, permitiendo o aumentando los efectos genotóxicos de otras exposiciones (Silbergeld, 2003). Los tipos de cáncer en poblaciones expuestas al plomo pueden variar, dependiendo de sus interacciones con dianas directas, de co-exposiciones químicas genotóxicas y/o de los órganos en los que el plomo se acumula como son hueso, hígado y próstata (preferentemente por los mismos mecanismos que determinan el metabolismo del calcio o zinc) (Silbergeld, 1991; Platz y Helzlsouer, 2001).

1.3.6. Litio

El litio es un metal que se emplea en la industria (especialmente en aleaciones conductoras del calor y en baterías eléctricas) y también tiene aplicaciones clínicas farmacológicas, siendo comúnmente utilizado en el tratamiento de enfermedades maníaco depresivas, por sus bien documentados efectos estabilizantes del humor (Rowe y Chuang, 2004). Sin embargo, recientes datos experimentales sugieren que el litio también muestra efectos neuroprotectores en la prevención de la muerte celular programada de las neuronas en diferentes paradigmas (Zhong y Lee, 2007; Feng et al., 2008; Aghdam y Barger, 2007; Dunn et al., 2005; Fornai et al., 2008). La inmensa mayoría de estos estudios sugieren que los efectos neuroprotectores del litio son facilitados a través de la modulación de múltiples mecanismos; no obstante, parece que la quinasa de la glucógeno sintasa (GSK-3) es probablemente la principal diana involucrada en los

efectos neuroprotectores del litio (Aghdam y Barger, 2007; Dunn et al., 2005; Fornai et al., 2008; Engel et al., 2006). De esta manera, la inhibición de GSK-3 por este ión podría considerarse para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad del Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Rowe y Chuang, 2004; Aghdam y Barger, 2007; Engel et al., 2006).

Los mecanismos neuroprotectores son complejos, probablemente involucrando múltiples factores como la inactivación de los receptores NMDA (N-metil_D-aspartato), cambios en la expresión de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos además de la activación de factores de supervivencia celular (Chuang, 2004; Chuang y Priller, 2006; Rowe y Chuang, 2004) (Figura 1.20).

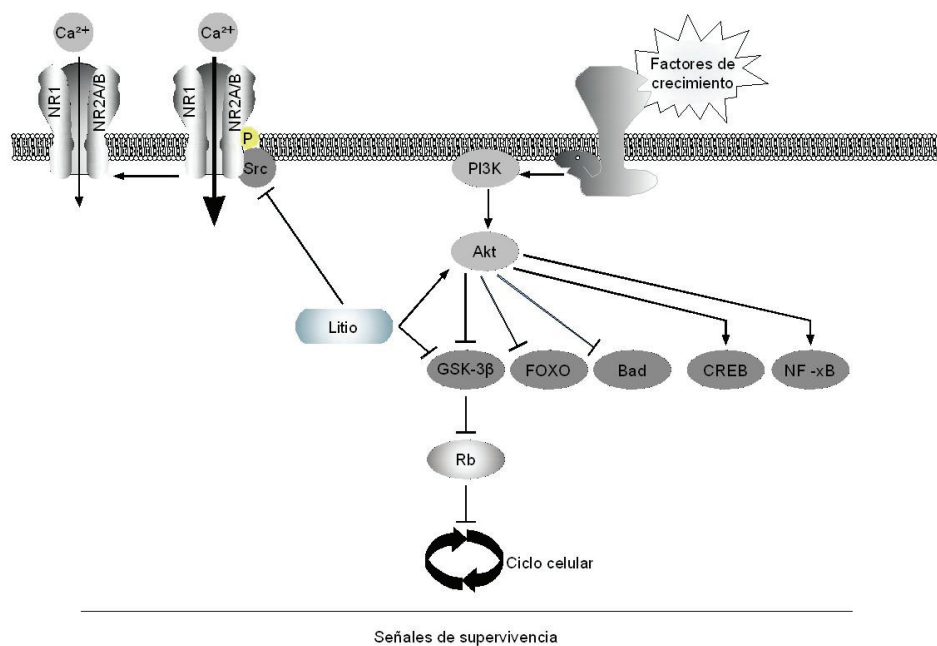


Figura 1.20. Efectos neuroprotectores del litio en neuronas (Camins et al., 2009).

Se ha demostrado que el litio reduce los niveles de la proteína proapoptótica p53 en células granulares del cerebelo y células SH-SY5Y (Yeste-Velasco et al., 2008; Manji y Lenox, 2000; Manji et al., 2000). El papel del litio sobre p53 es importante porque hay evidencias para una función fundamental de p53 en muerte neuronal en muchas enfermedades neurodegenerativas. Resultados en modelos *in vitro* e *in vivo* documentan niveles mayores de p53 en neuronas apoptóticas. Además, resultados obtenidos en ratones o neuronas deficientes en p53 y estudios que emplean oligonucleótidos antisentido p53 o inhibidores de p53, demostraron un papel de p53 como mediador en la apoptosis neuronal en modelos neuronales que producen enfermedades neurodegenerativas (Chen y Chuang, 1999). Varios estudios han implicado a p53 en muerte celular que produce apoplejía, lesiones cerebrales traumáticas, AD, PD, y ALS (Duan et al., 2002).

1.3.7. Zinc

El zinc, un elemento traza esencial para animales y humanos, tiene 3 funciones en las metaloproteínas de zinc: catalítica, co-catalítica y estructural (Vallee y Falchuk, 1993). El zinc es necesario para la replicación y transcripción del ADN, y la síntesis de proteínas. Numerosas proteínas y enzimas de zinc están asociadas con el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Beyersmann y Haase, 2001). Este metal tiene papeles cruciales en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. La falta de zinc en la dieta retarda fuertemente el crecimiento de humanos y animales (MacDonald, 2000; Brown et al., 2001). También suprime eficazmente la proliferación de tumores transplantados en animales portadores de tumores (Minkel et al., 1979; Saryan et al., 1979; Takeda et al., 1997). La respuesta de tumores neoplásicos a la deficiencia de zinc podría ser de utilidad terapéutica.

Por otro lado, el metabolismo del zinc en células tumorales puede asociarse con su potencial maligno. Las células normales y las células malignas secretan metaloproteasas de matriz, que son importantes para la invasión y metástasis. Se sabe que la cantidad de enzimas secretadas por las células malignas supera a la de células normales (Liotta et al., 1991; Vihinen y Kähäri, 2002). En células tumorales, las funciones del zinc están estrechamente relacionadas con la metástasis y la proliferación. El zinc puede también estar involucrado en la regulación de la muerte celular programada, apoptosis, que se observó en células tumorales tratadas con irradiación γ y fármacos antitumorales (Truong-Tran et al., 2001). De este modo, es importante evaluar la relación entre la viabilidad celular y la absorción de zinc, ya que hay la posibilidad de que la absorción de zinc sea un índice de viabilidad tumoral (Ando y Ando, 1994).

Wt-p53 es uno de los factores de transcripción, tipo “dedos de zinc” mejor conocidos y se une a ADN a través de una secuencia específica (p53DBD) que comprende los residuos aminoácidos del 96-308 (Bargonetti et al., 1993). Se ha demostrado que la coordinación de zinc es necesaria para el correcto plegado del dominio centro de p53 *in vitro* y la interrupción de esta interacción reduce enormemente o deroga la unión de p53 al ADN y la transactivación de genes diana (Meplan et al., 2000) (Figura 1.21).

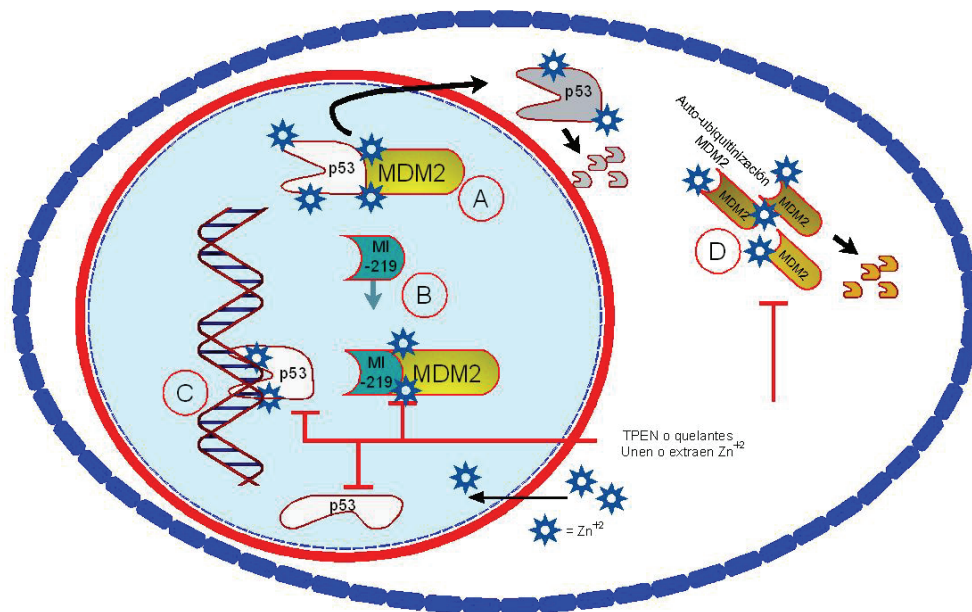


Figura 1.21. El zinc juega un papel crucial en la biología de p53. (A) MDM2 se une a p53 y lo capta para su exportación del núcleo y su degradación proteosómica. (B) La capacidad de MI-219 para bloquear esta interacción aumenta con la presencia de zinc, liberándose p53 para unirse al ADN. Además, la secuencia específica del sitio de unión al ADN de p53 requiere átomos de zinc. Si hay zinc presente, la transcripción iniciada por p53 se bloquea mediante el loop de retroalimentación de p53-MDM2 y se promueve la autoubiquitinización de MDM2. El TPEN, un quelante de metales permeable a membranas, anula los efectos mediados por zinc ya que lo extrae de p53 y causa un cambio conformacional que impide la unión al ADN. Cambios en la afinidad de unión inducidos por zinc (o su eliminación) pueden también frenar la interacción MI-219-MDM2 y MDM2-p53. (D) TPEN también bloquea la autoubiquitinización de MDM2 mediada por zinc (Azmi et al, 2011).

Una deficiencia de zinc suave es un acontecimiento común en la tercera edad, una población más propensa a cánceres (Prasad et al., 1993; Prasad, 2001; 2004). La deficiencia observada de zinc en la tercera edad se ha atribuido a la combinación de factores que incluyen una pobre absorción de zinc además del consumo de dietas pobres en zinc (Hambidge et al., 1998). Se ha encontrado zinc intracelular bajo en diferentes tumores y se ha correlacionado con la inducción de

un daño oxidativo en el ADN, disrupción de p53, unión de AP-1 al ADN y afecta a la reparación de ADN (Ho y Ames, 2002; Ho, 2004; Ho y Song, 2009).

La exposición a elevadas concentraciones de zinc induce la apoptosis en distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales de la retina ARP-19 (Rodríguez et al., 2004), líneas celulares tumorales de próstata humana (Feng et al., 2000), neuronas corticales (Lobner et al., 2000), células HL-60 de leucemia humana (Kondohm et al., 2002) y células PC12 (Seo et al., 2001).

Sus efectos degenerativos han sido estudiados más intensamente en cerebro, donde el zinc está altamente concentrado en las vesículas sinápticas de un subgrupo de neuronas glutamatérgicas. Se considera que funciona como un neurotransmisor/neuromodulador, el zinc liberado desde tales células puede alcanzar concentraciones muy elevadas en la hendidura sináptica (Frederickson et al., 2000; Cuajungco y Lees, 1997; Assaf y Chung, 1984; Choi y Koh, 1998). Bajo estas circunstancias, la translocación del zinc a las células post-sinápticas causa muerte celular, un fenómeno asociado con numerosos desórdenes neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y epilepsia (Frederickson et al., 2000; Cuajungco y Lees, 1997).

1.4. Cáncer e inhibidores.

En los últimos años ha habido un considerable interés en el desarrollo de inhibidores de proteínas quinasas para el tratamiento del cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas y otras patologías, y algunos ya han sido aprobados para su uso clínico. Las proteínas quinasas son reguladoras clave de la señalización celular y por tanto representan atractivas dianas para la intervención terapéutica en diversas enfermedades humanas (Cohen, 2002). Diversas moléculas inhibitoras de proteínas quinasas relevantes en enfermedades están actualmente en diferentes

estados de pruebas clínicas, y los primeros fármacos de dicha clase han recibido la aprobación de la FDA (Capdeville et al., 2002; Muhsin et al., 2003). La mayoría de estos inhibidores interactúan con el sitio de unión al ATP, una secuencia relativamente conservada, siendo probables dianas en diversas proteínas quinasas, incluso cuando se supone que son altamente específicos. Como el conocimiento sobre la verdadera selectividad de un inhibidor es un pre-requisito para la correcta interpretación de sus efectos biológicos, métodos eficientes para determinar las dianas celulares de los inhibidores de las proteínas quinasas son de vital importancia tanto para conocer las rutas de señalización como para el desarrollo de fármacos. Para que la selectividad de los inhibidores sea altamente específica, normalmente es evaluada en ensayos enzimáticos paralelos para un set de proteína quinasas recombinantes (Davies et al., 2000; Bain et al., 2003). Incluso el panel de selectividad más amplio disponible actualmente, comprende menos de 100 miembros de la familia de las proteínas quinasas, por lo que la gran mayoría de las más de 500 proteínas quinasas humanas no están probadas, y además, dianas de proteína alternativas como diferentes tipos de enzimas no están analizadas (Manning et al., 2002).

Se estima que el 30% de los programas de investigación y desarrollo de las industrias farmacéuticas están actualmente centrados en las proteínas quinasas, y se han desarrollado un gran número de inhibidores con una gran selectividad para determinadas proteínas quinasas. La utilización de estos compuestos para la investigación básica fundamental puede ser de gran valor en el futuro para el entendimiento de los papeles de las proteínas quinasas en las rutas de señalización celular (Bain et al., 2007).

A continuación se detallan los inhibidores que se utilizaron para este trabajo:

1.4.1. IC261

IC261 (Figura 1.22) es un inhibidor ATP-competitivo selectivo de CK1 δ y de CK1 ϵ con menor efecto sobre CK1 α (Behrend et al., 2000; Mashhon et al., 2000). Se ha demostrado que *in vitro* con la proteína purificada, la concentración de inhibición IC50 está en el rango 1-25 μ M (Behrend et al., 2000; Bain et al., 2007), pero la inhibición de CK1 en cultivos celulares requiere concentraciones del extremo superior de este rango. En varios estudios, cultivos celulares fueron tratados con IC261 a concentraciones de 25-100 μ M. Por ejemplo, a una concentración de 100 μ M, IC261 bloqueó parcialmente la degradación dependiente de CK1 δ/ϵ del regulador circadiano Per2 (Eide et al., 2005; Kloss et al., 1998; Price et al., 1998; Toh et al., 2001; Meng et al., 2008). Además, la inhibición de CK1 δ/ϵ con 40 μ M de IC261 modula negativamente la señalización de Wnt fortaleciendo las interacciones de proteínas en el complejo de destrucción de la β -catenina (Gao et al., 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que IC261 induce cambios en las células a dosis mucho menores. Por ejemplo, entre 0,4-1 μ M y dependiendo del número de células asesinas sensibles a p53, IC261 causa detención del ciclo celular, defectos en el huso mitótico y apoptosis (Behrend et al., 2000; Stöter et al., 2005).

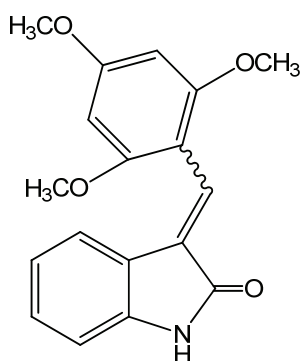


Figura 1.22. Estructura de IC261. IC261 es una 3-[(2,4,6-Trimetoxifenil)metilidenil]indolin-2-ona.

1.4.2. PP1

Las pirazolopirimidinas PP1 (Figura 1.23) y PP2 han sido extensamente utilizadas para asignar funciones fisiológicas a la familia de proteínas quinasas Src, aunque no discriminan entre los diferentes miembros de esta familia (Hanke et al., 1996; Liu et al., 1999). También inhiben otras proteínas tirosina quinasas, como Eph-A2 y FGF-R1. Inhibieron Src y la estrechamente relacionada Lck con valores IC₅₀ de 50 nM, mientras que CSK, p38 α Mapk y CK1 δ fueron inhibidas con 3-10 veces menor potencia. Curiosamente, se encontró que RIP2 fue inhibida incluso más potentemente que Src o Lck (Bain et al., 2007; Windheim et al., 2007).

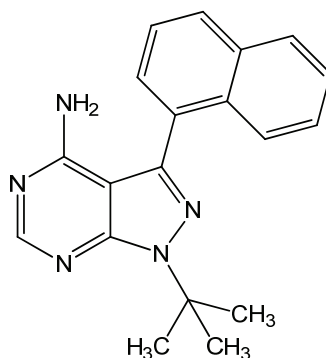


Figura 1.23. Estructura de PP1. PP1 es una (4-amino-5-(4-metilfenil)-7-(*t*-butil)pirazol-d-3,4-pirimidina

1.4.3. Indirubín-3-monoxima

Indirubin (3,2-bisindol) es un ingrediente activo de Danggui Luhui Wan, una mezcla de 11 hierbas medicinales tradicionalmente utilizadas contra ciertos tipos de leucemias por la Academia China de Medicina (Xiao et al., 2002). Entre los derivados de indirubín, el indirubin-3'-monoxima (I3M; Figura 1.24) es el compuesto más frecuentemente utilizado para establecer los efectos biológicos y fisiológicos del indirubín, ya que tiene mejores características de solubilidad que el

indirubín (Marko et al., 2001). Es bien conocido que I3M es un fuerte inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Leclerc et al., 2001; Marko et al., 2001; Perabo et al., 2006). Estudios adicionales informan que I3M induce la detención del ciclo celular en la fase G2/M por la inhibición de CDK1 y la quinasa de la glucógeno sintasa (GSK)-3 en células HBL-100, e induce detención del ciclo celular en la fase G2/M en células MCF-7 (Damiens et al., 2001). Además, un estudio demostró que I3M inhibió la activación del factor nuclear (NF)- κ B a través de la inhibición del inhibidor- κ B ($I\kappa$ -B) α , la fosforilación y degradación de $I\kappa$ -B α , la translocación nuclear de p65, unión del ADN, y la expresión génica dependiente de NF- κ B (Sethi et al., 2006). Más recientemente, se ha encontrado que I3M inhibe la autofosforilación del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR)-1 y activa a largo plazo a la proteína quinasa activada por mitógenos p38, que estimula la señalización extracelular regulada por quinasas (Zhenn et al., 2007). Aunque la actividad antiangiogénica de I3M había sido demostrada utilizando pez cebra transgénico con vasos sanguíneos fluorescentes (Tran et al., 2007), el detalle del mecanismo molecular todavía se desconoce. I3M funciona como un inhibidor de la ruta de señalización VEGFR-2, conduciendo a la inhibición de la angiogénesis, sugiriendo un nuevo mecanismo de acción para I3M y su potencial uso como un agente antiangiogénico (Kim y Park, 2011).

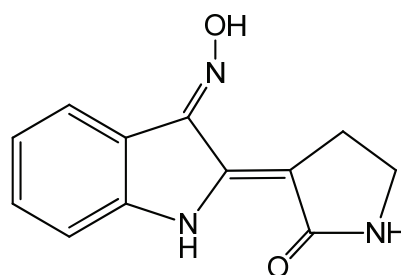


Figura 1.24. Estructura de Indirubín-3-monoxima. Es una 3-[(3E)-3-(hidroxiimino)-2,3 dihidro-1H-indol-2-iliden]-2,3-dihidro-1H-indol-2-ona

1.4.4. Roscovitina

La roscovitina (Figura 1.25) pertenece a las purinas 2,6,9 tri-substituídas (De Azevedo et al., 1997; Meijer et al., 1997). Es un inhibidor selectivo para Cdk1, 2, 5, 7 y 9 con concentraciones IC50 en el rango nanomolar y que compite con el sitio de unión al ADN de las quinasas (Bach et al., 2005; De Azevedo et al., 1997; Tang et al., 2005). Se sabe que también inhibe a otras quinasas como CaM quinasa 2, CK1 α , CK1 δ , DYRK1A, EPHB2, ERK1, ERK2, FAK, y IRAK4 a concentraciones del rango micromolar (1-40 μ M). Sin embargo, otras quinasas incluídas Cdk4, Cdk6 y Cdk8 no son sensibles a la roscovitina (Bach et al., 2005; Tang et al., 2005).

Como las Cdks tienen un importante papel en un amplio rango de funciones celulares, se han sugerido como tratamientos potenciales para diversas enfermedades patofisiológicamente diferentes. Los efectos de roscovitina han sido estudiados in vitro en más de cien líneas celulares e in vivo en modelos animales. La media de la IC50 requerida para la inhibición de la proliferación celular no excede la concentración de 20 micromolar (Meijer et al., 1997; McClue et al., 2002; Raynaud et al., 2004). Además, se demostró que inhibe la iniciación de la síntesis de DNA (Krude, 2000), la formación de centrosomas (Matsumoto, 1999) y la formación del nucleolo (Sirri, 2002).

Se ha demostrado que la roscovitina induce apoptosis en varias líneas celulares independientemente del estatus de p53, sin embargo, tiene una mayor potencia para inducir apoptosis en células que expresan p53 que en las que no lo expresan (Meijer et al., 1997; McClue, 2002; Wesierska-Gadek et al., 2005; 2008).

Los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de roscovitina han sido implicados en el tratamiento de cáncer y utilizado en estudios sobre los efectos antitumorales de la roscovitina (Wesierska-Gadek et al., 2003).

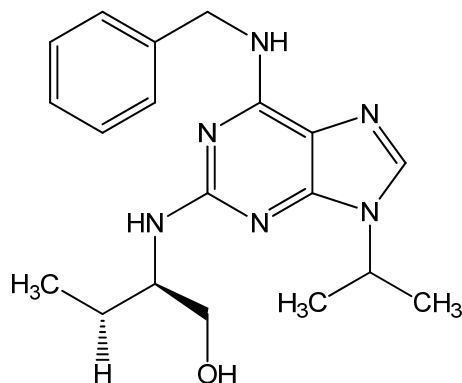


Figura 1.25. Estructura de Roscovitina. Es una 2-(R)-(1-Etil-2-hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina.

1.4.5. SB203580

SB203580 (Cuenda et al., 1995), es un piridinil imidazol (Figura 1.26), que se ha utilizado en numerosos estudios para evaluar los papeles fisiológicos de las MAPKs p38 α y p38 β . Aunque estos compuestos han sido y todavía son muy útiles, estudios más recientes han identificado otras proteínas quinasas a las que inhiben con similar (GAK y CK1) o incluso con mayor potencia (RIP2) (Godl et al., 2003). SB203580 también inhibe a c-Raf (Hall-Jackson et al., 1999) y GSK3 *in vitro* (Bain et al., 2007), aunque menos fuertemente, e inhibe la formación de ZMP, un activador de AMPK, desde su precursor inactivo AICAR (aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranósido), probablemente por inhibición de transportadores de adenosina (Fryer et al., 2002).

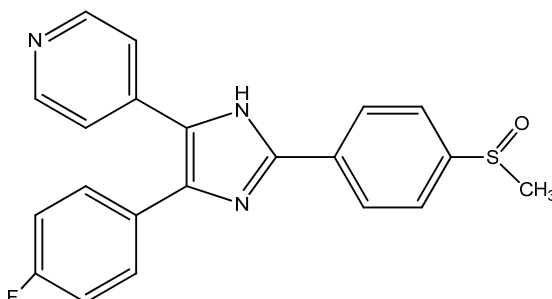


Figura 1.26. Estructura de SB203580. Es un 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridinil)-1H-imidazol.

1.4.6. SP600125

A finales del 2001, se describió a SP600125 (Figura 1.27) como inhibidor de JNK, tras un screening de una colección propia (Celgene/Signal Pharmaceuticals) de inhibidores de la actividad de JNK2 contra el dominio de transactivación de c-Jun. La naturaleza plana de SP600125 y la poca solubilidad en solución acuosa, dada su naturaleza de antrapirazolona, ya fueron destacadas en su descripción inicial. La inhibición de JNK por SP600125 se observó que es reversible y ATP-competitiva, mostrando valores de IC₅₀ para la inhibición de JNK en el rango 40-90 nM con una selectividad 300 veces mayor que otras proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), ERK y p38-2 y entre 10-100 veces mayor selectividad que sobre otras 14 proteínas quinasas probadas. Estos resultados sugieren una alta afinidad e interacciones específicas de SP600125 en el sitio de unión al ATP de JNK (Bennett et al., 2001).

En el 2002, Bain y colaboradores ya dijeron que SP600125 no era un inhibidor específico de JNK, ya que inhibió a 13 de 30 proteínas quinasas probadas con similar o mayor potencia que a las isoformas de JNK. Sin embargo, a pesar de ello, muchos laboratorios han continuado utilizando SP 600125 como inhibidor de JNK. En el año 2007, Bain y colaboradores demostraron que SP600125 inhibió

tanto o más potentemente que las isoformas de JNK a PKD1, CHK2, Aurora B y C, MELK, CK1, DYRK2, DYRK3 y HIPK3 (Bain et al., 2007).

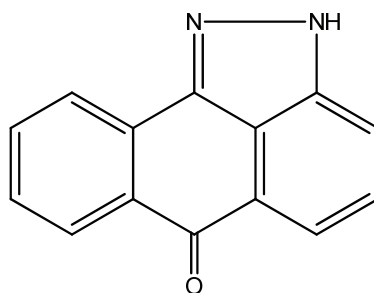


Figura 1.27. Estructura de SP600125. Es una antra[1,9]pirazol-6(2H)-ona).

1.4.7. TDZD-8 y TDZD-20

Las tiadiazolidinonas (TDZDs) son pequeñas moléculas heterocíclicas con propiedades farmacocinéticas y toxicológicas favorables, tal y como la biodisponibilidad oral y la penetración de la barrera hematoencefálica (Alonso et al., 2004) y se ha demostrado que son inhibidores no ATP-competitivos de la GSK-3 β (Martinez et al., 2002). Se ha postulado que los TDZDs podrían ser de potencial uso terapéutico para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y otras importantes patologías como la diabetes de tipo II, cáncer y procesos inflamatorios crónicos (Dorronsoro et al., 2002; Martinez et al., 2002).

TDZD-8 (Figura 1.28A) y TDZD-20 (Figura 1.28B), son inhibidores no ATP-competitivos de GSK-3 β (IC₅₀ = 2 y 6,5 μ M respectivamente), que se unen al sitio activo de GSK-3 β , e inhiben las actividades de Cdk1/ciclina B, casein quinasa II, y proteína quinasa A y C (IC₅₀ > 100 μ M) (Jordan, 2007).

Se ha demostrado que TDZD-8 es un agente protector en múltiples modelos murinos de enfermedades tales como artritis, lesión de médula espinal, colitis, y shock séptico (Chin et al., 2005; Dugo et al., 2006; Cuzzocrea et al.,

2006a; Cuzzocrea et al., 2006b; Wittle et al., 2006). También se ha visto que TDZD-8 induce selectivamente la muerte de las principales formas de células de leucemia, incluyendo las células madre mieloides malignas y las poblaciones progenitoras, evitando los tejidos hematopoyéticos normales (Guzman et al., 2007).



Figura 1.27. Estructura de TDZDs. A) TDZD-8 es un 4-bencil-2metil-1,2,4-tiodiazolidina-3,5-diona. B) TDZD-20 es un 5-bencilamino-3-oxo-2,3-dihidro-1,2-4-tiadiazol.

1.4.8. Estaurosporina

La estaurosporina (Figura 1.29) se descubrió y aisló como un alcaloide producido a partir de un cultivo de *Streptomyces*. Posteriormente se comprobó que tenía propiedades inhibitorias sobre proteínas quinasas, impidiendo la unión de ATP a la molécula de quinasa debido a su fuerte afinidad por el sitio de unión a ATP. A pesar de haberse descrito como un potente inhibidor de PKC (Phospholipid/ Ca^{2+} dependent protein kinase) con un IC_{50} de 3 nM (Tamaoki et al., 1986; Tamaoki y Nakano, 1990), la estaurosporina se une a muchas otras quinasas con una alta afinidad, con lo cual este compuesto presenta muy poca selectividad (Karaman et al., 2008) y es uno de los inhibidores conocidos menos específico a nivel general. Además, se ha visto que su utilización induce apoptosis en muchos tipos celulares (Hartel et al., 2003; Hwang et al., 2011) y también puede inhibir la actividad catalítica de otros enzimas, como la topoisomera II (Lassota et al., 1996).

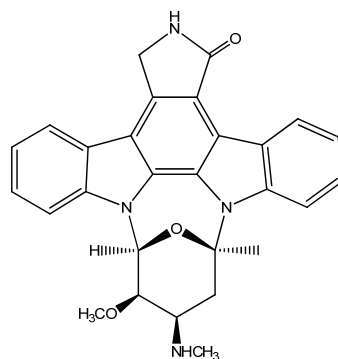


Figura 1.28. Estructura de estaurosporina. Es una (9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-Hexahidro-10-metoxi-9-9-metil-11-(metilamino)-9,13-epoxi-1*H*,9*H*-diindol[1,2,3-*gh*:3',2',1'-1*m*]pirrol[3,4-*j*][1,7]benzodiazonin-1-ona.

1.4.9. RO-31-8220

El compuesto RO 31-8220 (Figura 1.30) fue desarrollado como un derivado de la estaurosporina que resultó ser más selectivo para las isoformas de PKC con un IC₅₀ de entre 5 y 27 nM (Davis et al., 1989; Dieter and Fitzke, 1991), aunque estudios recientes muestran que también es inhibidor de otras proteína squinasas con una eficacia similar a la ejercida sobre PKC (Davies et al., 2000). Al igual que la estaurosporina, induce apoptosis (Han et al., 2000).

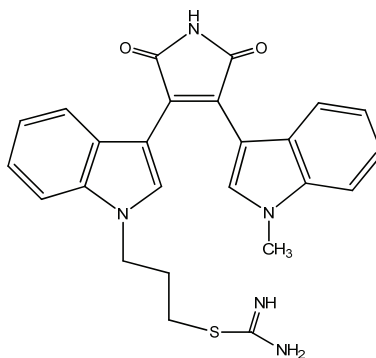


Figura 1.29. Estructura de RO-31-220. Es un 3-[1-[3-(Amidinotio)propil-1*H*-indol-3-il]-3-(1-metil-1*H*-indol-3-yl)-3-metasulfonato.

1.4.10. Inhibidor de Cdk1

El inhibidor de Cdk 1 (Figura 1.31) es un inhibidor competitivo por el sitio de unión del ATP de la proteína quinasa y fue descrito como un compuesto inhibidor de Cdk1 y Cdk5 con un IC₅₀ de 5,8 μ M y 25 μ M respectivamente (Andreani et al., 2000). En un estudio de la determinación de la estructura tridimensional de VRK3 y VRK2, se ha descrito que se une a estas quinasas y también a VRK1 (Scheeff et al., 2009).

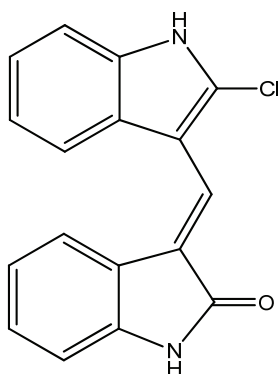


Figura 1.30. Estructura de Inhibidor de la Cdk1. Es una 3-(2-Cloro-3-indolilmetilene)-1,3-dihidroindol-2-ona.

1.4.11. Oxindol 1

El Oxindol 1 (Figura 1.32) se ha descrito como un inhibidor selectivo del receptor tirosina quinasa Flk-1 del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) con un IC₅₀ de 390 nM. A concentraciones más elevadas (IC₅₀ de 12 μ M) también es capaz de inhibir al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y a algunos complejos de ciclinas/Cdk. Sin embargo, no afecta a la actividad quinasa de los receptores tirosina quinasas EGFR o ErbB2 (Sun et al., 1998; Kent et al., 1999). Además, es otro de los inhibidores descritos que se unen a las proteínas quinasa VRK (Scheeff et al., 2009).

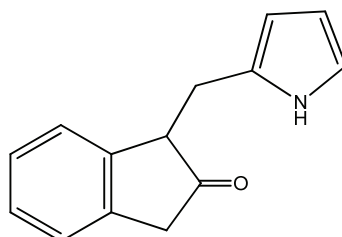


Figura 1.31. Estructura de Oxindol 1. Es una 3-(1H-Pirrol-2-ilmetilene)-1,3-dihidroindol-2-ona.

1.4.12. AZD-7762

El compuesto AZD-7762 (Figura 1.33) se utiliza como inhibidor de las quinasas CHK1/2 (Checkpoint Kinase 1/2), una proteína quinasa implicada en la respuesta celular frente al daño al ADN. AZD-7762 inhibe a Chk1 por unión reversible al sitio de unión al ATP de Chk1, con un IC₅₀ de 5 nM y a Chk2 menor de 10 nM (Zabludoff et al., 2008). Además, este inhibidor sensibiliza las células ante el tratamiento de radioterapia en combinación con otros fármacos (Mitchell et al., 2010; Morgan et al., 2010) y está siendo utilizado en ensayos clínicos (Ashwell et al., 2008; Cheng et al., 2011).

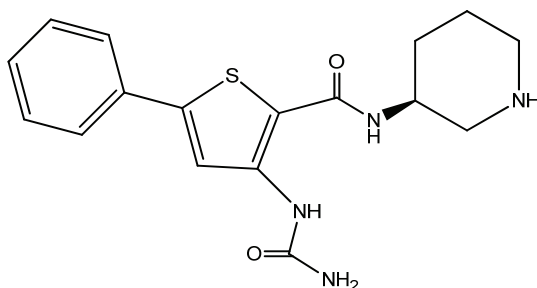


Figura 1.32. Estructura de AZD-7762. Es una 5-(3-fluorofenil)-3-ureidotiofen-N-[(S)-piperidina-3-il]-2-carboxamida.

1.4.13. VX-680

El compuesto VX-680 (Figura 1.34) es un inhibidor de las quinasas Aurora-A, -B, -C con valores de IC en un rango nanomolar (0.6, 18 y 4.6 nM respectivamente) y se considera un agente antitumoral útil, ya que bloquea la progresión del ciclo celular e inhibe la proliferación, y también induce apoptosis en diferentes tipos de células cancerosas. Además, este compuesto causa una fuerte inhibición del crecimiento tumoral en varios modelos *in vivo*, permitiendo la regresión de leucemia, tumores de colon y páncreas a dosis bien toleradas (Harrington et al., 2004; Shi et al., 2007; Gautschi et al., 2008).

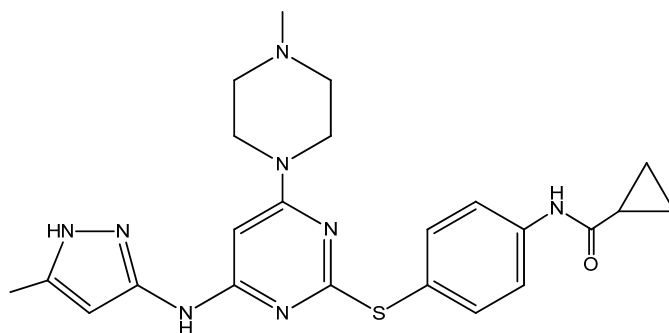


Figura 1.33. Estructura de VX-680. Es un ácido [4-[4-(4-metil-piperazin-1-il)-6-(3-metil-1H-pirazol-3-ilamino)-pirimidin-2-sulfanil]-fenil]-ciclopropanocarboxamida.

