

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

BÚSQUEDA DE SEÑALES DE TRANSPORTE NUCLEOCITOPLÁSMICO EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LOS TELÓMEROS

Alumno: Conde Gallastegi, Enrique
Fecha: Junio 2015

Director
Dr. Jose Antonio Rodríguez

Curso Académico
2014/2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	Pág. 1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	Pág. 8
2.1. Análisis bioinformático.	Pág. 8
2.1.1. Predicción de NLS.	Pág. 8
2.1.2. Predicción de NES.	Pág. 8
2.1.3. Criterio de selección.	Pág. 8
2.2. Análisis experimental.	Pág. 9
2.2.1. Descripción del ensayo de exportación nuclear. .	Pág. 9
2.2.2. Clonación.	Pág. 10
2.2.3. Transfección, tratamiento y fijación.	Pág. 12
2.2.4. Microscopía de fluorescencia.	Pág. 12
3. RESULTADOS.	Pág. 14
3.1. Análisis bioinformático.	Pág. 14
3.1.1. Predicción de NLS.	Pág. 14
3.1.2. Predicción de NES.	Pág. 15
3.2. Análisis experimental.	Pág. 17
3.2.1. Clonación.	Pág. 17
3.2.2. Ensayo de exportación nuclear.	Pág. 18
4. DISCUSIÓN.	Pág. 22
5. CONCLUSIÓN.	Pág. 24
6. BIBLIOGRAFÍA.	Pág. 24

1. INTRODUCCIÓN

El núcleo de la célula eucariota está separado del citoplasma por una doble membrana, que divide eficazmente los procesos nucleares, como la replicación de DNA y la transcripción/maduración de RNA, de la traducción del mRNA en el citoplasma. El transporte de macromoléculas hacia dentro y fuera del núcleo es esencial para la regulación del crecimiento celular y está mediado por canales que permean la envoltura nuclear, llamados complejos de poros nucleares (NPC). Mientras que la mayoría de las moléculas pequeñas (menores de 40 kDa) pueden difundir pasivamente a través del NPC, muchas proteínas contienen señales en su secuencia aminoacídica que facilitan un transporte nucleocitoplásmico dependiente de energía, específico y rápido (Nigg *et al.*, 1997).

Las señales de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) hacen posible la importación nuclear mediante la unión directa a uno o más receptores de la familia de las α -importinas o β -importinas (Ohno *et al.*, 1998). Otras secuencias proteicas median el proceso contrario, es decir, la exportación proteica del núcleo al citoplasma (Nakielny y Dreyfuss, 1997). Este transporte al citoplasma se lleva a cabo gracias a las llamadas señales de exportación nuclear, (NES) (*nuclear export signal*), y las rutas y los detalles de este mecanismo están menos estudiadas que las de importación. Las proteínas que contienen ambas secuencias, NLS y NES, tienen la capacidad de alternar su localización nucleocitoplásmica; y por lo tanto, mediante la regulación de este movimiento, la célula es capaz de controlar la localización y la actividad de dichas proteínas (Hood y Silver, 1999). Ambos procesos, de importación y exportación nuclear se resumen en la **Figura 1**.

Las primeras NESs “transferibles”, es decir, aquellas secuencias capaces de proporcionar la exportación cuando se fusionan a otras proteínas, fueron identificadas en la proteína Rev del VIH-1 (Pemberton *et al.*, 1998) y en el inhibidor de la protein kinasa (PKI) (Wen *et al.*, 1995). Desde el descubrimiento de estas señales se han podido detectar más proteínas celulares, de muy diversas funciones, que también las contenían, entre ellas la famosa proteína supresora de tumores p53 (Nguyen *et al.*, 2012). Los estudios iniciales de estas secuencias llevaron a proponer un consenso de NES [$\phi^1 - (X)_{2-3} - \phi^2 - (X)_{2-3} - \phi^3 - (X) - \phi^4$], con cuatro residuos

hidrofóbicos conservados (ϕ^{1-4}) separados por un número variable de residuos intermedios (X) (Prieto *et al.*, 2014). Este tipo de señal realiza su función uniéndose directamente a un receptor de exportación nuclear llamado CRM1/exportina, y la formación del complejo nuclear NES-CRM1 se estabilizada por la RanGTPasa unida a GTP, como se muestra en la **Figura 1** (Senapedis *et al.* 2014).

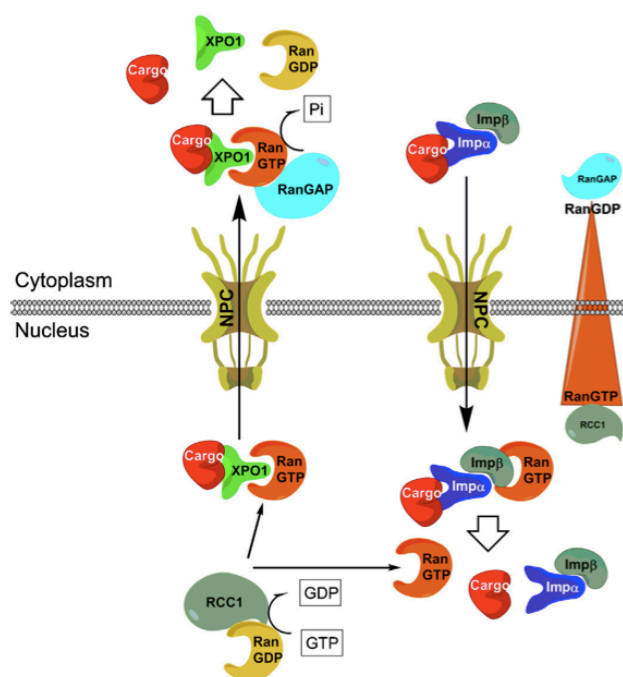


Figura 1. Representación de los procesos de importación y exportación nuclear mediada por las NLSs y las NESs. La importación nuclear ocurre cuando la α -importina reconoce y se une a las señales de importación nuclear (NLS) presentes en algunas proteínas. La importación se facilita mediante la posterior unión de la β -importina en el citoplasma y este complejo se transporta hacia el núcleo a través del complejo de poros nucleares (NPC). Una vez en el núcleo la unión de RanGTP induce la liberación de la proteína carga. La exportación nuclear ocurre cuando CRM1 reconoce y se une a la señal de exportación nuclear de la proteína. La exportación en este caso se ve facilitada por la posterior unión de RanGTP formando un complejo que se transporta hacia el citoplasma a través del NPC. En el citoplasma RanGTP se hidroliza a RanGDP gracias a la presencia de RanGAP, que facilita la hidrólisis, liberando así la proteína carga. RCC1 y RanGAP aseguran un control exhaustivo de la importación y de la exportación mediante un gradiente de Ran GDP:GTP a través de la envoltura nuclear (Senapedis *et al.* 2014)

Las secuencias NES poseen una destacable importancia en la actividad de algunas proteínas. Se ha demostrado que tienen un papel importante en la transición epitelio-mesenquimal (Muqbil *et al.*, 2014), aunque la implicación que tienen estos mecanismos en el cáncer quizá sea la mas llamativa y la más interesante a la hora de buscar razones para indagar aun más en ellos. Está reconocido que los exportadores nucleares, en particular el CRM1, se expresan de forma aberrante en el cáncer, provocando la exportación de muchos de los represores de tumores conocidos y de

muchos reguladores del crecimiento celular como p53 y FOXO (Turner *et al.*, 2012). Por ello, hay laboratorios que tratan de buscar moléculas inhibitoras de CRM1, llamadas colectivamente inhibidores selectivos de la exportación nuclear, SINEs, como un tratamiento universal para el cáncer.

En este proyecto los mecanismos de transporte nucleocitoplásmico han inspirado una búsqueda de proteínas que puedan contener este tipo de señales, y una familia de proteínas a ser estudiada por su trascendencia en la actualidad, por los avances en su estudio y por su interés en la investigación del cáncer en particular es, sin duda alguna, la relacionada con los telómeros. El término telómero hace referencia a un gran complejo nucleoproteico encontrado en los extremos de los cromosomas, donde su estructura es diferente al resto de la cromatina.

