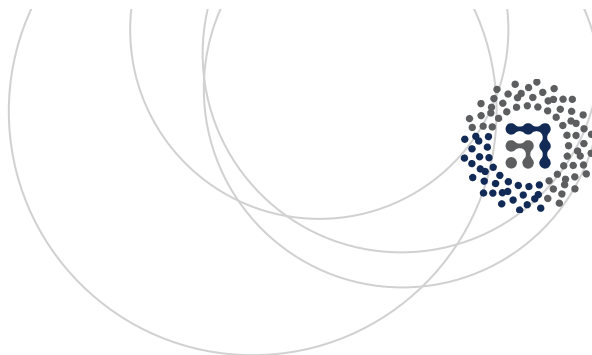


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Biologia Gradua

# Nukleo-zitoplasma garraioa emateko seinaleen bilaketa TOB/BTG proteina familiako TOB2, BTG2 eta BTG3 proteinetan

Egilea:

Ione Armentia Garitaonandia

Zuzendaria:

Jose Antonio Rodríguez Perez (EHU/UPV)

© 2016, Ione Armentia Garitaonandia

## **LABURPENA:**

TOB/BTG proteina familia, berriki deskribatutako hazkuntza inhibitzaile funtzioa duten bost proteina dira eta nahiko kontserbatuak daude. Familiako kideak TOB1, TOB2, BTG1, BTG2 eta BTG3 proteinak dira. Besteak beste, hazkuntza inhibitzaile funtzioa CCR4-Not konplexuko Caf1 proteinarekin interakzionatuz ematen dela proposatu da. Interakzioa G0/G1 faseetik S fasera igarotzean ematen da, eta momentu horretan Caf1 nukleoan aurkitzen da. TOB/BTG familiako proteinak nukleora garraiatu behar dira interakzioa emateko, eta garraio hori nola gertatzen den aztertzea garrantzitsua da beraien funtzioa hobeto ulertzeko. Garraio nukleo-zitoplasmikoa TOB/BTG familiako TOB1 eta BTG1 kideetan jada aztertuta dago, eta esportazio (NES) eta inportazio (NLS) seinaleak badituztela ikusi da. Ikerketa honetan, beste hiru kideetan (TOB2, BTG2 eta BTG3) garraio seinaleak bilatu eta horien aktibitatea aztertu da. Lehenengo, analisi bioinformatikoak egin ziren, ustezko NES (uNES) eta ustezko NLS-ak (uNLS) bilatzeko. TOB2, BTG2 eta BTG3 proteinetan hainbat uNES eta uNLS aurkitu ziren. Ondoren, BTG3 proteinaren uNES eta uNLS-aren aktibitatea metodo molekularren bidez aztertu zen. BTG3 proteinak, amino terminaleko TOB/BTG homologia domeinuan, NES aktibo berri bat daukala aurkitu dugu.

### **Hitz gakoak:**

TOB/BTG proteina familia; garraio nukleo-zitoplasmikoa; NES; NLS

## **ABSTRACT:**

TOB/BTG family, is a novel described anti-proliferative protein group that includes 5 different but highly conserved proteins: TOB1, TOB2, BTG1, BTG2 and BTG3. Their anti-proliferative activity is due in part to interaction with Caf1, a member of the CCR4-Not complex. The interaction takes place in the transition between G0/G1 and S phases. During G0/G1 Caf1 is located within the nucleus. Therefore TOB/BTG proteins need to translocate to the nucleus to interact with Caf1. To better understand TOB/BTG proteins function, is fundamental to examine how translocation occurs. Nuclear transportation of two TOB/BTG family members (TOB1 and BTG1) has already been examined and it has been seen nuclear export signals (NES) and nuclear localization signals (NLS) in both of them. In this research we focused on the other three family members: TOB2, BTG2 and BTG3. First we make bioinformatic analysis with different programs to find putative NES and NLS signals. We observed putative NES and NLS on the three proteins. Next, we decided to analyse putative BTG3's NES and NLS activity using molecular methods. We have discovered a new NES on the amino terminal, TOB/BTG homology domain, of BTG3 protein.

### **Key words:**

TOB/BTG family; nucleocytoplasmic transport; NES; NLS

## AURKIBIDEA

1- Sarrera.....	3
2- Hipotesia eta helburuak .....	6
3- Materiala eta metodoak.....	7
3.1- Analisi bioinformatikoa: ustezko NLS eta NES sekuentzien bilaketa .....	7
3.2- Klonazioa.....	7
3.2.1- Adierazpen bektoreak .....	7
3.2.2- Bektorea prestatzen: liseriketa eta desfosforilazioa .....	8
3.2.3- Intertua prestatzen: oligoen diseinua .....	8
3.2.4- Intertua prestatzen: hibridazioa eta luzapena .....	9
3.2.5- Intertua prestatzen: liseriketa eta purifikazioa.....	10
3.2.6- Bektorearen eta intertuaren ligazioa .....	10
3.2.7- Transformazioa .....	10
3.3- Kolonien hautaketa PCR baheketarako .....	10
3.4- Miniprep eta sekuentziakzioa .....	11
3.5- Transfekzioa .....	11
3.6- Esportazio saiakera.....	11
3.7- NLS azterketa funtzionala .....	12
3.8- Fluoreszentziako mikroskopia eta NES aktibitatearen kuantifikazioa .....	12
4- Emaitzak .....	13
4.1- Analisi bioinformatikoak.....	13
4.2- Klonazioaren emaitzak eta arazoak .....	15
4.2.1- Transformazioa .....	15
4.2.2- Ustezko NES-aren klonazioa .....	15
4.2.3- Ustezko NLS-aren klonazioa .....	16
4.2.3.1- Lehenengo saiakera.....	16
4.2.3.2- Bigarren saiakera .....	16
4.2.3.3- Hirugarren saiakera.....	17
4.2.3.4- Laugarren saiakera, definitiboa.....	18
4.3- BTG3-ren ustezko NES aktibitatearen kuantifikazioa (esportazio saiakera).....	19
4.4- BTG3-ren ustezko NLS azterketa funtzionala .....	20
5- Eztabaida.....	21
6- Bibliografia .....	23

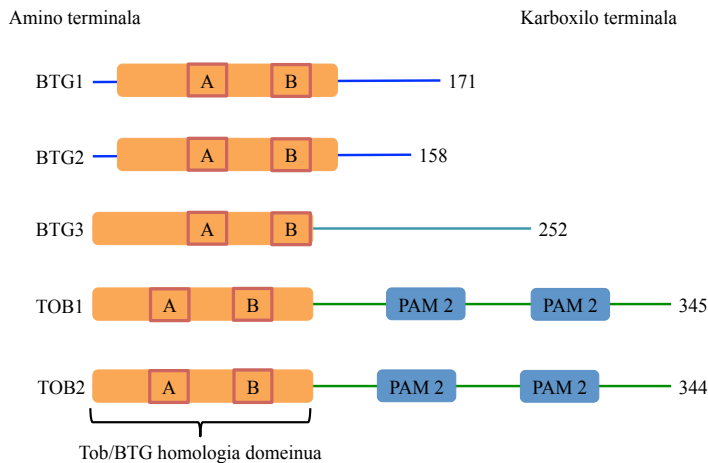
## 1-SARRERA

Zelulak etengabe ingurune aldakor batera moldatu behar dira eta horretarako, beste hainbat mekanismoren artean, hazkuntza zelularra erregulatu dezakete. Hazkuntza zelularrean, mitosi bidez, zelula batetik abiatuta genetikoki berdinak diren zelula berriak lortzen dira. Ziklo zelularra estuki erregulatuta dago, eta hiru kontrol puntu nagusi daude. Lehenengoa G1/S faseen tartean dago, bertan erabakitzen da zelula zatiketan sartuko den ala ez. Bigarrena G2/M faseen tartean dago, zeinean zelula mitosirako prestatzen hasten den, kromosomak lerrokatuz. Azkenekoa metafasetik anafasera igarotzean ematen da, kromatida ahizpak bananduz. Kontrol sistemaren parte diren proteina garrantzitsu batzuk, ziklinen menpeko kinasak (CDK) dira eta ziklinen bidez erregulatu dira. Ziklo zelularren fase bakoitzean CDK bakoitza dagokion ziklinarekin lotzea garrantzitsua da, zikloak aurrera jarraitzeko (Alberts *et al.*, 2010).

CDK proteinez gain, hainbat proteinek hazkuntza zelularren erregulazioan parte hartzen dutela ikusi da, eta horien artean TOB/BTG familiako proteinak ditugu. Familia horretako proteinen funtzio nagusia, hazkuntza zelularra inhibitzea da. Horretarako ziklo zelularra blokeatzen dute, zelula G0/G1 faseetik S fasera pasa behar denean (Yoshida *et al.*, 2003). Inhibizio hori ziklina eta CDK-aren arteko lotura oztopatzen dutelako ematen da. Hazkuntza inhibitzeak, TOB/BTG proteinei tumore supresore funtzioa eman dakieke eta hori dela eta, azken urteotan garrantzi handia hartzen ari dira minbiziaren aurkako ikerketetan (Mauxion *et al.*, 2009).