1.4.14. PLX-4720

PLX4720 (Figura 1.35) es un inhibidor de B-RafV600E, diseñado para bloquear el sitio de unión al ADN cuando la proteína oncogénica B-RafV600E está en una conformación activa, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos tumorales de melanoma y tumor colorrectal (Tsai et al., 2008). PLX4720 fue efectivo reduciendo la proliferación celular, migración, e invasión en un modelo heterocigótico para el tipo salvaje de B-Raf/B-RafV600E, por lo que debe ser testado y considerado para

estudios de fase I en el tratamiento de pacientes con B-RAFV600E ATC (Nucera et al., 2011).

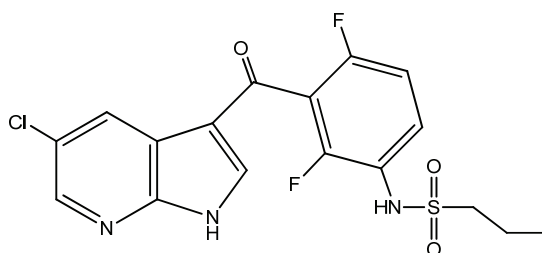


Figura 1.34. Estructura de PLX-4720. Es un ácido N-(3-(5-cloro-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-carbonil)-2,4-difluoro-fenil)propano-1-sulfonamida.

1.4.15. GDC-0879

GDC-0879 (Figura 1.36) es un potente y selectivo inhibidor de B-Raf en diversos ensayos *in vitro* y celulares con una IC₅₀ de 0,13 nM para la enzima purificada de B-Raf V600E y de 63 nM para pERK en la línea celular MALME-3M (Hansen et al., 2008; Wong et al., 2009). Además, su empleo en modelos preclínicos ha mostrado eficacia antitumoral (Hoeflich et al., 2009a;b).

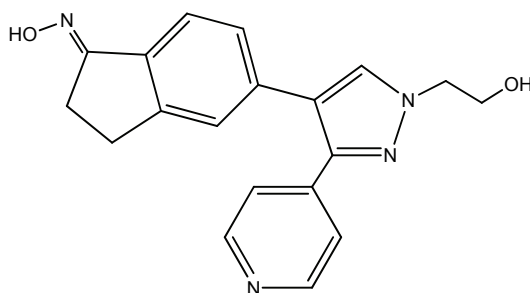


Figura 1.35. Estructura de GDC-0879. Es un 5-[1-(2-hidroxi-etil)-3-piridin-4-il-1H-pirazol-4-il]-indan-1-ona oxima.

OBJETIVOS

- **Estudiar la sensibilidad a inhibidores de los miembros catalíticamente activos de la familia de proteínas quinasas VRK y comparación con la quinasa homóloga viral B1R.**

- **Estudiar la sensibilidad a metales de los miembros catalíticamente activos de la familia de proteínas quinasas VRK y comparación con la quinasa homóloga viral B1R.**

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reactivos

Los reactivos químicos generales fueron obtenidos de MERCK (Alemania), Prolabo, Sigma Chemical Co (St Louis, USA), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania); Probus, Analema, Serva Feinbiochemica GmbH & Co y Vorquímica (España).

Tris (hidroximetil) aminometano, SDS, EGTA, EDTA, BSA, DTT, β -mercaptoetanol, leupeptina, aprotinina, isopropanol, Azul de Coomassie R-250 y los metales fueron de Sigma Chemical Co, (St. Louis, USA).

Los inhibidores de proteasas IC261, PP1, Indirubin-3-monoxime, Cdk1 Inhibitor, Oxindole I SB203580, Roscovitine, SP600125, TDZD-8 y TDZD-20 de Calbiochem-Merck (Darmstadt, Germany). Staurosporine y RO 31-8220 de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). VX-680, AZD7762, PLX-4720 y GDC-0879 de Selleck Chemicals (Houston, TX). PMSF y ATP, fueron obtenidos en Boehringer Mannheim Bioproductos. La histona H3 fue de Upstate Biotechnology-Millipore (Lake Placid, NY).

Los reactivos de electroforesis y marcadores de peso molecular preteñidos fueron obtenidos de Bio-Rad.

El ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP fue obtenido de Hartmann Analytic.

El material fotográfico empleado fue de la firma Agfa (Curix R2).

3.1.2. Equipos y aparatos

- Electroforesis: mini Protean III[®], fuentes de alimentación PAC 3000, secador de geles MO 543 y capturadores de imágenes Gel Doc 1000 y Versa Doc Imaging System MO 2000, todos de Bio-Rad.

- Centrifugación del cultivo bacteriano: Rotor modelo JA-20, Centrifuga Beckman modelo J2-21.
- Las restantes centrifugaciones se realizaron en centrifugas Centromix, Heraeus spatech/Biofuge A, Denver Instrument y BHG-Hermle Z229.
- Las incubaciones de la fracción soluble con la resina a 4°C y en movimiento continuo se realizaron en un mixing Rotor de la casa Renner GmbH.
- Otros: Espectrofotómetro PU UV/VIS Philips, Contador de centelleo Beckman LS6000TA, Agitador Rotamax 120 Heidolph, Thermomixer Compact (Eppendorf) y revelador automático de la firma Agfa-Gevaert AG, modelo Gevamat 60.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST

Para la expresión de proteínas de fusión de este tipo utilizamos el vector pET que contiene un promotor de expresión para *Escherichia coli*, inducible con IPTG y que expresa la proteína clonada fusionada a GST.

La cepa BL21DE3 de *Escherichia coli* se transformó con los vectores indicados para expresión de proteína recombinante unida a GST. Se inoculó dicha cepa en medio selectivo (LB + ampicilina 50 µg/mL) y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche. Se diluyó ese inóculo en medio selectivo fresco y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6-0.8.

En este punto se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG a una concentración de 0.2 mM y dejando crecer las bacterias a 30°C durante

3 a 4 horas más. El cultivo bacteriano resultante se centrifugó a 10000 g y el “pellet” resultante fue resuspendido en un tampón de lisis (Tabla 3.1).

Tampón de lisis	
PBS 1X frío	10 mL
Tritón X-100	1%
Lisozima	0.2 µg/mL
PMSF	1 mM
Aprotinina	10 µg/mL
Leupeptina	10 µg/mL

Tabla 3.1. Composición química del tampón de lisis.

Tras 20 min de incubación a 4°C, se sonicó la suspensión con 3 pulsos de 30 s cada uno a 4°C y baja potencia, en un sonicador “Misonic XL2010”, tras la cual se centrifugó a 30000 x g 30 min a 4°C. Ese sobrenadante resultante o fracción soluble 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-glutación (“*Glutathion Sepharose 4B beds*”, *Amersham Pharmacia Biotech*) entre 3-12 horas a 4°C en agitación orbital suave con la resina “TALON Metal Affinity Resin” (BD Biosciences).

Una vez unida la proteína de fusión a la resina, se lavó varias veces mediante centrifugación suave con PBS + inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 2 mM DTT, 10 µg/mL aprotinina y 10 µg/mL de leupeptina) y se eluyó la proteína varias veces con glutación reducido 20 mM en Tris-HCl pH 8 50 mM durante 15 min a temperatura ambiente y en agitación suave.

Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie*.

Para la purificación de las proteínas se utilizó el método desarrollado por Santos, C.R. (2006), Blanco, S. (2006) y Valbuena, A. (2008). (Figura 3.1)

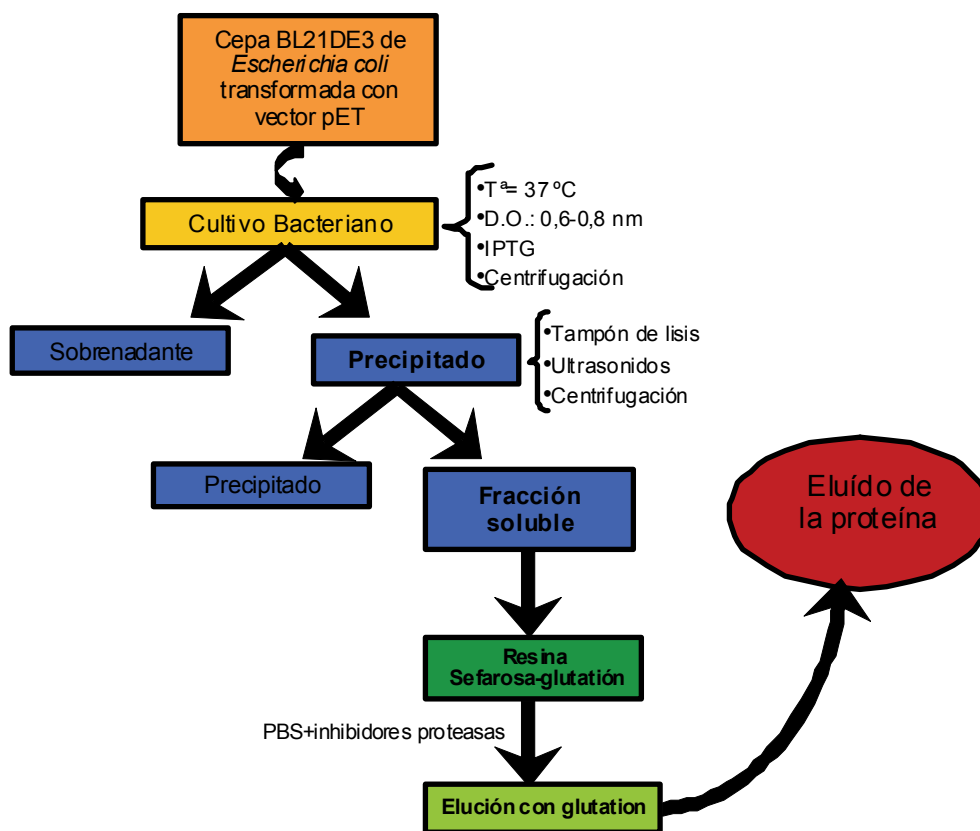


Figura 3.1. Representación esquemática del proceso de Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST

3.2.2. Tinción con Coomassie

Para monitorizar el proceso de purificación y para comprobar la correcta purificación de la proteína, las fracciones proteicas obtenidas se separaron por tamaño mediante una electroforesis vertical en geles SDS-PAGE.

Posteriormente el gel de poliacrilamida se fijó y se tiñó durante 10 minutos en solución de tinción *Coomassie* (Tabla 3.2) y posteriormente se lavó el gel con una solución de desteñido (Tabla 3.3) hasta la correcta visualización de las bandas de interés.

Finalmente se transfirió a papel Whatman 3M y se secó en un secador de geles (Bio-Rad) durante 2h a 80°C.

Solución de tinción	
<i>Coomassie</i> brilliant blue R250	0,5 %
Metanol	50 %
Ácido acético glacial	10%

Tabla 3.2. Composición química de la solución de tinción.

Solución de desteñido	
Metanol	50 %
Ácido acético glacial	10%

Tabla 3.3. Composición química de la solución de tinción.

3.2.3. Ensayos de actividad quinasa *in vitro*.

La actividad serina/treonina quinasa se analizó mediante ensayos de fosforilación utilizando las proteínas quinasa GST-VRK y GST-B1R recombinantes expresadas en *E. coli* a concentraciones que varían de 2 a 10 µg en un volumen final de 30 µL de tampón específico para caseína quinasa (Tabla 3.4).

Tampón quinasa	
Tris-HCl pH7.5	20 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	0.5 mM
KCl	150 mM
ATP	5 µM
[γ ³² P] ATP	5 µM (5 µCi)

Tabla 3.4. Composición química del tampón quinasa.

Como sustratos se utilizaron la histona H3 recombinante de *Xenopus laevis* (Upstate) en una concentración de 1 µg y también la proteína recombinante GST-p53 correspondiente al fragmento de p53 murino que va del aminoácido 1 al 85 en una concentración de 10 µg.

Los inhibidores de proteasas se disolvieron en DMSO y los metales en agua destilada para conseguir las concentraciones indicadas para cada ensayo.

Se realizó una pre-incubación con la quinasa recombinante, los sustratos y el inhibidor durante 10 minutos antes de añadir el ATP y después se incubó 30 minutos, todo ello a 800 rpm y 30°C en un Thermomixer Compact (Eppendorf). Las reacciones de fosforilación se pararon mediante la adición de tampón de carga (Tabla 3.7) e incubación durante 5 minutos a 100° C. Posteriormente las muestras

fueron procesadas y fraccionadas en un gel de poliacrilamida de entre 10%-15% de SDS, teñido en tinción de *Coomassie* y secado como se ha descrito anteriormente.

Finalmente para detectar las bandas radiactivas, los geles fueron expuestos a una temperatura de -80°C durante 1-24 h, según cada caso. Tras revelar las películas se interpretaron las señales de fosforilación utilizando como referencia el gel teñido con *Coomassie*.

En el caso de los experimentos de inhibición de la actividad quinasa, se cuantificó la cantidad de fosfato incorporado. Para ello, se recortaron las bandas del gel de poliacrilamida, se les añadió 4 mL de líquido de centelleo Ecoscint H, y se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) en el contador de partículas β de Beckman LS6000TA. El tiempo de medida es de 5 minutos por vial con 2 réplicas por muestra.

Se representó gráficamente con el programa *Excel 2007* (Microsoft), obteniendo así las rectas de regresión y se calcularon las ecuaciones de dichas rectas. Se indicó el valor del coeficiente de determinación (R^2) (cuanto más cercano a 1 sea este valor, más fiable es la ecuación de regresión) y se calcularon los valores de IC50 (concentración de inhibidor a la cual la actividad quinasa se reduce a la mitad).

3.2.4. Determinación de la concentración proteica

Se usó el método de Bradford (1976), basado en la fijación sobre las proteínas del colorante Azul de Coomassie que en presencia de proteínas se torna de color rojo a azulado cambiando su máximo de absorción de 465 a 595 nm. El cambio en la absorción del colorante es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra.

Se preparó una solución del colorante al 0,01 % en 50 mL de etanol al 95 %, a la que se añadió 100 mL de una solución de ácido fosfórico al 85 % (p/v), que

finalmente se aforó a un litro con agua destilada. El reactivo se conservó a temperatura ambiente y antes de cada uso fue filtrado a través de papel de filtro Wathman N°1.

Para cada medición de concentración de proteínas se hizo una escala de calibrado con BSA.

3.2.5. Electroforesis para proteínas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Todas las muestras de proteínas fueron analizadas en geles de poliacrilamida de 10-15 % (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970).

Este método se basa en la exposición de la mezcla de proteínas a un campo eléctrico, de forma que las moléculas cargadas migrarán al electrodo de polaridad opuesta. La movilidad de las moléculas dependerá de la viscosidad del medio, del tamaño, de la forma y de la carga de la molécula. La velocidad de desplazamiento electroforético de una partícula dependerá principalmente de los grupos ionizables que existan sobre superficie, y naturalmente, del signo y magnitud de la carga de dichos grupos, lo que a su vez dependerá de la fuerza iónica y del pH del medio (Nakai y Wayne, 1996).

La muestra de proteínas se trata con β -mercaptoetanol, que asegura la separación de las cadenas proteicas.

Además se añade SDS (dodecil sulfato sódico), un detergente que rodea la proteína en una cantidad proporcional a su masa molecular y le confiere carga negativa. Con ello se consigue que la proteína migre hacia el ánodo, de forma inversamente proporcional a su masa y sin depender de su carga intrínseca (Lozano y Tudela, 1988).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la solidificación de los geles se utilizó persulfato de amonio y TEMED (N,N, N', N'-tetrametiletilenodiamina) como catalizador de la formación de radicales libres.

Los geles están formados por un gel separador del 10-15% (Tabla 3.5) y por un gel concentrador del 4% (Tabla 3.6).

Gel separador 10 %	
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
30% Acrilamida/bis	37,5/1(2,6%C)
SDS	10 %
Temed	0,05 %
Persulfato amónico	10%

Tabla 3.5. Composición química del gel separador.

Gel separador 4 %	
Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
30% Acrilamida/bis	37,5/1(2,6%C)
SDS	10 %
Temed	0,05 %
Persulfato amónico	10%

Tabla 3.6. Composición química del gel concentrador.

El gel separador es el que se encuentra en mayor proporción, y que sirve para separar las proteínas de las muestras, según su tamaño. En función del

MATERIAL Y MÉTODOS

porcentaje de acrilamida / bisacrilamida presente en la mezcla, se puede modificar el tamaño del poro del gel, del cual dependerá la dificultad de desplazamiento que encuentren las moléculas de muestra sometidas a electroforesis. En general, a menor porcentaje de acrilamida / bis, mayor porosidad del gel, y en consecuencia, menor dificultad de desplazamiento de las moléculas a su través. Así, para resolver proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 30-100 kDa se emplearon preferentemente geles del 10% de acrilamida y para proteínas de entre 30-15 kDa se utilizaron geles del 12,5%.

El gel concentrador es el de menor proporción de acrilamida. Se añade para concentrar las proteínas en un mismo frente, desde el cual se pueda medir la distancia recorrida por cada una.

Para ello las muestras se procesaron con tampón de carga (Tabla 3.7) y se cocieron a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfriaron en hielo.

Tampón de carga	
Tris-HCl pH 6,8	62,5 M
Glicerol	10 %
SDS	2,3 %
Azul de bromofenol	0,1 %
β -mercaptoetanol	5 %

Tabla 3.7. Composición química del tampón de carga.

La electroforesis se realizó con un tampón de electroforesis o running buffer (Tabla 3.8) unos 70 min con un voltaje de 150 V y a temperatura ambiente. Como marcadores de masa molecular se utilizaron marcadores preteñidos “Precision Plus Protein™ Standards Dual Color” de Bio-Rad.

Tampón de electroforesis	
Tris-HCl pH 8,3	124 mM
Glicina	960 mM
SDS	17 mM

Tabla 3.8. Composición química del tampón de electroforesis.

3.2.6. Cálculos de constantes cinéticas.

Los ensayos enzimáticos necesarios para el cálculo de las constantes aparentes de Michaelis-Menten (K_m) de la reacción catalizada por la proteína VRK1 purificada de *Escherichia coli* se llevaron a cabo en un medio tamponado a pH 7,5 con tampón quinasa descrito en la tabla 3.4, pero sin añadir el cloruro de magnesio (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM DTT y 150 mM KCl) y con el catión divalente e estudiar en cada caso (magnesio, manganeso o zinc) y se realizó de la misma manera que los ensayos descritos anteriormente en el apartado 3.2.4.

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de la representación de dobles recíprocos $1/V_0$ vs $1/[S]$, donde V_0 es la velocidad inicial de reacción a una concentración de sustrato S determinada.

Se define como unidad de actividad enzimática (UA) a la cantidad de enzima que cataliza la autofosforilación de un mol de enzima por minuto en condiciones estándar (temperatura de 30 °C y pH de 7,5).

RESULTADOS

4.1. Expresión en bacterias y purificación de proteínas fusionadas a GST.

4.1.1. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK1

Se comprobó el método de purificación realizándose análisis electroforéticos con los diferentes pasos desarrollados para la obtención de un extracto con proteína purificada.

En la figura 4.1 se puede observar como tanto en las fracciones correspondientes a la alícuota del cultivo bacteriano sin la adición del inductor de la proteína deseada (IPTG), como a las correspondientes a las alícuotas tras la adición del IPTG, no se observa ningún tipo de banda electroforética de proteínas debido a que todavía estarían en el interior de las bacterias gracias a la integridad de la pared bacteriana.

En la alícuota del lisado se observa una serie de bandas que serían todas las proteínas de las bacterias. A continuación se centrifuga, obteniéndose un precipitado, con los restos proteicos de las membranas y orgánulos, y un sobrenadante o fracción soluble, que contiene las proteínas solubles, entre las que se encuentra la proteína de fusión expresada (Figura 4.1).

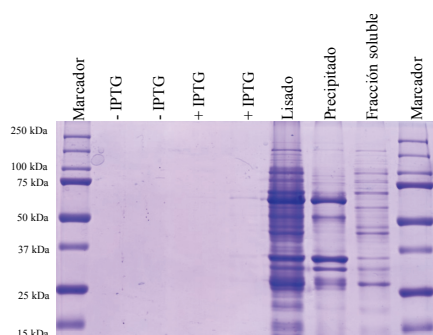


Figura 4.1. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la GST-VRK1.

A continuación, la fracción soluble se incubó con la resina de Sefarosa-glutatinación entre 3-12h a 4°C en agitación suave. Tras una nueva centrifugación, se toma una alícuota tanto del precipitado (resina de Sefarosa-glutatinación) como del sobrenadante (lavado de la resina) (Figura 4.2).

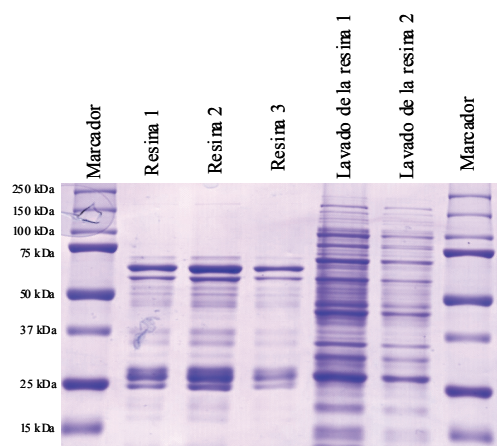


Figura 4.2. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la GST-VRK1.

Una vez unida la proteína de fusión a la resina, se lavó varias veces mediante centrifugación suave con PBS e inhibidores de proteasas y se eluyó la proteína varias veces con glutatión reducido durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Se tomaron alícuotas tanto de la resina como del eluido para poder comprobar la presencia de la proteína deseada (Figura 4.3).

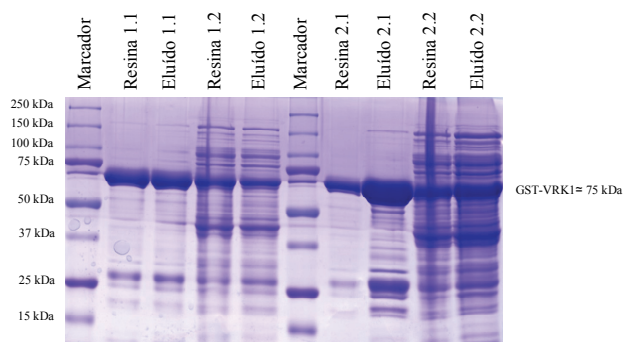


Figura 4.3. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la GST-VRK1.

El procedimiento explicado en este apartado es el mismo que se siguió en las purificaciones del resto de las proteínas obtenidas (apartados 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.5).

4.1.2. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK2A

Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* (Figura 4.4).

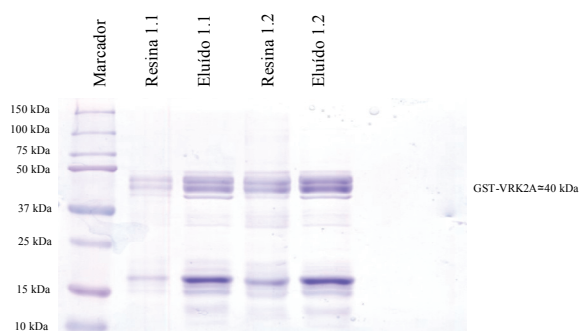


Figura 4.4. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la GST-VRK2A.

4.1.3. Expresión en bacterias y purificación de GST-VRK2B

Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* (Figura 4.5).

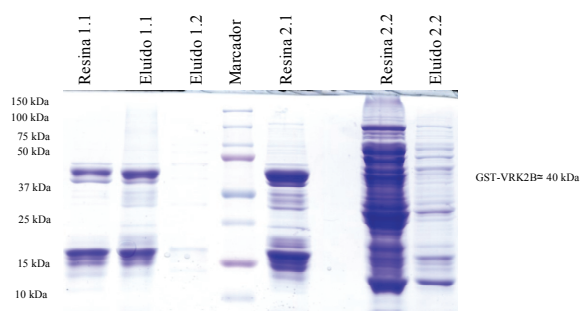


Figura 4.5. SDS-PAGE 10% teñido con azul de *Coomassie*. Pasos de purificación de la GST-VRK2B.

4.1.4. Expresión en bacterias y purificación de GST-B1R

Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* (Figura 4.6).

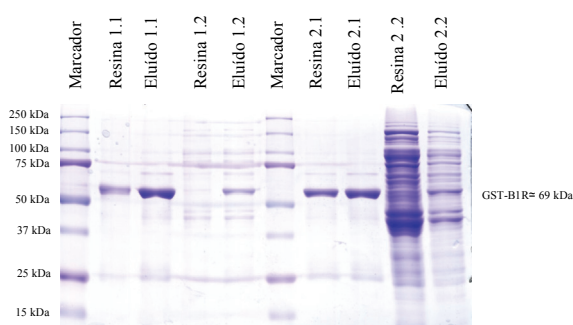


Figura 4.6. SDS-PAGE 10% teñido con azul de *Coomassie*. Pasos de purificación de la GST-B1R.

4.1.5. Expresión en bacterias y purificación de GST-p53

Se comprobó la purificación de la proteína eluida mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* (Figura 4.7).

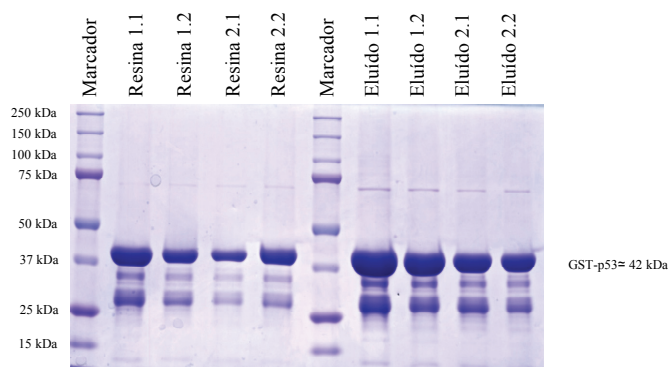


Figura 4.7. SDS-PAGE 10% teñido con azul de *Coomassie*. Purificación de la GST-p53.

A la vista de los resultados obtenidos en todas las proteínas purificadas se podría decir que el proceso ha funcionado correctamente, consiguiendo resultados similares a otros autores como Santos, C.R. (2006), Blanco, S. (2006) y Valbuena, A. (2008).

4.2. Estudio de la sensibilidad a diferentes inhibidores comerciales de la familia de quinasas VRK y B1R.

Se probó el efecto de un panel de 16 inhibidores sobre la actividad quinasa de la familia de proteínas humanas VRK y en algunos casos también de la proteína viral B1R, con el objetivo de identificar alguno que afectara a la actividad de dichas proteínas. Los inhibidores utilizados se han descrito anteriormente en el apartado de Introducción y son compuestos que inhiben a diferentes grupos de proteínas relacionadas con diversas funciones celulares.

Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con las proteínas recombinantes humanas VRK1, VRK2A, VRK2B y con la proteína viral B1R fusionadas al epítipo GST expresadas y purificadas a partir del cultivo de bacterias *E. coli* (tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de Material y Métodos) y se realizaron ensayos quinasa (tal y como se describe en el apartado 3.2.3 de Material y Métodos). Determinamos el efecto de los inhibidores en base a la actividad de autofosforilación y de fosforilación de dos sustratos diferentes, la histona H3 recombinante comercial o el supresor de tumores p53 fusionado a GST.

4.2.1. Inhibidores comerciales y H3 como sustrato

Los inhibidores probados en este bloque son IC261, PP1, Indirubín-3-monoxima, SB203580 y SP600125 y el sustrato utilizado en este caso fue la histona H3 recombinante.

Como se puede observar en la figura 4.8, algunos de estos inhibidores no tuvieron ningún efecto o el efecto fue muy débil a la concentración utilizada (100 μ M). Sin embargo, si se detectaron diferencias de sensibilidad a estos inhibidores entre VRK1 y VRK2A. Así, VRK2A presentó mayor sensibilidad a los inhibidores

Indirubín-3-monoxima y SP600125 que VRK1. Ambas quinasas mostraron inhibición frente al IC261, aunque se pudo observar que la respuesta de inhibición era diferente entre VRK1 y VRK2A. Además, también se observó que la respuesta de inhibición fue similar para la actividad de autofosforilación y para la fosforilación del sustrato de histona H3. En el caso de la quinasa VRK2B, el patrón de inhibición fue el mismo que el de VRK2A, algo esperado debido a que ambas isoformas presentan una secuencia idéntica en el dominio catalítico.

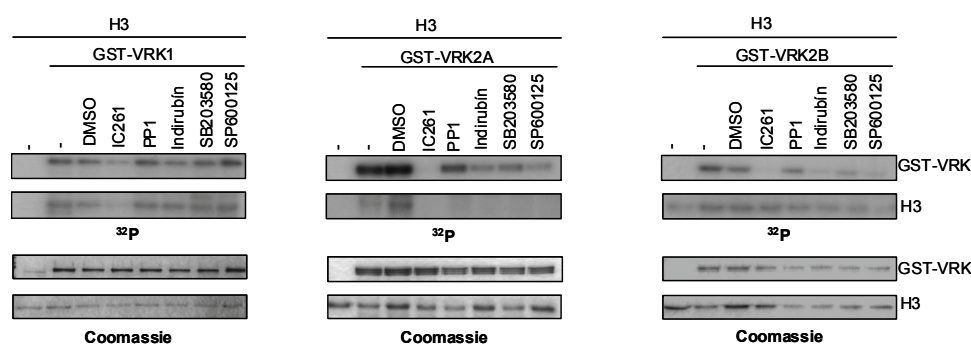


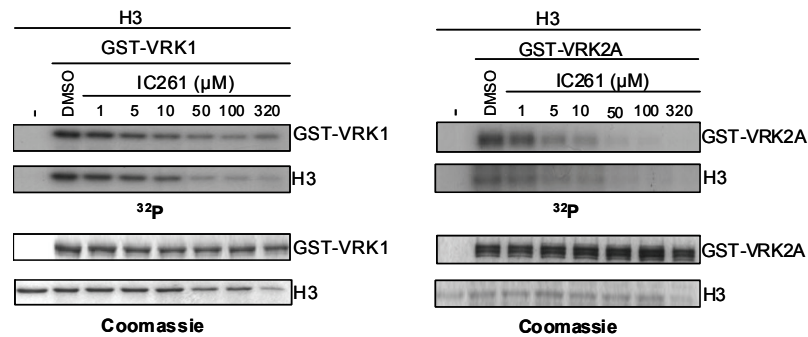
Figura 4.8. Efecto de inhibidores en la actividad quinasa de las proteínas VRK humanas. Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de las proteínas recombinantes GST-VRK1, GST-VRK2A y GST-VRK2B frente a 5 inhibidores a una concentración de 100 μM y utilizando 1 μg de la histona H3 recombinante como sustrato de fosforilación.

Una vez determinada la sensibilidad a una concentración elevada y fija, se estudiaron más detalladamente los inhibidores que parecían tener algún efecto a la concentración de 100 μM .

Para ello, se realizaron curvas de dosis de concentración de cada uno de los compuestos que presentaron inhibición (IC261, Indirubín-3-monoxima y SP600125), en un rango de concentraciones en el que la respuesta fuese lineal, para poder así determinar los valores de IC_{50} (concentración de inhibidor a la cual la actividad quinasa disminuye a la mitad).

El inhibidor ATP-competitivo IC261 (selectivo de la familia CK1) fue más efectivo inhibiendo a VRK2A que a VRK1 (Figura 4.9.A). Posteriormente se calcularon las rectas de regresión lineal (Figura 4.9.B) y el valor de la concentración para el compuesto a la que la actividad de la quinasa era del 50%, obteniéndose así un valor IC₅₀ de 11 μM en el caso de VRK2A y de 121 μM para VRK1 (Tabla 4.1).

A



B

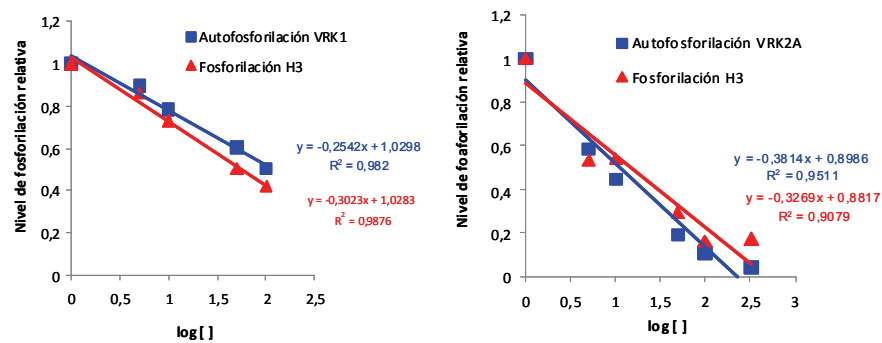


Figura 4.9. Diferente sensibilidad entre VRK1 y VRK2A al inhibidor IC261. A. Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de las proteínas recombinantes GST-VRK1 y GST-VRK2A frente a diferentes concentraciones del inhibidor IC261. Como sustrato de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante. B. Gráficas de regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK1 y VRK2A.

El inhibidor ATP-competitivo Indirubín-3-monoxima (selectivo de la familia CDKs) parece tener un leve efecto de inhibición sobre la VRK2A y VRK2B (Figura 4.8), por lo que se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con la proteína purificada GST-VRK2A en un rango de concentración de dicho compuesto entre 1 y 360 μM (rango en el que la respuesta de inhibición era lineal) y utilizando como sustato a la histona H3 recombinante (Figura 4.10.A). Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.10.B) y un valor de IC_{50} de 50 μM (Tabla 4.1).

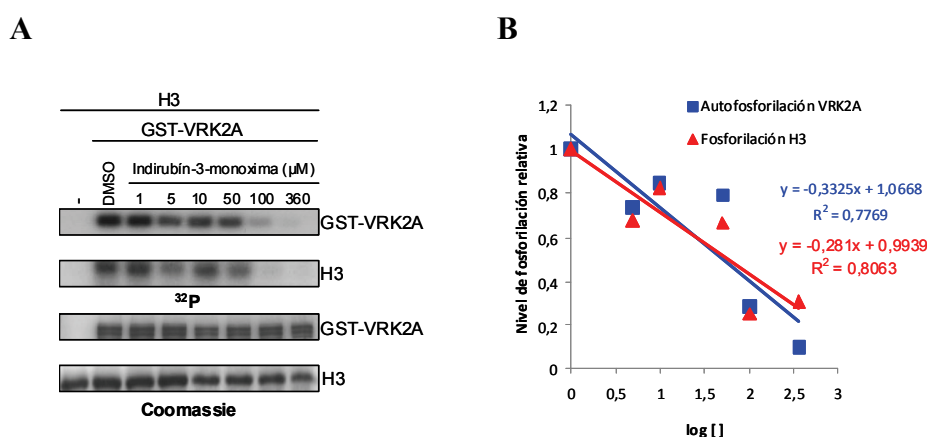


Figura 4.10. Sensibilidad de VRK2A frente al inhibidor Indirubín-3-monoxima. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK2A frente a diferentes concentraciones del inhibidor Indirubín-3-monoxima. Como sustrato de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante. **B.** Gráfica de regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK2A.

También se comprobó el efecto de inhibición del compuesto SP600125 (inhibidor de la JNK quinasa) ya que parecía tener un leve efecto de inhibición sobre VRK2A y VRK2B (Figura 4.8). Se realizaron ensayos quinasa en un rango de concentración del inhibidor entre 1 y 500 μM (rango en el que la respuesta de inhibición era lineal) y utilizando como sustato a la histona H3 recombinante (Figura 4.11.A). Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.11.B) y un valor de IC_{50} de 28 μM (Tabla 4.1).