El DNA de los telómeros de todos los organismos eucariotas consiste en secuencias cortas y repetitivas. Para todos los vertebrados, incluyendo a los humanos, la secuencia repetitiva es d(TTAGGG) (Gómez *et al.*, 2012). La mayor parte de ese DNA está organizado en nucleosomas, solamente la parte más distal se puede encontrar en la conformación especial de los telómeros. La hebra rica en guanina siempre se encuentra en sentido 5'-3' hacia la porción final del cromosoma y contiene un extremo de unos 200 nucleótidos que sobresale debido al problema de la replicación terminal. El hecho de que el DNA sea sintetizado solamente en la dirección 5'-3' significa que la cadena retrasada de la horquilla de replicación se sintetiza en la forma de fragmentos de DNA discontinuos (fragmentos de Okazaki), cada uno de los cuales es cebado con un cebador de RNA por una enzima separada. Sin embargo, cuando la horquilla de replicación se aproxima al extremo de un cromosoma, la maquinaria de replicación se encuentra con un problema: no hay lugar para establecer el cebador de RNA necesario para comenzar el fragmento de Okazaki (Alberts, 3th ed.). Sin una estrategia para enfrentar este problema, en el cromosoma queda un extremo de hebra sencilla. Los telómeros forman vueltas llamadas *T-loops* que sirven para aislar los extremos de los cromosomas y protegerlos. En esta conformación, como se observa en la **Figura 2**, la parte de doble hebra describe un amplio bucle estabilizado por las proteínas de unión a telómeros o complejo shelterina, mientras que al final del *T-loop*, la sección de hebra sencilla desplaza una de las hebras del tramo de hebra doble e interacciona con una de ellas.

A esta estructura de triple hebra se le llama *D-loop*, del inglés *displacement loop* (Zvereva *et al.*, 2010).

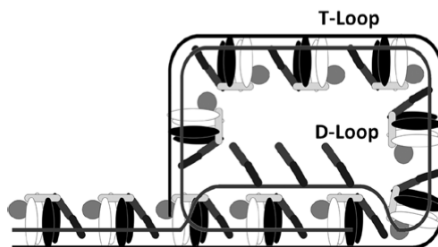


Figura 2. Representación de un telómero con la configuración de *T-loop* y *D-loop*. La hebra doble de los telómeros adquiere la conformación de *T-Loop*, mientras que la hebra sencilla desplaza a una de las hebras anteriores para adquirir una configuración de triple hebra llamada *D-Loop*. Esta configuración está estabilizada por los complejos shelterina. (Gómez *et al.*, 2012)

Como ya se ha indicado, un gran número de proteínas interactúan con las secuencias repetitivas de los telómeros. La telomerasa es, quizá, la más conocida de todas. Se trata de una transcriptasa inversa específica, y es, en la mayoría de los mamíferos, la encargada de mantener la longitud telomérica. Es una ribonucleoproteína compuesta por una unidad catalítica llamada TERT (*telomerase reverse transcriptase*) y por una parte de RNA que sirve como molde para sintetizar las unidades repetidas de los telómeros (Wyatt *et al.*, 2010). La localización subcelular de la telomerasa parece estar regulada por la proteína TCAB1 (Zhong *et al.*, 2011). Durante la fase S TCAB1 controla la localización del complejo telomerasa en los cuerpos de Cajal, por lo que se trata de un elemento esencial para la actividad de este complejo.

Previamente se ha mencionado el complejo shelterina, las proteínas de unión a telómeros. En humanos los telómeros están unidos por un complejo de seis proteínas llamado complejo shelterina, que como se puede observar en la **Figura 3** está constituido por TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 y POT1. Este complejo previene la activación de la respuesta de daño del DNA (DDR) en los extremos de los cromosomas y actúa en la regulación de la actividad de la telomerasa.

Las proteínas más conocidas del complejo son la TRF1 y TRF2, siendo TRF1 la primera en ser descubierta. El extremo C terminal de esta proteína reconoce y se une específicamente a un fragmento de DNA telomérico. TRF2, por otra parte, tiene funciones únicas actuando como estabilizador de la hebra sencilla que sobresale en

los extremos y previniendo la fusión de telómeros (Smogorzewska *et al.*, 2000). TRF1 y TRF2 impiden la actividad de la telomerasa, lo que se traduce en inhibición de la elongación telomérica (Bianchi y de Lange, 1999).

La proteína RAP1 es reclutada por la TRF2, aunque hasta la fecha su rol *in vivo* se desconoce. Aun así, se ha demostrado que su sobreexpresión causa la elongación de los telómeros y que su deficiencia contribuye a la fragilidad y a la recombinación de los mismos (Martínez *et al.*, 2010). Rap1 no solo se une a los telómeros, si no que también a secuencias no teloméricas mediante el reconocimiento del motivo TTAGGG, y tiene roles fuera de los telómeros como factor de transcripción que controla la expresión de enzimas glicolíticas y genes ribosómicos.

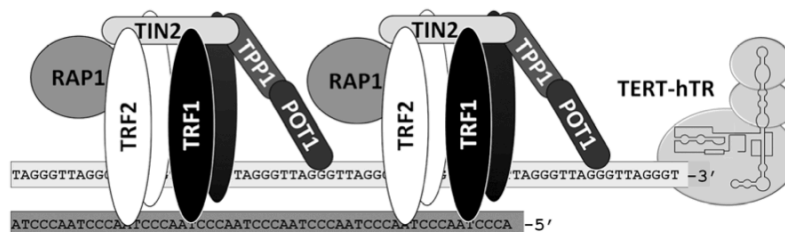


Figura 3. Representación esquemática de las proteínas de unión a telómeros o complejo shelterina. En la figura se muestran dos complejos shelterina con sus componentes proteicos interaccionando entre sí y con las secuencias teloméricas. También se muestra el complejo telomerasa compuesto por su unidad catalítica (TERT) y el RNA molde (Gómez *et al.*, 2012).

La proteína TPP1, por otro lado, es necesaria para reclutar a la telomerasa *in vivo*, tal y como lo demostraron Tejera *et al.* (2010).

Finalmente, en el complejo shelterina, se encuentra POT1, acrónimo de *protection of telomeres*. La anteriormente mencionada TPP1 se une a POT1 por su extremo carboxilo terminal. Esta unión es constante y necesaria para la localización de POT1 en los telómeros y para la regulación de la elongación de los telómeros mediante la interacción con la telomerasa. En la **Figura 4** se puede ver como POT1 regula la elongación telomérica actuando como un activador o como un inhibidor de la telomerasa dependiendo de la posición de POT1 en el extremo 3' del DNA de hebra sencilla. POT1 contribuye a la protección de los telómeros inhibiendo la formación de puentes anafásicos y evitando que el sistema de reparación de DNA reconozca erróneamente la hebra sencilla (Baumann y Price, 2011).

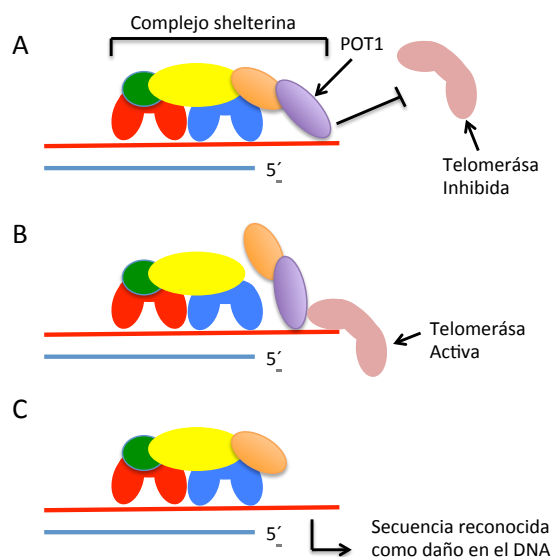


Figura 4. Regulación de la telomerasa y del sistema de reparación del DNA llevado a cabo por POT1. (A) POT1 impide el acceso de la telomerasa aislando el extremo terminal del DNA. (B) Durante la fase S un modo alternativo de unión hace accesible el extremo 3' a la telomerasa. (C) La ausencia de POT1 conlleva a la activación del sistema de reparación del DNA.