TOB/BTG proteina familia 5 proteina desberdinek osatzen dute; TOB1, TOB2, BTG1, BTG2 eta BTG3 (Winkler, 2010). Egiturari dagokionez, proteina guztiek amino terminalean oso kontserbatuta dagoen 110 aminoazidotako sekuentzia bat dute, zeina TOB/BTG homologia domeinu edo APRO domeinu moduan ere ezagutzen den (1.irudia) (Yuan *et al.*, 2011). Bertan, oso kontserbatuak dauden 22 aminoazidotako A kutxa eta 20 aminoazidotako B kutxa bereizten dira (1.irudia) (Mauxion *et al.*, 2009). Bestalde, karboxilo muturrek kontserbazio maila baxuagoa dute, baina TOB proteinen kasuan PAM2 moduan ezagutzen den gune kontserbatua dute (1.irudia) (Winkler, 2010).

TOB/BTG familiako proteina bakoitzak ehun desberdinen garapen prozesuetan parte hartzen du (Ikematsu *et al.*, 1999). Adibidez, BTG2 eta BTG3 proteinek mioblastoaren proliferazioan parte hartzen dute (Yuan *et al.*, 2011). Gainera, BTG3 proteinek espermatogenesisian eta kartilago zelulen desberdintzapenean parte hartzen du (Ikematsu *et al.*, 1999), eta BTG2 proteinek zelula neuronalen desberdintzapenean (Ajima *et al.*, 2000). BTG1 proteinek neurogenesisian parte hartzen du (Yoshida, 1998). TOB1 proteina obario eta testikuluetan adierazten dela ikusi da (Shapouri *et al.*, 2016), eta TOB2-k adierazpen handia erakusten du enbrio faseko muskulu eskeletikoaren ehunean (Shapouri *et al.*, 2016).



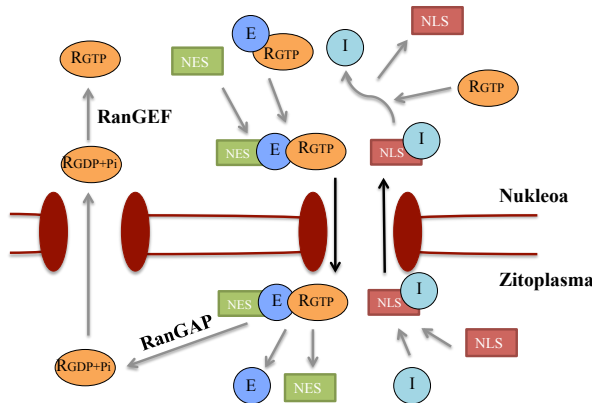
**1.irudia: TOB/BTG familiako 5 proteinen sekuentzia aminoazidikoetan dauden egiturak.** Proteina guztiek amino terminalean TOB/BTG homologia domeinua dute, non A kutxa eta B kutxa kokatzen diren. Gainera TOB1 eta TOB2 proteinek karboxilo terminalean PAM 2 gune kontserbatuak dituzte.

TOB/BTG proteinen funtzioaren erregulazioa, proteinen adierazpen mailaren, ematen diren interakzioen eta kokapen zelularren araberakoa da. Proteina horien adierazpen maila handia denean, zelulen proliferazioa eta desberdintzapena inhibitzen dute (Ikematsu *et al.*, 1999). TOB1 eta BTG2-ren gainadierazpenak D1 ziklin-aren adierazpena inhibitzen dute (Iwanaga *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2003; Rodier *et al.*, 2001). Interakzioei dagokienez, TOB/BTG homologia domeinuaren bidez, CCR4-Not konplexuaren parte den, Caf1-ekin interakzionatzen dute (Doidge *et al.*, 2012), zeinak aldi berean CDK-rekin interakzionatzen duen (Ikematsu *et al.*, 1999). Caf1 eta CDK-ren arteko elkarrekintza beharrezkoa da CDK-ren funtzionamendu egokirako (Ikematsu *et al.*, 1999). TOB/BTG proteinek Caf1-ekin interakzionatzen badute, Caf1-CDK interakzioa oztopatzen da, ziklo zelularra inhibituz. Interakzio horietan, garrantzitsua da proteinek duten kokapen zelularra. TOB/BTG familiako proteinak nagusiki zitoplasman kokatzen dira (Ikematsu *et al.*, 1999). Aldiz, Caf1 eta CDK proteinak nukleoan kokatzen dira (Collart, 2016). Beraien arteko interakzioa emateko, TOB/BTG eta Caf1-en kokapena berdina izan behar da momentu batean. TOB/BTG proteinek ziklo zelularra G0/G1 faseetik S fasera igarotzean inhibitzen dute (Yoshida *et al.*, 2003), eta G0/G1 faseetan Caf1 nagusiki nukleoan kokatzen da (Collart, 2016). Beraz, TOB/BTG proteinak nukleora sartu behar dira. Oraindik ez daude argi TOB/BTG proteinek kokapena kontrolatzeko dituzten mekanismoak. Horregatik, beraien funtzioa hobeto ezagutzeko, garrantzitsua da TOB/BTG familiako proteinek nukleora eta zitoplasmara translokatzeko mekanismorik duten aztertzea.

Garraio nukleo-zitoplasmatikoa, energiarik gabekoa (pasiboa) edo energiaren menpekota (aktiboa) izan daiteke. Bi kasuetan, garraioa poro nuklearraren konplexuan (NPC) zehar ematen da, zitoplasmatik nukleora eta nukleotik zitoplasmara. Pasiboki soilik 60 kDa baino txikiagoak diren molekulak garraiatu daitezke (Ding *et al.*, 2010). Garraio aktiboan, karioperinak, RanGTPasak, NPC osatzen duten nukleoporinak eta beste hainbat konposatuk parte hartzen dute. Nukleorako

inportazioari dagokionez, karioperinak (inportinak), garraiatu beharreko nukleorako garraio seinalea (NLS) ezagutu, eta bertara lotzen da zitoplasman, inportina-karga konplexua eratuz. Ondoren konplexu hori NPC-an zehar nukleoporekin interakzionatuz nukleora garraiatzen da. Bertan, inportina RanGTP-rekin lotu eta lotura horren ondorioz, karga askatu egiten da. Ondoren, inportina birziklatu egiten da zitoplasmara itzuliz (2A.irudia). Bestalde, nukleotik zitoplasmara ematen den esportazioari dagokionez, karioperinak (esportinak) garraiatu beharreko molekularen nukleo esportazio seinalea (NES) ezagutu eta bertara lotzen da nukleoan. Lotura horrez gain, RanGTP-aren lotura ere ematen da, esportina-karga-RanGTP konplexua eratuz. Konplexu hori NPC-an zehar zitoplasmara garraiatzen da. Behin zitoplasman, RanGAP-en bidez, RanGTP-aren hidrolisia ematen da RanGDP-ra. Horrekin batera karga esportinatik askatu eta zitoplasman aske gelditzen da. Ondoren RanGDP-a, difusioz, nukleora itzultzen da, eta bertan, RanGEF-ren bidez, RanGTP bihurtzen da (2A.irudia) (Pemberton & Paschal, 2005).

A)



B)

**AKORDIO SEKUENTZIAK:**

**NLS monopartitua:**

K-K/R-X-K/R

**NLS bipartitua:**

(K/R)(K/R)X<sub>10-12</sub>(K/R)<sub>3/5</sub>

**NES:**

L X<sub>(1-3)</sub>L X<sub>(2-3)</sub>L X L

**ADIBIDEAK**

**SV40 T antigenoa (NLS monopartitua):**

PKKKRKV

**HIV-Rev (NES):**

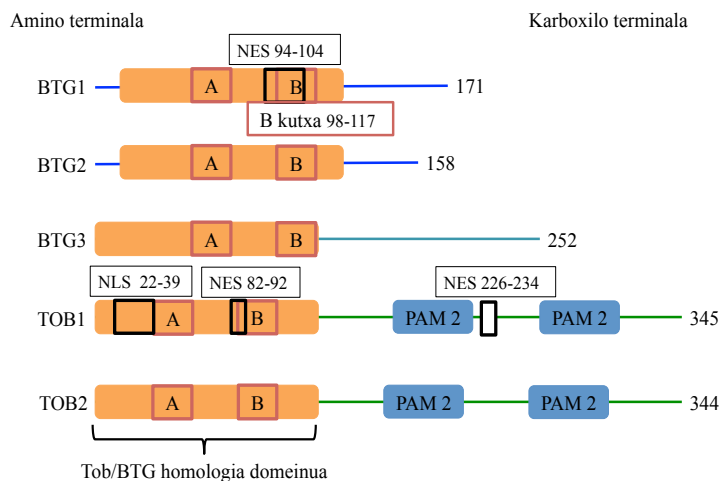
LPPLRLTL

**2.irudia: garraio nukleo-zitoplasmatikoaren eskema eta seinaleak.** A) Nukleorako garraio inportina (I) eta NLS-aren arteko interakzioaren bidez. Nukleotik zitoplasmara garraioa esportina (E) - RanGTP(RGTP) - NES konplexuaren bidez. Ran GAP-en bidez, RanGTP-ren hidrolisia zitoplasman, RanGDP-a difusioz nukleora itzultzen da, non, RanGEF bidez RanGTP bihurtzen den. B) NES eta NLS akordio sekuentziak. NLS-aren kasuan, K hizkiak lisina aminoazidoa, R hizkiak arginina aminoazidoa eta X hizkiak edozein aminoazido adierazten dute. (K/R)<sub>3/5</sub>-ek esan nahi du 5 aminoazidoetatik 3 lisina edo arginina direla. NES-aren kasuan L leuzina aminoazidoa da, beste edozein aminoazido hidrofobikogatik aldatu daitekeena, eta X edozein aminoazido izan daiteke. Ondoren NLS monopartitu baten eta NES baten benetazko adibideak daude.