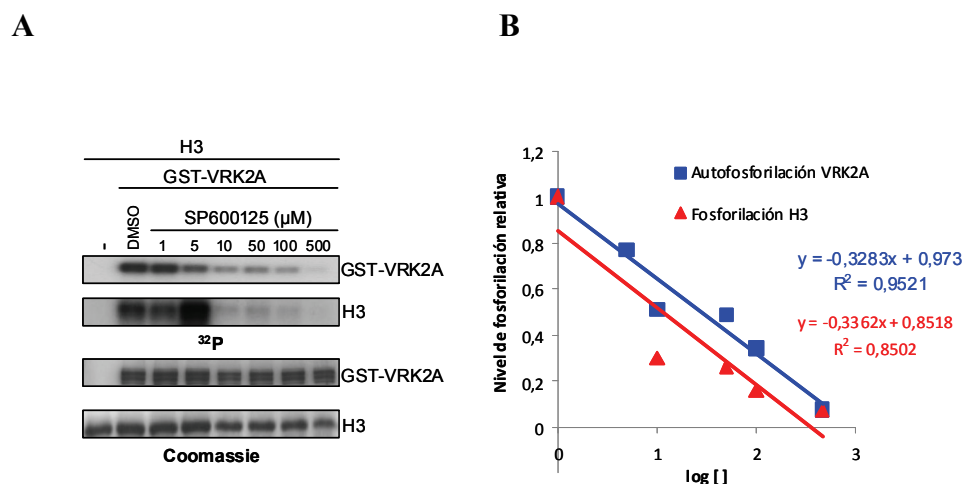


Figura 4.11. Sensibilidad de VRK2A frente al inhibidor SP600125. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK2A frente a diferentes concentraciones del inhibidor SP600125. Como sustrato de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante. **B.** Gráfica de regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK2A.

	IC ₅₀ (μM)			
	GST-VRK1		GST-VRK2A	
	Autofosf	Fosf H3	Autofosf	Fosf H3
IC261	121,39 ± 1,05	121,39 ± 1,05	11,09 ± 1,10	14,71 ± 1,13
PP1	-	-	-	-
Indirubín	-	-	50,66 ± 1,23	57,23 ± 1,17
SB203580	-	-	-	-
SP600125	-	-	27,59 ± 1,09	11,13 ± 1,21

Tabla 4.1. Sensibilidad de las proteínas humanas VRK1 y VRK2A a inhibidores quinasa. Se indican los valores de IC₅₀ junto con su desviación estándar (± SD) para los inhibidores frente a los que se detecta inhibición. El símbolo “-” hace referencia a que la actividad quinasa no se ve afectada o la inhibición es muy débil. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.2.2. Inhibidores comerciales y p53 como sustrato

Los inhibidores probados en este bloque son TDZD-8, TDZD-20, RO-31-8220, Inhibidor de la Cdk 1, Oxindol 1, Estaurosporina, AZD-7768, VX-680, PLX-4720, GDC-0879, Roscovitina y el sustrato utilizado en este caso fue la proteína GST-p53 expresada y purificada de cultivo de *E.coli*, que corresponde al fragmento que comprende del aminoácido 1 al 85 de la proteína p53 murina. Este panel de inhibidores fue probado por nuestro grupo de investigación, utilizando como sustrato la histona H3 recombinante comercial, por lo que se quiso comprobar si al cambiar el sustrato se producían diferencias en la efectividad de la autofosforilación y fosforilación de las VRKs.

Para ello se realizaron ensayos quinasa *in vitro* a una concentración de 100 μ M de cada inhibidor y se cuantificó la cantidad de fosfato incorporado, realizando una media de tres experimentos con su desviación típica y se representaron gráficamente.

En la figura 4.12 se puede observar como los inhibidores TDZD-8, RO-31-8220 y Estaurosporina provocan un efecto de inhibición mayor del 50 % sobre la actividad quinasa de VRK1. La Estaurosporina y su derivado, RO-31-8220, son inhibidores de PKC y presentan una fuerte afinidad por el sitio de unión a ATP de las proteínas quinasas. Mientras que TDZD-8 es un inhibidor no competitivo con el ATP frente a la quinasa GSK3.

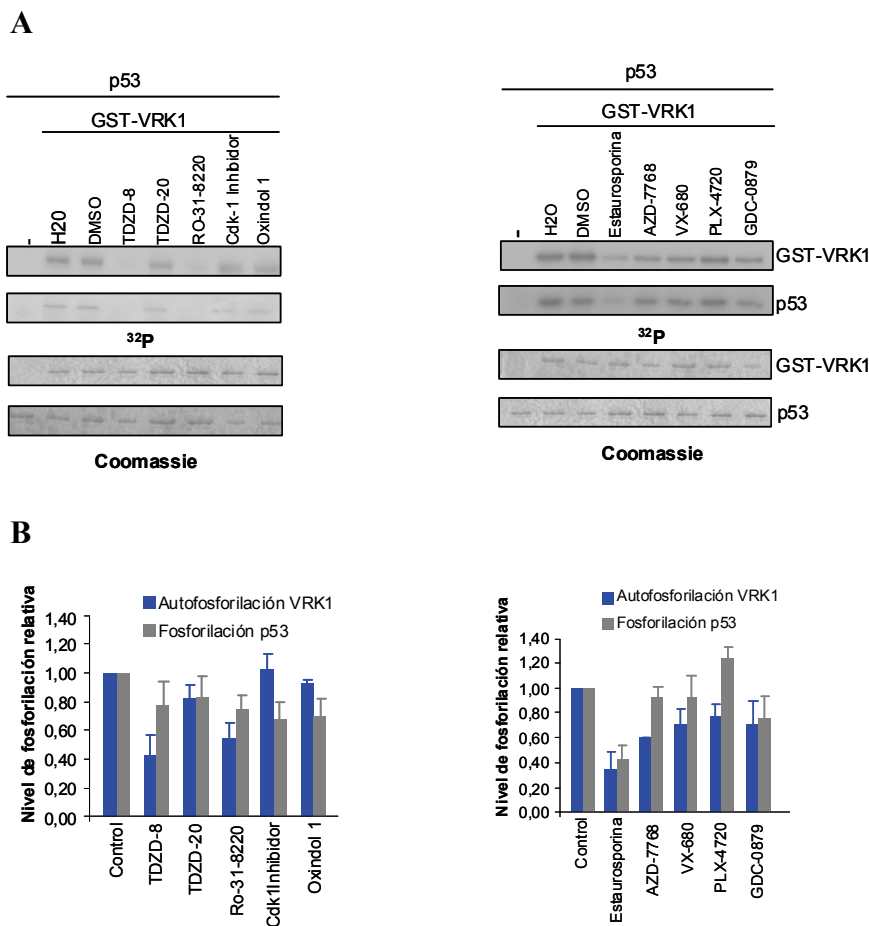
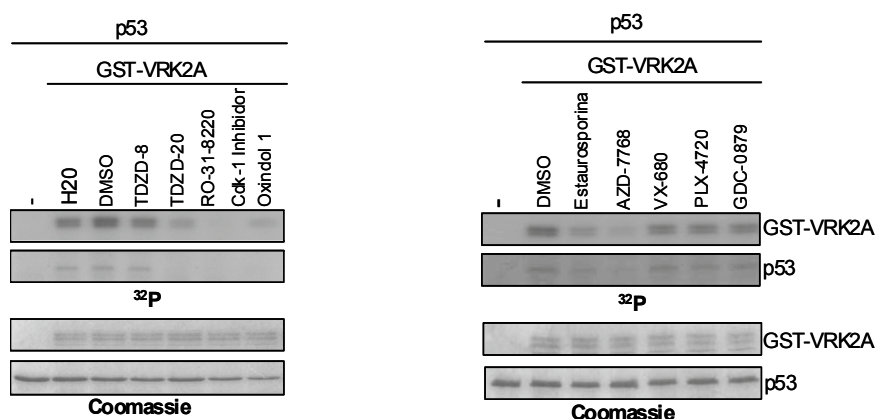


Figura 4.12. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad quinasa de la proteína humana VRK1. A. Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a 10 inhibidores a una concentración de 100 μ M y utilizando 2 μ g de la proteína GST-p53 como sustrato de fosforilación. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

En la figura 4.13. se puede observar como los inhibidores RO-31-8220, el Inhibidor de la Cdk1 y AZD-7762 provocan un efecto de inhibición mayor del 50 % sobre la actividad quinasa de VRK2A. Como ya se dijo anteriormente, RO-31-8220 es un inhibidor de las quinasas PKC y AZD-7768, es un inhibidor de las

quinasas CHK1/2. Los tres son inhibidores competitivos por el sitio de unión al ATP.

A



B

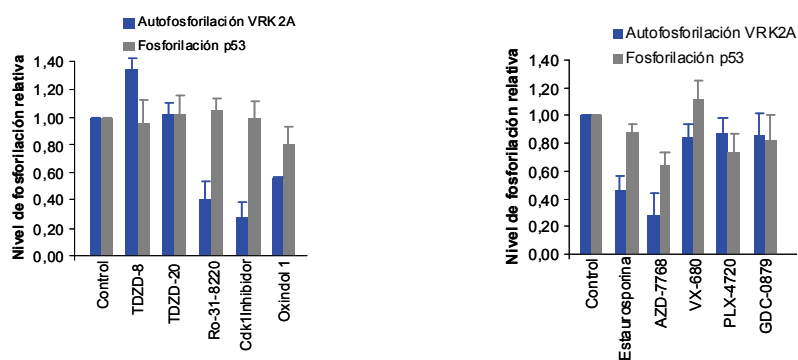
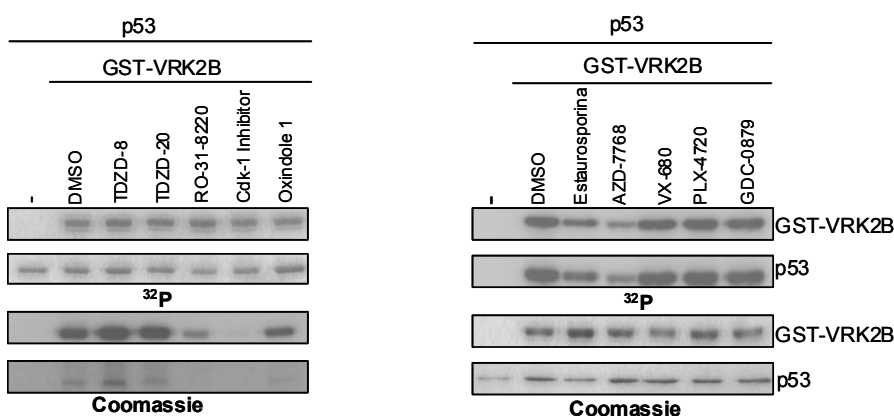


Figura 4.13. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad quinasa de la proteína humana VRK2A. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK2A frente a 10 inhibidores a una concentración de 100 μ M y utilizando 2 μ g de la proteína GST-p53 como sustrato de fosforilación. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

En la figura 4.14. se puede observar como sólo el compuesto AZD-7762 (inhibidor de las quinasas CHK1/2) provoca un efecto de inhibición mayor del 50 % sobre la actividad quinasa de VRK2B.

A



B

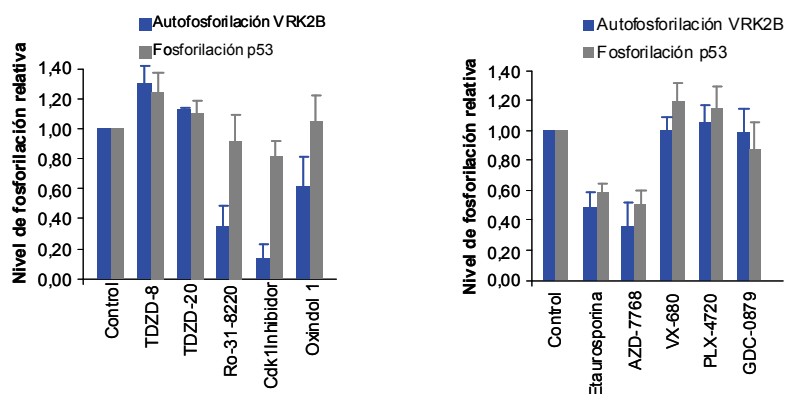


Figura 4.14. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad quinasa de la proteína humana VRK2B. A. Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK2B frente a 10 inhibidores a una concentración de 100 μ M y utilizando 2 μ g de la proteína GST-p53 como sustrato de fosforilación. B. Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Además de los anteriores inhibidores, se probó otro compuesto más, la Roscovitina, un inhibidor potente y selectivo de las Cdks y competitivo por el sitio de unión al ATP. En la figura 4.15 se muestran los ensayos quinasa *in vitro* frente a diferentes concentraciones de Roscovitina, ya que con este compuesto se habían obtenido resultados positivos en nuestro grupo de investigación utilizando un sustrato diferente (histona H3).

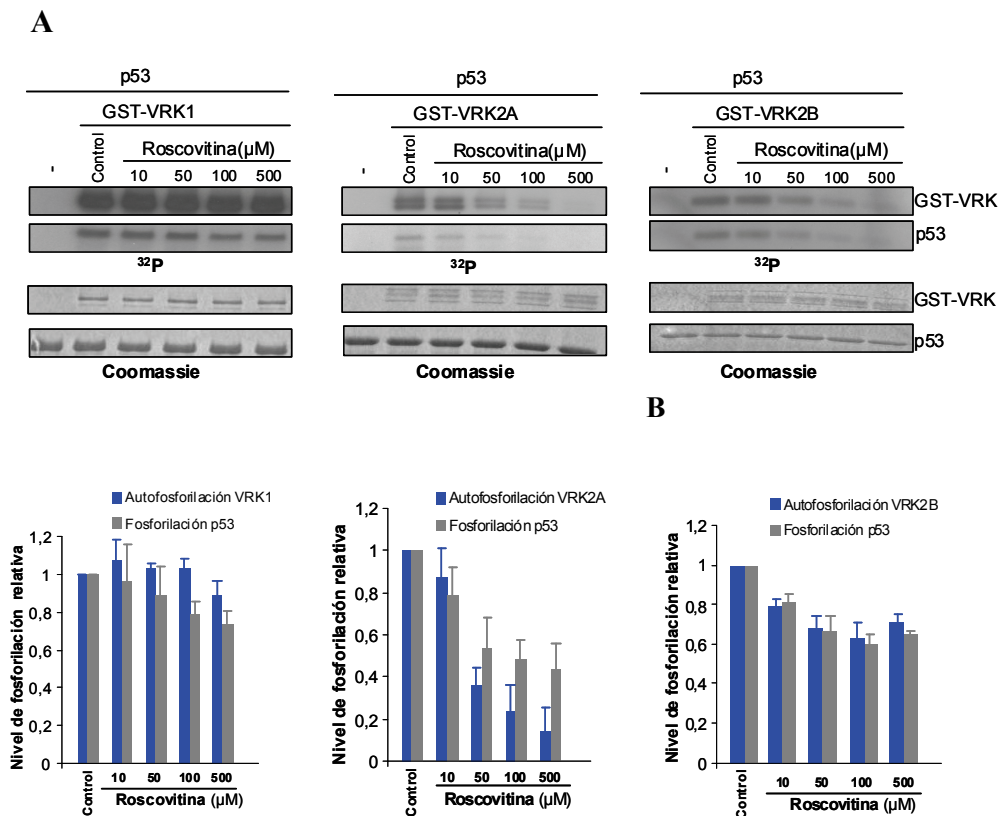


Figura 4.15. Sensibilidad de VRK2A frente al inhibidor Roscovitina. A. Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de las proteínas recombinante GST-VRK1, GST-VRK2A y GST-VRK2B frente a diferentes concentraciones del inhibidor Roscovitina. Como sustrato de fosforilación se utilizó 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Como se puede observar, VRK2A fue más sensible a Roscovitina, mientras que VRK1 y VRK2B sólo muestran inhibición a una concentración de 500 μM . Una vez realizados los ensayos quinasa con las diferentes concentraciones de roscovitina y cuantificada la cantidad de fosfato incorporado, se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.16.) y un valor de IC_{50} de $35,38 \pm 1,3 \mu\text{M}$ para la autofosforilación de VRK2A y de $2,13 \pm 1,08 \mu\text{M}$ para fosforilación del sustrato p53 (Tabla 4.2).

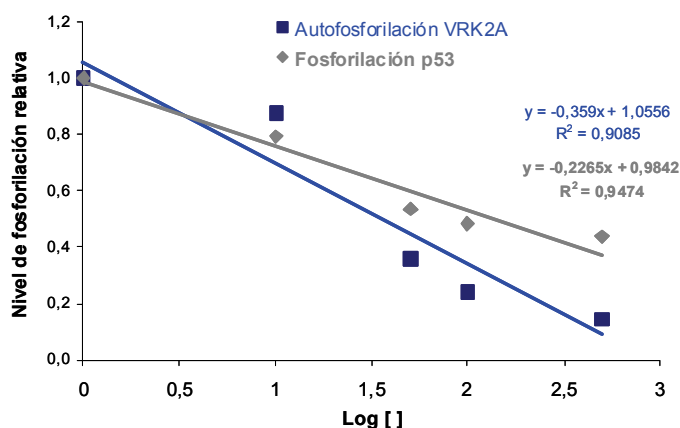


Figura 4.16. Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK2A a la Roscovitina. Se indican las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada una de ellas (R^2).

	IC_{50} (μM)			
	GST-VRK1		GST-VRK2A	
	Autofosf	Fosf p53	Autofosf	Fosf p53
Roscovitina	-	-	$35,38 \pm 1,30$	$2,13 \pm 1,08$

Tabla 4.2. Sensibilidad de las proteínas humanas VRK1 y VRK2A a la Roscovitina. Se indican los valores de IC_{50} junto con su desviación estándar (\pm SD). El símbolo “-“hace referencia a que la actividad quinasa no se ve afectada o la inhibición es muy débil. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.2.3. Inhibidores comerciales frente a B1R con H3 y p53 como sustratos.

Por último se realizó el mismo panel de inhibidores para la quinasa viral B1R, comprobándose que ninguno de estos 5 compuestos probados provocó efecto de inhibición ni a la concentración tan elevada de 100 μ M (Figura 4.17).

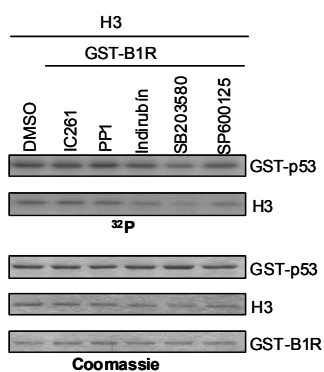


Figura 4.17. Efecto de inhibidores en la actividad quinasa de la proteína viral B1R. Ensayo quinasa *in vitro* con 2 μ g de las proteínas recombinantes GST-B1R frente a 5 inhibidores a una concentración de 100 μ M y utilizando 1 μ g de la histona H3 recombinante y 2 μ g de GST p53 como sustratos de fosforilación.

4.3. Estudio de la sensibilidad a diferentes metales de la familia de quinasas VRK y B1R.

Se realizó un estudio similar al descrito en el apartado 4.2., pero en este caso se probó el efecto que provocaron una serie de metales sobre la actividad quinasa de las diferentes VRKs y B1R.

4.3.1. Ambientales y ocupacionales.

En este primer bloque, se estudiaron los siguientes metales: cadmio, cobalto, cobre, mercurio y plomo.

Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con las proteínas recombinantes humanas VRK1, VRK2A, VRK2B y con la proteína viral B1R fusionadas al epítipo GST y se determinó el efecto de dichos metales en base a la actividad de autofosforilación de las quinasas y de fosforilación de dos sustratos diferentes, la histona H3 recombinante comercial o el supresor de tumores p53 fusionado a GST.

Para una primera aproximación, se fijó una concentración de 100 μ M para todos los metales, para ver si el comportamiento era similar o variable entre las diferentes proteínas humanas VRK.

VRK1 fue sensible al cadmio, cobre y mercurio con un porcentaje de inhibición de la actividad quinasa para la autofosforilación de 92, 98 y 96 % respectivamente (los valores para la fosforilación de cada uno de los sustratos siguen unos patrones muy similares a la autofosforilación) (Figura 4.18.; Tabla 4.3.).

VRK2A solamente fue sensible al cadmio y mercurio, y en menor medida que la VRK1, con unos porcentajes de inhibición de la autofosforilación de 72 y 24 % respectivamente (Figura 4.18.; Tabla 4.3.).

RESULTADOS

Por último, VRK2B, sólo fue ligeramente inhibida por el cadmio, con un 39 % de inhibición de la autofosforilación (Figura 4.18.; Tabla 4.3.).

A



B

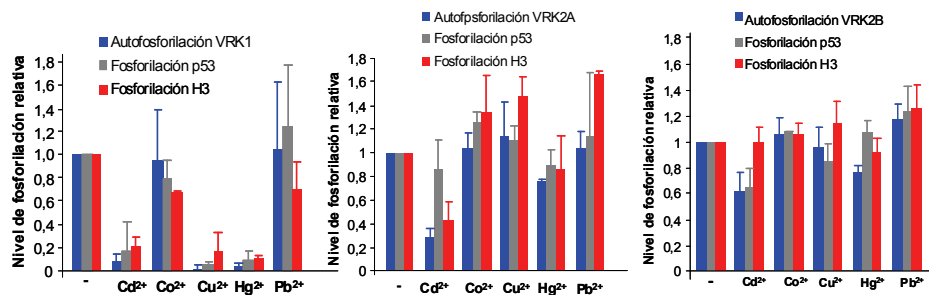


Figura 4.18. Efecto de metales en la actividad quinasa de las proteínas VRK humanas. **A.** Ensayos quinasa in vitro con 2 μ g de las proteínas recombinante GST-VRK1, GST-VRK2A y GST-VRK2B frente a una concentración 100 μ M de diferentes metales. Como sustratos de fosforilación se utilizó 2 μ g de GST-p53 y 1 μ g de H3 recombinante. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

RESULTADOS

En la Tabla 4.3. se muestran los porcentajes de inhibición de las proteínas humanas VRK tanto para la autofosforilación de las mismas, como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados, provocados por la acción de los metales que tuvieron algún efecto a la concentración de 100 μ M.

		% INHIBICIÓN		
		Cadmio	Cobre	Mercurio
VRK1	Autofosforilación	92 \pm 8	98 \pm 3	96 \pm 3
	Fosforilación p53	83 \pm 26	94 \pm 2	90 \pm 8
	Fosforilación H3	79 \pm 9	82 \pm 16	89 \pm 11
VRK2A	Autofosforilación	72 \pm 7	-	24 \pm 1
	Fosforilación p53	15 \pm 25	-	11 \pm 13
	Fosforilación H3	58 \pm 15	-	14 \pm 14
VRK2B	Autofosforilación	39 \pm 15	-	24 \pm 5
	Fosforilación p53	35 \pm 14	-	-
	Fosforilación H3	1 \pm 11	-	7 \pm 9

Tabla 4.3. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de las VRKs frente a los diferentes metales. El símbolo “-“hace referencia a que la actividad quinasa no se ve afectada o la inhibición es muy débil. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Una vez determinada la sensibilidad a una concentración elevada y fija, se estudiaron más detalladamente los metales que parecían tener algún efecto a la concentración de 100 μ M.

Para ello, se realizaron curvas de dosis de concentración de cada uno de los compuestos que presentaron inhibición, en un rango de concentraciones en el que

la respuesta fuese lineal, para poder así determinar los valores de IC_{50} (concentración de inhibidor a la cual la actividad quinasa disminuye a la mitad).

En el caso de la VRK1 se realizaron ensayos quinasa de curvas de concentración para el cadmio, cobre y mercurio en un rango de concentración de entre 1 y 100 μ M.

En la figura 19 se muestra el efecto del cadmio sobre la actividad quinasa de la proteína VRK1, observándose como a partir de la concentración de 50 μ M de cadmio existe una clara inhibición de la misma, tanto para la autofosforilación como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados.

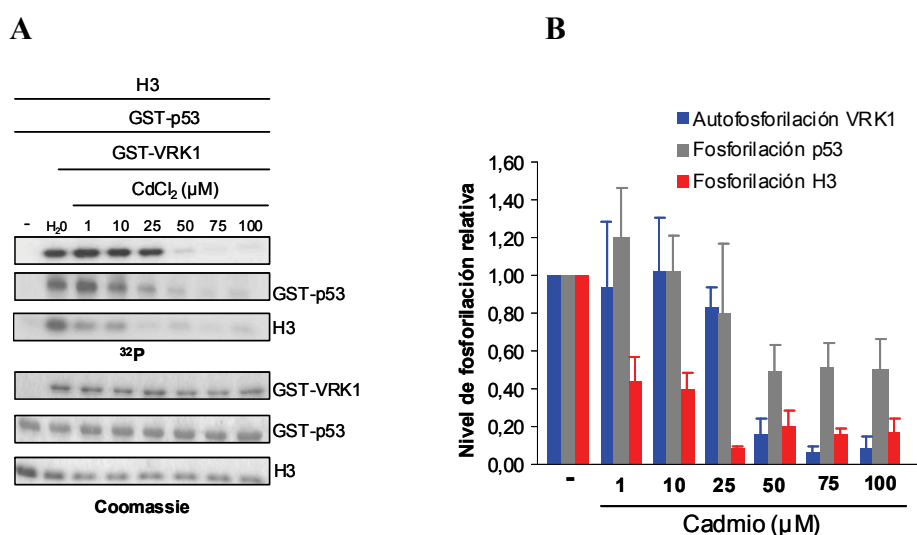


Figura 4.19. Sensibilidad de VRK1 frente al cadmio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μ g de histona H3 recombinante y 2 μ g de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Una vez realizados los ensayos quinasas con las diferentes concentraciones de cadmio y cuantificada la cantidad de fosfato incorporado, se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.20.) y un valor de IC_{50} de $22,02 \pm 1,44 \mu M$ para la autofosforilación y de $27,22 \pm 1,07 \mu M$ para fosforilación del sustrato p53 y de $34,85 \pm 1,20 \mu M$ para la fosforilación de la histona H3 (Tabla 4.4.).

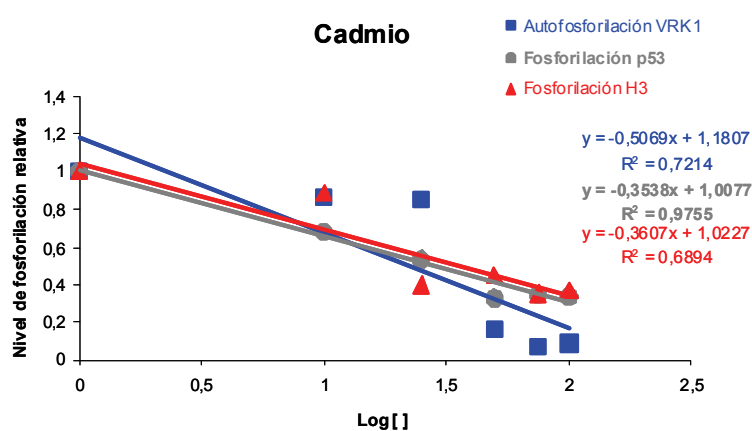


Figura 4.20. Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK1 debida al cadmio.

En la figura 4.21 se muestra el efecto del cobre sobre la actividad quinasas de la proteína VRK1, observándose como a partir de la concentración de $10 \mu M$ de cobre existe una clara inhibición de la misma, tanto para la autofosforilación como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados (Figura 4.21.A/B). Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.21.C.) y un valor de IC_{50} de $6,86 \pm 1,16 \mu M$ para la autofosforilación y de $8,67 \pm 1,18 \mu M$ para fosforilación del sustrato p53 y de $42,37 \pm 1,16 \mu M$ para la fosforilación de la histona H3 (Tabla 4.4.).

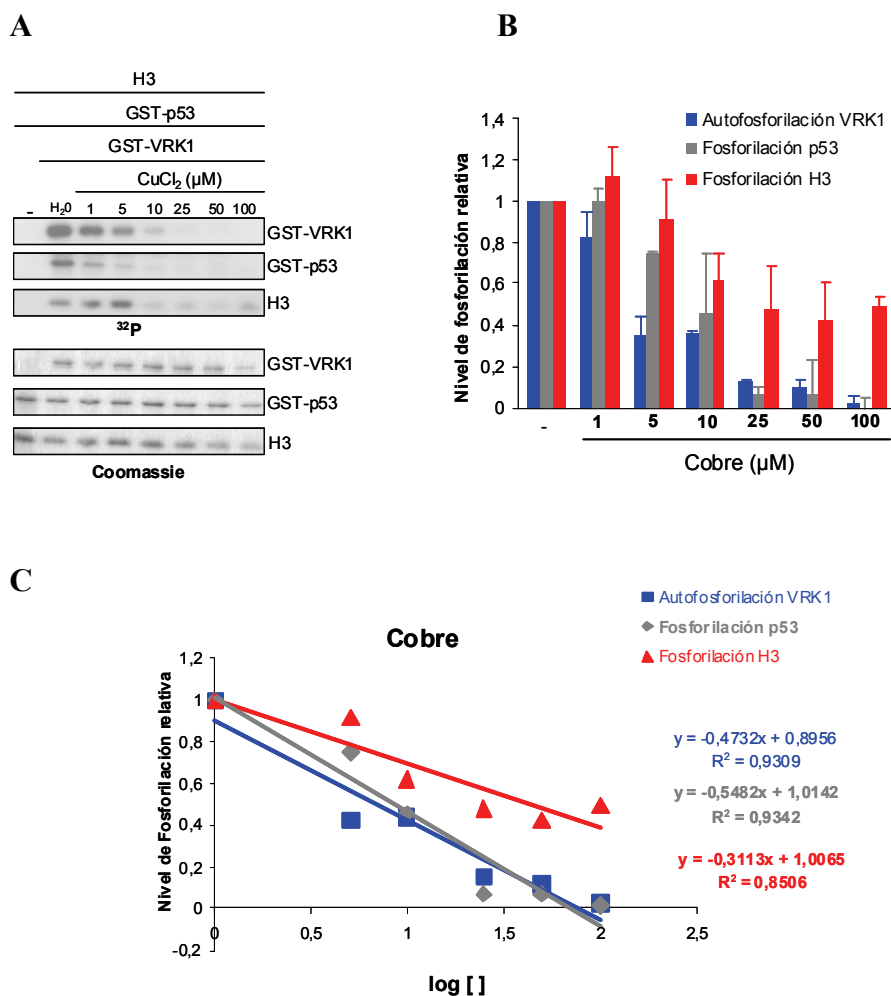


Figura 4.21. Sensibilidad de VRK1 frente al cobre. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica. **C.** Regresión lineal de la inhibición de VRK1 por cobre.

En la figura 4.22 se muestra el efecto del mercurio sobre la actividad quinasa de la proteína VRK1, observándose como a partir de la concentración de 10 μM de mercurio existe una clara inhibición de la misma, tanto para la autofosforilación como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados.

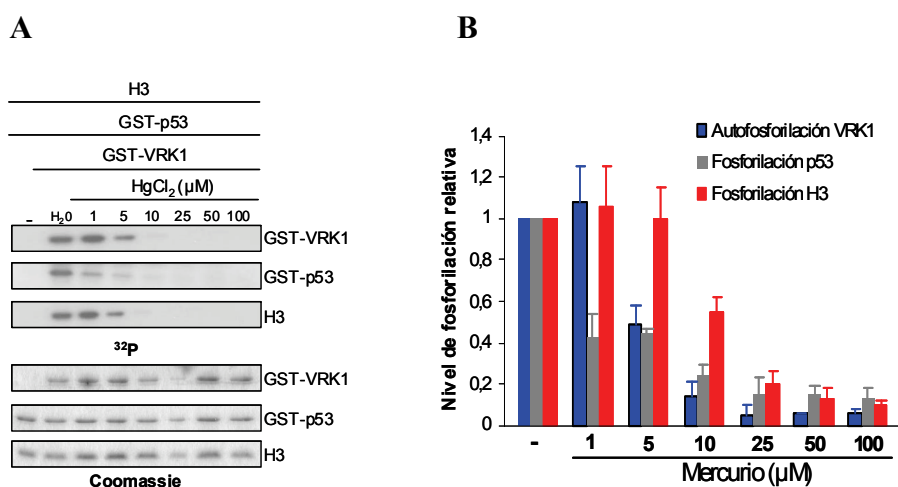


Figura 4.22. Sensibilidad de VRK1 frente al mercurio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.23.) y un valor de IC_{50} de $4,89 \pm 1,29 \mu\text{M}$ para la autofosforilación y de $23,03 \pm 1,25 \mu\text{M}$ para fosforilación del sustrato p53 y de $12,33 \pm 1,24 \mu\text{M}$ para la fosforilación de la histona H3 (Tabla 4.4).

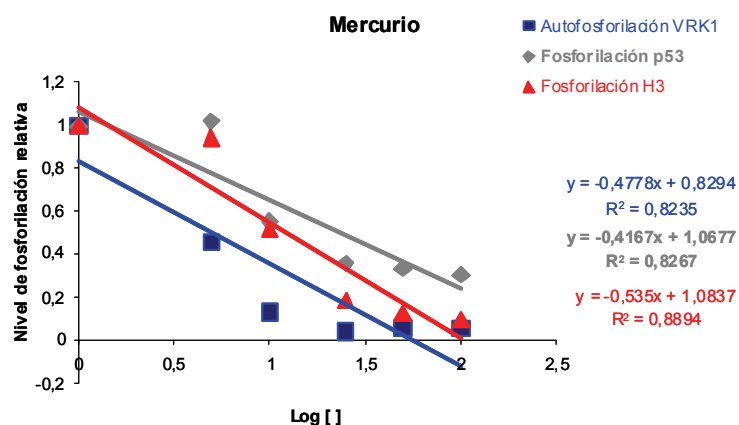


Figura 4.23. Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK1 debida al mercurio.

En el caso de la VRK2A se realizaron ensayos quimasa de curvas de concentración para los dos metales que provocaron inhibición a la concentración de 100 μM , que como se puede ver en la figura 4.18 y en la tabla 4.3., fueron el cadmio y en menor medida el mercurio. Se probaron en un rango de concentración de entre 1 y 100 μM .

En la figura 4.24.A/B se muestra el efecto del cadmio sobre la actividad quimasa de la proteína VRK2A, observándose como a partir de la concentración de 50 μM de cadmio existe una ligera inhibición de la misma, tanto para la autofosforilación como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados. Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.24.C.) y un valor de IC_{50} de $150,60 \pm 1,24 \mu\text{M}$ para la autofosforilación, pero tanto para la fosforilación del sustrato p53 como de la histona H3 son necesarias cantidades muy elevadas del metal para alcanzar el 50 % de inhibición de la actividad quimasa de VRK2A (Tabla 4.4.).