Además de las proteínas que interactúan directamente con los telómeros, existen otras que actúan interaccionando con el complejo shelterina, y entre ellas destaca la tanquirasa, el principal factor asociado a TRF1. La tanquirasa es un enzima responsable de polimerizar unidades de ADP ribosa específicamente en los residuos de ácido glutámico de TRF1. Hsiao y Smith (2007) demostraron que esta modificación post-traducciona conlleva a que TRF1 pierda la afinidad por el DNA, lo que le lleva finalmente a ser ubiquitinada y degradada por el proteosoma. Por lo tanto, la tanquirasa es un regulador positivo de la elongación de los telómeros, pues actúa efectivamente eliminando a TRF1 de los telómeros. También tiene una función durante la mitosis, en la transición metafase-anafase. En este paso las cromátidas hermanas requieren la tanquirasa para poder segregar los telómeros hermanos. Ambas funciones nucleares pueden verse en la **Figura 5**. Además de en el núcleo, también tiene otras funciones en el citoplasma, donde se asocia con el aparato de Golgi y cataliza la misma reacción en sustratos en un proceso importante de transporte vesicular inducido por insulina.

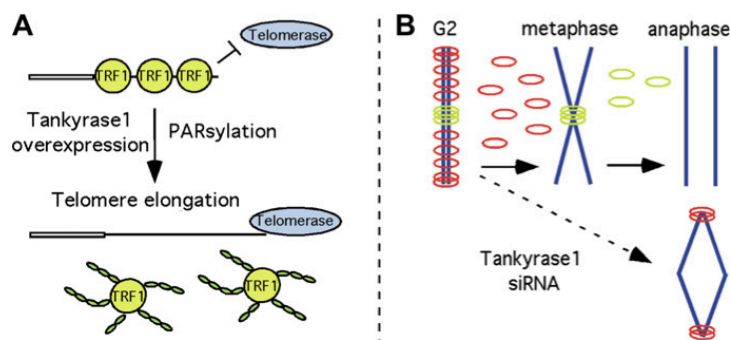


Figura 5. Funciones nucleares de la tanquirasa. (A) La tanquirasa es un regulador positivo de la elongación telomérica. (B) Además es requerida para la segregación de los telómeros hermanos en la transición metafase-anafase. (Hsiao y Smith, 2007)

Teniendo en cuenta la importancia de las funciones que tienen las proteínas mencionadas en la regulación de la estructura de los telómeros e indirectamente en las bases moleculares del cáncer; y destacando, además, que algunas de ellas presentan funciones en varios compartimentos celulares, este proyecto pretende localizar señales de localización nuclear (NLS) y señales de exportación nuclear (NES) en dichas proteínas. Así pues, se pretende estudiar las NES y NLS que puedan contener 8 de las proteínas relacionadas con los telómeros: TERT, TCAB1, TRF1, TRF2, RAP1, TPP1, POT1 y tanquirasa.

El estudio de estas señales consta de dos partes. Por un lado se realiza un análisis bioinformático mediante programas en web, cuyos algoritmos de búsqueda de señales se complementan para priorizar candidatos. La segunda parte consiste en un ensayo de exportación nuclear in vivo, basado en una proteína quimérica fluorescente y transportadora de la secuencia a testear, que permitirá determinar la actividad exportadora que contiene esta última.

Las ocho proteínas fueron sometidas al análisis bioinformático y dos de ellas fueron seleccionadas para ser estudiadas mediante el ensayo experimental.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

2.1.1 Predicción de NLS

Para analizar la secuencia de aminoácidos de las 8 proteínas propuestas se usaron tres programas web de predicción de NLS: Wregex (Prieto *et al.*, 2014), ELM (Gould *et al.*, 2010) y NLS mapper (Kosugi *et al.*, 2009). Cada programa utiliza diferentes algoritmos para identificar secuencias de aminoácidos que puedan constituir potenciales NLSs. Los tres programas funcionan introduciendo en ellos los archivos FASTA de las proteínas a estudiar y en todos los casos se analizaron las secuencias de todas las isoformas presentes en la base de datos Uniprot. Estas herramientas predicen posibles NLS indicando la posición en la que se encuentra, los aminoácidos que la componen y la fiabilidad de la predicción mediante un sistema de puntuación.

2.1.2. Predicción de NES

Para la predicción de NES se emplearon también tres programas web: Wregex (Prieto *et al.*, 2014), ELM (Gould *et al.*, 2010) y Net NES (la Cour *et al.*, 2004). El Net NES es un programa exclusivo para localizar NES, cuyo funcionamiento coincide con el de los demás: introduciendo el archivo FASTA de la proteína en cuestión el programa proporciona las posibles secuencias NES. En este caso también se analizaron las mismas isoformas que en la predicción de NLS.

2.1.3. Criterio de selección.

Para seleccionar las secuencias que pasarían a ser estudiadas experimentalmente, se tomaron tres criterios y se aplicaron consecutivamente. Primero, se descartaron todas aquellas señales, NLS o NES, que ya estuviesen caracterizadas. Segundo, se tomaron aquellas secuencias en las que más de un programa hubiese coincidido en predecirla y tuvieran puntuación alta. Por último, se tomó en cuenta el criterio del alumno en cuanto al interés que pudiera evocar la proteína donde se detecta la señal.

Una vez obtenidos los resultados de este análisis se seleccionaron las NES predichas de POT1 y tanquirasa para ser estudiadas experimentalmente. Las razones de esta decisión se profundizan en el apartado de discusión.

2.2. ANÁLISIS EXPERIMENTAL.

nota: el trabajo experimental se realizó bajo la supervisión directa del director del TFG

2.2.1. Descripción del ensayo de exportación nuclear.

El ensayo de exportación in vivo utilizado en este proyecto fue desarrollado por Henderson y Eleftheriou (Henderson y Eleftheriou, 2000), y se basa en la capacidad que tengan las secuencias candidatas para restaurar la actividad exportadora de la proteína quimérica Rev(1.4)-GFP, una fusión entre un mutante de la proteína del VIH Rev, cuyo NES se ha eliminado, y la proteína de fluorescencia verde (GFP). En la **Figura 6** se muestra un esquema del ensayo.

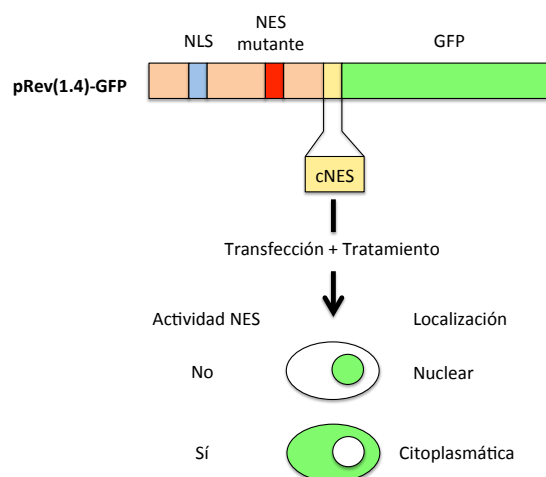


Figura 6. Representación esquemática del ensayo de exportación in vivo realizado en este proyecto. Las NES candidatas (cNES) se clonan en el plásmido pRev(1.4)-GFP entre Rev(1.4) y GFP para obtener un plásmido Rev(1.4)-cNES-GFP. Después de la transfección de este constructo en células y el tratamiento con los compuestos adecuados se prueba la actividad de la posible NES mediante el análisis de la localización subcelular de la proteína. Si la proteína fluorescente se encuentra en el núcleo la cNES se considerará inactiva, mientras que si se encuentra en el citoplasma la cNES será activa.

En el ensayo se utilizó el vector pRev(1.4)-GFP. Este plásmido codifica para un mutante de la proteína Rev(1.4) (fusionada con GFP), la cual contiene una NES inactiva, pero retiene la NLS, por lo que se acumula en el núcleo/nucleolo de las células. Las NES candidatas (cNES) que se predijeron en el trabajo bioinformático se clonaron entre Rev(1.4) y GFP, obteniendo plásmidos Rev(1.4)-cNES-GFP. Este plásmido fue transfectado en células HeLa, tratadas con los compuestos adecuados

(apartado 2.2.3.) y se detectó la localización subcelular de la proteína quimérica por microscopía de fluorescencia.