Garraio aktiboan garrantzitsuak diren garraio seinaleak, NLS-ak eta NES-ak dira. Lehenengo NLS sekuentzia SV40 T antigenoan identifikatu zen (2B irudia) (Kalderon *et al.*, 1984). NLS sekuentziak bi motatakoak izan daitezke, monopartitua edo bipartitua (2B irudia). 2B.irudian NLS monopartitu eta bipartitu baten akordio sekuentzia eta SV40 T antigenoaren adibidea dugu (Xu *et al.*, 2010; Kalderon *et al.*, 1984). Lehenengo NES sekuentzia HIV Rev proteinan identifikatu zen (Fischer *et al.*, 1995).

Mota bakarreko NES-ak ezagutzen dira (2B.irudia). 2B.irudian NES-en akordio sekuentzia eta HIV Rev-aren adibidea dago (Fischer *et al.*, 1995; Zhao & Zheng, 2012).

TOB/BTG familiako bi kideetan, TOB1 eta BTG1 proteinetan, garraio seinale aktiboak aurkitu dira. BTG1-n NES-a, 94-104 posizioan, B kutxa gainezartzen kokatzen da (3.irudia) (Rodier *et al.*, 2001). BTG1-ek ez dauka NLS egitura duen sekuentziarik. Inportazioa emateko, nahikoa da amino terminalean, 98-117 posizioan (3.irudia), kokatzen den B kutxarekin. Karboxilo terminalak, nukleorako garraioan laguntzen du, baina ez da ezinbestekoa (Rodier *et al.*, 2001). TOB1-ek bi NES eta NLS bat ditu. NES bat amino terminaleko B kutxa gainezartzen kokatzen da, 82-92 posizioan (3.irudia). Beste NES bat karboxilo terminaletik gertuago, 226-234 posizioan kokatzen da (3.irudia) (Kawamura-Tsuzuku *et al.*, 2004). NLS-a amino terminalean kokatzen da, 22-39 posizioan (3.irudia). Familiako beste hiru kideetan (TOB2, BTG2 eta BTG3) garraio seinaleak ez dira oraindik aztertu.



**3.irudia: TOB/BTG familiako proteinetan dauden garraio seinaleak.** Aztertuta dauden NLS eta NES sekuentziak agertzen dira TOB1 eta BTG1 proteinetan. Lauki beltzez NLS eta NES aktiboak daude, bakoitzaren kokapen aminoazidikoa adierazten delarik. BTG1-en kasuan nukleorako inportazioa B kutxak bideratzen du.

Ikusitakoarekin, pentsa dezakegu TOB/BTG familiako proteinen kokapen zelularrak proteinen funtzioa baldintza dezakeela. Gainera, TOB1 eta BTG1-en agertzen diren NLS eta NES-ak TOB/BTG homologia domeinuan kokatzen direnez, posible da, familiako beste kideek ere garraio nukleo-zitoplasmatikorako seinaleak izatea. Familiako beste kideek NLS eta NES aktiborik duten aztertzeak, beraien funtzioa hobeto ulertzen lagunduko liguke.

## 2- HIPOTESIA ETA HELBURUAK

Lan honen hipotesia, TOB/BTG familiako TOB2, BTG2 eta BTG3 proteinek zitoplasmatik nukleora eta nukleotik zitoplasmara garraiatzeko NLS eta NES sekuentzia aktiboak dituztela da.

Hipotesi hori testatzeko, giza TOB/BTG proteina familian NES eta NLS motiboak bilatu eta beraien aktibitatea aztertu da. Horretarako, bioinformatika eta biologia molekularreko teknikak erabiliko dira. Lehenengo, proteinen ustezko NLS-ak (uNLS) eta ustezko NES-ak (uNES) bilatuko dira analisi bioinformatikoen bidez, ondoren uNLS eta uNES horien klonazioa burutuko da, eta azkenik, seinale horiek, zelula eukariotoetan, garraioa nukleo-zitoplasmatikoa bideratzen duten ala ez aztertuko da.

### **3-MATERIALA ETA METODOAK**

#### 3.1-Analisi bioinformatikoa: ustezko NLS eta NES sekuentzien bilaketa

Proteinen sekuentzia aminoazidikoan oinarriturik uNLS eta uNES-en bilaketa egiteko lanabes bioinformatiko desberdinak erabili ziren. Programa guztiek proteinen sekuentzia erabiltzen zuten eta emaitzak modu desberdin batean islatzen zituzten. Sekuentzia aminoazidikoa UniProt (<http://www.uniprot.org/>) plataformatik lortu zen. NLS-aren azterketarako, PSORT II (<http://psort-hgc-jp/form2.html>), ELM (<http://elm.eu.org/links.html>), WREGEX (<http://wregex.ehubio.es/>) eta cNLS mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>) programak erabili ziren. NES-aren azterketarako, NetNES 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>), WREGEX (<http://wregex.ehubio.es/>) eta Valid NES (<http://validness.ym.edu.tw/PREDICTION.php>) programak erabili ziren. NetNES 1.1 Server programak emaitza modura aminoazido bakarra ematen du. Aminoazido horren inguruko bost aminoazidotako sekuentzia aukeratu zen, beste programekin konparatu ahal izateko. WREGEX eta Valid NES programek, uNES sekuentzia bakoitzari puntuazio bat ematen diote. WREGEX-en kasuan, 0-100 bitarteko puntuazioa eta Valid NES-en kasuan 0-1 bitartekoa. Programek emandako emaitzetatik abiatuta, sekuentzia batzuk aukeratu ziren beraien funtzioa testatzeko. NES sekuentziaren kasuan, 19 aminoazidotako sekuentzia aztertu zen eta NLS-aren kasuan, aldiz, 14 aminoazidotakoa. NES eta NLS aktibitatea testatzeko, aminoazido sekuentzia kodetzen zuten DNA sekuentziak klonatu ziren adierazpen bektore batean.

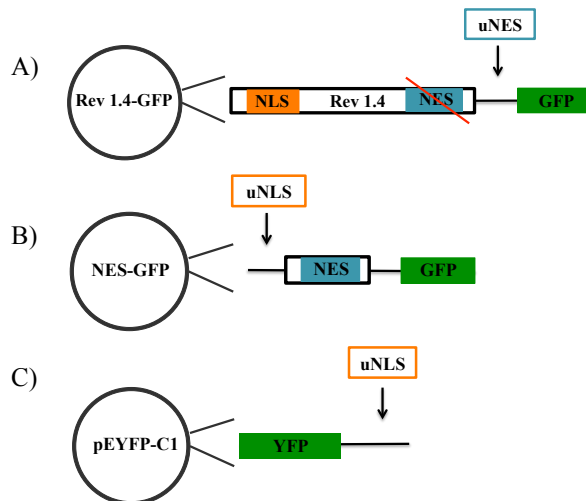
#### 3.2-Klonazioa

##### 3.2.1-Adierazpen bektoreak

uNES-aren klonazioan Rev 1.4-GFP plasmidoa (Henderson & Eleftheriou, 2000) erabili zen. Rev 1.4-GFP plasmidoak, HIV Rev proteina mutante baten (Rev 1.4) eta fluoreszentzia berdedun proteinaren (GFP) fusio bat kodetzen du. Rev 1.4 proteinak, NLS bat dauka eta bere NES-a mutatuta dago (Henderson & Eleftheriou, 2000) (4A.irudia), kontrola nukleoan egiten delarik. uNES-a Rev 1.4 eta GFP-aren tartean klonatzen da (4A.irudia), fusio proteinaren zitoplasmarako garraioa bideratzen duen aztertzeke.



uNLS-aren klonazioan, bi bektore desberdin erabili ziren: NES-GFP (Garcia-Santisteban *et al.*, 2012) eta pEYFP-C1 (CLONTECH). NES-GFP plasmidoak, NES aktibo bat eta GFP bat ditu (4B.irudia), kontrola zitoplasman egiten delarik. Intereseko NLS sekuentzia, plasmidoaren NES sekuentziaren aurretik txertatu zen (4B.irudia). pEYFP-C1 plasmidoak, ez du ez NLS ez NES aktiborik (4C.irudia), eta fluoreszentsia horidun proteina (YFP) bat dauka, kontrola zitoplasman eta nukleoan egiten delarik. Intereseko intsertua YFP ondoren klonatu zen (4C.irudia).



**4.irudia: erabilitako plasmidoen egitura eta uNLS eta uNES-en txertaketa guneak.** A) Rev 1.4-GFP plasmidoa. B) NES-GFP plasmidoa. C) pEYFP-C1 plasmidoa.