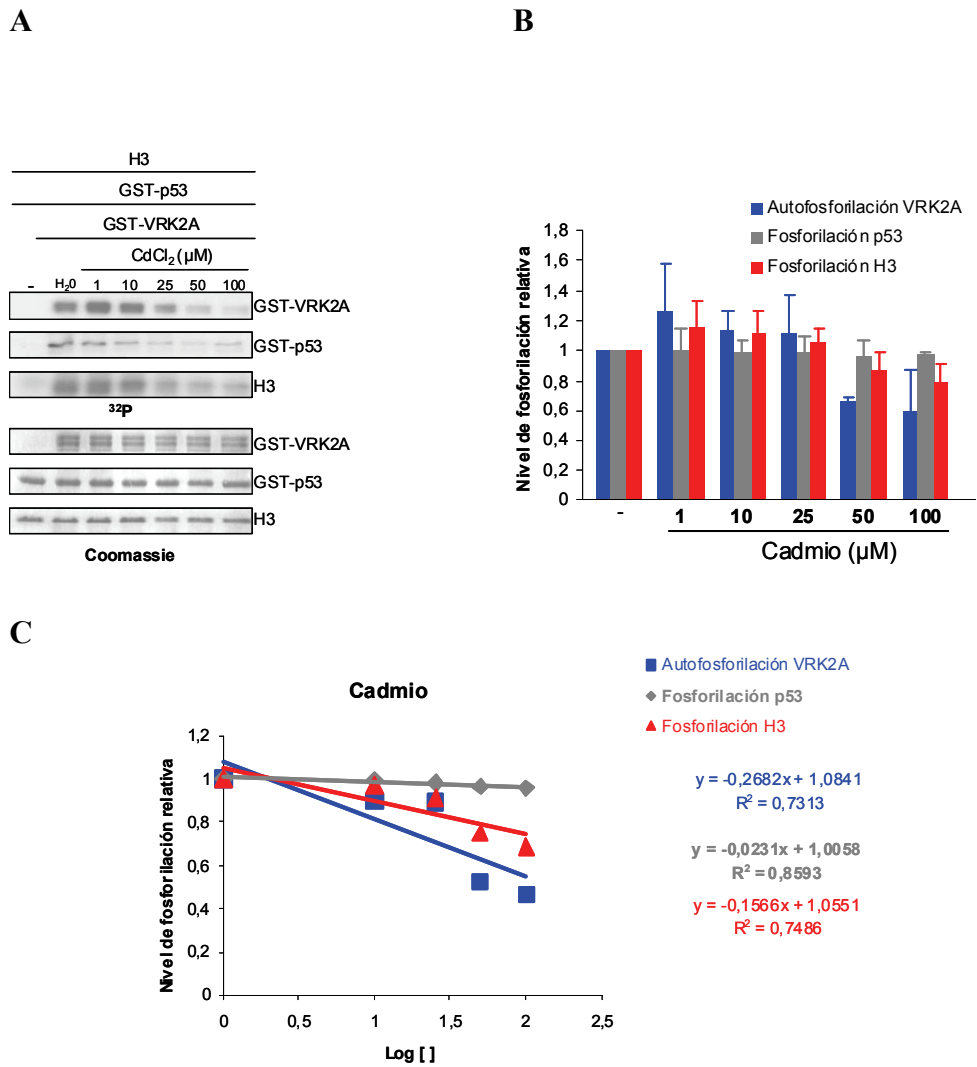


Figura 4.24. Sensibilidad de VRK2A frente al cadmio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK2A frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica. **C.** Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK2A debida al cadmio.

En la figura 4.25. se muestra el efecto del mercurio sobre la actividad quinasa de la proteína VRK2A, observándose como la inhibición de la misma debida a este metal es muy pequeña, tanto para la autofosforilación como para la fosforilación de los dos sustratos utilizados.

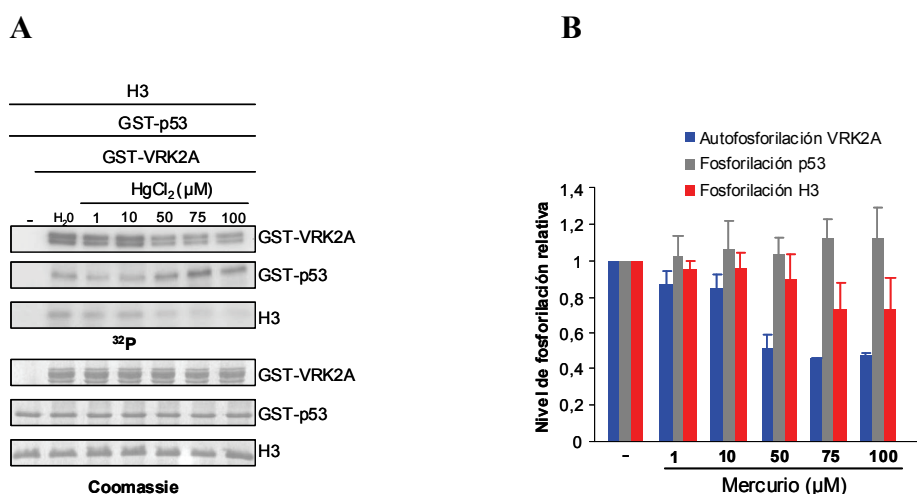


Figura 4.25. Sensibilidad de VRK2A frente al mercurio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.26.) y un valor de IC₅₀ de 153,74 ± 1,17 μM para la autofosforilación pero tanto para la fosforilación del sustrato p53 como de la histona H3 son necesarias cantidades muy elevadas del metal para alcanzar el 50 % de inhibición de la actividad quinasa de VRK2A (Tabla 4.4.).

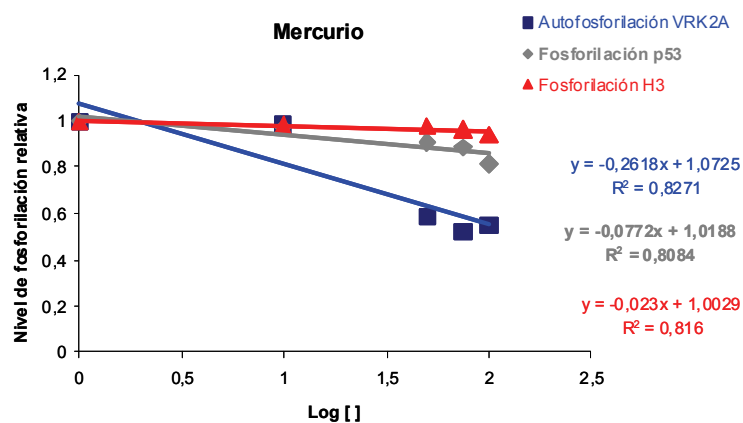


Figura 4.26. Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de VRK2A debida al mercurio.

		IC ₅₀ (μM)		
		Cadmio	Cobre	Mercurio
VRK1	Autofosforilación	22,02 ± 1,44	6,86 ± 1,16	4,89 ± 1,29
	Fosforilación p53	27,22 ± 1,07	8,67 ± 1,18	23,03 ± 1,25
	Fosforilación H3	34,85 ± 1,20	42,37 ± 1,16	12,33 ± 1,24
VRK2A	Autofosforilación	150,60 ± 1,24	-	153,74 ± 1,17
	Fosforilación p53	-	-	-
	Fosforilación H3	3505 ± 1,12	-	-

Tabla 4.4. Sensibilidad de las proteínas humanas VRK1 y VRK2A a diferentes metales. Se indican los valores de IC₅₀ junto con su desviación estándar (± SD). El símbolo “-” hace referencia a que la actividad quinasa no se ve afectada o la inhibición es muy débil. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Por último, se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con la proteína viral B1R fusionada al epítipo GST y se determinó el efecto de dichos metales en base solamente a la actividad de fosforilación de dos sustratos diferentes, la histona H3 recombinante comercial o el supresor de tumores p53 fusionado a GST, debido a la poca actividad de autofosforilación que B1R presenta.

Para una primera aproximación, se fijó una concentración de 100 μ M para los metales y se observó que B1R siguió un patrón similar a VRK1, siendo inhibida por el cadmio, cobre y mercurio (Tabla 4.5. y Figura 4.27.).

		% INHIBICIÓN		
		Cadmio	Cobre	Mercurio
B1R	Fosforilación p53	69 \pm 11	70 \pm 5	82 \pm 4
	Fosforilación H3	50 \pm 21	65 \pm 14	64 \pm 21

Tabla 4.5. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de las B1R frente a diferentes metales. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

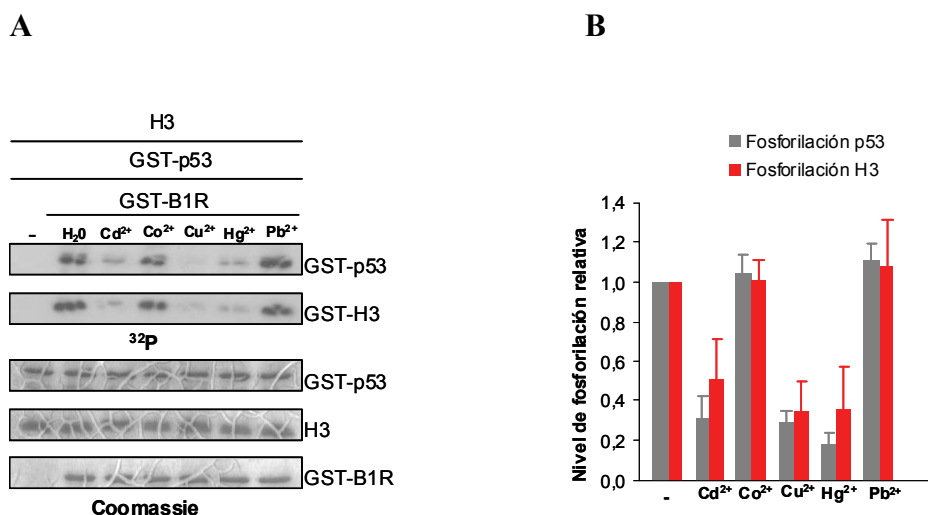


Figura 4.27. Efecto de metales en la actividad quinasa de la proteína B1R. A. Ensayos quinasa in vitro con 2 μ g de las proteínas recombinante GST-B1R frente a una concentración 100 μ M de diferentes metales. Como sustratos de fosforilación se utilizó 2 μ g de GST-p53 y 1 μ g de H3 recombinante. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Se realizaron curvas de dosis de concentración de cada uno de los compuestos que presentaron inhibición, en un rango de concentraciones en el que la respuesta fuese lineal, entre 1 y 100 μ M, para el cadmio, cobre y mercurio.

En la figura 4.28 se muestra el efecto del cadmio sobre la actividad quinasa de la proteína B1R, observándose como para la fosforilación del sustrato p53 a partir de una concentración 50 μ M de cadmio existe una inhibición de la misma, de aproximadamente el 50 %. Sin embargo, la fosforilación de la histona H3 no parece verse afectada por dicho metal. Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.28.C) y un valor de IC₅₀ de $48,5 \pm 1,17$ μ M para la fosforilación del sustrato p53 pero para la fosforilación de la histona H3 son necesarias cantidades muy elevadas del metal para alcanzar el 50 % de inhibición de la actividad quinasa de B1R (Tabla 4.6.).

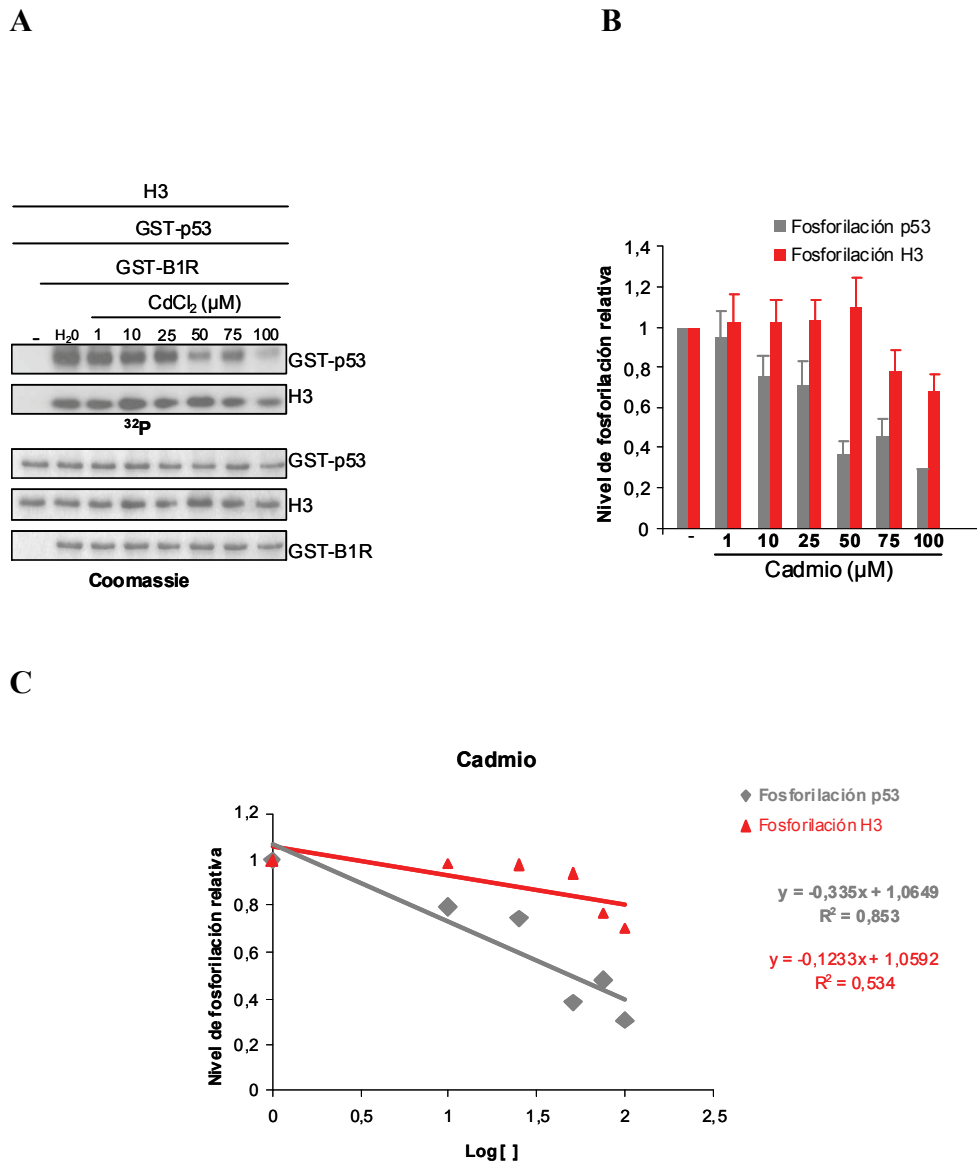


Figura 4.28. Sensibilidad de B1R frente al cadmio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-B1R frente a diferentes concentraciones de cadmio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica. **C.** Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de B1R debida al cadmio.

En la figura 4.29 se muestra el efecto del cobre sobre la actividad quinasa de la proteína B1R, observándose como tanto para la fosforilación del sustrato p53 como para la fosforilación de la histona H3, hay una alta inhibición incluso a la concentración probada más pequeña (1 μM) del metal.

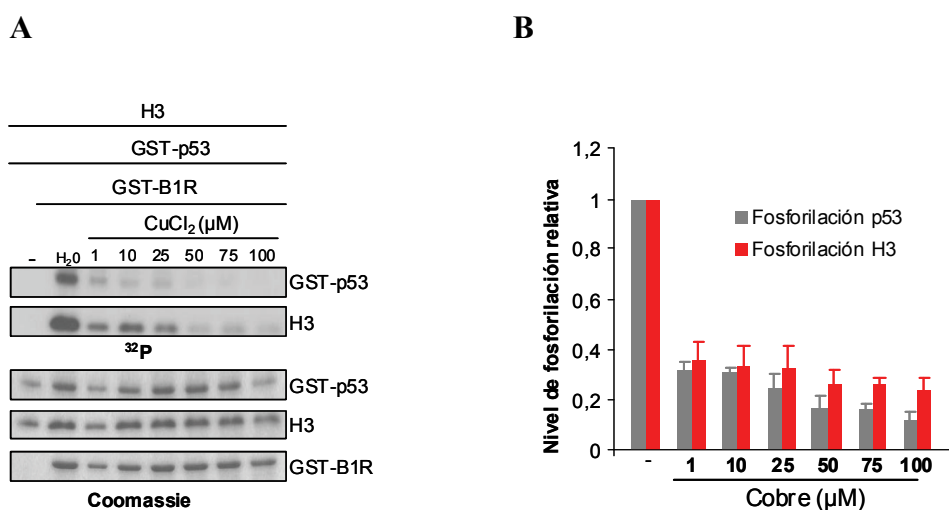


Figura 4.29. Sensibilidad de B1R frente al cobre. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-B1R frente a diferentes concentraciones de cobre. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.30) y un valor de IC_{50} de $0,089 \pm 1,06 \mu\text{M}$ para la fosforilación del sustrato p53 y de $0,015 \pm 1,03 \mu\text{M}$ para la fosforilación de la histona H3 por parte de la quinasa viral B1R (Tabla 4.6).

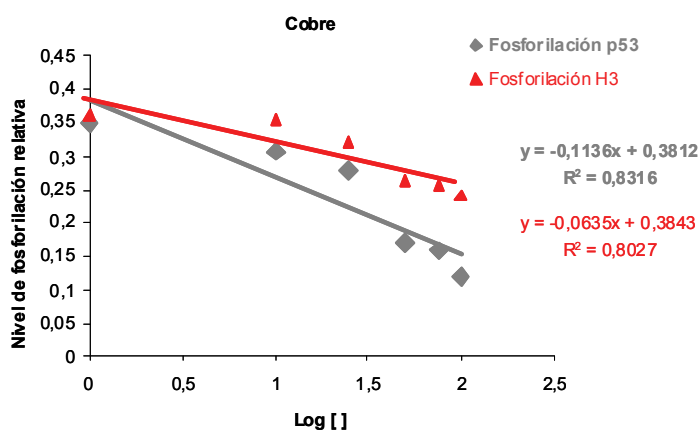


Figura 4.30. Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de B1R debida al cobre.

En la figura 4.31 se muestra el efecto del mercurio sobre la actividad quinasa de la proteína B1R, observándose como tanto para la fosforilación del sustrato p53 como para la fosforilación de la histona H3, existe una alta inhibición incluso a concentraciones pequeñas del metal, aunque algo mayores que con el cobre. Se obtuvo la recta de regresión lineal (Figura 4.31.C) y un valor de IC_{50} de $5,95 \pm 1,15 \mu\text{M}$ para la fosforilación del sustrato p53 y de $7,60 \pm 1,13 \mu\text{M}$ para la fosforilación de la histona H3 por parte de la quinasa viral B1R (Tabla 4.6.).

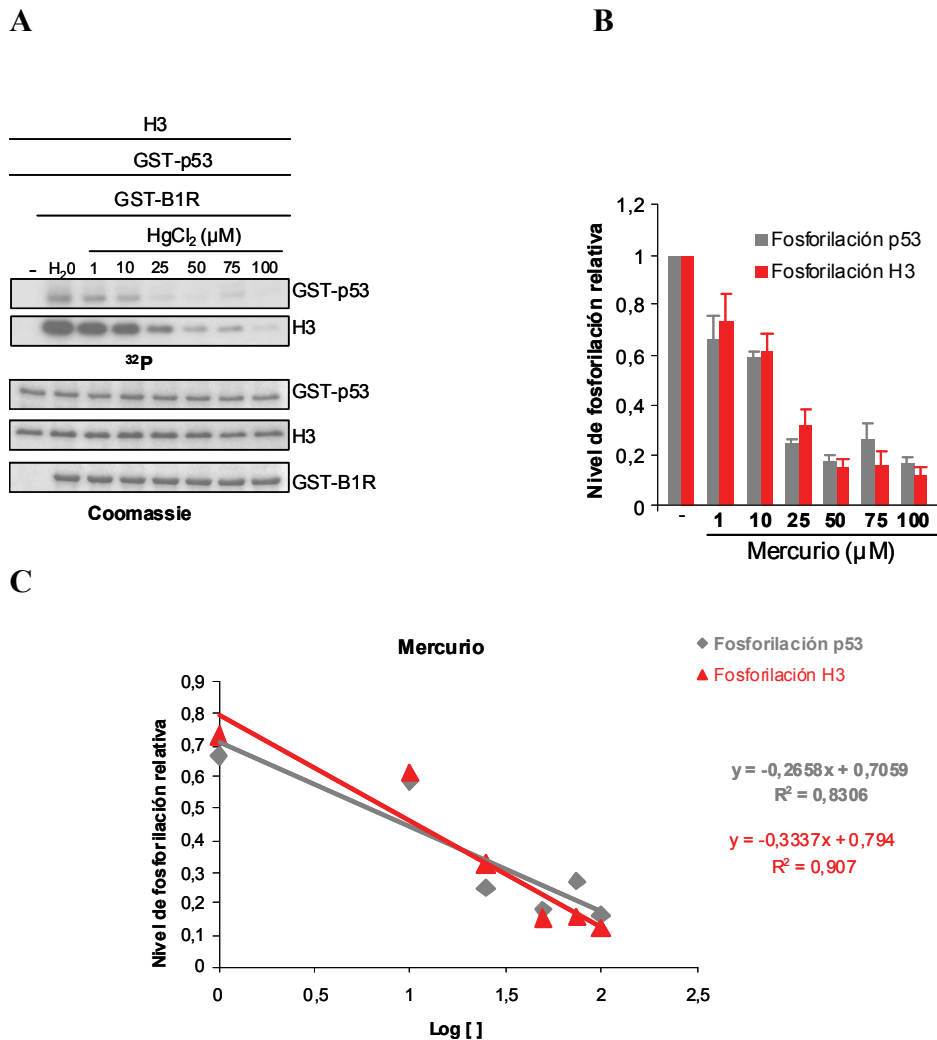


Figura 4.31. Sensibilidad de B1R frente al mercurio. **A.** Ensayos quinasa *in vitro* con 2 μg de la proteína recombinante GST-B1R frente a diferentes concentraciones de mercurio. Como sustratos de fosforilación se utilizó 1 μg de histona H3 recombinante y 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por los sustratos. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica. **C.** Regresión lineal de la respuesta de inhibición de la actividad de B1R debida al mercurio.

		IC ₅₀ (μM)		
		Cadmio	Cobre	Mercurio
B1R	Fosforilación p53	48,50 ± 1,17	0,089 ± 1,06	5,95 ± 1,15
	Fosforilación H3	-	0,015 ± 1,03	7,60 ± 1,13

Tabla 4.6. Sensibilidad de las proteínas humanas VRK1 y VRK2A a diferentes metales. Se indican los valores de IC₅₀ junto con su desviación estándar (± SD). El símbolo “-” hace referencia a que la actividad quinasa no se ve afectada o la inhibición es muy débil. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

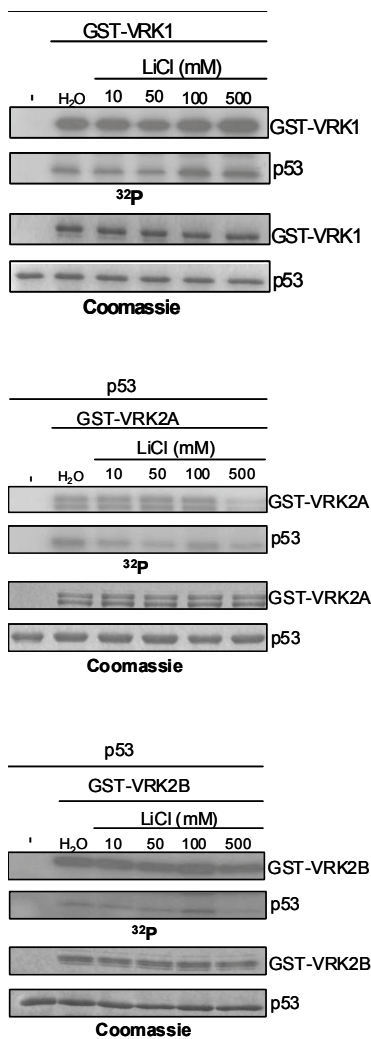
4.3.2. Litio

Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con las proteínas recombinantes humanas VRK1, VRK2A y VRK2B fusionadas al epítipo GST y se determinó el efecto de litio en base a la actividad de autofosforilación de las quinasa y de fosforilación del sustrato supresor de tumores p53 fusionado a GST.

Se probaron concentraciones milimolares, en un intervalo de 10 a 500 mM, para ver si el comportamiento era similar o variable entre las diferentes proteínas humanas VRK.

A la vista de los resultados que se muestran en la figura 32, se observó que ninguna de las 3 proteínas VRK se vieron afectadas por la utilización de litio, ni en lo que se refiere a la capacidad de autofosforilación de las mismas ni la capacidad de fosforilar al sustrato p53. Tan sólo VRK2A, a la concentración más alta utilizada (500 mM) presentaba una ligera inhibición (aproximadamente del 20 %).

A



B

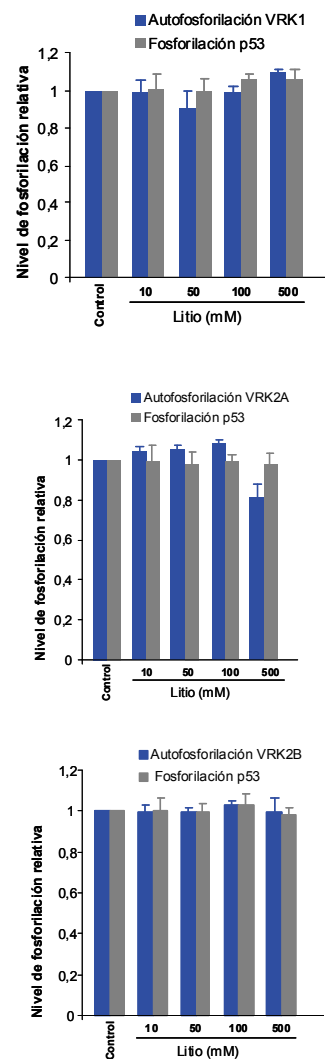


Figura 4.32. Efecto del litio en la actividad quinasa de las proteínas VRK humanas. A. Ensayos quinasa in vitro con 2 μ g de las proteínas recombinantes GST-VRK1, GST-VRK2A y GST-VRK2B frente a diferentes concentraciones de litio y utilizando 2 μ g de GST-p53 como sustrato de fosforilación. B. Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.3.3. Zinc

Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con las proteínas recombinantes humanas VRK1, VRK2A y VRK2B fusionadas al epítipo GST y se determinó el efecto del zinc en base a la actividad de autofosforilación de las quinasas y de la fosforilación del sustrato supresor de tumores p53 fusionado a GST.

Se probaron concentraciones micromolares, en un amplio intervalo de 0,05 a 10000 μM , para ver si el comportamiento era similar o variable entre las diferentes proteínas humanas VRK.

Como se puede observar en la figura 4.33., existen diferencias según la VRK de la que se trate.

VRK1 presenta una inhibición de su actividad quinasa a partir de 100 μM , alcanzándose un 50 % de inhibición de la autofosforilación de la enzima en el punto 100 μM . Pero esta es una concentración demasiado alta ya que el zinc parece afectar a la estructura de la enzima (como se puede observar el Coomassie de la figura 4.33.A) en las concentraciones más altas utilizadas. En cuanto a lo que se refiere a la fosforilación del sustrato, se observa un aumento de la actividad quinasa en las concentraciones centrales probadas, y tanto en las concentraciones más pequeñas como en las mayores, parece haber una ligera inhibición. En este caso, observando el Coomassie, se ve que la estructura de p53 parece no estar afectada, si bien es cierto que al estar afectada la proteína VRK1, puede que ya no sea capaz de fosforilar al sustrato.

VRK2A y VRK2B resultaron ser menos sensibles al zinc, ya que la autofosforilación no se ve inhibida hasta las concentraciones más altas, en las cuales parece estar afectada la estructura de la enzima (como se puede observar los Coomassies de la figura 4.33.A). En cuanto a la fosforilación del sustrato, siguió un perfil similar al caso anterior, con una pequeña subida de la actividad quinasa en las concentraciones centrales y después una disminución de la misma.

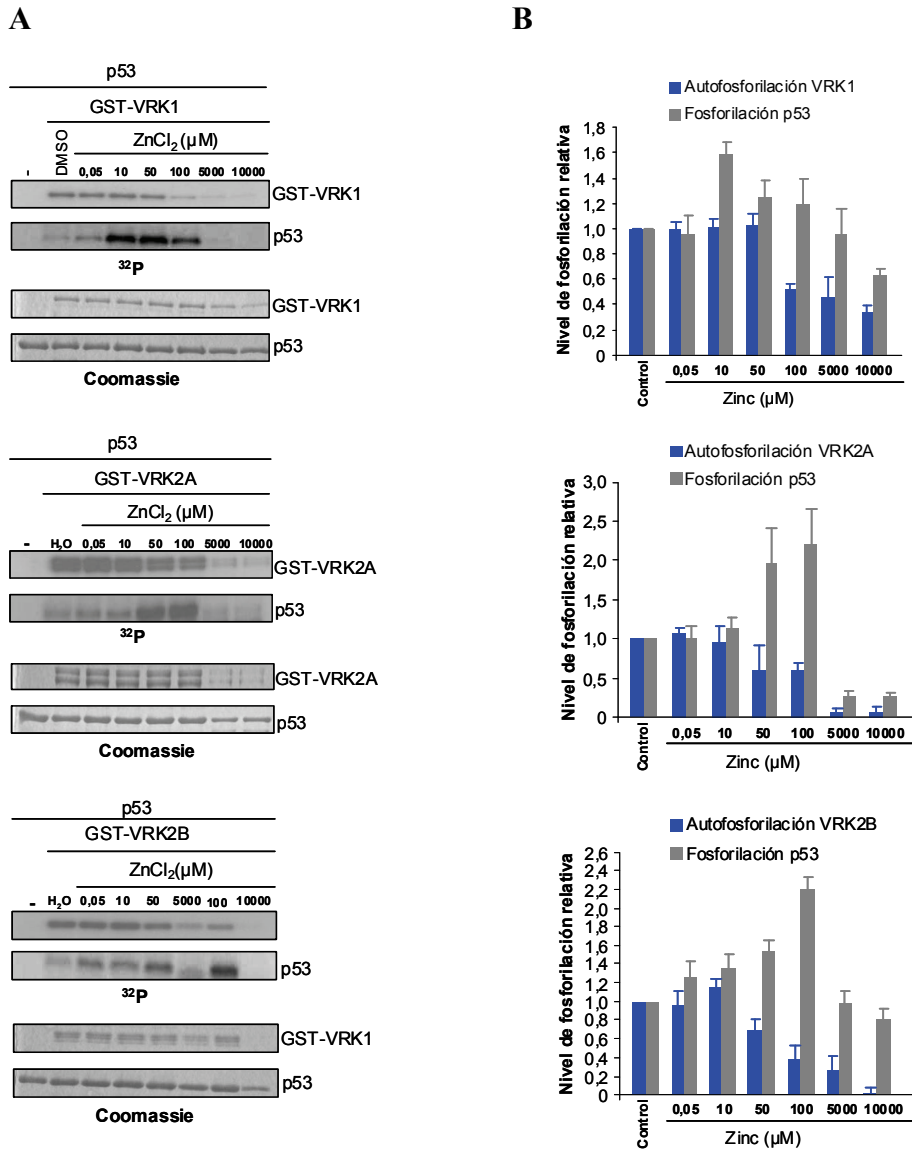


Figura 4.33. Efecto del zinc en la actividad quinasa de las proteínas VRK humanas. **A.** Ensayos quinasa in vitro con 2 μg de las proteínas recombinantes GST-VRK1, GST-VRK2A y GST-VRK2B frente a diferentes concentraciones de zinc y utilizando 2 μg de GST-p53 como sustrato de fosforilación. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.4. Combinaciones de inhibidores con metales.

A continuación se probaron algunos de los inhibidores testados en el apartado 4.3.1 con alguno de los metales utilizados en el apartado 4.3.2. para comprobar si con la combinación de ambos se conseguían mejores resultados que con la utilización de cada compuesto por separado.

4.4.1. Cadmio

Como ya vimos anteriormente, el cadmio provocaba un efecto de inhibición tanto en la VRK1 como en la VRK2A, aunque en diferente medida, siendo más efectiva la inhibición de la actividad quinasa sobre la VRK1 (con una IC_{50} de $22,02 \pm 1,44 \mu\text{M}$) que sobre VRK2A (con una IC_{50} de $150,60 \pm 1,24 \mu\text{M}$).

Sin embargo, se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con la proteína VRK2A, ya que resultó ser más sensible a diferentes inhibidores y también lo es al cadmio, para ver si se obtenía una potenciación de la inhibición de la actividad quinasa con la combinación de ambos. Para ello se eligieron 5 compuestos de los que se había obtenido un efecto inhibitorio (RO-31-220, Inhibidor de la Cdk1, AZD-7762, IC261 y Roscovitina) y uno más (Oxindol 1) que no provocó efecto inhibitorio sobre la VRK2A.

Se utilizaron concentraciones de inhibidores menores a los valores de IC_{50} , tanto para el metal (el valor de IC_{50} es de $150,60 \pm 1,24 \mu\text{M}$ como se muestra en la tabla 4.4. y la concentración utilizada en este caso es de tan sólo $25 \mu\text{M}$) y para los diferentes inhibidores (los valores de IC_{50} están en el intervalo de 11 a $40 \mu\text{M}$ y la concentración utilizada en este caso es de tan sólo $5 \mu\text{M}$).

Como se puede observar en la figura 4.34., la inhibición provocada por la combinación de metal con inhibidor era mayor que la alcanzada por cada uno de los compuestos por separado.

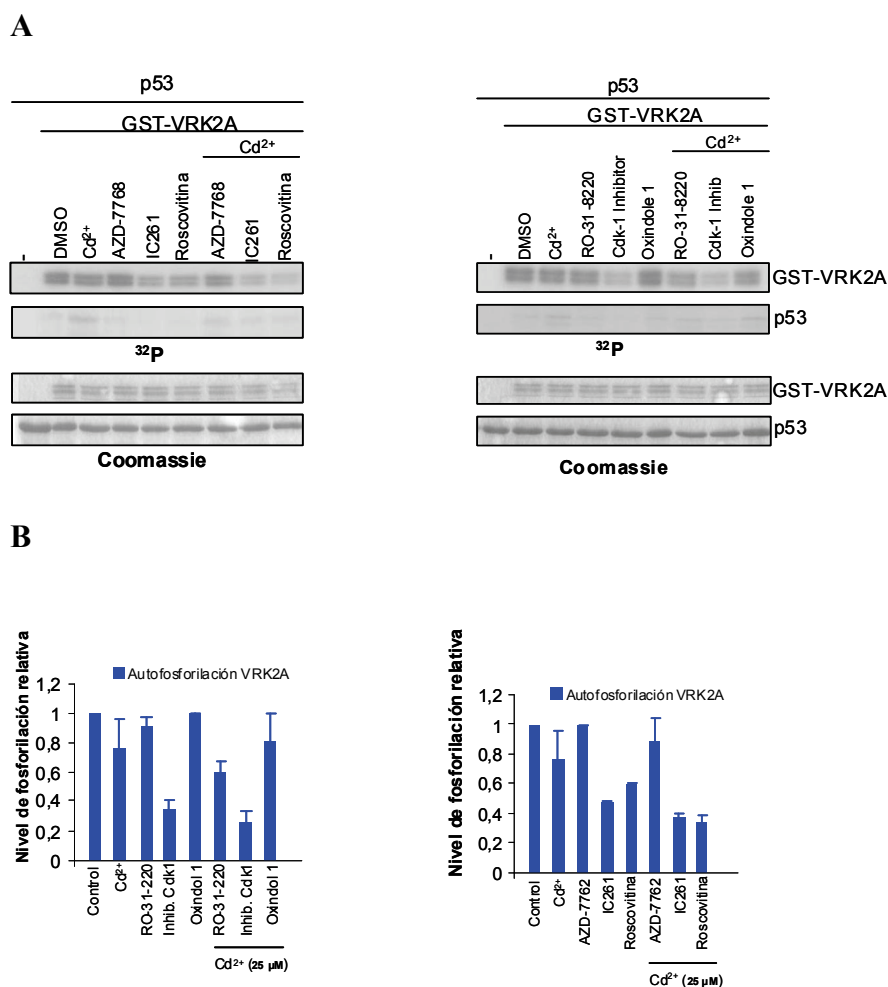


Figura 4.34. Sensibilidad de VRK2A frente a la combinación de diferentes inhibidores con el cadmio. **A.** Ensayos quinasa in vitro con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK2A frente a una concentración de 25 μ M de cadmio y 5 μ M de los diferentes inhibidores. Como sustrato de fosforilación se utilizó 2 μ g de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

En la tabla 4.7. se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de la VRK2A, para el compuesto inhibidor como para la combinación de dicho compuesto con el cadmio. Se observa un ligero aumento de la inhibición cuando se utiliza la combinación.