2.2.2. Clonación

Primero de todo se diseñó una pareja de oligonucleótidos que codifican cada NES a estudiar. Cada pareja de oligonucleótidos se diseñó de forma que fuesen complementarios por los extremos. En la **Tabla 1** se muestran los oligonucleótidos diseñados para cada una de las cNES, cuyas secuencias se mandaron a la empresa Biologio para que fuesen sintetizados.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados de la NES de tanquirasa y POT1. En negrita se muestran las secuencias que reconocen las enzimas de restricción.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
Tanquirasa-F	CTG ATG GAT CCA GCC AGA GAA GCA GAC CTA GCT AAG GTT AAG AAG ACA CT
Tanquirasa-R	GGC GAC CGG TGG ATT AAT GAT TTC CAG AGC GAG TGT CTT CTT AAC CTT AG
POT1-F	CTG ATG GAT CCA ACA TCG TGG ATT CCT TCT TCT GTG GCA GAA GCA CTG GG
POT1-R	GGC GAC CGG TGG ATA TTG GAG GGG TAC AAT ACC CAG TGC TTC TGC CAC AG

Con los oligonucleótidos se prepararon los insertos correspondientes, los cuales contienen la secuencia candidata flanqueada por dos extremos cohesivos. Para ello los oligonucleótidos complementarios (solo por los extremos) se pusieron en contacto y se extendieron con la enzima Klenow, para obtener unos oligonucleótidos de doble hebra y con extremos romos. A continuación se digirieron con las enzimas de restricción BamH1 y BstH1, dejando ambos extremos cohesivos.

Después se ligó el inserto con el plásmido Rev(1.4)-GFP. El plásmido como se puede ver en la **Figura 7**, contiene una región diseñada para insertar la NES candidata. El plásmido se trató con las mismas enzimas de restricción que el inserto y posteriormente se puso en contacto con el inserto para terminar de consolidar el plásmido con la ligasa.

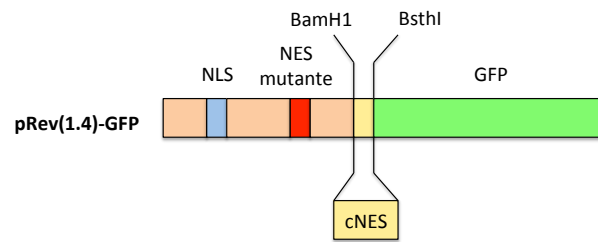


Figura 7. Inserción de una NES candidata en el vector pRev(1.4)-GFP. Las cNES se insertan en el plásmido pRev(1.4)-GFP entre Rev(1.4) y GFP para obtener un plásmido Rev(1.4)-cNES-GFP. El inserto se introduce entre las dos zonas de restricción que se han cortado con las enzimas BamH1 y BstH1.

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes con los plásmidos mediante el método de shock térmico, por lo que se obtuvieron dos lotes de bacterias, uno trasportaba la secuencia de tanquirasa y el otro la de POT1. El plásmido contiene una región que proporciona resistencia a la kanamicina, por lo que las bacterias transformadas correctamente, es decir aquellas que tengan el plásmido cerrado con el inserto, crecerán en presencia de dicho antibiótico. Se sembraron tres placas de agar que contenían kanamicina. Una de ellas se sembró con bacterias que contenían el plásmido abierto y sin inserto, y que por lo tanto no podría crecer en presencia de kanamicina. Esta placa serviría de control. Las otras dos placas se sembraron cada una con las bacterias transformadas con las secuencias de tanquirasa y POT1.

Con el fin de revisar si efectivamente existía inserto en el plásmido de las bacterias se realizó una PCR con muestras de varias colonias bacterianas, seguida de una electroforesis en gel de agarosa. Para la PCR se emplearon unos cebadores que flanqueaban la zona de inserción. Como se puede observar en la **Figura 8**, cuando no había inserto la zona amplificada tenía un tamaño de 200 pb, mientras que si existía inserto el tamaño aumentaba en aproximadamente 60 pb.

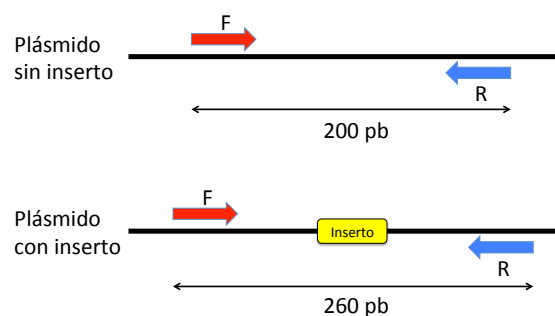


Figura 8. PCR de la zona de inserción del plásmido Rev(1.4)-GFP. Cuando en el plásmido había un inserto el segmento que se ampliaba era unos 60 pb mayor que cuando no existía inserto.

Terminando con el apartado de clonación, se llevó a cabo la purificación del plásmido empleando para ello el kit Miniprep de Qiagen. Después se calculó la concentración de DNA obtenido empleando un espectrómetro Nanodrop. Para controlar que la secuencia insertada esta intacta y sin mutaciones, se enviaron las muestras de DNA a la empresa STAB VIDA para secuenciarlas.

2.2.3. Transfección, tratamiento y fijación.

Se utilizaron placas de 12 pocillos para cultivar células HeLa sobre un cubreobjetos estéril previamente colocado en el fondo del pocillo. Las células HeLa se transfectaron con un control negativo, que consistía en un plásmido pRev(1.4)-GFP sin inserto; con un control positivo, consistente en una NES confirmada en estudios previos (García-Santisteban *et al.*, 2012); y con el plásmido con las secuencias candidatas, extraído en el paso anterior. Para ello se utilizó el reactivo XtremeGENE (Roche), el cual forma micelas alrededor del DNA que las células internalizan como material genético propio. Se prepararon dos pocillos por muestra.

24 horas después de la transfección todos los pocillos se trataron con 1µg/ml de cicloheximida y la mitad de los pocillos con 1µg/ml de actinomicina D (Act.D) durante tres horas. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica, asegura que la GFP citoplásmica provenga de la exportación nuclear y no de una nueva síntesis proteica. La actinomicina D es un inhibidor de la transcripción, y cuando se añade a las células previene la asociación nucleolar y la importación nuclear de Rev, por lo que causa la acumulación citoplásmica de la proteína Rev que contenga una NES.

Las células, ya transfectadas y tratadas, se fijaron con 3,7% formaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se montó el cubreobjetos del fondo de los pocillos sobre un portaobjetos para la detección directa de las proteínas autofluorescentes.

2.2.4. Microscopía de fluorescencia

Las muestras fueron examinados en *SIGKER Analytical and High-Resolution Microscopy* en el servicio de Biomedicina (UPV/EHU). Se utilizó un microscopio de

fluorescencia Zeiss Axioskop y las imágenes fueron tomadas con la cámara digital Nikon DS-Qi1Mc utilizando el programa NIS-Elements F. Las fotos se tomaron con un objetivo 40X.

Para cada muestra se realizó un recuento de células. Se contaron más de 100 células por preparación, clasificando cada una de ellas en tres grupos posibles: nucleares (presentan la proteína quimérica en el núcleo), nucleocitoplásmicas (presentan la proteína tanto en el núcleo como en el citoplasma) o citoplásmicas (presentan la proteína únicamente en el citoplasma). Los resultados del recuento se representaron en forma de porcentaje de células en cada uno de los grupos.

Además a cada secuencia estudiada se le asignó una puntuación basada en la actividad de exportación que poseía. Este sistema de puntuación fue desarrollado por Henderson y Eleftheriou (Henderson y Eleftheriou, 2000) y evalúa la actividad NES que posee una secuencia en función de los resultados obtenidos en el recuento de células. Los criterios que se tomaron para asignar las puntuaciones se reflejan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Sistema de puntuación adaptado del descrito por Henderson y Eleftheriou. A cada secuencia se le asigna una puntuación desde +1 hasta +8 dependiendo del porcentaje de células en la que la proteína Rev(1.4)-cNES-GFP se acumule parcial o completamente en el citoplasma.