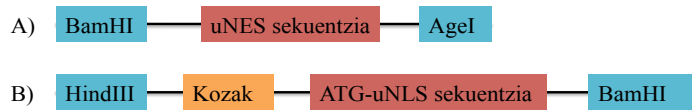
### 3.2.2- Bektorea prestatzen: liseriketa eta desfosforilazioa

Bektore zirkular bakoitza errestrikzio entzima jakinekin moztu zen. Rev 1.4-GFP plasmidoa, BamHI eta AgeI errestrikzio entzimekin moztu zen, eta NES-GFP eta pEYFP-C1 plasmidoak HindIII eta BamHI errestrikzio entzimekin. Ondoren, plasmido liseritu guztiei muturrak desfosforilatu zitzaizkien, alkaline fosfatasa (AP) erabiliz. Izan ere, AP-ak DNA harizpien 5' eta 3' muturreko fosfatoak kentzen ditu, bektorearen berligazioa oztopatuz.

### 3.2.3-Intsertua prestatzen: oligoen diseinua

uNES eta uNLS kodetzen duten oligoak diseinatu, eta Biologieko enpresan eskatu ziren. Sekuentziak eraikitzeko UniProt (<http://www.uniprot.org/>), NCBI "nucleotide" datu basea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) eta Word programa erabili ziren. UniProt-eko sekuentzia aminoazidikoetik abiatuta, analisi bioinformatikoetan lortutako uNES eta uNLS-a barneratzen zuten aminoazidoak aukeratu ziren. Ondoren, NCBI-n aminoazido horien sekuentzia nukleotidikoa lortu zen. Sekuentzia nukleotidiko horri, beharrezkoak ziren errestrikzio guneen sekuentziak gehitu zitzaizkion (5.irudia eta 1.taula). Klonatu beharreko uNES sekuentziaren aurrean BamHI mozketa lekua eta atzean AgeI mozketa lekua jarri ziren (5.irudia). uNLS-aren aurretik HindIII mozketa gunea, Kozak sekuentzia eta ATG hasiera kodoia jarri ziren, eta uNLS-aren atzetik, BamHI mozketa

gunea (5.irudia). Oligo bikote bakoitzean, bata harizpi zuzena eta bestea alderantzikoa zen (1.taula). Bien arteko parekamendu eta luzapena eginez harizpi bikoitzeko sekuentzia osoa eraiki zen (6.irudia).



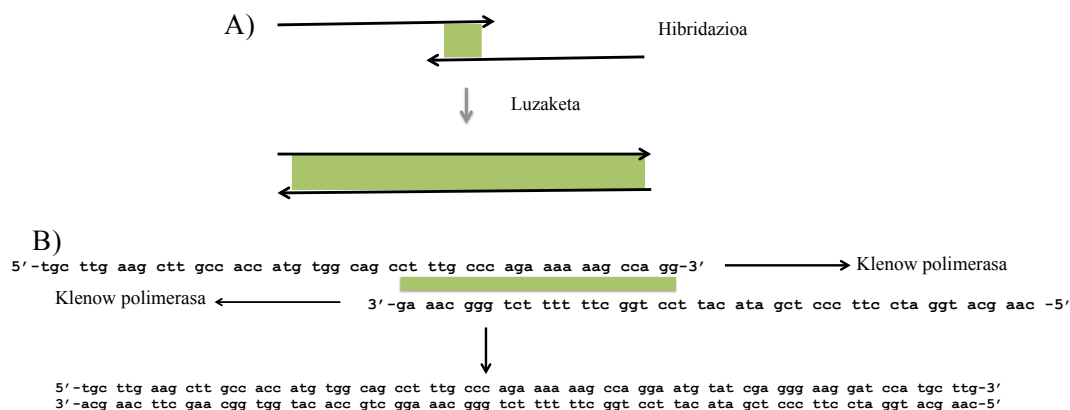
**5.irudia: seinaleak aztertzeke klonatu ziren DNA sekuentzien egiturak.** A) uNES-aren hasieran BamHI mozketa gunea, ondoren uNES sekuentzia eta azkenik AgeI mozketa lekua. Ez zen beharrezkoa uNES-aren hasiera kodoia ATG izatea, proteinaren itzulpena uNES-a baino lehen hasten zelako. B) uNLS-aren hasieran HindIII mozketa lekua, ondoren Kozak sekuentzia, gero ATG hasiera kodoia eta uNLS sekuentzia, azkenik BamHI errestrikzio gunea.

**1.taula: uNES eta uNLS kodetzen duen DNA lortzeko, oligoen harizpi zuzenaren eta alderantzikoen sekuentziak.** Beltzez, analisi bioinformatikoetan lortutako uNES eta uNLS-en DNA sekuentzia eta azpimarratuta errestrikzio guneak. uNES-erako BamHI (lerro jarraitua) eta AgeI (lerro ez jarraituak) errestrikzio guneak eta uNLS-erako HindIII (lerro ez jarraitua) eta BamHI (lerro jarraitua) errestrikzio guneak.

Intsertua	Harizpi zuzena	Alderantzizko harizpia
Rev 1.4 GFP-uNES	5'tgcttgccgggatccaaagaggca gttgagaggtttctgagaaattgac3'	5'caagcagaccggatattttctgaagtattagggtc aatttctcag3'
NES-GFP-uNLS	5'tgcttgaagcttgccaccatgtggcagcctttgccaga aaaaagccagg3'	5'caagcatggatccttcctcgatacattcctggcttttct gggcaaag3'
pEYFP-uNLS	5'tgcttgaagcttgccaccatgtggcagcctttgccc agaaaaagcc3'	5'caagcagatcctcaccctcgatacattcctggcttttct tgggcaaag3'

### 3.2.4-Intsertua prestatzen: hibridazioa eta luzapena

Oligo bikoteak osagarriak diren zatian hibridatu eta Klenow polimerasaren (Thermo Scientific) bidez luzaketa egin zen, sekuentzia osoa lortuz (6.irudia).



**6.irudia: hibridazioaren eta luzapenaren eskema.** Harizpi bakarreko oligo bikoteetatik abiatuz intereseko sekuentzia osoa lortu zen. A) Eskema grafikoa. B) Sekuentzia nukleotidiko baten hibridazioa eta luzapenaren adibidea. Kasu honetan NES-GFP-ean txertatu zen intsertuaren adibidea.

Biologio enpresari eskatutako oligoak, liofilizatuta zeudenak, 1 µg/µL uretan bersuspenditu ziren. Hibridazioa egiteko, oligo zuzenaren eta alderantzizkoaren 0,5 µL, Buffer B (Roche) 0,5 µL eta 39,5 µL H<sub>2</sub>O nahastu ziren, 45 µL-ko bolumen totala lortuz. Nahasketa 5 minutuz 100°C-tan mantendu zen, ondoren mahaian pixkanaka giro tenperaturara itzultzen utzi zen. Horrela, osagarriak ziren zatian bi harizpiak hibridatzea lortu zen (6.irudia). Luzapenari dagokionez, Klenow polimerasaren (Thermo Scientific) 0,5 µL, dNTP 100mM-eko 0,5 µL, Buffer B (Roche) 0,5 µL eta falta zena 5 µL-tara iristeko ura jarri zen. Polimerasa lanean utzi zen 2 h-duz 37 °C-tan. Ondoren, Klenow entzima desaktibatzeke 75 °C-tan jarri zen 20 minutuz.

### 3.2.5-Intsertua prestatzen: liseriketa eta purifikazioa

uNLS-a zuen intsertua, BamHI eta HindIII errestrizio entzimekin moztu zen, uNES-a zuena, BamHI eta AgeI entzimekin. Ondoren, Qiagen PCR purifikazio protokoloa (QIAGEN) erabili zen liseritutako laginak purifikatzeko. Bertatik liseritutako intsertu bakoitzaren 30 µL lortu ziren.

### 3.2.6-Bektorearen eta intsertuaren ligazioa

Bektorea eta intsertua independenteki liserituak zeudenean, T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) erabiliz, bien arteko ligazioa egin zen. Kontrol negatiboa ere egin zen, non konposatu guztiak intsertua izan ezik jarri ziren.

### 3.2.7-Transformazioa

Plasmido errekonbinanteak *E.coli* DH5α bakterioetan transformatu ziren. DNA gehitu ondoren, bakterioak ordu batez izotzetan inkubatu ziren. 30 segundoko “shock”-a eman zitzaizen 37°C-tan eta berriro izotzetan jarri ziren 2 minutuz. Ondoren, bakterio esekidura guztia 700 µL LB medioan jarri zen ordu batez 37 °C-tan, bakterioak errekupeartzeko. Azkenik, kanamiznadun agarreko plaka batean 450 µL bakterio transformatu erein ziren hautaketa egiteko. Gau batez kolonien hazkuntza eman ondoren, kolonien behaketa eta hautaketa egin zen, PCR baheketa batekin jarraitzeko.

### 3.3-Kolonien hautaketa PCR baheketarako

Hautaketarako kanamiznadun plakan hamar kolonia markatu, txotx batekin ikutu eta 50 mL-ko Falkon hodi batean prestatutako 10 mL LB medioan (kanamiznaduna) inokulatu ziren. Inkubaketa egin zen 220 rpm-tara, 37 °C-tan, gau batez.