	% INHIBICIÓN	
	Inhibidor	Inhibidor + Cd
RO-31-220	10 ± 7	41 ± 6
Inhibidor Cdk1	66 ± 6	74 ± 7
Oxindol 1	1,0 ± 0,5	19 ± 18
AZD-7762	0 ± 1	11 ± 14
IC261	53 ± 1	63 ± 2
Roscovitina	41 ± 5	66 ± 5

Tabla 4.7. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de VRK2A debido a diferentes inhibidores utilizados individualmente o en combinación con el metal cadmio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.4.2. Litio

Otro de los metales probados para las combinaciones fue el litio, a pesar de que no se obtuvieron resultados de inhibición de la actividad quinasa sobre ninguna de las VRKs. En este caso la quinasa utilizada fue la VRK1.

En cuanto a los inhibidores probados fueron: IC261, PP1, Indirubín-3-monoxima y Roscovitina. De estos, tan sólo el compuesto IC261 fue capaz de provocar un efecto inhibitorio sobre la actividad quinasa de VRK1, con un valor de IC_{50} de $121,39 \pm 1,05 \mu\text{M}$, como ya vimos anteriormente.

Las concentraciones probadas en las combinaciones fueron de 1 y 50 mM para el litio y de 10, 50 y 100 μM para los diferentes inhibidores.

En el caso del inhibidor IC261, se obtuvo un $49 \pm 23 \%$ de inhibición de la actividad quinasa de VRK1 cuando se utilizó la combinación de 10 μM de IC261 más 50 mM de litio. Y se observó, que cuando la cantidad de litio era menor (1 mM), era necesario aumentar la cantidad de IC261 hasta 50 μM para conseguir la misma inhibición de la actividad quinasa de VRK1 (Tabla 4.8.; Figura 4.35.)

		% INHIBICIÓN	
		Li = 1 mM	Li = 50 mM
IC261	10 μM	26 \pm 10	49 \pm 23
	50 μM	60 \pm 4	73 \pm 13
	100 μM	72 \pm 9	68 \pm 22

Tabla 4.8. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de VRK1. Datos de las diferentes combinaciones a diferentes concentraciones de IC261 y litio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

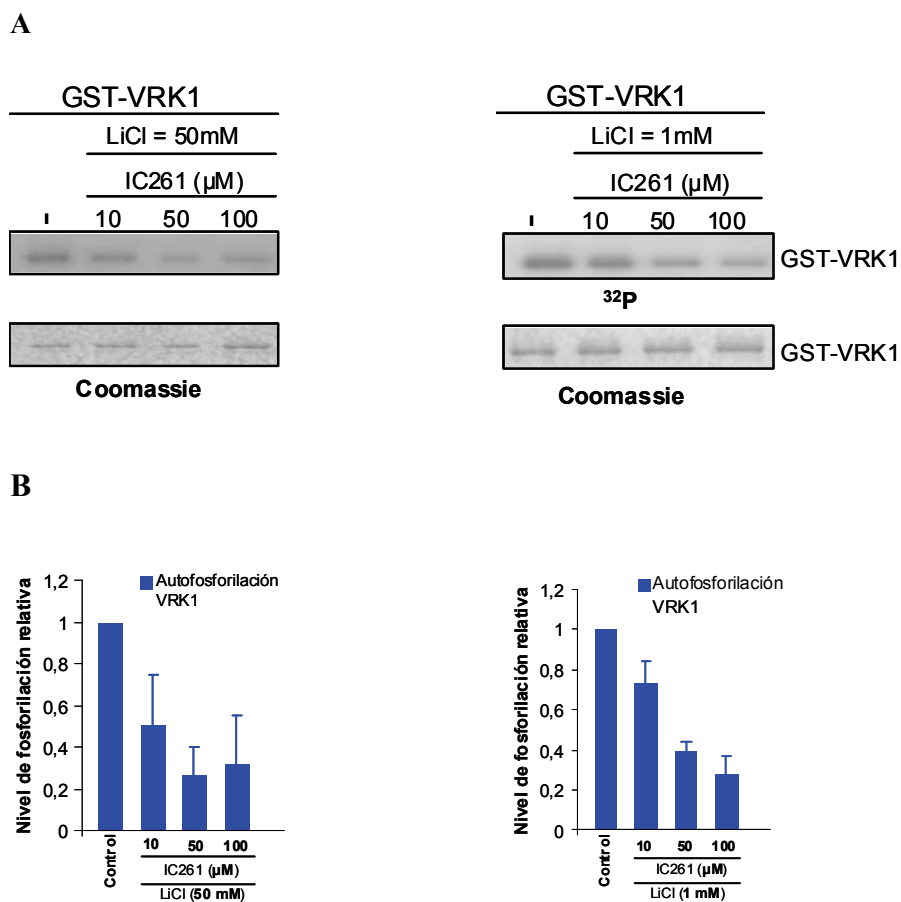
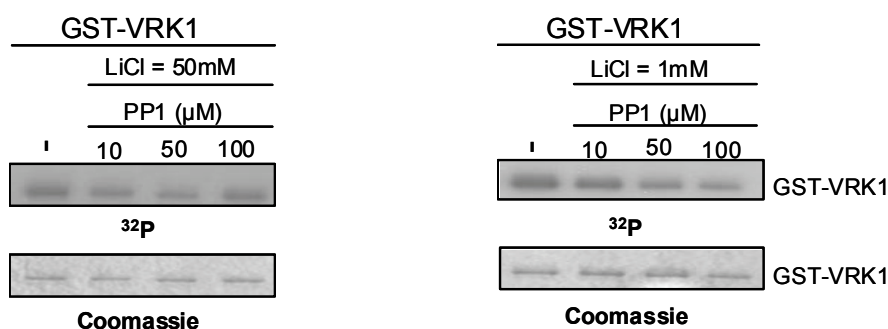


Figura 4.35. Sensibilidad de VRK1 frente a la combinación de IC261 con litio.
A. Ensayos quinasa in vitro con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a una concentración de 1 y 10 mM de litio y 10, 50 y 100 μM de IC261. Como sustrato de fosforilación se utilizó 2 μg de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

En el caso del inhibidor PP1, se obtuvo un $47 \pm 7 \%$ de inhibición de la actividad quinasa de VRK1 cuando se utilizó la combinación de $10 \mu\text{M}$ de PP1 más 50 mM de litio. Y se observó, que cuando la cantidad de litio era menor (1 mM), era necesario aumentar la cantidad de PP1 hasta $50 \mu\text{M}$ para conseguir la misma inhibición de la actividad quinasa de VRK1 (Figura 4.36.; Tabla 4.9.).

A



B

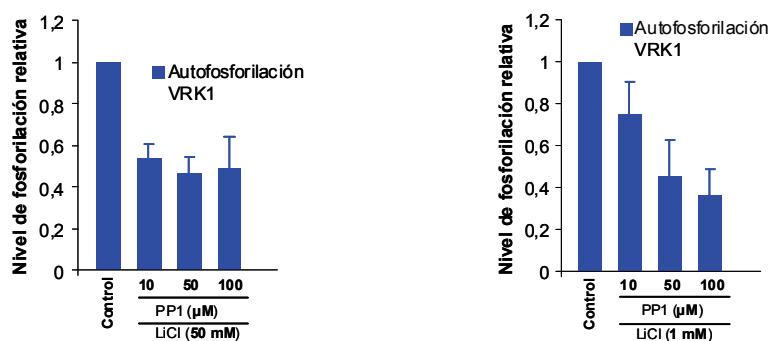


Figura 4.36. Sensibilidad de VRK1 frente a la combinación de PP1 con litio. **A.** Ensayos quinasa in vitro con $2 \mu\text{g}$ de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a una concentración de 1 y 10 mM de litio y 10 , 50 y $100 \mu\text{M}$ de PP1. Como sustrato de fosforilación se utilizó $2 \mu\text{g}$ de GST-p53. **B.** Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

		% INHIBICIÓN	
		Li = 1 mM	Li = 50 mM
PP1	10 μ M	25 \pm 15	47 \pm 7
	50 μ M	55 \pm 17	54 \pm 8
	100 μ M	64 \pm 12	50 \pm 14

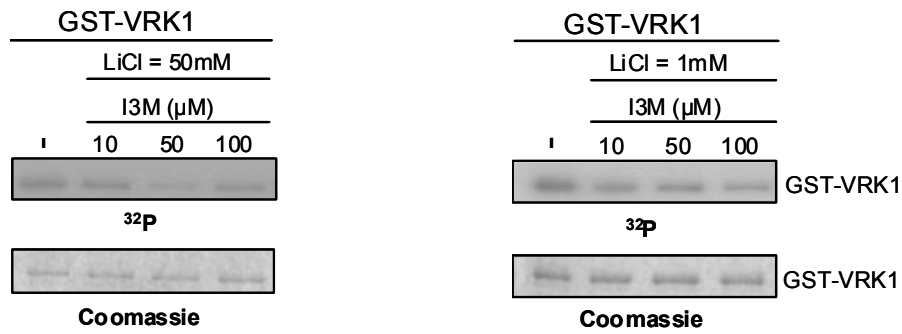
Tabla 4.9. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de VRK1. Datos de las diferentes combinaciones a diferentes concentraciones de PP1 y litio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Con el inhibidor Indirubín-3-monoxima, se obtuvo un resultado de inhibición de la actividad quinasa de VRK1 similar, independientemente de que se aumentara la cantidad de litio. En ambos casos, fue necesario utilizar una concentración de 50 μ M de Indirubín-3-monoxima, tanto para 50 como para 1 mM de litio, para conseguir una inhibición del 50 % (Tabla 4.10; Figura 4.37.).

		% INHIBICIÓN	
		Li = 1 mM	Li = 50 mM
Indirubín	10 μ M	40 \pm 7	36 \pm 18
	50 μ M	46 \pm 12	49 \pm 15
	100 μ M	65 \pm 11	44 \pm 21

Tabla 4.10. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de VRK1. Datos de las diferentes combinaciones a diferentes concentraciones de Indirubín-3-monoxima y litio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

A



B

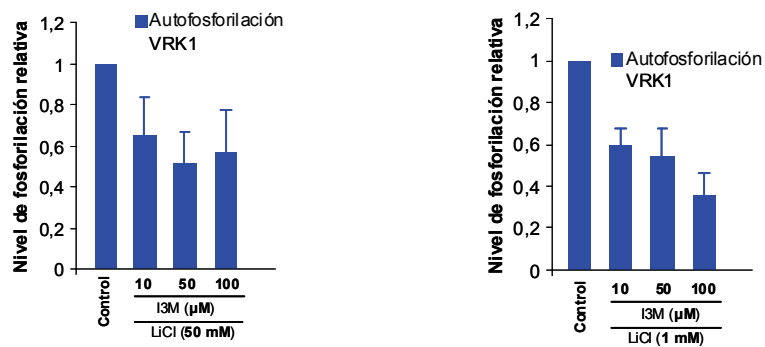
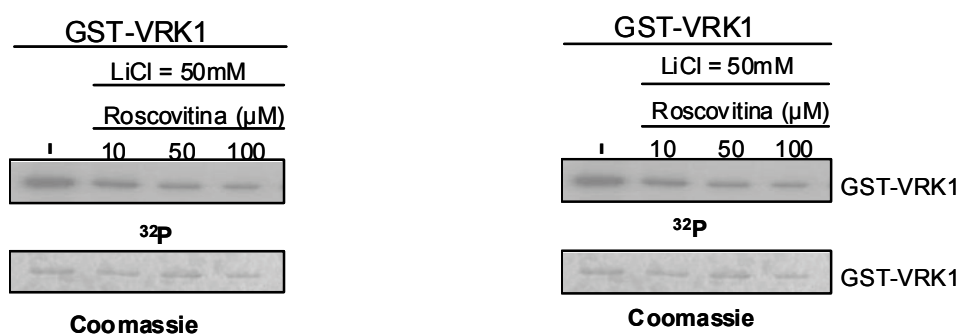


Figura 4.37. Sensibilidad de VRK1 frente a la combinación de Indirubín-3-monoxima con litio. A. Ensayos quinasa in vitro con 2 μ g de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a una concentración de 1 y 10 mM de litio y 10, 50 y 100 μ M de Indirubín-3-monoxima. Como sustrato de fosforilación se utilizó 2 μ g de GST-p53. B. Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

Por último, con la Roscovitina, se obtuvo un resultado del 50 % de inhibición de la actividad quinasa de VRK1 sólo cuando la cantidad de litio fue de 50 mM. Para la concentración menor de litio, no se consiguió una inhibición mayor a un 40 % de inhibición ni utilizando la concentración más alta de Roscovitina (Tabla 11.; Figura 4.38.).

A



B

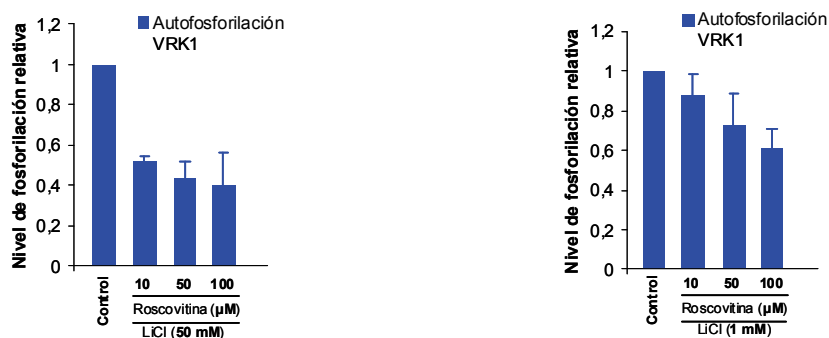


Figura 4.38. Sensibilidad de VRK1 frente a la combinación de Roscovitina con litio. A. Ensayos quinasa in vitro con 2 μg de la proteína recombinante GST-VRK1 frente a una concentración de 1 y 10 mM de litio y 10, 50 y 100 μM de Roscovitina. Como sustrato de fosforilación se utilizó 2 μg de GST-p53. B. Representación gráfica de la cantidad de fosfato incorporado por la proteína y el sustrato. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

		% INHIBICIÓN	
		Li = 1 mM	Li = 50 mM
Roscovitina	10 μ M	13 \pm 12	48 \pm 2
	50 μ M	28 \pm 16	56 \pm 7
	100 μ M	39 \pm 9	60 \pm 16

Tabla 4.11. Porcentajes de inhibición de la actividad quinasa de VRK1. Datos de las diferentes combinaciones a diferentes concentraciones de Roscovitina y litio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.5. Estudio cinético de VRK1.

Los parámetros cinéticos de la proteína quinasa VRK1 se estudiaron probando tres cofactores diferentes: magnesio, manganeso y zinc. Para los tres sustratos empleados se obtuvieron curvas de tipo hiperbólico de Michaelis-Menten y posteriormente se representaron utilizando la representación de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para obtener los valores de K_m y V_{max} para cada sustrato. El resumen de los datos obtenidos se puede observar en la tabla 4.12.

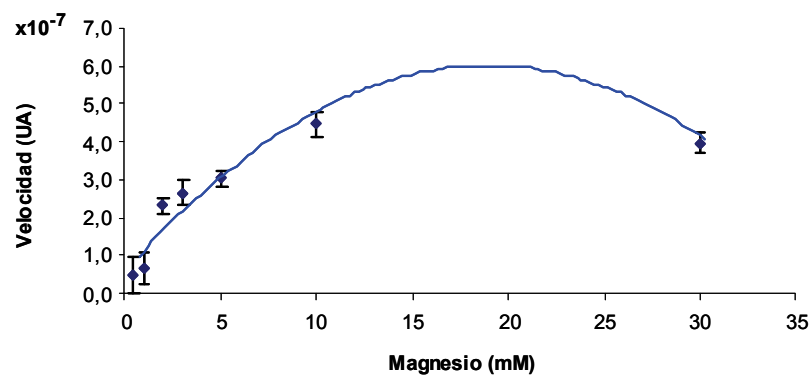
		Cinética enzimática	
		K_m (mM)	V_{max} (UA)
VRK1	Magnesio	9,38 \pm 2,01	0,086 \pm 0,010
	Manganeso	2,19 \pm 0,53	0,428 \pm 0,081
	Zinc	0,43 \pm 0,11	0,420 \pm 0,096

Tabla 4.12. Valores de K_m y V_{max} para la VRK1 con diferentes metales.

4.5.1. Magnesio

Para el metal divalente magnesio, se obtuvo una K_m de $9,38 \pm 2,01$ mM y una V_{max} de $0,086 \pm 0,010$ UA (Figura 4.39; Tabla 4.12).

A



B

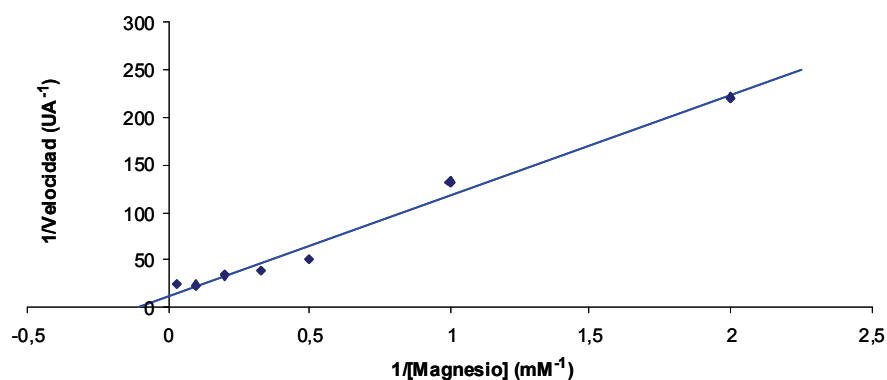
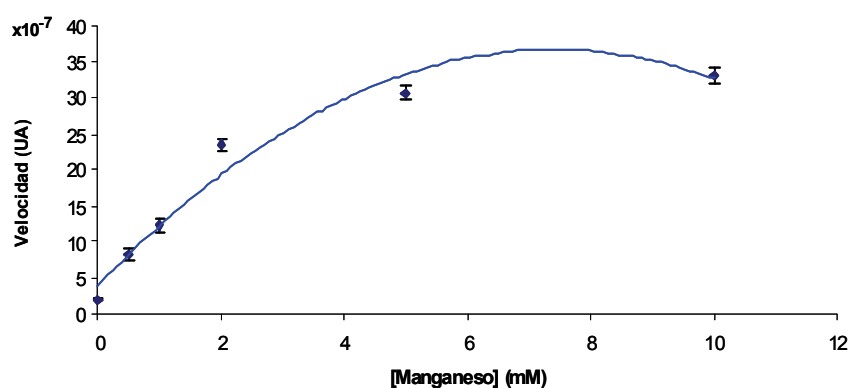


Figura 4.39. Variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de Magnesio. A. Curva de Michaelis-Menten. B. Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de magnesio. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.5.2. Manganeseo

Para el metal divalente manganeseo, se obtuvo una K_m de $2,19 \pm 0,53$ mM y una V_{max} de $0,428 \pm 0,081$ UA (Figura 4.40; Tabla 4.12).

A



B

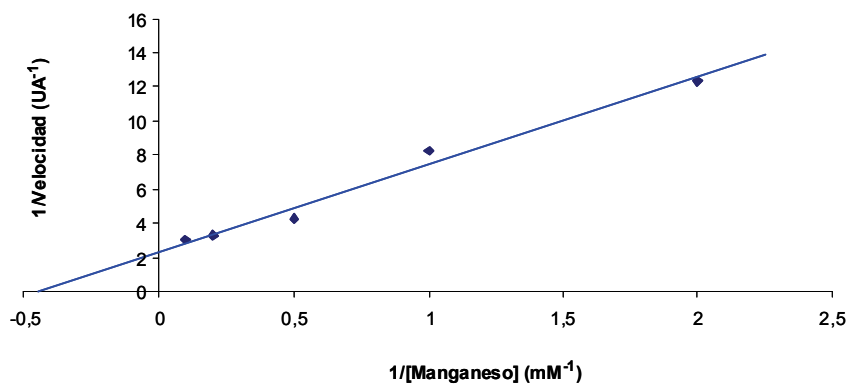
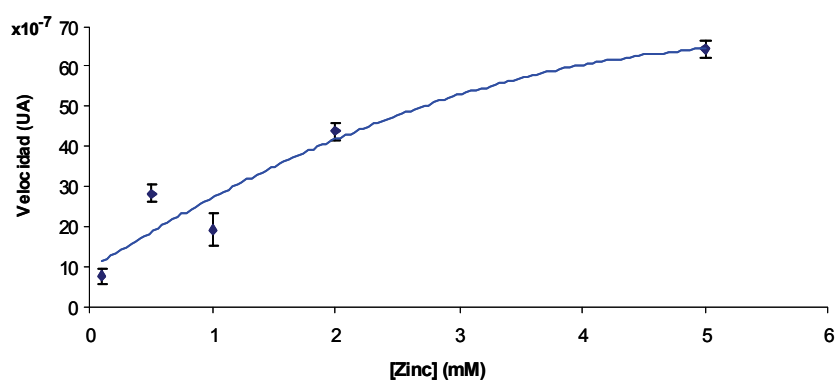


Figura 4.40. Variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de Manganeseo. A. Curva de Michaelis-Menten. B. Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de manganeseo. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

4.5.3. Zinc

Para el metal divalente manganeso, se obtuvo una K_m de $0,43 \pm 0,11$ mM y una V_{max} de $0,420 \pm 0,096$ UA (Figura 4.41; Tabla 4.12).

A



B

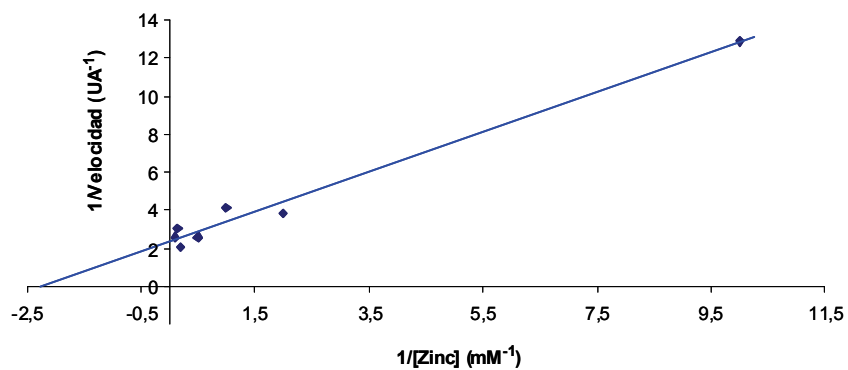


Figura 4.41. Variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de Zinc. A. Curva de Michaelis-Menten. B. Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de VRK1 con la concentración de zinc. Los datos se obtuvieron realizando la media de tres experimentos con su desviación típica.

DISCUSIÓN

La identificación y la validación de inhibidores específicos para las proteínas humanas VRK y la proteína B1R del virus Vaccinia pueden tener aplicaciones clínicas. El desarrollo de inhibidores específicos es una posibilidad real y podrían resultar de gran utilidad. Además, como estas quinasas están implicadas en respuesta al daño del ADN y a factores de crecimiento, su inhibición podría permitir que las células sean más sensibles a otros tratamientos, como la quimioterapia o irradiación, sin tener efectos nocivos para los pacientes.

Encontrar un inhibidor selectivo de las quinasas es un gran reto. Las proteínas quinasas son dianas terapéuticas importantes por sus papeles en las rutas de señalización celular y se caracterizan, en general, por la presencia de un sitio de unión al ATP altamente conservado. (Manning et al., 2002B; Zhang et al., 2009; Cohen, 2001; Yang et al., 2010; Bain et al., 2003; Davies et al., 2000).

El conocimiento de la selectividad de los inhibidores de quinasas es importante para predecir e interpretar sus efectos tanto en el campo de investigación como en el clínico (Fedorov et al., 2007; Banham y Smith, 1992). Además, una alta selectividad por la quinasa puede ser esencial para la eficacia de los agentes terapéuticos, pero puede servir también para ser utilizado como una herramienta para conocer el papel biológico de la quinasa (Fournier et al., 2006).

Los inhibidores competitivos por el sitio de unión al ATP pueden utilizarse para estabilizar la conformación de las quinasas y así poder también determinar la estructura tridimensional de las mismas mediante cristalografía (Knight et al., 2006; Anastassiadis et al., 2011).

Se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro* por ser un método económico, rápido y robusto, aunque la extrapolación de estos resultados para predecir la eficacia celular debe realizarse con cautela. La potencia de los inhibidores competitivos por el sitio de unión al ATP en el contexto celular es dictado no sólo por la afinidad intrínseca del inhibidor de la quinasa, sino también

por la constante de Michaelis-Menten para la unión del ATP y la concentración celular de ATP (Kilpinin et al., 2010).

La existencia de pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las quinasas se pueden aprovechar para desarrollar inhibidores altamente selectivos (Dar y Shokat, 2011). Esto podría resultar útil para la familia de quinasas VRK ya que presentan una serie de particularidades en su estructura y en su dominio catalítico que las diferencia de la mayoría de las proteínas quinasas (Nichols y Traktman, 2004).

Por tanto, el desarrollo de inhibidores específicos para la familia de quinasas VRK podría servir para conocer más en profundidad las funciones biológicas de las quinasas VRK1 y VRK2, y para su posible utilización terapéutica, puesto que se ha encontrado mayor expresión de VRK1 en tejidos tumorales y células en proliferación (Santos et al., 2006), además de observarse un aumento de la actividad de VRK1 en respuesta a diferentes tipos de daño génico.

En este estudio se realizaron ensayos quinasa *in vitro* frente a una serie de inhibidores que incluyen compuestos específicos frente a quinasas implicadas en diferentes procesos celulares, en muchos de los cuales participan las proteínas VRK. Un silenciamiento o expresión reducida de VRK1 causa un bloqueo en el progreso del ciclo celular, antes de la fase G1 (Vega et al., 2004; Valbuena et al., 2008b) que puede ser utilizado en patologías donde la proliferación es parte de su patogénesis. En el caso de VRK2, su silenciamiento afecta a la señalización mediante MAPK, ya que VRK2 modula la transmisión de señales de proteínas scaffold (de apoyo estructurales), tales como JIP1 que afecta a la respuesta a hipoxia (Blanco et al., 2007) o a citoquinas (Blanco et al., 2008), y KSR1 implicada en señalización oncogénica (Fernández et al., 2010).

Debido a sus diferencias estructurales, las quinasas VRK1 y VRK2 se describen como proteínas con un índice bajo de promiscuidad y no son sensibles a

los inhibidores de quinasas comunes (Bain et al., 2003; Fedorov et al., 2007; Karaman et al., 2008).

En una primera aproximación se realizaron una serie de paneles de inhibidores comerciales a una concentración 100 μ M. De este modo, se confirma que tanto VRK1 como VRK2, además de B1R, son en general poco o nada sensibles a la mayoría de los inhibidores probados en este estudio que son inhibidores de una gran variedad de quinasas humanas con un IC50 en el rango nanomolar frente a sus dianas específicas. La mayoría de ellos tiene poco o ningún efecto sobre las VRK incluso a concentraciones muy altas, por lo que no serían adecuados para su uso *in vivo*. Y en segundo lugar, de los pocos inhibidores que tienen algún efecto, aunque sea a concentraciones elevadas, existe un patrón de respuesta de inhibición diferente entre VRK1 y VRK2.

Posteriormente se realizaron curvas de dosis de concentración de inhibidor para calcular los valores de IC50 con los inhibidores que presentaban mayor efecto para algunas de las quinasas VRK, ya que los inhibidores que a la concentración inicial del panel (100 μ M) no mostraron inhibición, o ésta fue muy débil, no se estudiaron más en profundidad, debido a que para que la inhibición de un compuesto “competitivo” pueda considerarse un efecto específico y se pueda aplicar en estudios *in vivo*, los valores de inhibición deberían situarse en el rango nanomolar, porque sino habría que utilizarlo *in vivo* a una concentración que sería demasiada alta y que probablemente resultaría tóxica o con muchos efectos no deseables para la célula.

En el primer bloque de inhibidores ensayados, se utilizó como sustrato a H3. Tanto VRK1 como VRK2A fueron sensibles a IC261, un compuesto que inhibe a CK1 a una concentración 6 μ M (Bain et al., 2003; 2007), similar a la inhibición que nosotros observamos con VRK2A, pero no tiene efecto sobre VRK1. VRK2A fue también sensible al inhibidor Indirubín-3-monoxima (un inhibidor de las Cdk) y a SP600125 (un inhibidor de la JNK quinasa), pero con

unos valores de IC_{50} mayores que los obtenidos para sus quinasas específicas, ya que nosotros observamos inhibición *in vitro* a concentraciones micromolares, lejanos de los valores descritos en la bibliografía situados en un rango nanomolar (Bain et al., 2007; Bennett et al., 2001; Leclerc et al., 2001; Marko et al., 2001; Perabo et al., 2006). También se observó que para que se pueda fosforilar el sustrato, es necesario que la quinasa esté autofosforilada, es decir, en conformación activa, algo que ya habían visto Nichols y Traktman (2004).

En un segundo bloque, se realizaron ensayos con otro panel de inhibidores, ya probados anteriormente en nuestro grupo de investigación (Vázquez-Cedeira et al., 2011), pero utilizando como sustrato a p53, para ver si se obtenían datos similares o diferentes según el sustrato empleado. Los resultados observados concuerdan con los vistos anteriormente. Se observó un efecto de inhibición por parte de los mismos inhibidores y también un efecto paralelo entre la autofosforilación de VRK1 y la fosforilación de p53. VRK1 es más sensible a estaurosporina y a su derivado, RO-31-8220, dos inhibidores de PKC. Mientras que VRK2 es más sensible al inhibidor de la Cdk1 y a Roscovitina, dos inhibidores de las Cdk. De hecho, se ha demostrado que el inhibidor de Cdk1 interactúa igualmente con ambas quinasas (Scheeff et al, 2009), pero sólo inhibe la actividad de VRK2. Otro inhibidor al que las quinasas VRK parecen mostrar algo de sensibilidad es AZD7762, un inhibidor de CHK1/2. Este es capaz de inhibir a VRK2, aunque con una IC_{50} 5 veces mayor que la requerida para la inhibición de CHK1/2 (Zabludoff et al., 2008; Morgan et al., 2010). Por último, TDZD-8, un inhibidor no competitivo por el sitio de unión al ATP y descrito como un inhibidor selectivo para GSK3 β , es capaz de inhibir a VRK1 pero no a VRK2. Se observó que, incluso los mejores inhibidores, sólo presentan algo de efecto a concentraciones micromolares, en ensayos donde la concentración de ATP es de 5 μ M, lo que sugiere que tanto el sustrato como el inhibidor deben de estar a concentraciones similares para presentar un efecto inhibitorio, lo que implicaría

que *in vivo* estos inhibidores no se podrían utilizar ya que la concentración de ATP intracelular es tres veces mayor.

Todos los resultados en conjunto indican que a pesar de su alto grado de similitud, VRK1 y VRK2 presentan una sensibilidad diferente a los inhibidores, lo cual podría ser útil para la discriminación entre ambas quinasas y poder estudiar la función de cada uno de los miembros de la familia VRK puesto que se podría inhibir la actividad de una de las quinasas sin afectar a la otra.

Las diferencias detectadas en el dominio de unión al ATP de las proteínas VRK sugieren que podrían ser adecuadas para diseñar inhibidores específicos, ya que la probabilidad de inhibición cruzada con otras proteínas es muy baja, como se puede observar en la puntuación de promiscuidad donde VRK1 y VRK2 son las quinasas con la posibilidad de tener los inhibidores más específicos (Fedorov et al., 2007). Esta predicción se confirmó en un estudio experimental diferente basado en la determinación de la especificidad de los inhibidores comunes por las quinasas (Karaman et al., 2008). VRK1 ha sido identificada como una quinasa sobre la que podrían actuar fármacos en rhabdomiosarcoma (Nishijo et al., 2009) y cáncer de mama (Martin et al., 2008). De este modo, los inhibidores que presentaron algún efecto, podrían utilizarse como modelos y proporcionar claves estructurales para construir inhibidores específicos de VRK1 y VRK2 con una baja promiscuidad.

El patrón de inhibición de VRK1 y VRK2 sugiere que podrían estar más próximas estructuralmente a las proteínas Cdks que a otras quinasas, aunque con grandes diferencias. Sin embargo, las altas concentraciones que se necesitan para conseguir algo de inhibición sugieren que, ninguno de los inhibidores probados se podría utilizar para inhibir las proteínas VRK en ensayos celulares, ya que se verían afectadas muchas otras quinasas.

Por otro lado, las quinasas de organismos patógenos pueden ser una diana útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ya que estas quinasas pueden

tener características únicas en el sitio activo que podrían aprovecharse para el desarrollo de inhibidores específicos.

Una de esas quinasas procedente de un organismo patógeno es la proteína viral B1R que tiene una autofosforilación reducida, pero es capaz de fosforilar a p53 en múltiples residuos (Santos et al., 2004) mientras que VRK1 (Vega et al., 2004; López-Borges y Lazo, 2000) y VRK2 (Blanco et al., 2006) fosforilan a p53 en un único residuo, y además presentan una gran actividad de autofosforilación. En resultados obtenidos en nuestro laboratorio se observó una cierta similitud en cuanto a la inhibición de esta proteína con las quinasas VRK, siendo inhibida por estaurosporina y RO 31-8220, pero también se pudo observar como el compuesto KU55933, un inhibidor de la ATM (enzima implicada en la señalización frente al daño al ADN) no afectó a ninguna de las proteínas VRK pero sí lo hizo sobre B1R (Vázquez-Cedeira et al., 2011). En el panel de inhibidores utilizado en este trabajo, ningún inhibidor de los probados sobre B1R provocó efecto alguno sobre su actividad.

Los metales son causa de toxicidad por acumulación en células y tejidos específicos, y su repercusión es diferente dependiendo del tipo celular, la concentración del metal y el tiempo de acumulación del mismo. Muchos de los metales que causan toxicidad son cationes divalentes, los cuales interfieren en los procesos celulares donde intervienen este tipo de cationes, como el calcio y el magnesio. Además, la toxicidad de los metales frecuentemente causa síntomas neurológicos. Esto es de destacar, ya que tanto VRK1 como VRK2 se han asociado con patologías neurológicas.

La sensibilidad a los metales de otras quinasas del quinoma humano no ha recibido mucha atención a pesar del gran número de quinasas presentes en las células de mamíferos y su posible inhibición mediante metales. Sin embargo sí están bien caracterizados los síndromes clínicos causados por la intoxicación de

metales, aunque en general no se conocen las dianas ni los mecanismos de patogeneidad.

Las quinasas humanas VRK se han asociado a diferentes fenotipos. Se ha demostrado que la reducción en los niveles de VRK1 en ratones interfiere en la meiosis causando esterilidad en machos y hembras (Wiebe et al., 2010; Schober et al., 2011; Choi et al., 2010). Por ello, una acumulación crónica de cadmio o mercurio podría causar una fertilidad reducida en individuos intoxicados.

Una mutación puntual en el gen de VRK1 causa un síndrome neurodegenerativo espino-cerebelar con ataxia y distrofia muscular (Renbaum et al., 2009), lo que sugiere que VRK1 podría tener un papel crucial en aspectos neurológicos causados por intoxicaciones con cadmio, cobre o mercurio.