Sistema de puntaje de NES				
Puntuación de actividad de la NES	GFP se acumula parcialmente en el citoplasma (%células)		GFP pasa completamente al citoplasma (%células)	
	-Act.D	3 h Act.D	-Act.D	3 h Act.D
1+	<50	51-80	Ninguno	
2+	<50	>80	-	<20
3+			<20	20-50
4+			<20	51-80
5+			<20	>80
6+			20-50	>80
7+			51-80	>80
8+			>80	>80

Search results - live scroll (scroll and wait for more results)						
#	Entry	Start	End	Sequence	"!"	Score
1	sp O95271 TNKS1_HUMAN	535	540	P-K-R-K-Q-V	1	10,0

Figura 9. Predicción de una única NLS en la proteína tanquirasa, llevada a cabo mediante el programa Wregex. En la figura se pueden distinguir la posición de la posible NLS, los aminoácidos que la componen y en último lugar una puntuación proporcionada por el programa indicando la fiabilidad de la predicción.

3.1.2 Predicción de NES

En el análisis de NES, reflejado en la **Tabla 4**, se encontraron cNES en las secuencias de la tanquirasa, en TERT y en POT1. Hay que destacar que se realizó la búsqueda, tanto de NLS como de NES, con todas las isoformas de cada proteína recogidas en la base de datos Uniprot, y se observó que las diferentes isoformas no conllevaban ninguna diferencia en cuanto a la predicción de NLS y NES en todas las proteínas, a excepción de la proteína POT1. POT1 fue la única proteína que analizando las dos isoformas de las que se disponían se vieron resultados diferentes en la predicción de NES. Como se puede observar en la **Figura 10** la isoforma 1 contiene un posible NES en la posición 523-539 que la isoforma 2 no la contempla. Además esta posible NES es la que obtiene una puntuación mas alta en el programa Wregex, a pesar de que los otros dos programas no encontraron esa secuencia en concreto, es decir, no había coincidencia entre los programas en la posición que se predecía la NES.

En el análisis de la secuencia de la tanquirasa, como se puede observar en la **Tabla 4** y en la **Figura 11** dos de los tres programas (Wregex y ELM) coinciden en predecir una NES en la posición 501-512. Es la secuencia que mayor puntuación obtuvo con el programa Wregex (82,5) de todo el análisis de NES. La puntuación que le dio NetNES a esta región de la proteína no supera el valor umbral de 0,5, predeterminado por el propio programa, como queda indicado con una flecha roja en **Figura 11C**).

Tabla 4. Resumen de la búsqueda bioinformática de NES. Resultados obtenidos de la búsqueda bioinformática mediante los programas: Net NES, Wregex y ELM. Negativo indica que el programa no pudo encontrar posibles NLS en la secuencia de aminoácidos; mientras que positivo indica que el programa encontró secuencias que podrían ser NLS, indicando entre corchetes la posición en la que se encuentra y entre paréntesis una puntuación arbitraria de cada programa para reflejar la fiabilidad de dicha predicción.

		PROGRAMA		
		Net NES	Wregex	ELM
PROTEÍNAS	TCAB	Negativo	Negativo	Negativo
	Tanquirasa	Positivo [1100] (score> 0,5); [500] (score< 0,5)	Positivo [501-512] (score: 82,5)	Positivo [501-512]
	TERT	Positivo [990] (score> 0,5); [550] (score< 0,5)	Positivo [652-668] (score: 58,2); [504-516] (score: 49,2); [539-552] (score: 38,7)	Positivo [652-668]
	TRF1	Positivo [70] (score> 0,5)	Negativo	Negativo
	TRF2	Positivo [350] (score< 0,5)	Negativo	Negativo
	RAP1	Positivo [325] (score> 0,5)	Positivo [256-268] (score: 49,2)	Negativo
	TPP1	Positivo [350] (score> 0,5); [280] (score> 0,5)	Positivo [510-523] (score: 61,1)	Negativo
	POT1	Positivo [205] (score> 0,5); [450] (score> 0,5)	Positivo [523-539] (score: 58,2); [208-219] (score: 46,4); [77-87] (score: 43,3)	Negativo

En el análisis de TERT, (**Tabla 4**), se encontraron dos coincidencias entre programas, una en la posición 652-668, en la que coincidían tanto Wregex como ELM; y otra en la posición 539-552, en la que coincidían Wregex y NetNES. Las puntuaciones de estas dos predicciones en TERT no superaban al obtenido con la tanquirasa. En TRF1, RAP1 y TPP1 se obtienen también resultados positivos, pero son individuales de cada programa y no coincidían en la posición en la que predicían la NES. El análisis de TCAB no produjo resultados positivos con ninguno de los tres programas utilizados.

Finalmente se decidió que se ensayarían experimentalmente las cNESs de la tanquirasa y de POT1. Las razones de dicha decisión se profundizarán en la discusión.

Search results - live scroll (scroll and wait for more results)						Search results - live scroll (scroll and wait for more results)							
#	Entry	Start	End	Sequence	"I"	Score	#	Entry	Start	End	Sequence	"I"	Score
1	sp Q9NUX5 POTE1_HUMAN	523	539	SW-I-PSS-V-AEA-L-G-I-VPLQ	1	58,2	1	sp Q9NUX5-2 POTE1_HUMAN	208	219	SH-I-HR-L-QN-L-T-I-D	1	46,4
2	sp Q9NUX5 POTE1_HUMAN	208	219	SH-I-HR-L-QN-L-T-I-D	1	46,4							
3	sp Q9NUX5 POTE1_HUMAN	77	87	D-I-VR-F-HR-L-K-I-Q	1	43,3	2	sp Q9NUX5-2 POTE1_HUMAN	77	87	D-I-VR-F-HR-L-K-I-Q	1	43,3

Figura 10. Predicciones de NES de las dos isoformas de POT1 realizadas por el programa Wregex. A la izquierda se encuentra la isoforma 1, la cual contiene una posible NES en posición 523-539, que no la contempla la secuencia aminoacídica de la isoforma 2, a la derecha.