PCR baheketarako, 10 mL LB hazkuntza mediotik abiatuta 500 µL hartu eta bakterioak 100 °C-tara inkubatu ziren DNA erauzteko. PCR programa jakin bat jarraituz (2.taula) eta primer espezifikook erabiliz, intereseko intsertua zegoen plasmidoaren zatia anplifikatu zen. PCR baheketaren bidez intsertu gabeko eta intsertudun plasmidoak zeintzuk ziren antzeman zen. Izan ere, intsertua zuten kolonietan anplifikaturiko zatia 50 bp inguru handiagoa izango zen. Behin intereseko intsertua zuten

plasmidoak identifikatu zirenean, bakterioetatik plasmido hori purifikatu egin zen (Miniprep) sekuentziatzera bidaltzeko.

**2.taula: PCR baheketa egiteko erabili zen PCR zikloa.**

Temperatura (°C)	Denbora (minutu)	
95	2	
95	1	} 30X
55	1	
72	1	
72	5	
4	∞	

### 3.4- Miniprep eta sekuentziazioa

Purifikazioan (Miniprep), 10 mL LB hazkuntza mediotik abiatuz, 70 µL plasmido DNA lortu ziren. Horretarako, QIAprep Spin Miniprep Kit protokoloa (QIAGEN) jarraitu zen. Plasmidoan intereseko intsertua modu egokian eta mutaziorik gabe txertatu zela ziurtatzeko, plasmidoak sekuentziatzera bidali ziren hasle espezifikoeekin Stabvida enpresara. Behin sekuentzia mutaziorik gabe klonatu zela jakinik, plasmidoak zelula eukariotoetan transfektatu ziren uNES eta uNLS-en funtzioa aztertzeko.

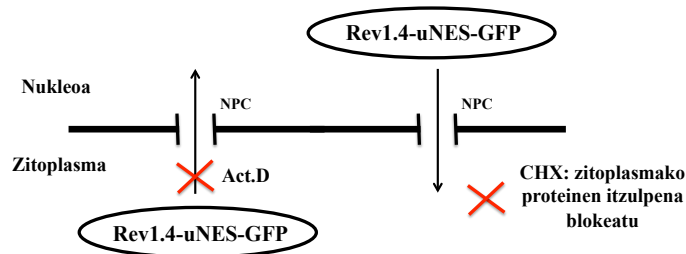
### 3.5-Transfekzioa

uNES-a zuen Rev 1.4-GFP plasmidoa HeLa zeluletan transfektatu zen, eta uNLS-a zuen pEYFP-C1 plasmidoa 293T zeluletan. HeLa eta 293T zelulak, transfekzioa burutu baino egun bat lehenago, 12 putzutako plaka batean erein ziren. Hurrengo egunean, zelulei media aldatu zitzairen, aurreko egunean jarritako media kenduz eta 750 µL-ko DMEM media (Invitrogen) jarritz. Horrela, suspentsioan gelditutako zelula hilak kendu eta soilik plakan itsatsiriko zelula biziekin gelditu ginen. 1,5 mL-ko eppendorf hodietan, lagin bakoitzeko, 1,5 µL DNA, 37,5 µL DMEM (ez suero ez penizilina) (Invitrogen) eta 1,5 µL X-tremeGENE (Roche), transfekzio errektiboa, jarri ziren (4 µL X-tremeGENE/100 µL DMEM). X-tremeGENE transfekziorako erabiltzen den errektibo bat da, egokia dena aktibitate zitotoxiko baxua erakusten duelako. Nahasketa 25 minutuz inkubatu eta DNA lagin bakoitzeko 37,5 µL, tantaka-tantaka, bota ziren zegozkien plakaren putzuetan.

### 3.6-Esportazio saiakera

NES-aren kasuan, DNA bakoitza (uNESa, kontrol positiboa eta kontrol negatiboa) bi aldiz transfektatu ziren. Lagin bat 5 µg/mL ziklohexamidarekin (CHX) (Sigma) tratatu zen eta bestea 5 µg/mL CHX eta 10 µg/mL aktinomizina-D-rekin (Act.D) (Sigma), ondoren laginak 3 orduz inkubatu ziren. CHX-k proteinen itzulpena blokeatzen du, zitoplasman behatzen diren proteina guztiak nukleotik etorriak zirela ziurtatuz (7.irudia). Act.D-k, nukleorako inportazioa blokeatzen du,

zitoplasmara esportatu diren proteinak bertan mantenduz (7.irudia). Horrela, NES ahulak detektatzea baimentzen du (Henderson & Eleftheriou, 2000). Kontrol negatiboa moduan, Rev 1.4 GFP plasmidoa inongo intserturik gabe, eta NES aktiborik gabe erabili zen. Kontrol positiboan, NES aktiboa zuen WW1 plasmidoa erabili zen. Azkenik, laginak fixatu ziren fluoreszentziatzko mikroskopioan zelulak behatzeko.



**7.irudia: uNES-aren esportazio saiakeran Act.D eta CHX tratamenduak duten eragina.** Act.D-k, proteinen nukleorako inportazioa blokeatzen du, NES ahulak detektatzea baimenduz. CHX-ak, zitoplasman proteinen itzulpena blokeatzen du, zitoplasman dauden proteinak nukleotik etorriak direla ziurtatuz. NPC: poro nuklearraren konplexua.

### 3.7-NLS azterketa funtzionala

DNA bakoitzeko (uNLS eta kontrolak) lagin bakarra jarri zen eta ez zen tratamendurik aplikatu. Kontrol negatiboan pEYFP-C1 plasmido hutsa transfektatu zen, inongo intserturik ez zuena. Kontrol positiboan, SV40 T-antigenoaren NLS funtzionala erabili zen. Laginak fixatu ziren zelulak fluoreszentziatzko mikroskopioan behatzeko.

### 3.8- Fluoreszentziatzko mikroskopia eta NES aktibitatearen kuantifikazioa

Laginak fixatu ziren %3,75 formaldehidoa erabiliz, eta PBS-arekin garbitu ziren. Zelulak fluoreszentziatzko mikroskopioan ikusteko, portak prestatu ziren Vectashield (Vector) itsasgarria erabiliz, zeinak kuprea itsasteaz gain, nukleoak tindatzen dituen, itsasgarriaren konposatua den, DAPI tindatzailearekin. Fluoreszentziatzko mikroskopioan fluoreszentzia berdea eta urdina erabili ziren. Nukleoak fluoreszentzia urdinarekin ikusi ziren eta proteinaren adierazpena nukleoan edo zitoplasman ematen zen fluoreszentzia berdearekin ikusi zen, GFP eta YFP proteina fluoreszentei esker.

Zelulen kontaketa egin zen eta horretarako fluoreszentzia berdea erabili zen. uNES-aren kasuan 200 zelula inguru zenbatu ziren, eta uNLS-aren kasuan 100 zelula inguru. Zenbatutako zelulak, fluoreszentzia zitoplasman, nukleo-zitoplasman edo nukleoan erakusten zutenaren arabera sailkatu ziren. uNES-aren kasuan, aktibitatea kuantifikatu zen Henderson eta Eleftheriou-ren NES puntuazio sistema erabiliz (Henderson & Eleftheriou, 2000)

## 4-EMAITZAK

### 4.1-Analisi bioinformatikoak

uNES eta uNLS-ak bilatzeko TOB2, BTG2 eta BTG3 proteinen sekuentzia aminoazidikoa programa desberdinetan sartu zen, 3.taulan eta 4.taulan dauden emaitzak lortuz.

**3.taula: analisi bioinformatikoetan programa desberdinekin aurkitutako uNES-ak.** Ezkerreko zutabeetan, erabilitako programak. Beste zutabeetan, proteina bakoitzaren uNES-ak. Proteina bakoitzaren izenaren alboan UniProt-eko erreferentzia zenbakia. Beltzez, programa desberdinen artean bat datozen sekuentziak. S: score (Valid NES programak ematen duen puntuazioa, 0-1 bitartekoa).