Se comprobó el efecto de algunos metales que frecuentemente causan intoxicaciones debido a su exposición ambiental y/o ocupacional. Para nuestro estudio escogimos cadmio, cobalto, cobre, mercurio y plomo. En una primera aproximación se realizaron ensayos quinasa *in vitro* a una concentración fija y elevada de 100 μ M. Los resultados obtenidos vuelven a presentar un patrón diferente de sensibilidad entre las proteínas humanas VRK, como ya sucedió en el estudio de los inhibidores comerciales. Así, la actividad quinasa de VRK1 fue inhibida por el cadmio, cobre y mercurio, mientras que VRK2A fue inhibida por el cadmio y mercurio y VRK2B solamente por el cadmio. La proteína viral B1R siguió un patrón similar a VRK1, siendo inhibida por el cadmio, cobre y mercurio.

Tras estos resultados, se realizaron curvas de dosis de concentración para los metales que causaron inhibición. Se observó que VRK1 presenta una mayor sensibilidad a la inhibición por metales, ya que precisa cantidades menores para verse afectada. Así se comprobó que, aunque el cadmio es capaz de inhibir tanto a VRK1 como a VRK2, lo hace de una manera mucho más eficiente sobre VRK1, con un IC_{50} en torno a 20 μ M, mientras que VRK2A necesita del orden de ocho veces más concentración para alcanzar el 50% de inhibición. Algo similar ocurre

en el caso del mercurio, donde VRK1 presenta un IC_{50} de aproximadamente 5 μ M, mientras que VRK2 necesita una concentración 30 veces mayor. Y por último, estaría el caso del cobre, que inhibe a VRK1 con un IC_{50} de 7 μ m pero no causa ningún efecto sobre VRK2. A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que la sensibilidad a los metales es independiente de la masa atómica del metal, ya que las VRK son sensibles a metales como cadmio, cobre y mercurio, pero no a cobalto o plomo. Además, como ocurría con los inhibidores, también se observó que para que se pueda fosforilar el sustrato, es necesario que la quinasa esté autofosforilada (Nichols y Traktman, 2004).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el estudio de los inhibidores comerciales, mostrando que VRK1 y VRK2 presentan un patrón de sensibilidad diferente, que puede ser útil para la discriminación entre ambas quinasas.

Posteriormente, se estudió el efecto del litio sobre las proteínas VRK, debido a su implicación en procesos neurológicos. Este metal tiene un efecto neuroprotector y se utiliza terapéuticamente como inhibidor de la GSK3 β ya que parece ser que esta quinasa es la principal diana en el efecto neuroprotector del litio (Aghdam y Barger, 2007; Dunn et al., 2005; Fornai et al., 2008; Engel et al., 2006). Este metal no provocó ningún efecto de inhibición sobre la actividad quinasa de las proteínas VRK, aunque sí parece potenciar ligeramente el efecto de algunos inhibidores cuando se utilizan conjuntamente. Se estudió la combinación del metal con alguno de los inhibidores ensayados con la proteína VRK1 que no habían provocado un efecto de inhibición en la actividad de esta quinasa y se observó que, al combinarlos con el litio, se conseguía un efecto de inhibición del 50 % en todos los casos probados a concentraciones de 50 μ M para el inhibidor y de 1mM para el metal. Esto podría ser de utilidad, como punto de partida, para intentar buscar un equilibrio de concentraciones entre el metal y el inhibidor, que sean efectivas en la

inhibición de las quinasas pero que no sean tóxicas para la célula, y así poder aplicarlos clínicamente.

Por último, se estudió el efecto del zinc sobre las VRK, ya que este elemento traza esencial está implicado en procesos de proliferación y diferenciación celular, proliferación de tumores, coordinación del correcto plegado del dominio centro de p53 *in vitro*, inducción de apoptosis y efectos neurodegenerativos (MacDonald, 2000; Brown et al., 2001; Meplan et al., 2000; Rodríguez et al., 2004; Feng et al., 2000; Lobner et al., 2000; Kondohm et al., 2002; Seo et al., 2001). Los iones de zinc contribuyen a la estabilidad de las proteínas y en sus funciones catalíticas más extensamente que otros metales de transición (Maret, 2004; Coleman, 1992). En nuestros resultados, se observa que sólo las concentraciones más elevadas de zinc (100 μ M) provocan una inhibición del 50 % de la actividad quinasa de VRK1 *in vitro*, pero esta concentración presenta el inconveniente de ser demasiado alta y además parece afectar a la estructura de la proteína causando su degradación. Además, entre la autofosforilación de la quinasa y la fosforilación del sustrato no existe una correlación directa como en los ensayos quinasa probados, tanto con otros metales como con los inhibidores. En este caso, la fosforilación de p53 se ve afectada a las concentraciones más pequeñas de zinc, prácticamente inhibiéndose por completo, pero al aumentar la concentración esta inhibición desaparece. En las concentraciones superiores, se vuelve a ver reducida la fosforilación, pero esto puede ser debido a la posible degradación de la proteína VRK, que ya no sería capaz de fosforilar al sustrato. En las proteínas de unión al ADN, como p53, típicamente se encuentra un motivo de dedo de zinc aunque se cree que el zinc contribuye a la integridad estructural de la proteína sin interaccionar con el ADN (Garvie y Wolberger, 2001). La proteína p53DBD experimenta un cambio conformacional tras la unión de iones metálicos, como el magnesio o el zinc, que se caracteriza por un incremento en la estabilidad de la misma (Xue et al., 2009).

Por este motivo, tal vez, en presencia de iones de zinc, p53 presente una mayor estabilidad o un cambio de conformación que permita a la quinasa VRK fosforilarlo más eficazmente, y por ello al aumentar la concentración del ión, aunque la autofosforilación de la propia quinasa se vea disminuída, la fosforilación es máxima.

Las proteínas con actividad enzimática tienen parámetros cinéticos adaptados a sus dianas o sustratos para ser sensibles a sus fluctuaciones intracelulares en diferentes condiciones fisiológicas, siendo este otro mecanismo de regulación. En este trabajo se ha estudiado la interacción de la enzima VRK1 con la molécula donadora del fosfato, el nucleótido ATP y la dependencia de cationes divalentes, con los que los nucleótidos suelen formar un complejo. Se estudió la cinética de VRK1 para el ATP en presencia de diferentes concentraciones de tres cationes divalentes (magnesio, manganeso y zinc) utilizando una concentración fija de ATP en ensayos de autofosforilación de la proteína humana VRK1. En un estudio anterior (Barcia et al., 2002), se observó que la quinasa es activa en presencia de los cationes divalentes de magnesio, manganeso y zinc, y que VRK1 presenta una mayor afinidad por el manganeso que por el magnesio. Los datos observados en este trabajo concuerdan con los datos de ese estudio anterior, aunque con unos valores de K_m algo superiores. Además se pudo comprobar que la enzima presenta una mayor afinidad por el zinc que por el manganeso. Sin embargo, si atendemos a los datos de la velocidad máxima de la enzima, esta es prácticamente igual para el manganeso y zinc pero de un orden casi cinco veces mayor que para el magnesio. Atendiendo a la relación entre la velocidad máxima (V_{max}) y la afinidad por el sustrato (K_m), el zinc es catalíticamente más eficiente que el manganeso y este más que el magnesio. Sin embargo, aunque el zinc es el metal de los tres ensayados que presenta los mejores parámetros cinéticos, no es aconsejable su utilización *in vivo* debido a que a altas concentraciones puede causar problemas de toxicidad.

CONCLUSIONES

1. Las quinasas humanas VRK y la proteína viral B1R son en general poco o nada sensibles a la mayoría de los inhibidores probados en este estudio.
2. VRK1 y VRK2 presentan una sensibilidad diferente a los inhibidores aunque los inhibidores que provocaron algún efecto lo hicieron a concentraciones demasiado altas para ser utilizados *in vivo*, pero podrían ser útiles para la discriminación entre ambas quinasas.
3. B1R no fue inhibida por ninguno de los inhibidores probados en este trabajo.
4. Los resultados obtenidos con los metales estudiados, vuelven a presentar un patrón diferente de sensibilidad entre las proteínas humanas VRK. Así, la actividad quinasa de VRK1 fue inhibida por el cadmio, cobre y mercurio, mientras que VRK2A fue inhibida por el cadmio y mercurio y VRK2B sólo por el cadmio.
5. La proteína viral B1R siguió un patrón similar a VRK1, siendo inhibida por el cadmio, cobre y mercurio.
6. El litio no provocó ningún efecto de inhibición sobre la actividad quinasa de las proteínas VRK, aunque sí parece potenciar ligeramente el efecto de algunos inhibidores cuando se utilizan conjuntamente.
7. El zinc puede comportarse como cofactor de la enzima igual que el magnesio o manganeso, pero a concentraciones altas puede desestabilizar a las proteínas VRK y p53.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R.G., Forrest, S. & Pienta, K.J. (2006). Simulating the hallmarks of cancer. *Artif. Life*. 12:617-634.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26:1324-1337.
- Aghdam, S.Y. & Barger, S.W. (2007). Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr. Alzheimer Res*. 4:21-31.
- Akesson, A., Julin, B. & Wolk, A. (2008). Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Res*. 68:6435-41.
- Alexander, C.S. (1969). Cobalt and the heart. *Ann. Intern. Med.* 70: 411–413.
- Alvarez, S.M., Gomez, N.N., Scardapane, L., Zirulnik, F., Martinez, D. & Gimenez, M.S. (2004). Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. *Toxicol. Lett.* 153:365-376.
- Amaral, A.F., Porta, M., Silverman, D.T., Milne, R.L., Kogevinas, M., Rothman, N., Cantor, K.P., Jackson, B.P., Pumarega, J.A., López, T., Carrato, A., Guarner, L., Real, F.X. & Malats, N. (2011). Pancreatic cancer risk and levels of trace elements. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2011-301086.
- Anastassiadis, T., Deacon, S.W., Devarajan, K., Ma, H. & Peterson, J.R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 29:1039-1045.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, A.K., Lamond, A.I. & Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 433:77-83.
- Ando, A. & Ando, I. (1994). Biodistributions of radioactive bipoisitive metal ions in tumor-bearing animals. *Biometals*. 7:185-192.
- Andreani, A., Cavalli, A., Granaiola, M., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., Rambaldi, M., Recanatini, M., Garnier, M. & Meijer, L. (2000). Imidazo[2,1 - b]thiazolymethylene- and indolylmethylene-2-indolinones: a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Design, synthesis, and CDK1/cyclin B inhibition. *Anticancer Drug. Des.* 15:447-452.

Antonio, M.T., Corredor, L. & Leret, M.L. (2003). Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol. Lett.* 143:331-340.

Araya, J., Maruyama, M., Inoue, A., Fujita, T., Kawahara, J., Sassa, K., Hayashi, R., Kawagishi, Y., Yamashita, N., Sugiyama, E. & Kobayashi, M. (2002). Inhibition of proteasome activity is involved in cobalt-induced apoptosis of human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:849-858.

Aschner, M. & Clarkson, T.W. (1988). Distribution of mercury 203 in pregnant rats and their fetuses following systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. *Teratology.* 38:145-155.

Aschner, M., Mullaney, K.J., Wagoner, D., Lash, L.H. & Kimelberg, H.K. (1994). Intracellular glutathione (GSH) levels modulate mercuric chloride (MC)- and methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced amino acid release from neonatal rat primary astrocytes cultures. *Brain Res.* 664:133-140.

Aschner, M., Yao, C.P., Allen, J.W. & Tan, K.H. (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int.* 37:199-206.

Assaf, S.Y. & Chung, S.H. (1984). Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. *Nature.* 308:734-736.

Ashwell, S., Janetka, J.W. & Zabludoff, S. (2008). Keeping checkpoint kinases in line: new selective inhibitors in clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 17:1331-1340.

ATSDR. (1999). Toxicological profile of cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

ATSDR. (1999). Toxicological profile of lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Azmi, A.S., Philip, P.A., Beck, F.W., Wang, Z., Banerjee, S., Wang, S., Yang, D., Sarkar, F.H. & Mohammad, R.M. (2011). MI-219-zinc combination: a new paradigm in MDM2 inhibitor-based therapy. *Oncogene.* 30:117-126.

Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S.P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D.C., Galons, H., Dierick, J.F., Pinna, L.A., Meggio, F., Totzke, F., Schächtele, C., Lerman, A.S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. & Meijer, L. (2005). Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* 280:31208-31219.

Baeriswyl, V. & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19:329-337.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371:199-204.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371:199-204.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R. and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408:297-315.

Banham, A.H. & Smith, G.L. (1992) Vaccinia virus B1R encodes a 34-kDa Serine/Threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions. *Virology.* 191:803-812.

Banham, A.H., Leader, D.P. & Smith, G.L. (1993). Phosphorylation of ribosomal proteins by the vaccinia virus B1R protein kinase. *FEBS Lett.* 321:27-31.

Barcia, R., López-Borges, S., Vega, F.M. & Lazo, P.A. (2002) Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch. Biochem. Biophys.* 399:1-5.

Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R. & Prives, C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* 7:2565-2574.

Beaud, G., Beaud, R. & Leader, D.P. (1995). Vaccinia virus gene H5R encodes a protein that is phosphorylated by the multisubstrate vaccinia virus B1R protein kinase. *J. Virol.* 69:1819-1826.

Beaud, G., Sharif, A., Topa-Masse, A. & Leader, D.P. (1994). Ribosomal protein S2/Sa kinase purified from HeLa cells infected with vaccinia virus corresponds to the B1R protein kinase and phosphorylates in vitro the viral ssDNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* 75:283-293.

Behrend, L., Milne, D.M., Stöter, M., Deppert, W., Campbell, L.E., Meek, D.W. & Knippschild, U. (2000). IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene.* 19:5303-5313.

Bellinger, D.C. & Bellinger, A.M. (2006). Childhood lead poisoning: the torturous path from science to policy. *J. Clin. Invest.* 116:853-857.

Bellinger, D.C. (2005). Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 73:409-420.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. & Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:13681-13686.

Bergers, G. & Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3:401-410.

Berglund, M., Elinder, C.G. & Järup, L. (2001). Humans Exposure Assessment. An Introduction. WHO/SDE/OEH/01.3.

Berlin, M. (1986). Mercury, en: Friberg, G.F., Nordberg, V. Vouk (Eds.), Handbook on the toxicology of metals, II ed., vol 16, Elsevier Science Publications, pp. 387-445.

Berx, G. & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a003129.

Beyersmann, D. & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82:493-512.

Beyersmann, D. & Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals.* 14:331-41.

Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. & Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 432:332-337.

Blanco, S., Klimcakova, L., Vega, F.M. & Lazo, P.A. (2006). The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS J*. 273:2487-2504.

Blanco, S., Santos, C. & Lazo, P.A. (2007). Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol. Cell Biol*. 27: 7273–7283.

Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Santos, C.R. & Lazo, P.A. (2008). Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS ONE*. 3: e1660.

Blasco, M.A. (2003). Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur. J. Cell. Biol*. 82:441-446.

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet*. 6:611-622.

Bluhm, R.E., Bobbitt, R.G., Welch, L.W., Wood, A.J., Bonfiglio, J.F., Sarzen, C., Heath, A.J. & Branch, R.A. (1992). Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. *Hum. Exp. Toxicol*. 11:201-210.

Blumenthal, N-C., Cosma, V., Skyler, D., LeGeros, J. & Walters, M. (1995). The effect of cadmium on the formation and properties of hydroxyapatite in vitro and its relation to cadmium toxicity in the skeletal system. *Calcif. Tissue Int*. 56:316-322.

Bodensteiner, K.J., Sawyer, H.R., Moeller, C.L., Kane, C.M., Pau, K.Y., Klinefelter, G.R. & Veeramachaneni, D.N. (2004). Chronic exposure to dibromoacetic acid, a water disinfection byproduct, diminishes primordial follicle populations in the rabbit. *Toxicol Sci*. 80:83-91.

Boldrick, J.C., Alizadeh, A.A., Diehn, M., Dudoit, S., Liu, C.L., Belcher, C.E., Botstein, D., Staudt, L.M., Brown, P.O. & Relman, D.A. (2002). Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:972-977.

Bonda, E., Wlostowski, T. & Krasowska, A. (2004). Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *BioMetals*. 17:615-624.

Boudreau, J., Vicent, R., Nadeau, D., Trottier, B., Fournier, M., Krzystyniak, K. & Chevalier, G. (1988). Toxicity of inhaled cadmium chloride: early responses of the antioxidant and surfactant systems in rat lungs. *J. Toxicol. Environ. Health*. 23:241-256.

Boyle P. & Bernard L. (2008) *World cancer report*. Lyon, France: IARC/WHO.

Boyle, K.A. & Traktman, P. (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*. 78:1992-2005.

Brown, K.H., Wuehler, S.E. & Peerson, J.M. (2001). The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr. Bull*. 22:113-125.

Calabrese, V., Bates, T.E. & Stella, A.M. (2000). NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res*. 25:1315-1341.

Camakaris, J., Voskoboinik, I. & Mercer, J.F. (1999). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 261:225-232.

Camins, A., Verdaguer, E., Junyent, F., Yeste-Velasco, M., Pelegrí, C., Vilaplana, J. & Pallás, M. (2009). Potential mechanisms involved in the prevention of neurodegenerative diseases by lithium. *CNS Neurosci. Ther*. 15:333-344.

Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov*. 1:493-502.

Carfagna, M.A., Ponsler, G.D. & Muhoberac, B.B. (1996). Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. *Chem. Biol. Interact*. 100:53-65.

Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 4:118-132.

Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 331:1559-1564.

Chandel, N.S., Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B. & Schumacker, P.T. (2000). Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*. 19:3840-3848.

Chen, R.W. & Chuang, D.M. (1999). Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol. Chem*. 274:6039-6042.

Cheng, H., Merika, E., Syrigos, K.N. & Saif, M.W. (2011). Novel agents for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". *JOP*. 12:334-338.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. & Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res*. 6:1521-1533.

Chin, P.C., Majdzadeh, N., D'Mello, S.R. (2005) Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 137: 193–201.

Choi, D.W. & Koh, J.Y. (1998). Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci*. 21:347-375.

Choi, Y.H., Park, C.H., Kim, W., Ling, H., Kang, A., Chang, M.W., Im, S.K., Jeong, H.W., Kong, Y.Y. & Kim, K.T. (2010). Vaccinia-related kinase 1 is required for the maintenance of undifferentiated spermatogonia in mouse male germ cells. *PLoS ONE*. 5:e15254.

Chuang, D.M. & Priller, J. (2006). Potential use of lithium in neurodegenerative disorders. In: Bauer, M., Grof, P. & Müller-Oerlinghausen, B. (Eds), *Lithium in Neuropsychiatry: The Comprehensive Guide*. Taylor & Francis Books Ltd., London. 381-397.

- Chuang, D.M. (2004). Lithium neuroprotection from glutamate excitotoxicity. Lithium and Mood stabilizers: Mechanism of Action. *Clinical Neurosci. Res.* 4:242-252.
- Clarkson, T.W. (1997). The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34:369-403.
- Clarkson, T.W., Magos, L. & Myers, G.J. (2003). The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 349:1731-1737.
- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur. J. Biochem.* 268: 5001–5010.
- Cohen, P. (2002). The race for a cure: who will benefit from the rapid advances in therapeutic cloning? *New Sci.* 173:6-7.
- Coleman, J.E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61:897-946.
- Colucci-D'Amato, L., Perrone-Capano, C. & di Porzio, U. (2003). Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays.* 25:1085-1095.
- Cuajungco, M.P. & Lees, G.J. (1997). Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 4:137-169.
- Cuzzocrea, S., Genovese, T., Mazzon, E., Esposito, E., Muià, C., Abdelrahman, M., Di Paola, R., Bramanti, P. & Thiemermann, C. (2007). Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the development of bleomycin-induced lung injury. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 20:619-630.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Esposito, E., Macarthur, H., Matuschak, G.M., Salvemini, D. (2006). A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319:73-81.
- Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (2001). Antimitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene.* 20:3786-3797.

Dar, A. C. & Shokat, K.M. (2011). The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 80: 769-795.

Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351:95-105.

Davis, P.D., Hill, C.H., Keech, E., Lawton, G., Nixon, J.S., Sedgwick, A.D., Wadsworth, J., Westmacott, D. & Wilkinson, S.E. (1989). Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Lett.* 259:61-63.

De Azevedo, W.F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, L., Strnad, M. & Kim, S.H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243:518-526.

De Boeck, M., Kirsch-Volders, M. & Lison, D. (2003) Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 533:135-152.

Dhillon, N. & Hoekstra, M.F. (1994). Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* 13: 2777-2788.

Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R. & Brown, P.O. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:11796-11801.

Dieter, P. & Fitzke, E. (1991). RO 31-8220 and RO 31-7549 show improved selectivity for protein kinase C over staurosporine in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:396-401.

Dietert, R.R. & Piepenbrink, M.S. (2006). Lead and immune function. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:359-385.

Duan, W., Zhu, X., Ladenheim, B., Yu, Q.S., Guo, Z., Oyler, J., Cutler, R.G., Cadet, J.L., Greig, N.H. & Mattson, M.P. (2002). p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann. Neurol.* 52:597-606.

Dugo, L., Abdelrahman, M., Murch, O., Mazzon, E., Cuzzocrea, S., Thiernemann, C. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors protect against the organ injury and dysfunction caused by hemorrhage and resuscitation. *Shock*. 25:485-491.

Dunn, N., Holmes, C. & Mullee, M. (2005). Does lithium therapy protect against the onset of dementia? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 19:20-22.

Ebner, H.L., Blatzer, M., Nawaz, M. & Krumschnabel, G. (2007). Activation and nuclear translocation of ERK in response to ligand-dependent and -independent stimuli in liver and gill cells from rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 210: 1036–1045.

Eckhouse, S., Lewison, G. & Sullivan, R. (2008). Trends in the global funding and activity of cancer research. *Mol. Oncol.* 2:20-32.

Eide, E.J., Woolf, M.F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E.L., Giovanni, A. & Virshup, D.M. (2005). Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25:2795-2807.

Elinder, C. & Friberg, L. (1986). En: Friberg, L., Nordberg, G. & Vouk, V., editors. Handbook on the toxicology of metals. Amsterdam: Elsevier. 211-232

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75: 817-825.

El-Missiry, M.A. & Shalaby, F. (2000). Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14:238-243.

Engel, T., Goñi-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J. & Hernández, F. (2006). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* 99:1445-1455.

Evan, G. & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*. 281:1317-1322.

Farina, M., Dahm, K.C., Schwalm, F.D., Brusque, A.M., Frizzo, M.E., Zeni, G., Souza, D.O. & Rocha, J.B. (2003). Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol. Sci.* 73:135-140.

Fedorov, O., Marsden, B., Pogacic, V., Rellos, P., Muller, S., Bullock, A.N., Schwaller, J., Sundström, M. & Knapp, S. (2007). A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 20523–20528.

Feng, H.L., Leng, Y., Ma, C.H., Zhang, J., Ren, M. & Chuang, D.M. (2008). Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience*. 155:567-572.

Feng, P., Liang, J.Y., Li, T.L., Guan, Z.X., Zou, J., Franklin, R. & Costello, L.C. (2000). Zinc induces mitochondria apoptosis in prostate cells. *Mol. Urol.* 4:31-36.

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 127:2893-917.

Fernández, I.F., Blanco, S., Lozano, J. & Lazo, P.A. (2010). VRK2 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Inversely Correlates with ErbB2 in Human Breast Cancer. *Mol. Cell Biol.* 30: 4687–4697.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*. 3:453-458.

Fornai, F., Longone, P., Ferrucci, M., Lenzi, P., Isidoro, C., Ruggieri, S. & Paparelli, A. (2008). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy*. 4:527-530.

Fournier, M.V., Martin, K.J., Kenny, P.A., Xhaja, K., Bosch, I., Yaswen, P. & Bissell, M.J. (2006). Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer Res.* 66:7095-7102.

Fox, S.B., Gasparini, G. & Harris, A.L. (2001). Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2:278-289.

Franco, J.L., Teixeira, A., Meotti, F.C., Ribas, C.M., Stringari, J., Garcia Pomblum, S.C., Moro, A.M., Bohrer, D., Bairros, A.V., Dafre, A.L., Santos, A.R. & Farina, M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ. Res.* 102:22-28.

Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, C.J. & Thompson, R.B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 130(5S Suppl):1471S-1483S.

Frumkin, H., Letz, R., Williams, P.L., Gerr, F., Pierce, M., Sanders, A., Elon, L., Manning, C.C., Woods, J.S., Hertzberg, V.S., Mueller, P. & Taylor, B.B. (2001). Health effects of long-term mercury exposure among chloralkali plant workers. *Am. J. Ind. Med.* 39:1-18.

Fu, H. & Boffetta, P. (1995). Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup. Environ. Med.* 52:73-81.

Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. & Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer.* 4:177-183.

Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A. & Virshup, D.M. (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:1182-1187.

Garvie, C.W. & Wolberger, C. (2001). Recognition of specific DNA sequences. *Mol. Cell.* 8:937-946.

Gautschi, O., Heighway, J., Mack, P.C., Purnell, P.R., Lara, P.N. Jr. & Gandara, D.R. (2008). Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin. Cancer Res.* 14:1639-1648.

Gerber, G.B., Léonard, A. & Hantson, P. (2002). Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42:25-34.

- Gitlin, J-D. (2003). Wilson disease. *Gastroenterology*. 125:1868-1877.
- Gonick, H.C. (2002). Lead, renal disease and hypertension. *Am. J. Kidney Dis.* 40:202-204.
- Gourley, M. & Williamson, J.S. (2000). Angiogenesis: new targets for the development of anticancer chemotherapies. *Curr. Pharm. Des.* 6:417-439.
- Goyer, R.A. & Waalkes, M.P. (2004). Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals*. 17:555-558.
- Graham, R.M., Frazier, D.P., Thompson, J.W., Haliko, S., Li, H., Wasserlauf, B.J., Spiga, M.G., Bishopric, N.H. & Webster, K.A. (2004). A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J. Exp. Biol.* 207:3189-3200.
- Guo, T. L., Miller, M., Shapiro, I. M. & Shenker, B. J. (1998). Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: Evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153:250-257.
- Gupta, A., Gupta, A. & Shukla, G.S. (1995). Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 14:428-433.
- Gutiérrez-Reyes, E.Y., Albores, A. & Ríos, C. (1998). Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology*. 131:145-154.
- Gutteridge, J.M. (1985). Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. *FEBS Lett.* 185:19-23.
- Guzman, M.L., Li, X., Corbett, C.A., Rossi, R.M., Bushnell, T., Liesveld, J.L., Hébert, J., Young, F., Jordan, C.T. (2007). Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8). *Blood*. 110:4436-4444.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 331-341.

Hambidge, K.M., Krebs, N.F. & Miller, L. (1998). Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(2 Suppl):410S-413S.

Han, Z., Pantazis, P., Lange, T.S., Wyche, J.H. & Hendrickson, E.A. (2000). The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell. Death Differ.* 7:521-530.

Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86:353-364.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-674.

Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A. & Connelly, P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271:695-701.

Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9:576-596.

Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 241:42-52.

Hansen, J.D., Grina, J., Newhouse, B., Welch, M., Topalov, G., Littman, N., Callejo, M., Gloor, S., Martinson, M., Laird, E., Brandhuber, B.J., Vigers, G., Morales, T., Woessner, R., Randolph, N., Lyssikatos, J. & Olivero, A. (2008). Potent and selective pyrazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:4692-4695.

Hansen, J.M., Zhang, H. & Jones, D.P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 40:138-145.

Harrington, E.A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R.K., Ajose-Adeogun, A.O., Nakayama, T., Graham, J.A., Demur, C., Hercend, T., Diu-Hercend, A., Su, M., Golec, J.M. & Miller, K.M. (2004). VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat. Med.* 10:262-267.

Hartwig, A. & Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127:47-54.

Hartwig, A. (2010). Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals.* 23:951-960.

Härtel, S., Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Alajuuma, P., Engelke, M., Diehl, H.A. (2003). Staurosporine-induced apoptosis in human cornea epithelial cells in vitro. *Cytometry A.* 55:15-23.

Heath, J.C. (1956). The production of malignant tumors by cobalt in the rat. *Br. J. Cancer.* 10:668-673.

Ho, E. & Ames, B.N. (2002). Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:16770-16775.

Ho, E. & Song, Y. (2009). Zinc and prostatic cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 12:640-645.

Ho, E. (2004). Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.* 15:572-578.

Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. & Andrews, B. (1997). Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:581-586.

Hoeflich, K.P., Herter, S., Tien, J., Wong, L., Berry, L., Chan, J., O'Brien, C., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Lackner, M., Stern, H., Choo, E., Murray, L., Friedman, L.S. & Belvin, M. (2009a). Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained

extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer Res.* 69:3042-3051.

Hoeflich, K.P., O'Brien, C., Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., Zhou, W., Berry, L., Murray, L., Amler, L., Belvin, M., Friedman, L.S. & Lackner, M.R. (2009b). In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin. Cancer Res.* 15:4649-4664.

Hoffmann, R. & Valencia, A. (2004). A gene network for navigating the literature. *Nat. Genet.* 36: 664.

Holmes, M., Suarez, J.D., Roberts, N.L., Mole, M.L., Murr, A.S. & Klinefelter, G.R. (2001). Dibromoacetic acid, a prevalent by-product of drinking water disinfection, compromises the synthesis of specific seminiferous tubule proteins following both in vivo and in vitro exposures. *J. Androl.* 22:878-890.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. & Harris, C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22: 3551-3555.

Hu, H., Rabinowitz, M. & Smith, D. (1998). Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ Health Perspect.* 106:1-8.

Huang, S., Shu, L., Dilling, M.B., Easton, J., Harwood, F.C. Ichijo, H. & Houghton, P.J. (2003). Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/ p21 (Cip1). *Mol. Cell.* 11:1491-1501.

Huang, Y.L., Sheu, J.Y. & Lin, T.H. (1999). Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin. Biochem.* 32:131-136.

Huk, O.L., Catelas, I., Mwale, F., Antoniou, J., Zukor, D.J. & Petit, A. (2004). Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *J. Arthroplasty.* 19:84-87.

Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell.* 50:823-829.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 80:225-236.

Hwang, S.Y., Cho, S.H., Lee, B.H., Song, Y.J. & Lee, E.K. Cellular imaging assay for early evaluation of an apoptosis inducer. *Apoptosis*. 16:1068-1075.

Hynes, N.E. & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:177-184.

IARC WG. (2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: inorganic and organic lead compounds, vol. 87. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer.

IARC/WHO. GLOBOCAN. 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations>. Accessed 2011.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1991). Chlorinated drinking water; chlorination byproducts; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 52:1-544.

International Agency for Research on Cancer (IARC): GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC. 2010

Jamall, I.S., Naik, M., Sprowls, J.J. & Trombetta, L.D. (1989). A comparison of the effects of dietary cadmium on heart and kidney antioxidant enzymes: evidence for the greater vulnerability of the heart to cadmium toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 9:339-345.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68:167-82.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61:69-90.

Jensen, A.A. & Tuchsén, F. (1990). Cobalt exposure and cancer risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 20:427-437.

Jin, T., Lu, J. & Nordberg, M. (1998). Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology*. 19:529-535.

- Johansen, K.M. & Johansen, J. (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.* 14:393-404.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298:1911-1912.
- Jordan, C.M., Whitman, R.D. & Harbut, M. (1997). Memory deficits and industrial toxicant exposure: a comparative study of hard metal, solvent and asbestos workers. *Int. J. Neurosci.* 90:113-128.
- Jordan, C.T. (2007). The leukemic stem cell. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 20:13-18.
- Jordan, J.D., Landau, E.M. & Iyengar, R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell.* 103:193-200.
- Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:272-279.
- Kang, T.H. & Kim, K.T. (2006). Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nat. Cell Biol.* 8:863-869.
- Kang, T.H. & Kim, K.T. (2008). VRK3-mediated inactivation of ERK signaling in adult and embryonic rodent tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783:49-58.
- Kang, T.H., Park, D.Y., Choi, Y.H., Kim, K.J., Yoon, H.S. & Kim K.T. (2007). Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 27:8533-8546.
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M. & Zarrinkar, P.P. (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 26:127-132.
- Karin, M. & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5:747-757.
- Kent, L.L., Hull-Campbell, N.E., Lau, T., Wu, J.C., Thompson, S.A. & Nori, M. (1999). Characterization of novel inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:768-774.

Kern, S. E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. & Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 252: 1708-1711.

Kesteloot, H., Roelandt, J., Willems, J., Claes, J.H. & Joossens, J.V. (1968). An enquiry into the role of cobalt in the heart disease of chronic beer drinkers. *Circulation*. 37:854-864.

Kilpinen, S., Ojala, K. & Kallioniemi, O. (2010). Analysis of kinase gene expression patterns across 5681 human tissue samples reveals functional genomic taxonomy of the kinome. *PLoS ONE* 5: e15068.

Kim, J.K. & Park, G.M. (2011). Indirubin-3-monoxime exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF- κ B and JNK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Inflammation Research*. 61:319-325.

Klaassen, C.D. & Liu, J. (1998). Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 23:97-102.

Klatsky, A.L. (2002). Alcohol and cardiovascular diseases: a historical overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957:7-15.

Klerkx, E.P., Alarcón, P., Waters, K., Reinke, V., Sternberg, P.W. & Askjaer, P. (2009). Protein kinase VRK-1 regulates cell invasion and EGL-17/FGF signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 335:12-21.

Klinefelter, G.R., Strader, L.F., Suarez, J.D., Roberts, N.L., Goldman, J.M. & Murr, A.S. (2004). Continuous exposure to dibromoacetic acid delays pubertal development and compromises sperm quality in the rat. *Toxicol. Sci.* 81:419-429.

Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., Balla, T., Weiss, W.A., Williams, R.L. & Shokat, K.M. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*. 125:733-747.

Kondoh, M., Tasaki, E., Araragi, S., Takiguchi, M., Higashimoto, M., Watanabe, Y. & Sato, M. (2002). Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Biochem.* 269:6204-6211.

Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T.M. (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0043.

Koyuturk, M., Yanardag, R., Bolkent, S. & Tunalı, S. (2007). The potential role of combined anti-oxidants against cadmium toxicity on liver of rats. *Toxicol. Ind. Health.* 23:393-401.

Krude, T. (2000). Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J. Biol. Chem.* 275:13699-13707.

Kwon, S.Y., Choi, Y.J., Kang, T.H., Lee, K.H., Cha, S.S., Kim, G.H., Lee, H.S., Kim, K.T. & Kim, K.J. (2005). Highly efficient protein expression and purification using bacterial hemoglobin fusion vector. *Plasmid.* 53:274-282.

Lassota, P., Singh, G. & Kramer, R. (1996). Mechanism of topoisomerase II inhibition by staurosporine and other protein kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271:26418-26423.

Lazo, P.A., Sevilla, A., Valbuena, A., Sanz-Garcia, M., López-Sánchez, I. & Blanco, S. (2007). VRK1 (Vaccinia-related kinase 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/VRK1ID43556ch14q32.html>.

Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (2001). Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* 276:251-260.

Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 141:1117-1134.

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

Linder, M.C. & Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:797S-811S.

Liotta, L.A., Steeg, P.S. & Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 64:327-336.

Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V. & Kirsch-Volders, M. (2001). Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.* 58:619-625.

Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D.O. & Shokat, K.M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem. Biol.* 6:671-678.

Livingstone, C., Patel, G. & Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* 14:1785-1797.

Lobner, D., Canzoniero, L.M., Manzerra, P., Gottron, F., Ying, H., Knudson, M., Tian, M., Dugan, L.L., Kerchner, G.A., Sheline, C.T., Korsmeyer, S.J. & Choi, D.W. (2000). Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 46:797-806.

López-Borges, S. & Lazo, P.A. (2000). The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene*. 19:3656-3664.

Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432:307-315.

Lundebye, A.K., Berntssen, M.H., Bonga, S.E., Wendelaar, S.E. & Maage, A. (1999). Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Mar. Pollut. Bull.* 39:137-144.

MacDonald, R.S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *J. Nutr.* 130(5S Suppl):1500S-1508S.

Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B. & Chevalier, G. (1991). In vitro and in vivo responses of rat tissues to cadmium-induced lipid peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46:929-36.