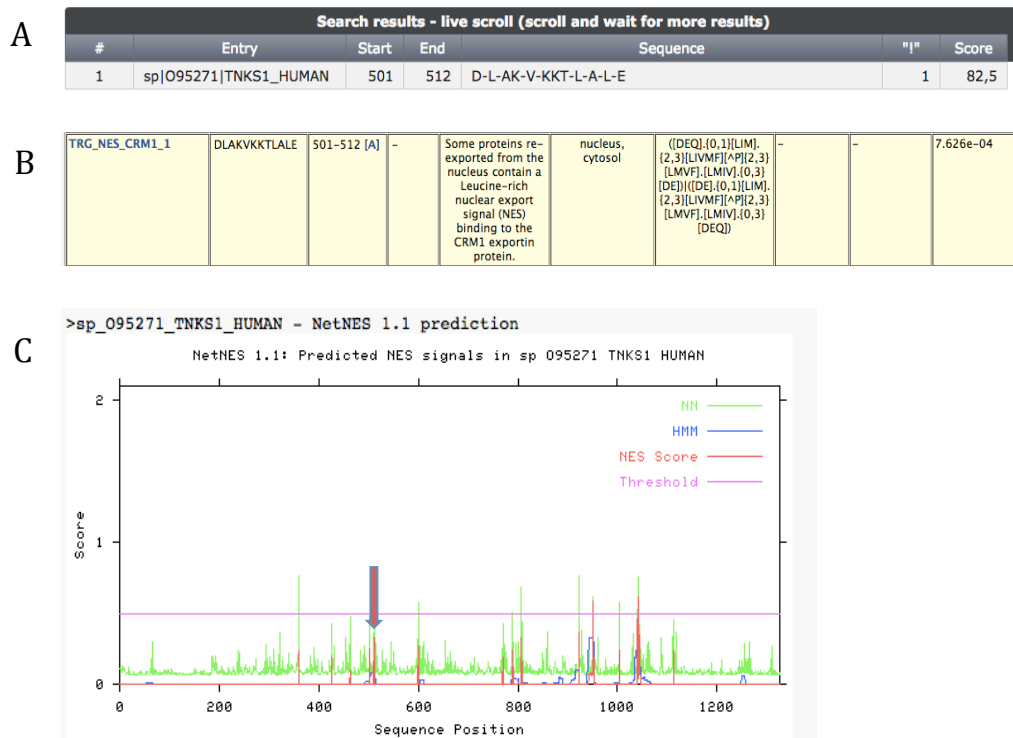


Figura 11. Predicción de NES de tanquirasa. En A se muestran los resultados aportados por Wregex indicando la posición de la posible NES, la secuencia de aminoácidos y la puntuación. Solo encontró una secuencia. En B se presentan los resultados de la búsqueda mediante el programa ELM, el cual proporciona la secuencia predicha y la posición de dicha secuencia. Este resultado coincide plenamente con el obtenido en Wregex. En C se muestra la gráfica que proporciona el programa Net NES para facilitar el visionado de resultados. En el eje horizontal se representa la cadena de aminoácidos de la proteína y en el eje vertical la puntuación (score) que obtiene cada región. El programa predetermina una puntuación de 0,5 como umbral para considerarlo resultado positivo. La línea que interesa en este estudio es la roja, la cual indica la puntuación que se obtiene en cada región. Se observa que hay dos picos que superan el umbral, pero ninguno de ellos coincide con la posición que predijo Wregex y ELM. Con una flecha roja se indica la posición donde Wregex y ELM predijeron la NES y se observa que no supera el umbral para considerarlo NES.

3.2. ANALISIS EXPERIMENTAL.

3.2.1 Clonación

Tras transformar *E. coli* con los dos plásmidos correspondientes, uno llevando la secuencia candidata de tanquirasa y el otro la de POT1, se cultivaron tres placas de

agar, siendo una de ellas el control que consistía en bacterias transformadas con un plásmido abierto sin inserto, por lo que las bacterias con este último plásmido no podrían crecer en presencia de kanamicina. Las observaciones realizadas al cabo de 24 horas fueron que el control negativo no había funcionado como se esperaba, ya que en dicha placa habían crecido muchas colonias. En las otras dos placas también hubo crecimiento como se esperaba.

De cada placa se extrajo DNA de cuatro colonias, se amplificó mediante una PCR y después se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el fin de averiguar si había inserto en las colonias, tal y como se explicó en el apartado de materiales y métodos. Como puede verse en la **Figura 12** todas las muestras están a la altura del control positivo por lo que hay un inserto de aproximadamente 60 pb en el plásmido de todas las colonias recogidas. También se analizó una de las colonias de la placa control (CX), que como se muestra en la **Figura 12** tiene el mismo tamaño que el control positivo, y no se puede tratar de un plásmido doble porque presentaría un tamaño mayor. De modo que se detectó un inserto no identificado en dicha placa que hacía que el plásmido se cerrase proporcionando resistencia al antibiótico.

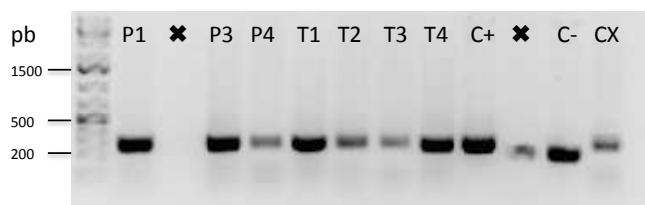


Figura 12. Gel de agarosa realizado para determinar si el plásmido contenía inserto. Previamente las muestras habían sido amplificadas mediante PCR. La letra de las calles indica si es POT (P), tanquirasa (T) o el control (C). El número indica la colonia. El control positivo (C+) proviene de un plásmido que contiene un inserto confirmado, mientras que el control negativo (C-) proviene del plásmido vacío. Todas las colonias que se aislaron contenían el plásmido con inserto. En todas las muestras la inserción se llevo a cabo correctamente pues todas presentan un tamaño mayor a 200 pb, el tamaño correspondiente al control negativo sin inserto.

3.2.2. Ensayo de exportación nuclear.

Se ensayaron cinco NES candidatas, de las cuales una era la secuencia encontrada en la tanquirasa, otra la encontrada en POT1 (POT1 c.7) y las tres restantes eran versiones mutadas de esta última, sirviendo como experimento de mutagénesis. Estas mutaciones se produjeron espontáneamente en el paso de clonación y se determinaron mediante secuenciación antes de transfectar las células HeLa. En la **Tabla 5** se ven las secuencias testeadas mediante este ensayo, y como se puede

observar la secuencia de POT1 cuenta con 3 secuencias añadidas a parte de la *wild type*. La proveniente de la colonia 1 contiene una delección de una serina. La colonia 3 experimentó una sustitución (CAA→CTA) produciendo el cambio de una glutamina a una leucina. Por último la colonia 5 también experimentó una sustitución en uno de los codones (TAT→AAT) dando lugar al cambio de tirosina a asparagina.

Tabla 5. Se muestran las secuencias ensayadas como posibles NES. Se ensayó la secuencia *wild type* de la tanquirasa y de POT1, además de tres variantes mutantes de POT1. En negrita se muestran los cambios que tienen estas variantes respecto al secuencia *wild type*.

Proteína	NES estudiada
Tanquirasa	R E A D L A K V K K T L A L E I I N
POT1 (c.7)(wt)	S W I P S S V A E A L G I V P L Q Y
POT1 (c.1)	S W I P S - V A E A L G I V P L Q Y
POT1 (c.3)	S W I P S S V A E A L G I V P L L Y
POT1 (c.5)	S W I P S S V A E A L G I V P L Q N

Por un lado, tal y como se muestra en la **Figura 13**, se comparó la actividad de las cNES de tanquirasa y de POT1 con la de los controles. La actividad exportadora de la secuencia de tanquirasa resultó ser similar a la del control negativo. Tanto en la muestra tratada con Act.D como en la no tratada, el porcentaje de células con localización nuclear de la proteína era alto, 78% y 80% respectivamente. En cuanto a la puntuación recibida aplicando el criterio de Henderson y Eleftheriou esta secuencia obtiene un 0, la misma puntuación que el control negativo. Las puntuaciones obtenidas por todas las secuencias estudiadas se muestran en la **Tabla 6**.

La secuencia de POT1 sí demostró tener mas actividad exportadora que el control negativo. Con la secuencia *wild type* el 47% de las células tenían la proteína quimérica localizada en ambos compartimentos (localización nucleocitoplásmica) y este valor ascendía hasta un 59% en las células tratadas con Act.D. Aplicando el sistema de puntuación esta secuencia obtenía un +1 en actividad exportadora.