#### Ustezko NES-ak

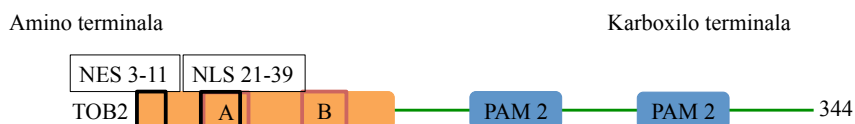
Programak	Proteinak		
	TOB2 (UniProt:Q14106)	BTG2 (UniProt:P78543)	BTG3 (UniProt:Q14201)
NetNES 1.1 Server	<b>5-IKVAL-9</b>	<b>98-SELTL-102</b>	<b>32-EKLTL-36</b> <b>84-SDLGL-88</b>
WREGEX	–	–	–
Valid NES	3-LEIKVAL-9 (S=0,25) 5-IKVALNF-11 (S=0,21)	96-LPSELTL-102 (S=0,16) 81-VASQIGL-87 (S=0,13)	30-FAEKLTL-36 (S=0,66) 82-LYSDLGL-88 (S=0,22)

**4.taula: analisi bioinformatikoetan programa desberdinekin aurkitutako uNLS-ak.** Ezkerreko zutabeetan, erabilitako programak. Beste zutabeetan, proteina bakoitzaren uNLS-ak. Beltzez, programa desberdinen artean bat datozen sekuentziak. S: score (WREGEX programak ematen duen puntuazioa, 0-100 bitartekoa)

#### Ustezko NLS-ak

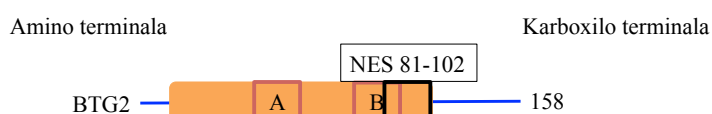
Programak	Proteinak		
	TOB2	BTG2	BTG3
PSORT II	21-PRRR-24 21-PRRRADL-27 22-RRRADLFGHEELERLLKKK-39	–	<b>189-PRKK-192</b> <b>190-RKKP-193</b> <b>187-PLPRKKP-193</b> <b>189-PRKKPGM-195</b>
WREGEX	–	–	<b>217-GRKNKP-222 (S=14,7)</b> <b>187-PLPRKKPG-194 (S=100)</b>
cNLS mapper	–	–	–
EML	–	–	<b>187-PLPRKKPG-194</b> <b>217-GRKNKP-222</b>

TOB2 proteinan, NetNES 1.1 Server programaren bidez lortutako uNES-a bat zetorren Valid NES programarekin lortutako bi emaitzekin (3.taula). 3-LEIKVAL-9 sekuentziaren uNES-a izateko puntuazioa 0,25-ekoa zen eta 5-IKVALNF-11 sekuentziarena 0,21-ekoa (3.taula). uNES-a amino terminalean kokatzen zen (8.irudia). uNLS-ak soilik PSORT II programarekin aurkitu ziren (4.taula). uNLS guztiak A kutxa gainezartzen kokatzen ziren 21-39 posizio inguruan (8.irudia).



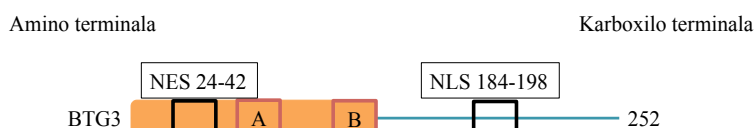
**8.irudia: TOB2 proteinaren sekuentzian identifikatutako uNES eta uNLS-ak.** Amino terminalean, TOB/BTG domeinu barruan, uNES bat (3-11) eta uNLS bat (21-39) aurkitzen dira. NLS-a A kutxa gainezartzen dago.

BTG2 proteinan, NetNes 1.1 Server programarekin eta Valid NES programarekin aurkitutako uNES sekuentziak bat zetozen. 96-LPSELTL-102 sekuentziaren uNES-a izateko puntuazioa 0,16-koa zen eta 81-VASQIGL-87 sekuentziarena 0,13-koa (3.taula). uNES-a, TOB/BTG homologia domeinuan, B kutxa gainezartzen kokatzen zen (9.irudia). Ez zen NLS seinalerik identifikatu (4.taula).



**9.irudia: BTG2 proteinaren sekuentzian identifikatutako uNES-a.** Amino terminalean, TOB/BTG domeinu barruan, B kutxa gainezartzen, uNES bat (81-102) aurkitzen da.

BTG3 proteinan, NetNes 1.1 Server eta Valid NES programetan bat zetozen bi uNES sekuentzia identifikatu ziren (3.taula). ValidNES programan, 30-FAEKLTL-36 sekuentziaren puntuazioa altuena zen ( $S=0,66$ ), TOB2 eta BTG2 proteinen uNES-en puntuazioak baino altuagoa (3.taula). Horregatik, 30-FAEKLTL-36 sekuentzia barneratzen zuen 24-42 aminoazido sekuentziari, metodo molekularren bidez aztertzeke lehentasuna eman zitzaion (10.irudia). PSORT II, WREGEX eta ELM programekin, 187-195 posizio inguruan, bat zetozen sei uNLS identifikatu ziren (4.taula). WREGEX programan 187-194 bitarteko sekuentziaren puntuazioa 100-ekoa zen (4.taula). WREGEX eta EML programekin 217-222 posizioetan beste uNLS bat aurkitu zen, eta horren WREGEX puntuazioa 14,7-koa zen (4.taula). 187-194 bitarteko sekuentziaren puntuazioa handiagoa izanik, eta programen arteko parekamendu gehiago behatu ondoren, 184-198 aminoazido sekuentzia metodo molekularren bidez aztertzeke uNLS modura aukeratu zen (10.irudia).



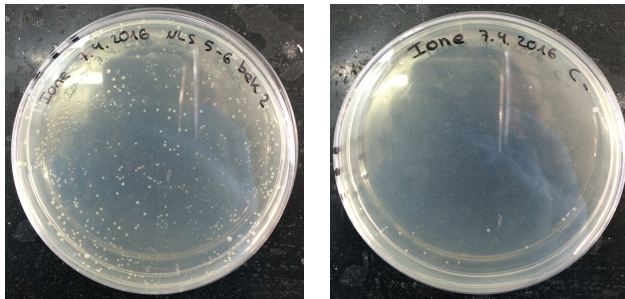
**10.irudia: BTG3 proteinaren sekuentzian identifikatutako uNES eta uNLS-a.** Amino terminalean, TOB/BTG domeinu barruan, uNES bat (24-42) aurkitzen da. Karboxilo muturrean uNLS bat (184-198) dago.

Beraz, BTG3 proteinaren 24-42 sekuentzia aminoazidikoa uNES bezala, eta 184-198 sekuentzia aminoazidikoa uNLS bezala aztertu ziren metodo molekularren bidez (10.irudia).

## 4.2.-Klonazioaren emaitzak eta arazoak

### 4.2.1-Transformazioa

Transformazioa kasu guztietan ondo ateratu zen. Orokorrean koloniak txikiak, borobilak eta leunak ziren (11.irudia). Kontrol negatiboan, teorikoki, ez zen koloniarik behatu behar. Hala ere, bai uNES eta bai uNLS-aren kasuan, kontrol negatiboan kolonia gutxi batzuk behatu ziren, beti ere inertsuta zuten plakan baino gutxiago (11.irudia).

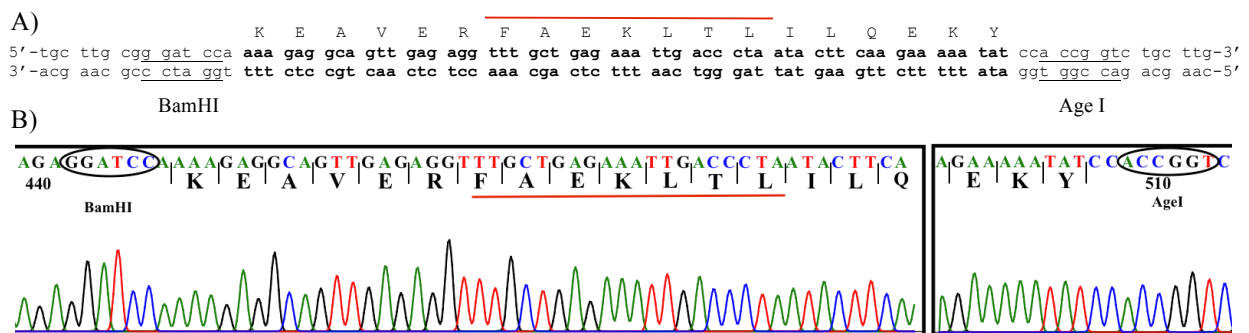


**11.irudia:** agarrezko plaketan kolonien behaketa, gau batez inkubatu ondoren. Kontrol negatiboan (eskuineko irudia) ez zen ia koloniarik behatu.

Plaketan hazi ziren bakterio koloniak intereseko plasmido errekonbinantea zutela ziurtatzeko PCR baheketa edo sekuentziatzea bidali ziren.

### 4.2.2- Ustezko NES-aren klonazioa

Behin bakarrik saiatu behar izan zen BTG3-ren uNES-aren (12A.irudia) klonazioa egiten, Rev 1.4-GFP plasmidoan. Transformazio plaketako 3 kolonia aukeratu, plasmidoak purifikatu eta sekuentziatzea bidali ziren. Plasmidoan, sekuentzia modu egokian eta mutaziorik gabe klonatu zela ikusi zen (12B.irudia).



**12.irudia:** uNES-aren klonazioko sekuentziario emaitza. A) Klonatu nahi zen uNES-aren sekuentzia. Beltzez azpimarratuta BamHI eta AgeI errestrizio guneak, lerro gorriaren barnean analisi bioinformatikoetan lortutako uNES sekuentzia eta beltzez idatzita uNES sekuentzia, kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoarekin. B) Rev 1.4-GFP plasmidoan klonatu zen uNES-aren sekuentzia. Borobilduta errestrizio guneak, kodoi bakoitzaren azpian bakoitzari dagokion aminoazidoa eta lerro gorriarekin azpimarratuta analisi bioinformatikoetan lortutako uNES-a.