Manji, H.K. & Lenox, R.H. (2000). Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 48:518-30.

- Manji, H.K., Moore, G.J. & Chen, G. (2000). Clinical and preclinical evidence for the neurotrophic effects of mood stabilizers: implications for the pathophysiology and treatment of manic-depressive illness. *Biol. Psychiatry*. 48:740-754.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27:514-520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002b) The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 298:1912-1934.
- Maret, W. (2004). Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry*. 43:3301-3309.
- Marko, D., Schätzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L. & Eisenbrand, G. (2001). Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br. J. Cancer*. 84:283-289.
- Martin, K.J., Patrick, D.R., Bissell, M.J., Fournier, M.V. (2008). Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS ONE* 3: e2994.
- Mashhoon, N., DeMaggio, A.J., Tereshko, V., Bergmeier, S.C., Egli, M., Hoekstra, M.F. & Kuret, J. (2000). Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275:20052-20060.
- Matsumoto, Y., Hayashi, K. & Nishida, E. (1999). Cyclindependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 9:429-432.
- Mattie, M.D., McElwee, M.K. & Freedman, J.H. (2008). Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J. Mol. Biol.* 383:1008-1018.
- Maxwell, P. & Salnikow, K. (2004). HIF-1, an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer. Biol. Ther.* 3:29-35.
- McClue, S.J., Blake, D., Clarke, R., Cowan, A., Cummings, L., Fischer, P.M., MacKenzie, M., Melville, J., Stewart, K., Wang, S., Zhelev, N., Zheleva, D. & Lane, D.P. (2002) In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int. J. Cancer*. 102:463-468.

McElroy, J.A., Shafer, M.M., Trentham-Dietz, A., Hampton, J.M. & Newcomb, P.A. (2006). Cadmium exposure and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 98:869-73.

Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G. & Moulinoux, J.P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 243:527-536.

Méplan, C., Richard, M.J. & Hainaut, P. (2000). Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem. Pharmacol.* 59:25-33.

Minami, A., Takeda, A., Nishibaba, D., Takefuta, S. & Oku, N. (2001). Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res.* 894:336-339.

Minkel, D.T., Dolhun, P.J., Calhoun, B.L., Saryan, L.A. & Petering, D.H. (1979). Zinc deficiency and growth of Ehrlich ascites tumor. *Cancer Res.* 39:2451-2456.

Mitchell, J.B., Choudhuri, R., Fabre, K., Sowers, A.L., Citrin, D., Zabludoff, S.D. & Cook, J.A. (2010). In vitro and in vivo radiation sensitization of human tumor cells by a novel checkpoint kinase inhibitor, AZD7762. *Clin. Cancer Res.* 16:2076-2084.

Morgan, M.A., Parsels, L.A., Zhao, L., Parsels, J.D., Davis, M.A., Hassan, M.C., Arumugarajah, S., Hylander-Gans, L., Morosini, D., Simeone, D.M., Canman, C.E., Normolle, D.P., Zabludoff, S.D., Maybaum, J. & Lawrence, T.S. (2010). Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res.* 70:4972-4981.

Morin, Y. & Daniel, P. (1967). Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy: etiologic considerations. *Can. Med. Assoc. J.* 97: 926-928.

Moromisato, D.Y., Anas, N.G. & Goodman, G. (1994). Mercury inhalation poisoning and acute lung injury in a child. Use of high-frequency oscillatory ventilation. *CHEST.* 105:613-615.

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

Moser, V.C., Phillips, P.M., Levine, A.B., McDaniel, K.L., Sills, R.C., Jortner, B.S. & Butt, M.T. (2004). Neurotoxicity produced by dibromoacetic acid in drinking water of rats. *Toxicol. Sci.* 79:112-122.

Moss B. (1996) Poxviridae: the viruses and their replication. En: Fields virology, eds Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa), 3rd ed. pp 2637–2671.

Moss, B. & Shisler, J.L. (2001). Immunology 101 at poxvirus U: Immune evasion genes. *Semin. Immunol.* 13:59-66.

Muhsin, M., Graham, J. & Kirkpatrick, P. (2003). Gefitinib. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:515-516.

Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L. & Beyreuther, K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science.* 271:1406-1409.

Nawaz, M., Manzl, C., Lacher, V. & Krumschnabel, G. (2006). Copper-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinase in trout hepatocytes: the role of reactive oxygen species, Ca²⁺, and cell energetics and the impact of extracellular signal-regulated kinase signaling on apoptosis and necrosis. *Toxicol. Sci.* 92:464-475.

Nayak, S.B., Bhat, V.R., Upadhyay, D. & Udupa, S.L. (2003). Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47:108-110.

Nezu, J., Oku, A., Jones, M.H. & Shimane, M. (1997). Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics.* 45:327-331.

Nichols, R.J. & Traktman, P. (2004). Characterization of three paralogous members of the mammalian vaccinia related Kinase (VRK) family. *J. Biol. Chem.* 279:7934-7946.

Nichols, R.J., Wiebe, M.S. & Traktman, P. (2006). The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Mol. Biol. Cell.* 17:2451-2464.

Nishijo, K., Chen, Q.R., Zhang, L., McCleish, A.T., Rodriguez, A., Cho, M.J., Prajapati, S.I., Gelfond, J.A., Chisholm, G.B., Michalek, J.E., Aronow, B.J., Barr, F.G., Randall, R.L., Ladanyi, M., Qualman, S.J., Rubin, B.P., LeGallo, R.D., Wang, C., Khan, J. & Keller, C. (2009). Credentialing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 69:2902-2911.

NRC. *Human exposure Assessment for airborne pollutants. Advances and opportunities.* Washington, DC: National Research Council, National Academy Press, 1991.

Nucera, C., Nehs, M.A., Nagarkatti, S.S., Sadow, P.M., Mekel, M., Fischer, A.H., Lin, P.S., Bollag, G.E., Lawler, J., Hodin, R.A. & Parangi, S. (2011). Targeting BRAFV600E with PLX4720 displays potent antimigratory and anti-invasive activity in preclinical models of human thyroid cancer. *Oncologist.* 16:296-309.

Olivieri, G., Hess, C., Savaskan, E., Ly, C., Meier, F., Baysang, G., Brockhaus, M. & Müller-Spahn, F. (2001). Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased beta-amyloid secretion. *J. Pineal Res.* 31:320-325.

Ostrakhovitch, E.A. & Cherian, M.G. (2005). Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis.* 10:111-121.

Othumpangat, S., Kashon, M. & Joseph, P. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J. Biol. Chem.* 280:25162-25169.

Ou, Y.C., White, C.C., Krejsa, C.M., Ponce, R.A., Kavanagh, T.J. & Faustman, E.M. (1999). The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. *Neurotoxicology.* 20:793-804.

Pang, J.H. & Chau, L.Y. (1999). Copper-induced apoptosis and immediate early gene expression in macrophages. *Atherosclerosis.* 146:45-52.

Perabo, F.G., Frössler, C., Landwehrs, G., Schmidt, D.H., von Rücker, A., Wirger, A. & Müller, S.C. (2006). Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer. *Anticancer Res.* 26:2129-2135.

Perona, R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* 8:77-82.

Pesch, B., Haerting, J., Ranft, U., Klimpel, A., Oelschlagel, B. & Schill, W. (2000). Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int. J. Epidemiol.* 29:1014-1024.

Platz, E.A. & Helzlsouer, K.J. (2001). Selenium, zinc, and prostate cancer. *Epidemiol. Rev.* 23:93-101.

Pollack, L.A., Rowland, J.H., Crammer, C. & Stefanek, M. (2009). Introduction: charting the landscape of cancer survivors' health-related outcomes and care. *Cancer.* 115:4265-4269.

Pollard, K. M. & Hultman, P. (1997). Effects of mercury on the immune system. *Metal Ions Biol. Syst.* 34:421-440.

Prasad, A.S. (2001). Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. *Nutrition.* 17:685-687.

Prasad, A.S. (2004). Zinc deficiency: its characterization and treatment. *Met. Ions Biol. Syst.* 41:103-137.

Prasad, A.S., Fitzgerald, J.T., Hess, J.W., Kaplan, J., Pelen, F. & Dardenne, M. (1993). Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition.* 9:218-224.

Rahmouni, S., Cerignoli, F., Alonso, A., Tsutji, T., Henkens, R., Zhu, C., Louis-dit-Sully, C., Moutschen, M., Jiang, W. & Mustelin, T. (2006). Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat. Cell Biol.* 8:524-531. Erratum in: *Nat. Cell Biol.* 2006 Jun;8(6):642.

Rajanna, B., Hobson, M., Boykin, M. & Chetty, C.S. (1990). Effects of chronic treatment with cadmium on ATPases, uptake of catecholamines, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20:36-41.

Raynaud, F.I., Fischer, P.M., Nutley, B.P., Goddard, P.M., Lane, D.P. & Workman, P. (2004). Cassette dosing pharmacokinetics of a library of 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase 2 inhibitors prepared by parallel synthesis. *Mol. Cancer Ther.* 3:353-362.

Rempel, R.E. & Traktman, P. (1992). Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins. *J. Virol.* 66:4413-4426.

Rempel, R.E., Anderson, M.K., Evans, E. & Traktman, P. (1990). Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. *J. Virol.* 64:574-583.

Renbaum, P., Kellerman, E., Jaron, R., Geiger, D., Segel, R., Lee, M., King, M.C. & Levy-Lahad, E. (2009). Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 85:281-289.

Rice, D. & Silbergeld, E.K. (1996). Lead neurotoxicity: concordance of human and animal research, in: L.W. Chang (Ed.), *Toxicology of Metals*, CRC Lewis Publishers, New York, pp. 659-675.

Rizk, S.L. & Sky-Peck, H.H. (1984). Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Res.* 44:5390-5394.

Rodriguez, I.R., Alam, S. & Lee, J.W. (2004). Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:2830-2837.

Rowe, M.K. & Chuang, D.M. (2004). Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 6:1-18.

Ryan, C.J. & Wilding, G. (2000). Angiogenesis inhibitors. New agents in cancer therapy. *Drugs Aging.* 17:249-255.

Sahmoun, A.E., Case, L.D., Jackson, S.A. & Schwartz, G.G. (2005). Cadmium and prostate cancer: a critical epidemiologic analysis. *Cancer Investig.* 23:256-263.

Sanfeliu, C., Sebastià, J., Cristòfol, R. & Rodríguez-Farré, E. (2003). Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.* 5:283-305.

Santos, C.R., Blanco, S., Sevilla, A. & Lazo, P.A. (2006). Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signalling. *Virology.* 80:7667-7675.

Santos, C.R., Vega, F.M. Blanco, S. Barcia, R. & Lazo, P.A. (2004). The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology*. 328:254-265.

Sanz-García, M., López-Sánchez, I. & Lazo, P.A. (2008). Proteomics identification of nuclear Ran GTPase as an inhibitor of human VRK1 and VRK2 (vaccinia-related kinase) activities. *Mol. Cell. Proteomics*. 7:2199-2214.

Saryan, L.A, Minkel, D.T., Dolhun, P.J., Calhoun, B.L., Wielgus, S., Schaller, M. & Petering, D.H. (1979). Effects of zinc deficiency on cellular processes and morphology in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res*. 39:2457-2465.

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

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. & Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic. Acids. Res*. 29:397-406.

Schwartz, G.G. & Reis, I.M. (2000). Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 9:139-145.

Shenker, B. J., Datar, S., Mansfield, K. & Shapiro, I. M. (1997). Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: A flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 143:397-406.

Shenker, B.J., Guo, T.L. & Shapiro, I.M. (2000). Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res*. 84:89-99.

Shi, Y., Reiman, T., Li, W., Maxwell, C.A., Sen, S., Pilarski, L., Daniels, T.R., Penichet, M.L., Feldman, R. & Lichtenstein A. (2007). Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood*. 109:3915-3921.

Seo, S.R., Chong, S.A., Lee, S.I., Sung, J.Y., Ahn, Y.S., Chung, K.C. & Seo, J.T. (2001). Zn²⁺-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J. Neurochem*. 78:600-610.

Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Lin, X., Chaturvedi, M.M. & Aggarwal, B.B. (2006). Indirubin enhances tumor necrosis factor-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 281:23425-23435.

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

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

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

Shamley, D.J. & Sack, J.S. (1989). Mercury poisoning. A case report and comment on 6 other cases. *S. Afr. Med. J.* 76:114-116.

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

Shay, J.W. & Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:72-76.

Shiio, Y., Eisenman, R.N., Yi, E.C., Donohoe, S., Goodlett, D.R. & Aebersold, R. (2003). Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 14:696-703.

Shippee, R.L., Burgess, D.H., Ciavarra, R.P., DiCapua, R.A. & Stake, P.E. (1983). Cadmium-induced suppression of the primary immune response and acute toxicity and mice: differential interaction of zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71:303-306.

Silbergeld, E.K. (1991). Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ. Health Perspect.* 91: 63-70

Silbergeld, E.K. (2003). Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutat. Res.* 533:121-133.

Silbergeld, E. K., Trevani, C., Strickland, G. T., Liggans, G., Woodruff, S., Sacci, J., Azad, A. & McKenna, K. (1998). Effects of mercury on resistance to *P. yoelli* malaria in a mouse model. *Toxicol. Sci.* 42:205-205.

Silbergeld, E.K., Waalkes, M. & Rice, J.M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am. J. Ind. Med.* 38:316-323.

Sirois, J.E. & Atchison, W.D. (2000). Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167:1-11.

Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. & Roussel, P. (2002). Cyclindependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J. Cell. Biol.* 15:969-81.

Smith, A.H., Lingas, E.O. & Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull. World Health organ.* 78:1093-1103.

Smith, G.L., Vanderplasschen, A. & Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 83:2915-31.

Stabler, S.P. & Allen, R.H. (2004). Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu. Rev. Nutr.* 24:299-326.

Stöter, M., Bamberger, A.M., Aslan, B., Kurth, M., Speidel D, Löning T, Frank HG, Kaufmann P, Löhler J, Henne-Bruns D, Deppert W. & Knippschild, U. (2005). Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. *Oncogene.* 24:7964-7975.

Straif, K., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. & Coglianò, V. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2009). A review of human carcinogens-part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 10:453-4.

Sun, L., Tran, N., Tang, F., App, H., Hirth, P., McMahon, G. & Tang, C. (1998). Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. *J. Med. Chem.* 41:2588-2603.

Takeda, A., Goto, K. & Okada, S. (1997). Zinc depletion suppresses tumor growth in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 59:23-29.

Talmadge, J.E. & Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70:5649-5669.

Tamaoki, T. & H. Nakano (1990). Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology.* 8: 732-735.

Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:397-402.

Tang, L., Li, M.H., Cao, P., Wang, F., Chang, W.R., Bach, S., Reinhardt, J., Ferandin, Y., Galons, H., Wan, Y., Gray, N., Meijer, L., Jiang, T. & Liang, D.C. (2005). Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J. Biol. Chem.* 280:31220-31229.

Tassabehji, N.M., VanLandingham, J.W. & Levenson, C.W. (2005). Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells. *Exp. Biol. Med.* 230:699-708.

Theophanides, T. & Anastassopoulou, J. (2002). Copper and carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42:57-64.

Toledo, F. & Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer.* 6:909-923.

Tran, T.C., Sneed, B., Haider, J., Blavo, D., White, A., Aiyekorun, T., Baranowski, T.C., Rubinstein, A.L., Doan, T.N., Dingleline, R. & Sandberg, E.M. (2007). Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res.* 67:11386-11392.

Truong-Tran, A.Q., Carter, J., Ruffin, R.E. & Zalewski, P.D. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals.* 14:315-330.

Turecký, L., Kalina, P., Uhlíková, E., Námerová, S & Krizko, J. (1984). Serum ceruloplasmin and copper levels in patients with primary brain tumors. *Klin. Wochenschr.* 62:187-189.

Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K.S., Fong, D., Zhu, Y.L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., Cheung, I., Rice, J., Suzuki, Y., Luu, C., Settachatgul, C., Shellooe, R., Cantwell, J., Kim, S.H., Schlessinger, J., Zhang, K.Y., West, B.L., Powell, B., Habets, G., Zhang, C., Ibrahim, P.N., Hirth, P., Artis, D.R., Herlyn, M. & Bollag, G. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:3041-3046.

Valbuena, A., Blanco, S., Vega, F.M., & Lazo, P.A. (2008a). The C/H3 domain of p300 is required to protect VRK1 and VRK2 from their downregulation induced by p53. *PLoS one* 3.e2649.

Valbuena, A., Lopez-Sanchez, I. & Lazo, P.A. (2008b). Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PLoS one* 3 e1642.

Valbuena, A., López-Sanchez, I., Vega, F.M., Sevilla, A., Sanz-García, M., Blanco, S. & Lazo, P.A. (2007a). Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch. Biochem. Biophys.* 465:219-226.

Valbuena, A., Suárez-Gauthier, A., López-Rios, F., López-Encuentra, A., Blanco, S., Fernández, P.L., Sánchez-Céspedes, M. & Lazo, P.A. (2007b). Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer*. 58:303-309.

Valbuena, A., Vega, F.M., Blanco, S. & Lazo, P.A. (2006). p53 downregulates its activating vaccinia-related kinase 1, forming a new autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* 26:4782-4793.

Vallee, B.L. & Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73:79-118.

van Dam, H. & Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*. 20: 2453-2464.

van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. & Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* 14:1798-1811.

Vaziri, N.D. & Sica, D.A. (2004). Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep.* 6:314-320.

Vázquez-Cedeira, M., Barcia-Sanjurjo, I., Sanz-García, M., Barcia, R. & Lazo, P.A. (2011). Differential Inhibitor Sensitivity between Human Kinases VRK1 and VRK2. *PLoS ONE* 6: e23235.

Vega, F.M., Gonzalo, P., Gaspar, M.L. & Lazo, P.A. (2003). Expression of the VRK (vaccinia-related kinase) gene family of p53 regulators in murine hematopoietic development. *FEBS Lett.* 544:176-180.

Vega, F.M., Sevilla, A. & Lazo, P.A. (2004). p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol Cell Biol.* 24:10366-10380.

Vernell, R., Helin, K. & Muller, H. (2003). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J. Biol. Chem.* 278:46124-46137.

Vihinen, P. & Kähäri, V.M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer.* 99:157-166.

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9:138-141.

Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature.* 408:307-310.

Vousden, K. H. & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2:594-604.

Waalkes, M.P. & Klaassen, C.D. (1985). Concentration of metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5:473-477.

Waalkes, M.P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533:107-120.

Walling, C. (1975). Fenton's reagent revisited. *Acc. Chem. Res.* 8:125-131.

Wang, G., Hazra, T.K., Mitra, S., Lee, H.M. & Englander, E.W. (2000). Mitochondrial DNA damage and hypoxic response are induced by CoCl₂ (2) in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic. Acids. Res.* 28:2135-2140.

Waters, K., Yang, A.Z. & Reinke, V. (2010). Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C.elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53. *Dev. Biol.* 344:1011-1025.

Wehner, A.P., Busch, R.H., Olson, R.J. & Craig, D.K. (1977). Chronic inhalation of cobalto oxide and cigarette smoke by hamsters. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 38:338-346.

Wesierska-Gadek, J., Gueorguieva, M. & Horky, M. (2003). Dual action of cyclin-dependent kinase inhibitors: Induction of cell cycle arrest and apoptosis. A comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. *Pol. J. Pharmacol.* 55:895-902.

Wesierska-Gadek, J., Gueorguieva, M. & Horky, M. (2005). Roscovitine-induced up-regulation of p53/AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 4:113-24.

Wesierska-Gadek, J., Wandl, S., Kramer, M.P., Pickem, C., Krystof, V. & Hajek, S.B. (2008). Roscovitine up-regulates p53 protein and induces apoptosis in human HeLaS(3) cervix carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 105:1161-1171.

Whittle, B.J., Varga, C., Pósa, A., Molnár, A., Collin, M., Thiemermann, C. (2006). Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br. J. Pharmacol.* 147:575-582.

Wide, C. (1986). Mercury hazards arising from the repair of sphygmomanometers. *Br. Med. J.* 293:1409-1410.

Wiebe MS, Nichols RJ, Molitor TP, Lindgren JK, Traktman P. (2010). Mice deficient in the serine/threonine protein kinase VRK1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia. *Biol. Reprod.* 82:182-193.

Windheim, M., Lang, C., Pegg, M., Plater, L.A. & Cohen, P. (2007). Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J.* 404:179-190.

Winship, K.A. (1985). Toxicity of mercury and its inorganic salts. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.* 4:129-160.

Witsch, E., Sela, M. & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 25:85-101.

Wong, H., Belvin, M., Herter, S., Hoeflich, K.P., Murray, L.J., Wong, L. & Choo, E.F. Pharmacodynamics of 2-[4-[(1E)-1-(hydroxyimino)-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl]-3-(pyridine-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]ethan-1-ol (GDC-0879), a potent and selective B-Raf kinase inhibitor: understanding relationships between systemic concentrations, phosphorylated mitogen-activated protein kinase kinase 1 inhibition, and efficacy. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 329:360-367.

Xiao, Z., Hao, Y., Liu, B. & Qian, L. (2002). Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk. Lymphoma*. 43:1763-1768.

Xue, Y., Wang, S. & Feng, X. (2009). Effect of metal ion on the structural stability of tumour suppressor protein p53 DNA-binding domain. *J Biochem.* 146:193-200.

Yaffe, M.B. & Elia, A.E. (2001). Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13:131-138.

Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J.F., Schostack, K., Simcox, M.E., Heimbrook, D., Bollag, G. & Su, F. (2010). RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.* 70: 5518–5527.

Yang, J., Yu, Y. & Duerksen-Hughes, P.J. (2003). Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat. Res.* 543:31-58.

Yang, S.J., Pyen, J., Lee, I., Lee, H., Kim, Y. & Kim, T. (2004). Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37:480-486.

Yeste-Velasco, M., Folch, J., Jiménez, A., Rimbau, V., Pallàs, M. & Camins, A. (2008). GSK-3 beta inhibition and prevention of mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286. *Eur. J. Pharmacol.* 588:239-243.

Zabludoff, S.D., Deng, C., Grondine, M.R., Sheehy, A.M, Ashwell, S., Caleb, B.L., Green, S., Haye, H.R., Horn, C.L., Janetka, J.W., Liu, D., Mouchet, E., Ready, S.,

Rosenthal, J.L., Queva, C., Schwartz, G.K., Taylor, K.J., Tse, A.N., Walker, G.E., White, A.M. (2008). AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol. Cancer Ther.* 7:2955-2966.

Zelko, I., Kobayashi, R., Honkakoski, P. & Negishi, M. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 352: 31-36.

Zelikoff, J. & Gardner, A. (1996). Immunomodulation by metals. In "Toxicology of Metals" (L. W. Chang, Ed.), pp. 783-884. CRC Press, Boca Raton, FL.

Zhang, J., Yang, P.L. & Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 9: 28–39

Zhen, Y., Sorensen, V., Jin, Y., Suo, Z. & Wiedlocha, A. (2007). Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK. *Oncogene.* 26:6372-6385.

Zhong, J. & Lee, W.H. (2007). Lithium: a novel treatment for Alzheimer's disease? *Expert Opin Drug Saf.* 6:375-383.

Zou, W., Yan, M., Xu, W., Huo, H., Sun, L., Zheng, Z. & Liu, X. (2001). Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *J. Neurosci. Res.* 64:646-653.

Zou, W., Zeng, J., Zhuo, M., Xu, W., Sun, L., Wang, J. & Liu, X. (2002). Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 67:837-843.

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos
ADC: ADenoCarcinoma
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AMP: del inglés “Adenosine MonoPhosphate”
AP1: del inglés “Activator Protein 1”
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATF: del inglés “Activating Transcription Factor”
ATF2: del inglés “Activating Transcription Factor 2”
ATM: del inglés “Ataxia–Telangiectasia Mutated”
ATP: adenosín trifosfato
ATP: del inglés “Adenosine TriPhosphate”
BAF: del inglés “Barrier to Autointegration Factor”
BSA: del inglés “Bovine Serum Albumin”
CDK: del inglés “Cyclin-Dependent Kinase”
CHK1/2: del inglés “Checkpoint kinase 1/2”
CHK1: del inglés “CHeckpoint Kinase 1”
CK1: del inglés “Casein Kinase 1”
CKI: del inglés “Casein Kinase I”
COX: ciclooxigenasa
CREB: del inglés “c-AMP-Response Element Binding”
DBD: del inglés “DNA-Binding Domain”
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA-PK: del inglés “DNA-dependent Protein Kinase”
DTT: DiTioTreitol
EDTA: del inglés “EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid”
EGF: del inglés “Epidermal Growth Factor”

ABREVIATURAS

EST: del inglés “Expressed Sequence Tag”
FGF: del inglés “Fibroblast Growth Factor”
GSK3: del inglés “Glycogen Synthase Kinase 3”
GST: Glutación-S-Transferasa
GTP: del inglés “Guanosine TriPhosphate”
h: hora
IPTG: IsoPropil- β -D-TioGalactopiranosido
JIP1: del inglés “JNK-Interaction Protein 1”
JNK: del inglés “Jun N-terminal Kinase”
Kb: kilobase
kDa: kiloDalton (unidad de peso molecular)
Km: Constante de “Michaelis Menten”
KSR: del inglés “Kinase Suppressor of Ras”
MBP: del inglés “Myelin Basic Protein”
Mdm2: del inglés “Mouse double minute-2”
mg: miligramo
min: minuto
mL: mililitro
mm: milimetro
mM: miliMolar
ng: nanogramo
NLS: del inglés “Nuclear Localization Signal”
nm: nanometro
°C: grado centígrado
PBS: del inglés “Phosphate Buffer Saline”
PCAF: del inglés “P300/CBP-Associated Factor”
PD: del inglés “Proline-rich Domain”
PEST: secuencia peptídica Prolina-Glutámico-Serina-Treonina

PGE2: prostaglandina E2
PGH2: prostaglandina H2
PI3K: del inglés “Phosphatidyl Inositol 3-Kinase”
Pirh2: del inglés “P53-induced protein with a RING-H2 domain”
PKA: del inglés “Protein kinase A”
PKC: del inglés “Protein kinase C”
Plk: del inglés “Polo-like kinase”
PLK3: del inglés “Polo-Like Kinase 3”
PMSF: del inglés “Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride”
PVDF: del inglés “PolyVinylidene Fluoride”
r.p.m.: revoluciones por minuto
RAN: del inglés “Ras-related Nuclear”
Rb: del inglés “Retinoblastoma protein”
ROS: del inglés “Reactive Oxygen Species”
s: segundo
S: Svedbergs (Coeficiente de sedimentación en centrifugación)
SCC: del inglés “Squamous Cell Carcinoma”
SDS: del inglés “Sodium Dodecyl Sulfate”
SDS-PAGE: del inglés “SDS-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis”
SP: motivo Serina-Prolina
Src: del inglés “Rous sarcoma virus kinase”
SRR: del inglés “Serine-Rich Region”
SUMO: del inglés “Small Ubiquitin-related MODifier”
TAD: del inglés “Transactivation Domain”
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TAK1: del inglés “Transforming growth factor β -Activated Kinase 1”
TDZD: del inglés “Thiadiazolidinones”
TP53: del inglés “Tumor Protein 53”

ABREVIATURAS

UV: radiación UltraVioleta

V: voltio

VEGF: del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”

VRK: del inglés “Vaccinia –Related Kinase”

wt: del inglés “wild type”

μCi: microcurio

x g: veces la fuerza de la gravedad

μg : microgramo

μL: microlitro

μM: microMolar

μm: micrometro

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		

ANEXO

Differential Inhibitor Sensitivity between Human Kinases VRK1 and VRK2

Marta Vázquez-Cedeira¹, Iria Barcia-Sanjurjo², Marta Sanz-García¹, Ramiro Barcia², Pedro A. Lazo^{1*}

1 Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

Abstract

Human vaccinia-related kinases (VRK1 and VRK2) are atypical active Ser-Thr kinases implicated in control of cell cycle entry, apoptosis and autophagy, and affect signalling by mitogen activated protein kinases (MAPK). The specific structural differences in VRK catalytic sites make them suitable candidates for development of specific inhibitors. In this work we have determined the sensitivity of VRK1 and VRK2 to kinase inhibitors, currently used in biological assays or in preclinical studies, in order to discriminate between the two proteins as well as with respect to the vaccinia virus B1R kinase. Both VRK proteins and vaccinia B1R are poorly inhibited by inhibitors of different types targeting Src, MEK1, B-Raf, JNK, p38, CK1, ATM, CHK1/2 and DNA-PK, and most of them have no effect even at 100 μ M. Despite their low sensitivity, some of these inhibitors in the low micromolar range are able to discriminate between VRK1, VRK2 and B1R. VRK1 is more sensitive to staurosporine, RO-31-8220 and TDZD8. VRK2 is more sensitive to roscovitine, RO 31-8220, Cdk1 inhibitor, AZD7762, and IC261. Vaccinia virus B1R is more sensitive to staurosporine, KUS5933, and RO 31-8220, but not to IC261. Thus, the three kinases present a different pattern of sensitivity to kinase inhibitors. This differential response to known inhibitors can provide a structural framework for VRK1 or VRK2 specific inhibitors with low or no cross-inhibition. The development of highly specific VRK1 inhibitors might be of potential clinical use in those cancers where these kinases identify a clinical subtype with a poorer prognosis, as is the case of VRK1 in breast cancer.

Citation: Vázquez-Cedeira M, Barcia-Sanjurjo I, Sanz-García M, Barcia R, Lazo PA (2011) Differential Inhibitor Sensitivity between Human Kinases VRK1 and VRK2. PLoS ONE 6(8): e23235. doi:10.1371/journal.pone.0023235

Editor: Andreas Hofmann, Griffith University, Australia

Received: March 29, 2011; **Accepted:** July 10, 2011; **Published:** August 4, 2011

Copyright: © 2011 Vázquez-Cedeira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: M.V.-C. and M.S.-G. have predoctoral fellowships from JAE/CSIC. I.B.-S. has a predoctoral fellowship from Zymofeed project of the Universidad de Santiago. This work was funded by grants from Ministerio de Educación, Ciencia e Innovación [SAF2010-14935 and CSD2007-0017], Junta de Castilla y León [CSI14A08 and GR15], Fundación Sandra Ibarra, and Kuba-Fundación INBIOMED to P.A.L.; and from the Zymofeed project from Xunta de Galicia to R.B. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pedro.lazo@csic.es

Introduction

Most biological processes are regulated by reversible phosphorylation, and kinases play a central role in signal transmission. Kinases interconnect different signalling pathways in time and space, and confer flexibility to the regulation and coordination of multiple biological processes including cell division, apoptosis and survival among others. Furthermore, alteration in kinase function is a common underlying process to many pathological situations including cancer, inflammation, and neurodegeneration. The elucidation of the human kinome [1] has opened up new possibilities to characterize and develop strategies to manipulate these regulatory processes with therapeutic aims [2].

Kinase domains are very suitable for development of specific inhibitors [3], some of which have already been applied in cancer treatment, both for tyrosine kinases, such as PDGF/kit with imatinib in a variety of tumours, or to Ser-Thr kinases such as for B-Raf in melanomas [4]. Kinase domains in an inactive state are more structurally diverse than their activated form [2]. However, the main problem in development of specific inhibitors resides in the high conservation of the catalytic domain, which reduces the specificity of most inhibitors by targeting several kinases simultaneously, which makes them non specific [5,6]. This cross-inhibition results in a significant promiscuity, which can be the

cause of unexpected side effects in clinical use. The inhibition promiscuity of a kinase can be predicted based on the conservation of specific residues within the kinase fold [7].

The VRK kinase family received its name from vaccinia virus B1R, its unique kinase required for viral replication [8,9]. The VRK family has a unique ortholog in *C. elegans* [10] and *D. melanogaster* [11], but is composed of three proteins in mammals [1], a similar situation to the p53 family that has only one member in invertebrates and three members in mammals [12], which reflects the evolution of regulatory mechanisms as the organisms become more complex. These kinases in the human kinome belong to a unique and isolated subfamily with only three proteins VRK that very early, and near the kinases common trunk, diverged from the branch that much later led to casein kinase I family [1]. In addition, the VRK proteins have unique substitutions suggesting they might be pseudokinases [13]. VRK1 and VRK2 are two novel Ser-Thr kinases [14] that have a common catalytic domain with a fifty-three percent homology [13,15], and play a role in cell division processes [16–18]. However, VRK1 [13,19–21] and VRK2 [13,22] have been demonstrated to be catalytically active; while VRK3, the most divergent of the three, is catalytically inactive [13]. Interestingly, the kinase activity of VRK1 and VRK2 proteins can be regulated by allosteric protein-protein interactions; they are both kinase-

active when bound to RanGTP, and kinase-inactive when bound to RanGDP [23]. This indicates that these two kinases have two alternative conformations that can be allosterically regulated [23]. VRK1 is a nuclear kinase [13,19], while VRK2 has two isoforms, a full-length protein of 508 aminoacids (known as VRK2 and VRK2A) [13], which is anchored to cytosolic organelle membranes, such as endoplasmic reticulum and mitochondria by its C-terminal hydrophobic anchoring region [22]; and VRK2B, with 397 aminoacids lacking the C-terminal region and detected both in cytosol and nucleus, perhaps functionally replacing in some aspects VRK1 and detected only in some cellular types, like adenocarcinomas [22]. The conservation in catalytic domain and different subcellular location indicate that substrate utilization, and perhaps specificity, might determine signal compartmentalization and substrate use. The regulation of kinases in time and space is likely to be an area of intense research in the future [24]. VRK1 is expressed at high levels in tumours with p53 mutations, such as in lung cancer [25] and identifies a subgroup of breast cancer with a poorer prognosis [26,27]. VRK1 is the best characterized protein of the VRK family regarding its substrates, that include phosphorylation of p53 in T18 [16,19], c-Jun in S63 and S73 [20], ATF2 in Ser62 and T73 [21], CREB1 in S133 [28] and histone H3 in T3 and S10 [23,29], this latter modification regulates methylation and affects chromatin structure. Also, VRK1 functions as a coordinator of several processes required for cell division [18], identifies a bad prognosis signature in breast cancer [26], and specific expression patterns in human tissues, normal and malignant [30]. Kinase inhibitor screenings have not yet identified any inhibitor for the VRK family [31], consistent with its low promiscuity index [7]. Kinases can be discriminated using a small panel of thirty-eight inhibitors and three hundred and seventeen kinases as targets, including both tyrosine and serine-threonine kinases [31].

The atypical structure of VRK proteins determined by specific aminoacid substitutions [15] makes them suitable targets for development of specific inhibitors with reduced kinase promiscuity [7]. Therefore, in this work we have aimed to determine if catalytically active VRK1 and VRK2 proteins have similar or different sensitivity to current kinase inhibitors with the aim to obtain the starting point for future development of kinase specific inhibitors with limited or no cross-inhibition.