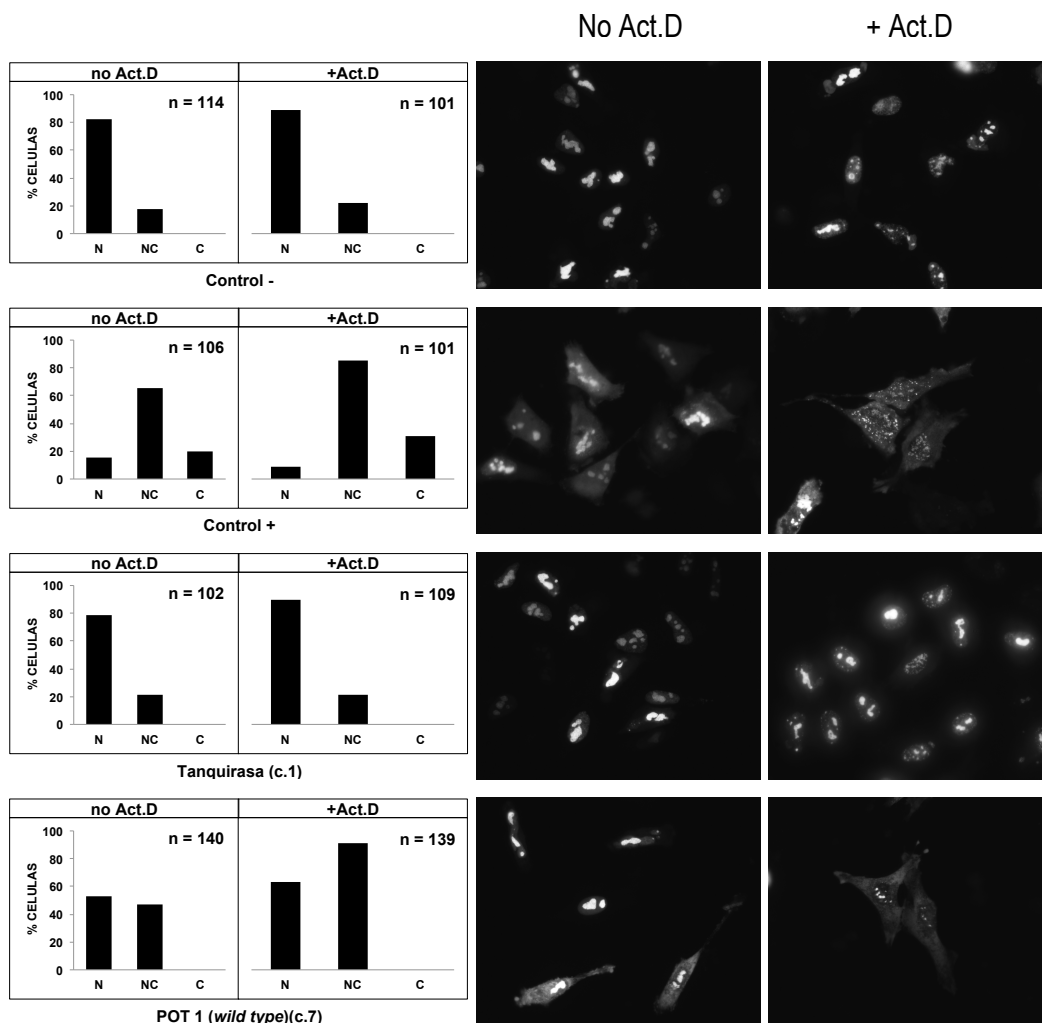


Figura 13. Resultados del ensayo de exportación nuclear de las secuencias de tanquirasa y POT1. Se muestra el porcentaje de células que presentan la proteína fluorescente en el núcleo, en el núcleo y en el citoplasma o únicamente en el citoplasma; tanto cuando las células no se trataron como cuando se trataron durante 3 horas con actinomicina D. Las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia intentan representar la totalidad de la preparación observada. La lectura de estos resultados se resume en que la secuencia predicha en la tanquirasa es inactiva, mientras que la predicha en POT1 muestra cierta actividad.

Por otro lado, como se observa en la **Figura 14**, se comparó la actividad exportadora de las diferentes variantes mutantes de la cNES de POT1. La secuencia mutante de la colonia 3 (sustitución glutamina – leucina), obtuvo unos resultados similares a la *wild type*. El 44% de las células exhibió la proteína en ambas localizaciones cuando no estaban tratadas, mientras que cuando se trataron fueron el 66% las células con esta disposición, algo mayor que en la secuencia *wild type*. La puntuación en este caso también fue de +1. La secuencia de la colonia 1, con una delección en una de las serinas, resultó negativa en el ensayo. Con un 73% de localización nuclear en las

células sin tratar y con un 64% con tratamiento de actinomicina D, la puntuación que recibe esta secuencia respecto a su actividad exportadora es 0. Igualmente, la secuencia de la colonia 5, tampoco demostró tener actividad NES, presentando un 83% de las células con localización nuclear cuando no se trataba y un 59% al tratarse. Por lo tanto en este caso la puntuación de actividad exportadora recibida también era 0.

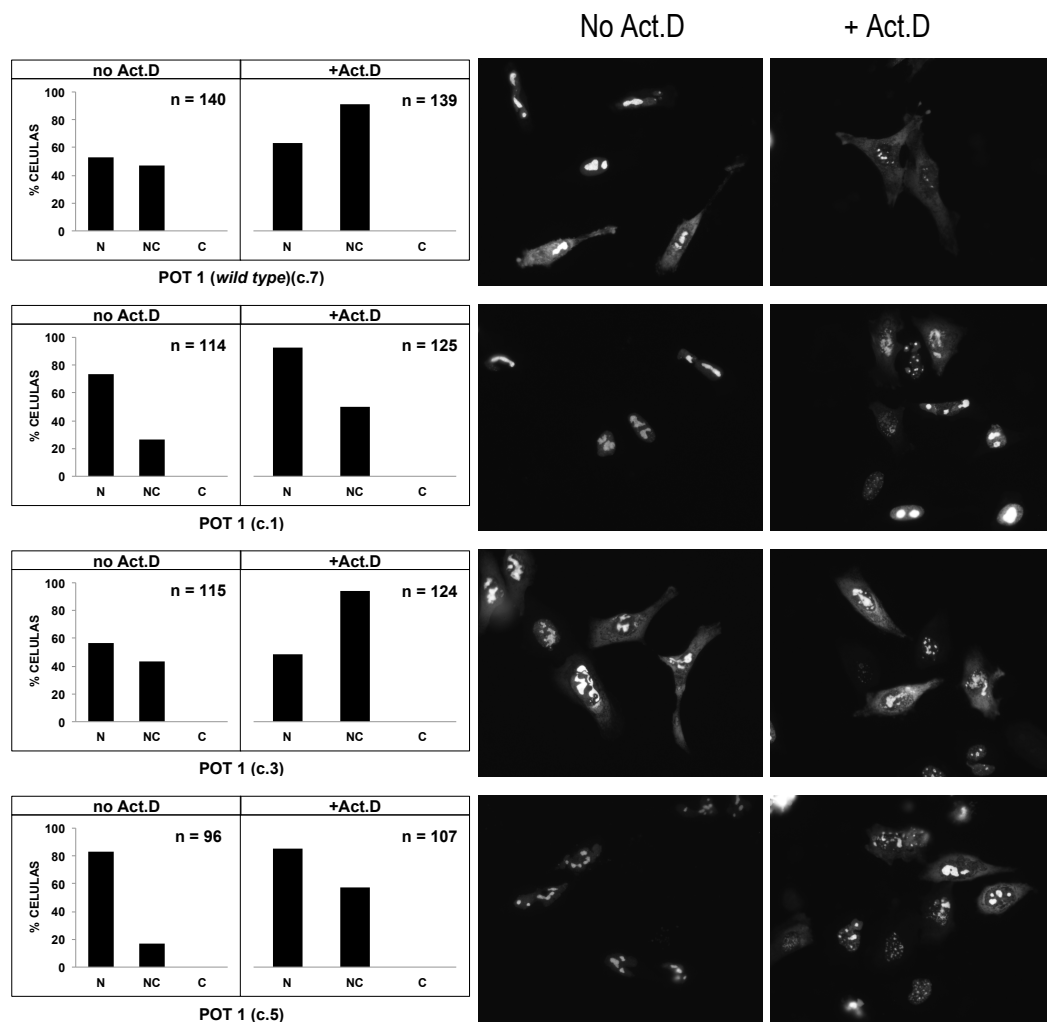


Figura 14. Resultados del ensayo con las secuencias mutadas de POT1. Se muestra el porcentaje de células que presentan la proteína fluorescente en el núcleo, en el núcleo y en el citoplasma o en el citoplasma únicamente; tanto cuando las células no se trataron como cuando se trataron durante 3 horas con actinomicina D. Las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia intentan representar la totalidad de la preparación observada. Únicamente la secuencia mutante de la colonia 3 ha presentado actividad exportadora

Tabla 6. Puntuaciones de actividad NES obtenidas por las secuencias estudiadas. Siguiendo el criterio de puntuación diseñado por Henderson y Eleftheriou y explicado en la sección de materiales y métodos se asignó una puntuación de actividad a cada secuencia. Se observa que la secuencia de la tanquirasa obtiene la misma puntuación que el control negativo mientras que la de POT1 consigue una actividad mayor en la forma *wild type* y en la mutada de la colonia 3.