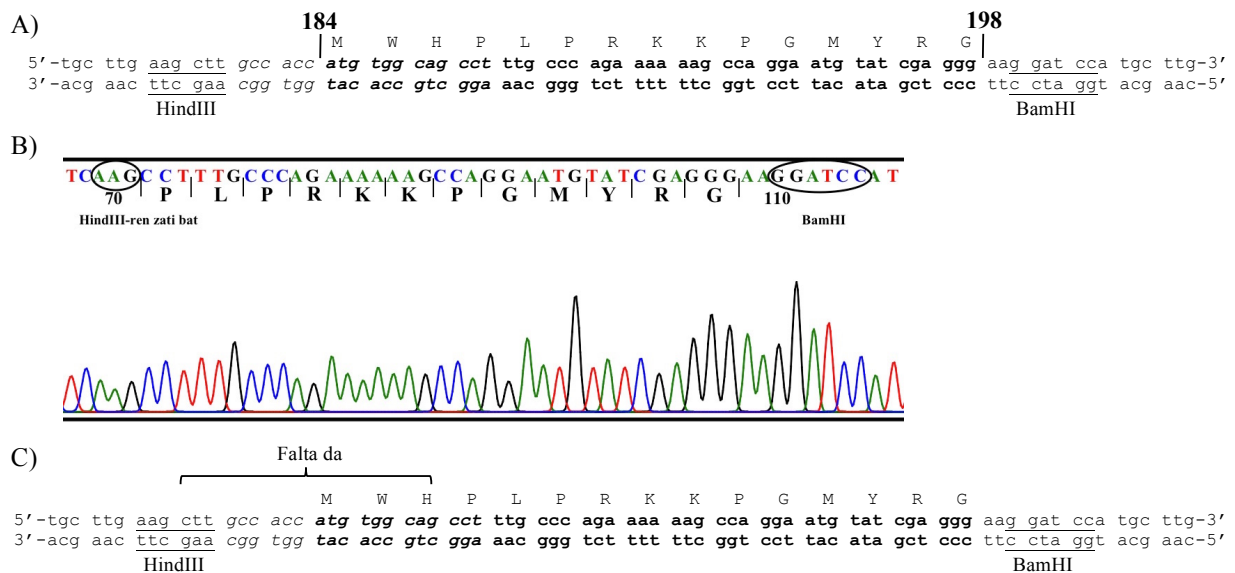
Klonazioan lortutako plasmidoa (Rev-BTG3 uNES-GFP) uNES-aren esportazio saiakera egiteko erabili zen.

#### 4.2.3-Ustezko NLS-aren klonazioa

BTG3-ren uNLS-a klonatzeko arazoak egon ziren, eta bi plasmido desberdin erabiliz, lau aldiz erreplikatu behar izan zen klonazioa. Azkenean uNLS-a ondo klonatzea lortu zen.

##### 4.2.3.1-Lehenengo saiakera

uNLS-a (13A.irudia) NES-GFP plasmidoan klonatu zen. Transformazio plaketako, 3 kolonia aukeratu, purifikatu eta sekuentziatzera bidali ziren. Hiru plasmidoetan akats berdina behatu zen, intereseko intsertuari sei kodoi falta zitzaizkion (13B eta C.irudia). NES-GFP plasmidoa zuten kolonia guztietan akats berdina behatu ondoren, uNLS-a pEYFP-C1 plasmidoan klonatzea erabaki zen.

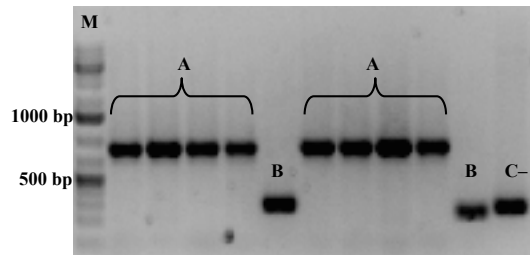


**13.irudia: uNLS-aren lehenengo klonazio saiakerako sekuentziario emaitza.** A) Klonatu nahi zen uNLS sekuentzia. Azpimarratuta HindIII eta BamHI errestrikzio guneak. Beltzez uNLS-aren sekuentzia, kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoarekin. Alboetako zenbakiak sekuentzia horren posizio aminoazidikoa adierazten dute. B) NES-GFP plasmidoan klonatu zen uNLS-aren sekuentzia. Borobilduta, errestrikzio guneak eta kodoi bakoitzaren azpian, bakoitzari dagokion aminoazidoa. C) Klonatu zen uNLS sekuentziaren eta klonatu nahi zen sekuentziaren arteko konparaketa. Plasmido errekonbinatuan 6 kodoi falta ziren.

##### 4.2.3.2-Bigarren saiakera

uNLS-a pEYFP-C1 plasmidoan klonatu zen. Transformazio plaketako kolonietatik abiatuta, 10 kolonien PCR baheketa egin eta pEYFP-C1 plasmidoa kontaminatuta zegoela ikusi zen (14.irudia). Intserturik gabeko kontrol negatiboaren (C-) PCR produktuaren tamaina 250 bp-takoa zen eta intsertua zuten laginena (A) 750 bp-takoa (14.irudia). Intsertu gabeko eta intsertudun PCR produktuen

arteak 500 bp-ko desberdintasuna zegoen. Kontuan izanik, klonatu nahi zen intsertuak 54 bp zituela, laginak kontaminatuta zeudela ondorioztatu zen.

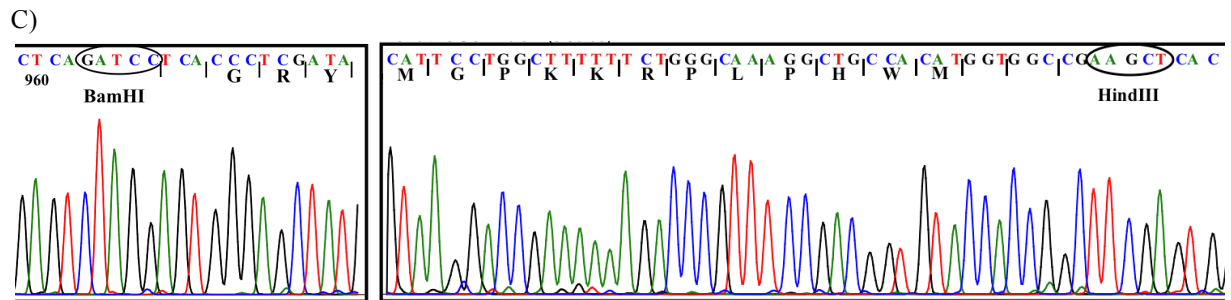
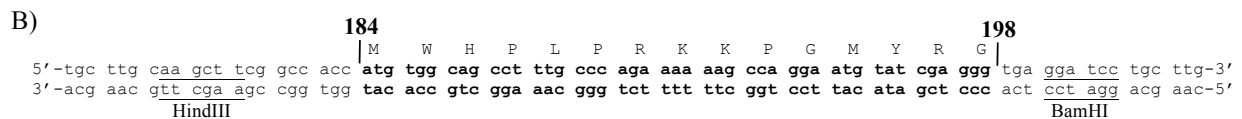
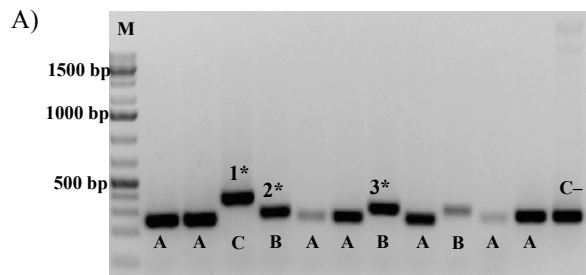


**14.irudia: uNLS-aren bigarren klonazio saiakerako PCR baheketaren emaitza.** Intsertua duten plasmidoak (A), intsertu gabekoak (B) eta kontrol negatiboa (C-) baino 500 bp handiagoak dira. Espero zena, soilik 54 bp handiagoa izatea zen. M, Gene Ruler 1Kb Plus markatzailea (Thermo Scientific)

PCR baheketan kontaminazioa ikusita, pEYFP-C1 bektore berria prestatu zen.

#### 4.2.3.3-Hirugarren saiakera

uNLS-a berriki prestatutako pEYFP-C1 bektorean klonatu zen. PCR baheketan, banda batzuk kontrol negatiboaren tamaina eta beste batzuk 50 bp eta 100 bp inguru handiagoak ziren (15A.irudia).