Results

Effect of kinase inhibitors on VRK1 and VRK2 kinase activity

Despite the similarity in the known *in vitro* substrates of VRK proteins, there are some differences in the primary aminoacid sequence of these kinases, suggesting that a possible way to functionally discriminate between VRK1 and VRK2 is by their sensitivity to kinase inhibitors. The VRK2 (VRK2A) crystal structure indicates that it initially has an active conformation, which is based on the structure of its kinase domain with its two lobes presenting a closed conformation, and an activation loop with a structure that is compatible with kinase activity [15], and has autophosphorylation activity [13,22]. VRK1, in addition to its autophosphorylation [19], also phosphorylates histone H3 in Thr3 and Ser10 [23,29]. As an initial approach, the effect of twenty inhibitors was determined at 100 μ M (Fig. 1) and 500 μ M (not shown) in order to identify which ones have some inhibitory effect on VRK1 or VRK2 kinase activity in the presence of 5 μ M ATP, which permits a higher sensitivity to inhibitors [6], and it is a good initial screening, since those inhibitors which are effective in the micromolar range are highly unlikely to be of any use *in vivo*, since

the intracellular ATP concentration is three orders of magnitude higher. Among these inhibitors, non-competitive and competitive, were included two that were detected to bind VRK1 and VRK2 proteins and identified by their induction of a thermal shift, such as oxindole I and Cdk1 inhibitor [15]. Their inhibitory effects were tested using an *in vitro* kinase assay based on autophosphorylation and histone H3 phosphorylation as substrate. Most of these inhibitors have little or no effect, but some differences were noticeable at these high concentrations of inhibitors. VRK1 was more sensitive to TDZD-8 (Fig. 1A) and VRK2 was more sensitive to roscovitine and Cdk1 inhibitor (Fig. 1B). The two kinases were somewhat sensitive to staurosporine, RO 31-8220, AZD7762 and IC261. Other inhibitors, such as TDZD-20 and oxindole I, were not able to inhibit either VRK1 or VRK2A. TDZD-8 and TDZD-20 are non competitive inhibitors. The inhibitor profile of VRK2B is similar to that of VRK2A (Fig. 1C) and this is consistent with the complete sequence identity of their common catalytic sites [22]. The summary of their IC₅₀ values in the presence of 5 μ M ATP is shown in Table 1.

The sensitivity of endogenous VRK1 to the inhibitors identified in kinase assays with bacterially expressed proteins was also determined. Endogenous VRK1 protein from 293T cell lysate was immunoprecipitated and used for kinase assays. The endogenous protein was sensitive to the same inhibitors as the purified protein (Fig. 2).

VRK2 is more sensitive than VRK1 to CDK inhibitors

Next we proceeded to analyze in more detail the differential effect of inhibitors targeting CDK proteins such as Cdk1 Inhibitor, roscovitine and indirubin-3'-monoxime. Indirubin-3'-monoxime had little effect at the high concentration of 100 μ M and was not studied any further (Fig. 1). VRK2 was more sensitive (Fig. 3A) to Cdk1 inhibitor than VRK1 (not shown), and the kinase activity of VRK2A was inhibited by fifty percent at 4 μ M, determined in the presence of low ATP, which is similar to that on Cdk1/cyclinB (5.8 μ M) [32]. It is important to note that the effect on both autophosphorylation and phosphorylation of H3 follow a similar pattern as shown in the graphs (Fig. 3A). Roscovitine (also known as CYC202 or Seliciclib), a pan-CDK inhibitor [33] currently in phase II clinical trials for breast and lung carcinomas [31], inhibited the activity of VRK2 (Fig. 3B) by fifty percent at approximately 25 μ M, which is higher than the one reported for inhibition of CDK1/cyclinB, and CDK2/cyclinA (0.7 μ M) [34]. VRK1 is less sensitive to roscovitine and was not inhibited at much higher concentrations, although at 250 μ M there was some noticeable effect (Fig. 3D).

Also, a pan aurora inhibitor, VX-680 [33], in use in clinical trials [35] was tested without noticeable inhibitory effect on any VRK protein (Fig. 1).

Effect of PKC inhibitors, RO 31-8220 and staurosporine, on VRK1 and VRK2 activity

Many inhibitors for PKC proteins have been reported. Among them are RO 31-8220 and staurosporine, which have been mainly tested on protein kinase C and can induce apoptosis [36], inhibit insulin secretion [37] and block PDGF response among many other effects that can require PKC [38]. The effect of RO 31-8220 was tested in kinase assays of VRK1 and VRK2A. For both kinases fifty percent inhibition was similar, between 11 to 34 μ M on H3 phosphorylation or autophosphorylation activity, which is also much higher than the 5–27 nM reported for PKC isoforms [39,40], although this inhibitor is known to inhibit multiple kinases such as MSK1, S6K1 and RSK [41,42]. The effect on both

Inhibitor Profiling of Human VRK Proteins

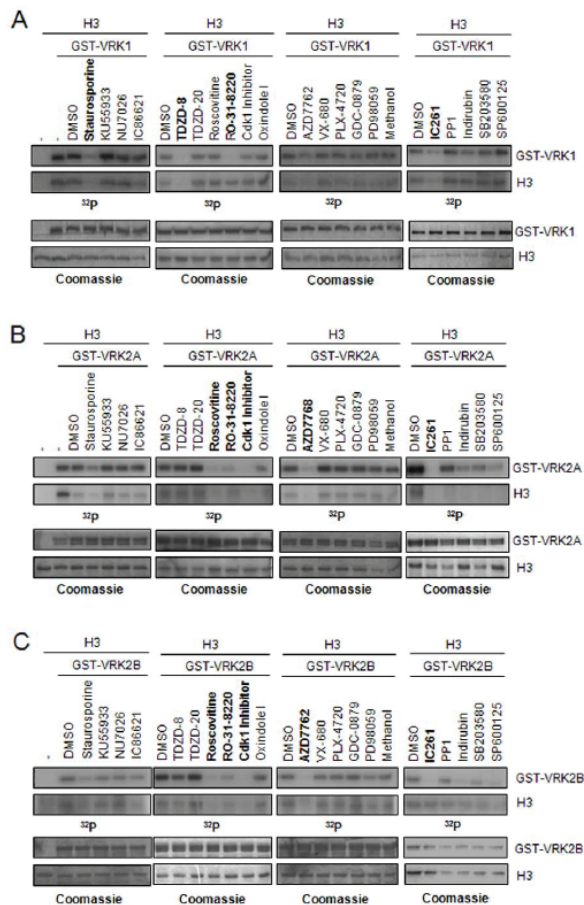


Figure 1. Effect of twenty different inhibitors on the kinase activity of human VRK1 (A), VRK2A (B) and VRK2B (C). The inhibition was assayed using both autophosphorylation (top), and phosphorylation of histone H3 (bottom), as targets in the kinase assay. All inhibitors were used at 100 μ M. In bold are marked those inhibitors that appear to be somewhat more effective in the inhibition of each kinase. The top gels show the in vitro kinase assay with ATP (5 μ M) and [γ - 32 P]-ATP (5 μ Ci), incubated for 30 minutes at 30°C. The bottom gels show the protein levels detected by Coomassie blue staining. The assays contain 2 μ g of the indicated kinase and 1 μ g of recombinant H3. TDZD-8 and TDZD-20 are non-competitive inhibitors. All the other compounds are competitive inhibitors.
doi:10.1371/journal.pone.0023235.g001

autophosphorylation and phosphorylation of H3 followed a similar pattern (not shown).

In a wide screening, staurosporine appeared to be a potential inhibitor, although not very efficient, of VRK proteins [31]. VRK1 is more sensitive and fifty percent inhibition was achieved at 15 μ M of staurosporine (Fig. 3C), which is much higher than the IC50 of 3 nM for PKC [43]. VRK2A was not inhibited by staurosporine (Fig. 3D). Therefore, staurosporine can discriminate

between VRK1 and VRK2, which is an unexpected observation since staurosporine is one of the less specific inhibitors known [31].

Effect of inhibitors targeting DNA damage response kinases: VRK2 is more sensitive than VRK1 to AZD7762

Cellular responses to DNA damage implicate many different kinases that might be suitable targets for pharmacological development, since they would sensitize cells to other chemother-

Table 1. VRK1 and VRK2A sensitivity and IC50 values of serine-threonine kinase inhibitors.

	IC ₅₀ (μM)			
	GST-VRK1		GST-VRK2A	
	Auto-phosphorylation	H3 phosphorylation	Auto-phosphorylation	H3 phosphorylation
Roscovitine	No inhibition		25.7±1.23	55.34±1.6
RO 31-8220	11.11±1.16	34.39±1.05	31.77±1.15	33.63±1.04
Cdk1 Inhibitor	No inhibition		11.2±1.33	10.77±1.29
Oxindole I	No inhibition		No inhibition	
Staurosporine	15.27±1.10	36.87±1.09	No inhibition	
KU55933	No inhibition		No inhibition	
NU7026	No inhibition		No inhibition	
IC86621	No inhibition		No inhibition	
AZD7768	No inhibition		39.98±1.07	24.38±1.07
VX-680	No inhibition		No inhibition	
PLX-4720	No inhibition		No inhibition	
GDC-0879	No inhibition		No inhibition	
PD98059	No inhibition		No inhibition	
IC261	121.39±1.05	55.93±1.04	11.09±1.10	14.71±1.13
PP1	No inhibition		No inhibition	
Indirubin	No inhibition		50.66±1.23	57.23±1.17
SB203580	No inhibition		No inhibition	
SP600125	No inhibition		27.59±1.09	11.13±1.21
TDZD-8	Inhibition at 7.5 μM		No inhibition	
TDZD-20	No inhibition		No inhibition	

The IC₅₀ values were calculated in the presence of 5 μM ATP. The individual points are the average from three experiments. The linear regression and the standard deviation were calculated with the SPSS program for VRK1 (Fig. S3) and VRK2A (Fig. S4). All values are μM. No inhibition is lack of effect at 100 μM. doi:10.1371/journal.pone.0023235.t001

apeutic drugs. Several inhibitors targeting ATM (KU 55933), DNA-PK (NU7026, IC86621), and CHK1/2 (AZD7762) were tested for their effect on VRK1 and VRK2A activity. Only

AZD7762, an inhibitor targeting CHK1 and CHK2, two serine-threonine kinases involved in DNA damage responses [44], which is currently used in clinical trials [45], had some effect on VRK activity. Fifty percent inhibition of both VRK2A autophosphorylation and H3 phosphorylation was at 30 μM (not shown). VRK1 was less sensitive than VRK2A, and some inhibition was detectable at 100 μM (Fig. S1). The other inhibitors, KU 55933, NU7026 and IC86621 had no noticeable effect on VRK1 or VRK2A kinase activity (Fig. 1).

Effect of casein kinase and MAPK inhibitors

VRK proteins are the closest group of kinases to casein kinase I family, from which they diverged very early [1]. IC261 is an inhibitor that targets several kinases such as CK1 [46–48]. Despite the closeness between the two VRK proteins, IC261 was more effective inhibiting VRK2A than VRK1, and VRK2A activity reached fifty percent inhibition at 10 μM (not shown).

Several inhibitors targeting p38 (SB203580), MEK1 (PD98059), B-Raf (PLX-4720 and GDC-0879) and JNK (SP600125) were tested. None of them was able to induce a significant inhibition of VRK1 or VRK2 activities at 100 μM (Fig. 1A,B). PP1, an inhibitor that targets several kinases such as Src, Lck and CK1δ [33], had no effect on VRK1 or VRK2 activities at 100 μM (Fig. 1A,B).

Non-competitive inhibitors: VRK1 is more sensitive than VRK2 to TDZD-8

Heterocyclic thiazolidinones, TDZD-8 and TDZD-20, are two non-competitive inhibitors that were developed to inhibit

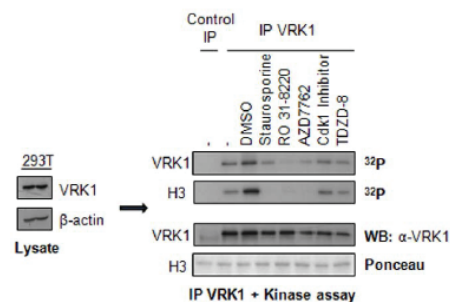


Figure 2. Inhibition of human VRK1 expressed in 293T cells. The endogenous VRK1 protein, from HEK 293T cells, was immunoprecipitated and used for an in vitro kinase assay. The relative inhibition was determined at a concentration of 75 μM for those inhibitors previously identified by testing them in bacterially expressed VRK1. Endogenous VRK1 protein was immunoprecipitated with 1F6 mAb, anti-VRK1, as control an anti-HA mAb was used. The VRK1 immunoprecipitate was incubated in the presence of 75 μM inhibitor, 5 μM ATP and 5 μCi of [³²P]ATP. doi:10.1371/journal.pone.0023235.g002

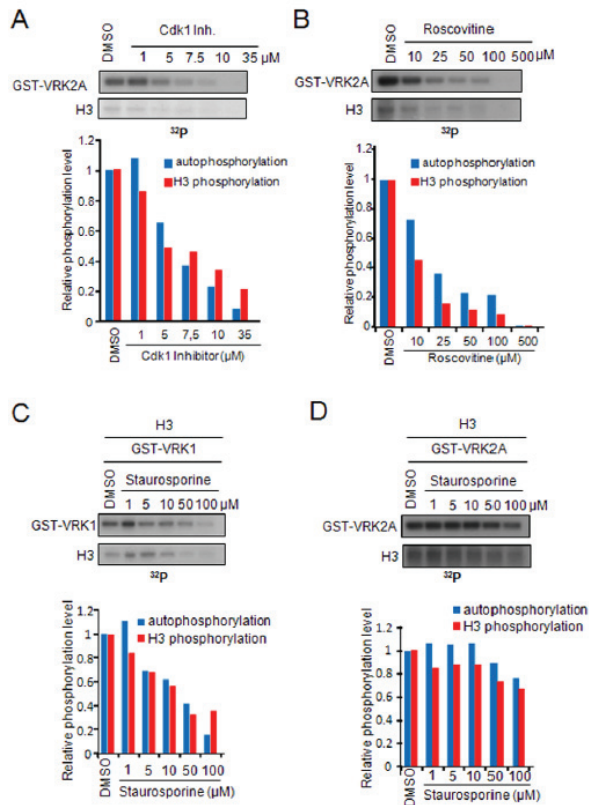


Figure 3. Differential effect of CDK inhibitors on VRK1 and VRK2 and discrimination between VRK1 and VRK2 by staurosporine. A. Inhibition of VRK2 by Cdk1 inhibitor. Quantification of the inhibition achieved on autophosphorylation and histone H3 phosphorylation is shown in the graph below. Quantification was performed in the linear response range. B. Inhibition of VRK2A by roscovitine, an inhibitor in phase II clinical trials. Quantification of the inhibition achieved on autophosphorylation and histone H3 phosphorylation is shown in the graph below. C. Inhibition of VRK1 activity by staurosporine. At the bottom the quantification in the linear response range is shown. D. Lack of effect of staurosporine on VRK2A activity. At the bottom the quantification in the linear response range is shown. doi:10.1371/journal.pone.0023235.g003

GSK3 β [49], and in clinical trials for treatment of Alzheimer's disease [50]. VRK1 was insensitive to this inhibitor, but in a very short concentration range its effect changed and VRK1 activity was fully inhibited. There was no significant inhibition of VRK1 activity at 5 μ M, but it was almost completely inhibited at 7.5 μ M, both in autophosphorylation or H3 phosphorylation (Fig. S2A). The related TDZD-20 inhibitor had no effect at similar concentrations (Fig. S2B). VRK2A was insensitive to TDZD-8 at 500 μ M (not shown) and it was also insensitive to TDZD-20 at 100 μ M (Fig. 1B).

Inhibition of vaccinia virus B1R kinase

Vaccinia virus, and related poxviruses, has a unique kinase in their genome that is required for viral DNA replication [8,9]. This

kinase, B1R, gave the name to mammalian VRK proteins, but their homology is reduced to forty percent [13], and it presents differences in its phosphorylation activity compared to the human VRK proteins. B1R has a reduced autophosphorylation, and phosphorylates p53 in multiple residues [51], whereas VRK1 [16,19] and VRK2 [22] phosphorylate p53 in a unique residue, and they also have a strong autophosphorylation activity. Therefore, it was tested the sensitivity of B1R to the panel of twenty kinase inhibitors in a kinase assay using p53 and histone H3 as substrates (Fig. 4) 5 in the presence of ATP at 5 μ M. B1R was sensitive to staurosporine, KU55933 and RO 31-8220. This result has some overlap, but is not identical, to VRK1 or VRK2 inhibition patterns.

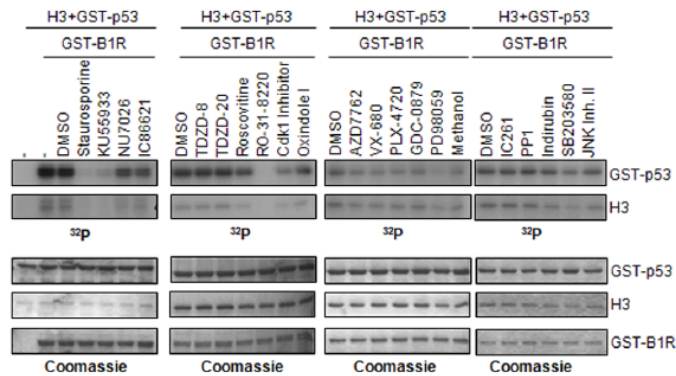


Figure 4. Inhibition of vaccinia virus B1R kinase. Phosphorylation assays were performed using 1 μ g of purified GST-p53 or Histone H3 as substrates. Quantification was performed in the linear response range. doi:10.1371/journal.pone.0023235.g004

Discussion

One of the main implications of VRK proteins is their potential utilization for developing specific inhibitors that may be used in oncologic treatments. But a main problem with current inhibitors is that they usually affect several related kinases simultaneously, although there might be some differences in affinity [5,6,33]. In practice, this means that the clinical use of inhibitors affecting several kinases might present a significant risk of uncontrolled side effects. An alternative approach to identify kinases for specific targeting is the use of kinase specific siRNA [52]. VRK proteins were not identified in an extensive kinase siRNA screening [53], probably because the effect was studied at forty-eight hours, which is not suitable for very stable proteins with half-life of four to six days such as VRK1 [54]. However, kinases knockdown has a limitation in case of very stable proteins, as VRKs, since in RNA interference experiments the observation time allows the reduction in RNA, but not in the protein level [53]. The knockdown of VRK1 and VRK2 has already provided indication of processes that might be selectively affected by their specific inhibition. Knockdown of VRK1 results in a block in cell cycle progression before the restriction point in G1 [16,54], thus it can be used in pathologies where proliferation is part of its pathogenesis. In the case of VRK2, its knockdown affects signalling by MAPK, since VRK2 modulates signal transmission by direct interaction with scaffold proteins, such as JIP1 affecting the response to hypoxia [55] or cytokines [56], and KSR1 affecting oncogene signalling [57].

Based on their structural differences, VRK1 and VRK2 kinases are predicted to be proteins with a very low promiscuity index and be insensitive to current kinase inhibitors [5,7,31]. The pattern of VRK inhibitors detected in this work confirms this prediction and presents two main characteristics. First of all, human VRK1 and VRK2, as well as vaccinia B1R, are in general very insensitive to the panel of inhibitors tested in the current study that target a large variety of human kinases with an IC50 in the nanomolar range in most cases. Most of them have little, if any, effect on VRK kinases even at a high concentration, which makes them unsuitable for *in vivo* use. The second characteristic is that the inhibition detected for some compounds does not bear any relation to a particular subtype of kinases.

Among the poor inhibitors identified, there is a clear differential pattern between VRK1 and VRK2. VRK1 is more sensitive to staurosporine and RO 31-8220, two inhibitors of PKC; while VRK2 is more sensitive to Cdk1 inhibitor and roscovitine, two Cdk1 (*cdc2*) inhibitors. Interestingly, Cdk1 inhibitor has been shown to equally interact with both kinases [15], but only VRK2 activity was inhibited. For all inhibitors, their sensitivity is reduced by three orders of magnitude when compared with their preferentially targeted kinases. Another inhibitor for which VRK proteins show some sensitivity is AZD7762 that targets CHK1 and CHK2 with much higher affinity. Although VRK2, and less efficiently VRK1, are inhibited by AZD7762, the IC50 is more than five orders of magnitude higher than that required for CHK1 and CHK2 inhibition [44,58]. Thus, IC261 inhibits CK1 at 6 micromolar, similar to the inhibition of VRK2 [5,33], but has no effect on VRK1 activity. In addition, VRK1, but not VRK2, is sensitive to a non-competitive inhibitor TDZD-8, which targets GSK3. Neither VRK1 nor VRK2 respond to current inhibitors of B-Raf (wild-type or mutant V600E), ATM, DNA-PK, MEK1 and aurora kinases. The observation that even the best inhibitors only have some effect at low micromolar concentrations, when they are assayed in the presence of 5 μ M ATP, indicates that both substrate and inhibitor have to be at similar concentrations in order to detect an inhibitory effect, and this means that *in vivo* the inhibitor is not likely to function since intracellular ATP concentration is three orders of magnitude higher.

These data suggest that a comparative analysis of VRK2 structure with that of those inhibitors to which they are somewhat sensitive might provide enough structural clues that can be used to start modelling VRK1 and VRK2 specific inhibitors with a reduced promiscuity. The differences detected in the kinase domain of VRK proteins indicate that they might be very suitable for designing specific inhibitors, because the likelihood of cross-inhibition of other kinases is very low, as suggested by the promiscuity score in which VRK1 and VRK2 are the kinases with the likelihood of having the most specific inhibitors [7]. This prediction was also confirmed in a different experimental approach based on the determination on the kinase specificity of current inhibitors [31]. VRK1 has been identified as a druggable kinase in rhabdomyosarcoma [59] and breast cancer [60].

The pattern of VRK1 and VRK2 inhibition suggests that they might be structurally closer to cdk1 than any other kinases, but even so, they maintain large differences. However, the high concentrations needed to achieve some inhibition means that none of the inhibitors tested can be used to inhibit VRK proteins in cell based assays, since they will also affect several other kinases.

Kinase activation implies a conformational change involving the activation loop that has a DFG motif in an out (inactive) or in (active) state [61,62]. These alternative conformations might affect the kinase response to inhibitors. In the DFG out or inactive state, the kinase might bind and prevent the activating conformational change, rather than displacing ATP in case of competitive inhibitors. Thus, depending on the conformation the effect may vary. On the other hand, in the active state, competitive inhibitors will displace the nucleotide. In vivo the situation is likely to be a mixture of different situations. VRK1 inhibition by TDZD-8, a non competitive inhibitor of GSK3 β [49], might be a particular case. The TDZD-8 effect on VRK1 activity seems to be an all or none effect at a specific concentration. This might reflect the switch between two alternative VRK1 conformations when the inhibitor reaches a critical threshold concentration. It would be interesting to know if TDZD-8 is acting by maintaining a loop out conformation for its activation loop [61] that has some peculiarities [15,62].

The identification and validation of specific inhibitors for human VRK proteins and vaccinia B1R have the potential of clinical applications. In this context, development of specific inhibitors for VRK1 and VRK2 is a real possibility because they are likely to be highly specific. Since these kinases have been implicated in response to growth factors and in DNA damage response, their inhibitors can make cells more sensitive to current chemotherapeutic drugs or irradiation, reducing the toxicity associated with them, since kinase inhibitors have shown to be well tolerated by patients. Use of kinase inhibitors for treatment of acute infection by poxviruses, such as smallpox, might be an alternative therapy for acute viral infection by reducing viral replication. The development of such specific inhibitors is a real possibility that needs to be pursued once the structure of these proteins and lead compounds become available.

Materials and Methods

Plasmids and expression of proteins

Human VRK1 was expressed from plasmid pGEX4T-VRK1 [19] and purified using Glutathion-Sepharose (GE Healthcare). VRK2A and VRK2B proteins were expressed from plasmids pGEX4T-VRK2A and pGEX4T-VRK2B respectively in BL21 *E. coli* strain [22]. Vaccinia virus B1R was expressed from plasmid pGEX-B1R [51]. The GST-p53 has been described previously [19,51]. GST fusion proteins were eluted from the corresponding resin with reduced glutathione [22]. Protein purification was checked in a 10% PAGE [63]. Endogenous VRK1 protein from 293T cells was immunoprecipitated with an anti-VRK1 monoclonal antibody (1F6) [63], and the immunoprecipitate was used for an in vitro kinase assay.

Reagents

All reagents were of analytical grade from Sigma. The nucleotide [³²P- γ] ATP was from PerkinElmer/NEN. Recombinant histone H3 was from Upstate Biotechnology-Millipore (Lake Placid, NY).

In vitro kinase assay

Kinase assays were performed using both purified proteins and histone H3, or immunoprecipitated candidate proteins. VRK kinase activity was determined by assaying protein phosphorylation

in a final volume of 30 μ L containing kinase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT and 150 mM KCl), 5 μ M ATP and 5 μ Ci of [³²P]ATP with 2 μ g of GST-VRK1, GST-VRK2A or GST-VRK2B protein and the indicated concentrations of kinase inhibitors. In this work we used bacterially expressed VRK1, as well as immunoprecipitated endogenous VRK1, and 1 μ g of recombinant histone H3 was used as a substrate. The kinase, substrate H3 and inhibitor were pre-incubated for 10 min at 30°C before adding ATP. In the case of vaccinia B1R protein that has a low autophosphorylation activity, 1 μ g of GST-p53 was used as substrate. Then, the reactions were performed at 30°C for 30 min in a Thermomixer (Eppendorf) and stopped by boiling in Laemmli buffer. Reactions and quantifications were performed in their linear response range. The proteins in the assay were analyzed by electrophoresis in 12.5% SDS-polyacrylamide gels. The gels were stained with Coomassie Blue or proteins were transferred to PVDF membrane and the incorporated activity was measured. The SPSS program v.19 (Inc. IBM Company) was used for linear regression analysis and calculation of IC50 values.

Kinase inhibitors

Roscovitine; Cdk1 Inhibitor; Oxindole I; IC261/SU 5607, an inhibitor of CK1; PPI, an inhibitor of LCK and FYN; PD 98059, a selective, reversible inhibitor of MEK; and SP600125 inhibitor of JNK, were from Calbiochem-Merck (Darmstadt, Germany). NU7026, an inhibitor of DNA-PK in a ATP-competitive manner; IC86621, a DNA-PK catalytic subunit inhibitor; SB 203580, inhibitor of p38; Indirubin-3'-monoxime, an inhibitor of CDK; Staurosporine, a potent inhibitor of PKC; and RO 31-8220 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). KU 55933 a selective and competitive ATM kinase inhibitor that functions as a radio- and chemosensitizer for cancer treatment, was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). VX-680, an Aurora kinases inhibitor; AZD7762, inhibitor of CHK1/2; PLX-4720 and GDC-0879, B-raf1 inhibitors were from Selleck Chemicals (Houston, TX). Non competitive inhibitors: TDZD-8 (GSK-3 β Inhibitor I), and TDZD-20 (GSK-3 Inhibitor XVII) were from Calbiochem-Merck (Darmstadt, Germany). Inhibitors are summarized in Table S1.

Supporting Information

Figure S1 Effect of AZD7762, a CHK1/2 inhibitor on VRK1 (A) and VRK2 (B). At the bottom the quantification in the linear response range is shown. VRK2A is more sensitive than VRK1 to this inhibitor independently of the assay type. AZD7762 is currently in phase II clinical trials. (TIF)

Figure S2 Effect of TDZD-8 and TDZD-20 non-competitive inhibitors on VRK1 and VRK2. A. Effect of TDZD-8 on VRK1 in autophosphorylation and H3 phosphorylation assays. At the bottom the quantification of the blots is shown. B. Effect of TDZD-20 on VRK1 autophosphorylation and H3 phosphorylation. C. Effect of TDZD-8 on VRK2A autophosphorylation and H3 phosphorylation. (TIF)

Figure S3 Determination of IC50 values for several inhibitors in autophosphorylation and histone H3 trans-phosphorylation assays of VRK1. The values from three experiments using inhibitors to which VRK1 is sensitive were used for calculation of the IC50 value. Linear regression analysis was performed and the R² value calculated using the SPSS program. (TIF)

Figure S4 Determination of IC50 values for several inhibitors in autophosphorylation and histone H3 trans-

phosphorylation assays of VRK2A. The values from three experiments using inhibitors to which VRK2A is sensitive were used for calculation of the IC50 value. Linear regression analysis was performed and the R² value calculated using the SPSS program. (TIF)

Table S1 Inhibitors of serine-threonine kinases (DOC)

References

- Manning G, Whyte DB, Martínez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912–1934.
- Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9: 28–39.
- Cohen P (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 268: 5001–5010.
- Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, et al. (2010) RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res* 70: 5518–5527.
- Bain J, McClachlan H, Elliott M, Cohen P (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371: 199–204.
- Davies SP, Reddy H, Cavano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95–105.
- Fedorov O, Marsden B, Pogacic V, Rello P, Muller S, et al. (2007) A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20523–20528.
- Banham AH, Smith GL (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: 803–812.
- Rempel RE, Traktman P (1992) Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins. *J Virol* 66: 4413–4426.
- Gorjanec M, Klerks EP, Galy V, Santarella R, Lopez-Iglesias C, et al. (2008) Caenorhabditis elegans BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in postmitotic nuclear envelope assembly. *Embo J* 26: 132–143.
- Aihara H, Nakagawa T, Yasui K, Ohta T, Hirose S, et al. (2004) Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early Drosophila embryo. *Genes Dev* 18: 877–888.
- Khoury MP, Bourdon J-C (2010) The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2: a00927.
- Nichols RJ, Traktman P (2004) Characterization of three paralogous members of the mammalian vaccinia related kinase family. *J Biol Chem* 279: 7934–7946.
- Klerks EP, Lazo PA, Aakjaer P (2009) Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family. *Histol Histopathol* 24: 749–759.
- Scheeff ED, Eswaran J, Bunkeoz G, Knapp S, Manning G (2009) Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure* 17: 128–138.
- Vega FM, Sevilla A, Lazo PA (2004) p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol Cell Biol* 24: 10366–10380.
- Neumann B, Walter T, Heriche JK, Bulkescher J, Erle H, et al. (2010) Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 464: 721–727.
- Valbuena A, Sanz-García M, Lopez-Sanchez I, Vega FM, Lazo PA (2011) Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cell Signal* 23: 1267–1272.
- Lopez-Borges S, Lazo PA (2000) The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene* 19: 3656–3664.
- Sevilla A, Santos CR, Barcia R, Vega FM, Lazo PA (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: 8950–8958.
- Sevilla A, Santos CR, Vega FM, Lazo PA (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: 27458–27465.
- Blanco S, Kimcakova L, Vega FM, Lazo PA (2006) The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS J* 273: 2487–2504.
- Sanz-García M, Lopez-Sanchez I, Lazo PA (2008) Proteomics identification of nuclear Ran GTPase as an inhibitor of human VRK1 and VRK2 (vaccinia-related kinase) activities. *Mol Cell Proteomics* 7: 2199–2214.
- Scott JD, Pawson T (2009) Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* 326: 1220–1224.
- Valbuena A, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Lopez-Encuentra A, Blanco S, et al. (2007) Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer* 58: 303–309.
- Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Chahannon C, Charpin C, et al. (2008) Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer Res* 68: 767–776.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PAL RB. Performed the experiments: MV-C IB-S MS-G. Analyzed the data: MV-C PAL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MV-C IB-S MS-G RB PAL. Wrote the paper: PAL.

- Fournier MV, Martin KJ, Kenny PA, Xhaja K, Bosch I, et al. (2006) Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer. *Cancer Res* 66: 7095–7102.
- Kang TH, Park DY, Kim W, Kim KT (2008) VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression. *J Cell Sci* 121: 3035–3041.
- Kang TH, Park DY, Choi YH, Kim KJ, Yoon HS, et al. (2007) Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 27: 8533–8546.
- Kilpinen S, Ojala K, Kallioniemi O (2010) Analysis of kinase gene expression patterns across 5681 human tissue samples reveals functional genomic taxonomy of the kinome. *PLoS ONE* 5: e15068.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, et al. (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 26: 127–132.
- Andreani A, Cavalli A, Granaola M, Leoni A, Locatelli A, et al. (2000) Imidazo[2,1-b]thiazolo[5,4-d]pyridine- and indolymethylene-2-indolones: a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Design, synthesis, and CDK1/cyclin B inhibition. *Anticancer Drug Des* 15: 447–452.
- Bain J, Pater L, Elliott M, Shapiro N, Hastie CJ, et al. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408: 297–315.
- De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek I, Strnad M, et al. (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 243: 518–526.
- Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Jr., et al. (2008) Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res* 14: 1639–1648.
- Han Z, Pantazis P, Lange TS, Wyche JH, Hendrickson EA (2000) The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell Death Differ* 7: 521–530.
- Kojima I, Mogami H, Shibata H, Ogata E (1993) Role of calcium entry and protein kinase C in the progression activity of insulin-like growth factor-1 in Balb/c 3T3 cells. *J Biol Chem* 268: 10003–10006.
- Yeo EJ, Provost JJ, Exton JH (1997) Dissociation of tyrosine phosphorylation and activation of phosphoinositide phospholipase C induced by the protein kinase C inhibitor Ro-31-8220 in Swiss 3T3 cells treated with platelet-derived growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1356: 308–320.
- Keller HU, Niggli V (1995) The PKC-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNs. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1111–1116.
- Mahon TM, Matthews JS, O'Neill LA (1997) Staurosporine, but not Ro 31-8220, induces interleukin 2 production and synergizes with interleukin alpha in EL4 thymoma cells. *Biochem J* 325(Pt 1): 39–45.
- Alessi DR (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 402: 121–123.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 17: 4426–4441.
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, et al. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 397–402.
- Zabludoff SD, Deng C, Grondine MR, Sheehy AM, Ashwell S, et al. (2008) AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol Cancer Ther* 7: 2955–2966.
- Mitchell JB, Choudhuri R, Fabre K, Sowers AL, Citrin D, et al. (2010) In vitro and in vivo radiation sensitization of human tumor cells by a novel checkpoint kinase inhibitor, AZD7762. *Clin Cancer Res* 16: 2076–2084.
- Behrend I, Milbe DM, Stoter M, Deppert W, Campbell LE, et al. (2000) IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* 19: 5303–5313.
- Cheong JK, Hung NT, Wang H, Tan P, Voorhoeve PM, et al. (2011) IC261 induces cell cycle arrest and apoptosis of human cancer cells via CK1/delta/varepsilon and Wnt/beta-catenin independent inhibition of mitotic spindle formation. *Oncogene*.
- Stoter M, Bamberg AM, Aylan B, Kurth M, Spiedel D, et al. (2005) Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. *Oncogene* 24: 7964–7975.
- Martinez A, Alonso M, Castro A, Perez C, Moreno EJ (2002) First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 45: 1292–1299.

Inhibitor Profiling of Human VRK Proteins

50. Savage MJ, Gingrich DE (2009) Advances in the Development of Kinase Inhibitor Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Drug Develop Res* 70: 125–144.
51. Santos CR, Vega FM, Blanco S, Barcia R, Lazo PA (2004) The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* 328: 254–265.
52. Knight ZA, Lin H, Shokat KM (2010) Targeting the cancer kinase through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 10: 130–137.
53. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7: 591–600.
54. Valbuena A, Lopez-Sanchez I, Lazo PA (2008) Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression. *PLoS ONE* 3: e1642.
55. Blanco S, Santos C, Lazo PA (2007) Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol Cell Biol* 27: 7273–7283.
56. Blanco S, Sanz-García M, Santos CR, Lazo PA (2008) Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS ONE* 3: e1660.
57. Fernandez IF, Blanco S, Lozano J, Lazo PA (2010) VRK2 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Inversely Correlates with ErbB2 in Human Breast Cancer. *Mol Cell Biol* 30: 4687–4697.
58. Morgan MA, Parsels IA, Zhao L, Parsels JD, Davis MA, et al. (2010) Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res* 70: 4972–4981.
59. Nishijo K, Chen QR, Zhang L, McCleish AT, Rodriguez A, et al. (2009) Credentiaing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 69: 2902–2911.
60. Martín KJ, Patrick DR, Bisell MJ, Fournier MV (2008) Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS ONE* 3: e2994.
61. Lochhead PA (2009) Protein kinase activation loop autophosphorylation in cis: overcoming a Catch-22 situation. *Sci Signal* 2: pe4.
62. Eswaran J, Knapp S (2010) Insights into protein kinase regulation and inhibition by large scale structural comparison. *Biochim Biophys Acta* 1804: 429–432.
63. Valbuena A, Lopez-Sanchez I, Vega FM, Sevilla A, Sanz-García M, et al. (2007) Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch Biochem Biophys* 465: 219–226.