Proteína	Actividad NES
Control -	0
Control +	+3
Tanquirasa	0
POT1 (c.1)	0
POT1 (c.3)	+1
POT1 (c.5)	0
POT1 (c.7)(wt)	+1

4. DISCUSIÓN

Los resultados de la bioinformática hicieron decantarse por el estudio de dos NES. Aunque en un principio el proceso experimental iba a consistir en el estudio de una NLS y una NES se decidió que sería más interesante y más acertado centrarse en estudiar dos NES por las siguientes razones. Primero, la mayoría de los NLS encontrados ya estaban registrados en las bases de datos, y dado que el objetivo del proyecto no era confirmar o revocar esta información, no interesaba seguir profundizando más en estas proteínas. Segundo, únicamente quedaría por estudiar la NLS de la tanquirasa puesto que TCAB, TPP1 y POT1 no presentaban en ninguno de los programas utilizados resultados positivos a posibles NLSs. Sin embargo, el hecho de que solo un programa hubiese encontrado esa posible NLS en la tanquirasa y la baja puntuación obtenida no pronosticaba un resultado muy prometedor de cara a la experimentación.

Teniendo en cuenta los resultados de la búsqueda bioinformática de NES, se seleccionaron la tanquirasa y POT1 para ser sometidos al ensayo in vivo, y se descartó TERT por las siguientes razones. Primero, la tanquirasa obtuvo la mayor puntuación en el programa Wregex con la NES predicha en la posición 501-512, y además dicha predicción coincidía con la realizada por el programa ELM, cumpliendo así el criterio de la coincidencia entre programas mencionado previamente. Segundo, en el análisis de TERT también se observaron coincidencias entre programas en las NES predichas, de hecho se encontraron dos coincidencias, en las posiciones 652-668 y 539-552, pero en este caso ninguna de las dos predicciones

superaba la puntuación de la que se encontró en tanquirasa. Tercero, a pesar de que el análisis bioinformático de la proteína POT1 reflejara unos resultados peores que los de TERT, el hecho de haber encontrado una NES que solamente se presentaba en una de las isoformas sugiere que el transporte de cada una de las isoformas pueda estar regulada de forma diferente y esto es biológicamente interesante.

La NES predicha en la tanquirasa era la secuencia que, a priori, tenía mayor posibilidad de que mostrara actividad, pues en el trabajo bioinformático dos de los tres programas coincidieron al predecirla y obtuvo la mayor puntuación en uno de ellos. Sin embargo el ensayo de exportación nuclear desmintió lo que habían predicho las herramientas bioinformáticas y se reveló que dicha secuencia no tiene actividad exportadora. Por lo tanto aunque se haya determinado en otros estudios (Gómez *et al.*, 2012) que la tanquirasa lleva acabo funciones tanto en el núcleo como fuera de él, los resultados indican que la secuencia analizada no media la localización de la proteína.

El estudio de la NES candidata de POT1 condujo a unas conclusiones diferentes. Esta secuencia mostró actividad exportadora obteniendo una puntuación +1. Una vez confirmado que una de las isoformas contiene una NES y la otra no, se pueden realizar una serie de reflexiones. Primero, se sugiere que el transporte de ambas isoformas está regulado de forma diferente. Segundo, la POT1 actúa inhibiendo o activando la actividad de la telomerasa y cuando ésta no se encuentra en el núcleo se activa el sistema de reparación de DNA (Price y Baumann, 2011), por lo que podría tratarse de alguna función aun no caracterizada de una de las isoformas de POT1 fuera del núcleo o una función relacionada con la activación del sistema de reparación del DNA.

Al ensayar tres variantes mutantes de la cNES de POT1, se ha podido comprobar que en dos de ellas (c.1 y c.5) la actividad exportadora se pierde mientras que con la otra mutación (c.3) la actividad se mantiene. Este hecho demuestra que no todos los residuos de la NES tienen la misma importancia para la funcionalidad de la señal. Además, en los casos en los que se ha perdido la actividad (c.1 y c.5), los residuos perdidos no pertenecen al núcleo conservado de residuos hidrofóbicos caracterizado

en el consenso (Prieto *et al.*, 2014), por lo que se demuestra que otros residuos intermedios también son esenciales para dicha actividad.

5. CONCLUSIÓN

Este proyecto comenzó con una reflexión y una búsqueda bibliográfica con el fin de hallar un grupo de proteínas sobre las cuales sería interesante investigar en el campo del transporte nucleocitoplásmico. Se eligió un conjunto de proteínas relacionado con los telómeros, y se han combinado una serie herramientas, tanto bioinformáticas como experimentales, para analizar las señales de transporte nucleocitoplásmico de dichas proteínas. Así pues, se ha identificado una secuencia con actividad en la proteína POT1. Se ha demostrado que no todos los residuos de esa secuencia tienen la misma importancia y que no solo los residuos hidrofóbicos son esenciales para la funcionalización de la señal. En torno a POT1 también se ha destacado la diferencia entre sus dos isoformas, una con NES y la otra sin ella, sugiriendo que el transporte de cada una de las isoformas se regula de forma diferente. Como estudios posteriores para investigar la regulación del transporte de POT1, se propone un ensayo que utilice la proteína POT1 completa, a diferencia de una quimérica que utiliza únicamente la NES de dicha proteína; y un ensayo en el que se analice de forma diferencial la regulación del transporte de las dos isoformas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B. *et al.* (2010) Essential cell biology, 3th ed, Panamericana, Mexico.
- Baumann, P. and Price, C. (2010). Pot1 and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 10, 3779-3784.
- Bianchi, A. and de Lange, T. (1999). Ku binds telomeric DNA in vitro. *J Biol Chem.* 274, 21223-21227.
- García-Santisteban, I., Bañuelos, S., Rodríguez, J.A. (2012). A global survey of CRM1-dependent nuclear export sequences in the human deubiquitinase family. *Biochem J.* 441, 209-217.
- Gomez, D.E., *et al.* (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int. J. Oncology*, 41, 1561-1569.
- Gould, C.M., *et al.* (2010). ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.* 38, 167-180.
- Henderson, B.R. and Eleftheriou, A. (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp. Cell Res.*, 256(1), 213-224.
- Hood, J. K., and Silver, P. A. (1999). In or out? Regulating nuclear transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 241-247.
- Hsiao, S.J. and Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles and beyond.

Biochimie. 90, 83-92.

Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. and Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 10171-10176.

la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel.* 17, 527-536.

Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A.R., *et al.* (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat Cell Biol.* 8, 768-780.

Muqbil, I, *et al.* (2014). Snail nuclear transport: The gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition? *Semin Cancer Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.003>

Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 420-429.

Nguyen KT, Holloway MP, Altura RA. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Biol.* 3, 137-51.

Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: Signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.

Ohno, M., Fornerod, M., and Mattaj, I. W. (1998). Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell* 92, 327-336.

Pemberton, L. F., Blobel, G., and Rosenblum, J. S. (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 392-399.

Prieto, G., Fullaondo, A., Rodriguez, J.A. (2014). Prediction of nuclear export signals using weighted regulas expressions (Wregex). *Bioinformatics*, 30(9), 1220-1227.

Senapedis, W.T., Baloglu, E., Landesman, Y. (2014). Clinical translation of nuclear export inhibitors in cancer. *Semin Cancer Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.005>

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schefer, M.R., Schnapp, G. and de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20, 1659-1668.

Tejera, A.M., Stagno d'Alcontres, M., Thanasoula, M., *et al.* (2010). TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. *Dev Cell* 18: 775-789.

Turner, J.G., Dawson, J., Sullivan, D.M. (2012). Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol.* 83, 1021-1032.

Uniprot, (2015), <http://www.uniprot.org/>

Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell.* 82, 463-473.

Wyatt, H.D.M., West, S.C., and Beattie, T.L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 38, 5609-5612.

Zhong, F., Savage, S.A., Shkreli, M., *et al.* (2011). Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 25, 11-16.

Zvereva MI, Shcherbakova DM and Dontsova OA. (2010) Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry.* 75, 1563-1583.