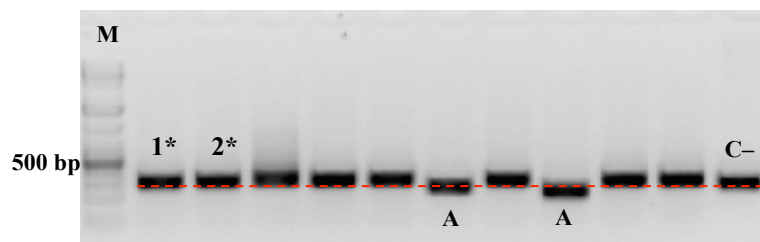
**15.irudia: uNLS-aren hirugarren klonazio saiakerako emaitzak.** A) PCR baheketaren emaitza. A, intsertu gabeko plasmidoak. B, intsertu bakarra zuten plasmidoak. C, bi intsertu zituen plasmidoa. C-, kontrol negatiboa eta M, markatzailea. Izar batez adierazitakoak sekuentziatzerara bidali ziren. B) Klonatu nahi zen uNLS sekuentzia, HindIII eta BamHI errestrikzio guneekin. Beltzez uNLS-aren sekuentzia, kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoarekin eta alboetako zenbakiak sekuentzia horren posizio aminoazidikoa adierazten dute. C) Sekuentziatzerara bidali zen 3\* plasmidoaren sekuentzia. Bertan HindIII eta BamHI errestrikzio guneak daude eta kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoa.

Kontrol negatiboaren (–C) tamaina zuten bandak (A), plasmido hutsa zuten (15A.irudia). Kontrol negatiboa baino 50 bp handiagoak ziren bandak (B), plasmidoa intsertu bakarrarekin zuten (15A.irudia). Kontrol negatiboa baino 100 bp handiagoak ziren bandak (C), plasmidoa bi intserturekin zuten (15A.irudia). 15A.irudian izar batekin adierazitakoak (1\*, 2\* eta 3\*), sekuentziatzera bidali ziren. 15B.irudian, klonatu nahi zen sekuentzia eta 15C.irudian, 3\*-ren sekuentziazio emaitza erakusten da. Intsertua alderantziz sartu zen bektorean (15C.irudia). Sekuentziaren hasieran BamHI errestrikzio gunea dugu, gero uNLS sekuentzia alderantziz sartuta eta azkenik, HindIII errestrikzio gunea (15C.irudia).

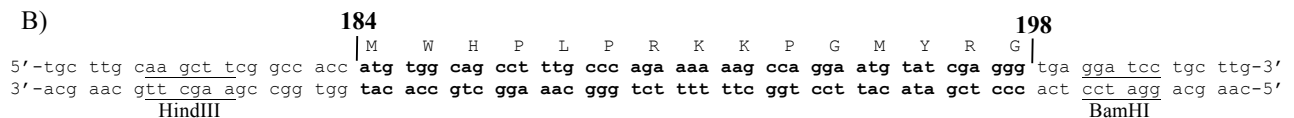
#### 4.2.3.4-Laugarren saiakera, definitiboa

uNLS-a pEYFP-C1 plasmidoan ondo klonatzea lortu zen. PCR baheketan, PCR produktu gehienek kontrol negatiboaren tamaina berdina zuten (16A.irudia). Bi PCR produktuk (A) kontrol negatiboa (C–) baino tamaina txikiagoa zuten (16A.irudia). Emaitza horiek nahiko arraroak ziren, izan ere, lagin guztiek kontrol negatiboaren tamaina berdina edo handiagoa izatea espero zen. Hala ere, izarrez adierazitako laginak (16A.irudia) sekuentziatzera bidali ziren.

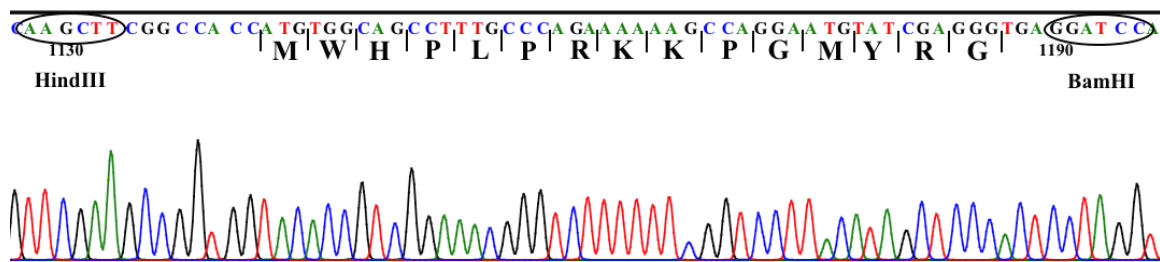
A)



B)



C)

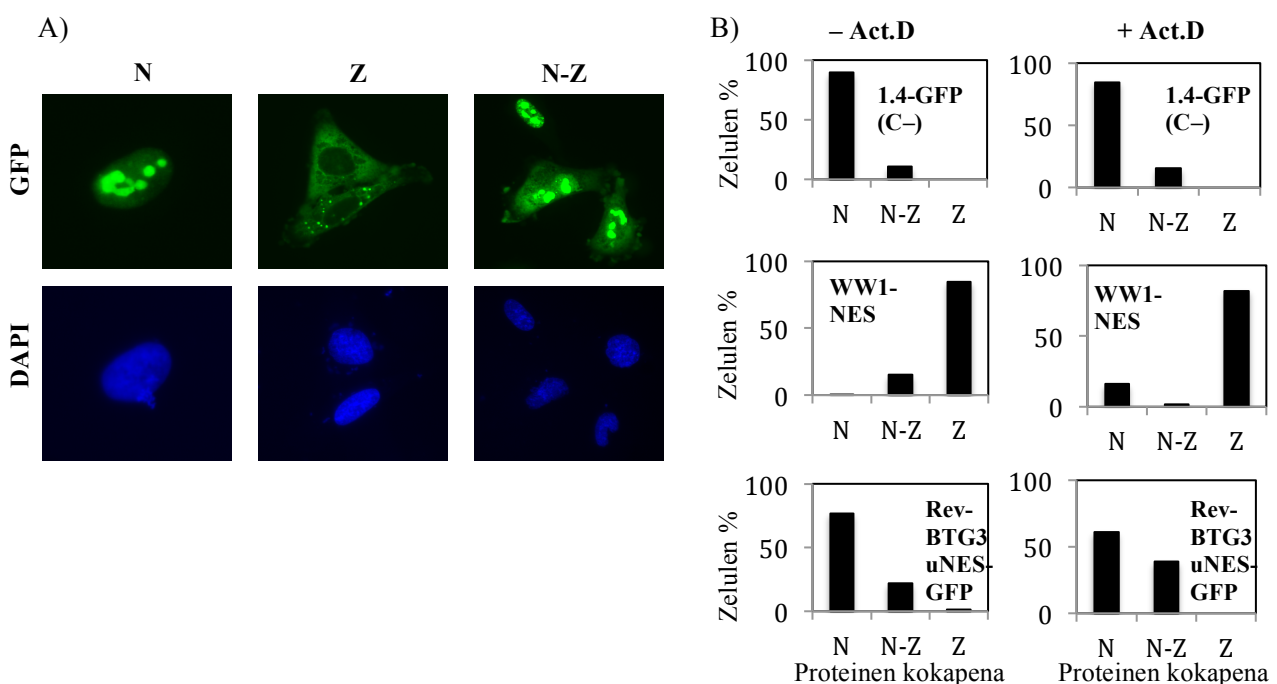


**16.irudia: uNLS-aren laugarren klonazio saiakerako emaitzak.** A) PCR baheketaren emaitza. A, kontrol negatiboa baino txikiagoak diren bandak. C–, kontrol negatiboa. M, markatzailea. Izar batez adierazitakoak sekuentziatzera bidali ziren. B) Klonatu nahi zen uNLS sekuentzia, HindIII eta BamHI errestrikzio guneekin. Beltzez uNLS-aren sekuentzia, kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoarekin eta alboetako zenbakiak sekuentzia horren posizio aminoazidikoa adierazten dute. C) 2\* plasmidoaren sekuentziazio emaitza. Bertan HindIII eta BamHI errestrikzio guneak daude eta kodoi bakoitzari dagokion aminoazidoa.

16B.irudian, klonatu nahi zen sekuentzia dugu. Sekuentziatzera bidali ziren plasmidoetatik \*2 moduan izendatuta zegoenak (16A.irudia), intsertua modu egokian eta mutaziorik gabe txertatuta zeukan (16C.irudia). 1\* moduan izendatutakoan, intsertua modu egokian txertatuta, baina uNLS-aren sekuentzian bi mutazio erakusten zituen (erakutsibako datuak). Azkenean, BTG3-ren uNLS-a ondo klonatu zen. Plasmido hori (YFP-BTG3 uNLS) azterketa funtzionala egiteko erabili zen.

#### 4.3-BTG3-ren ustezko NES-aren aktibitatearen kuantifikazioa (esportazio saiakera)

Rev-BTG3 uNES-GFP plasmidoa HeLa zeluletan transfektatu zen esportazio saiakera egiteko (17.irudia). Fluoreszentziako mikroskopiaz, zenbatutako zelula bakoitzean proteina nukleoan (N), nukleo eta zitoplasman (N-Z) edo zitoplasman (Z) zegoen behatu zen (17A.irudia).



**17.irudia: NES esportazio saiakeraren emaitzak.** A) Proteinen kokapen zelular posibleak erakusten dituzten irudiak: nuklearra (N), zitoplasmatikoa (Z) eta nukleo-zitoplasmatikoa (N-Z). Lehenengo lerroan berdez (GFP), proteina fluoreszenteak ditugu eta bigarren lerroan urdinez (DAPI), DAPI-rekin tindatutako nukleoak. B) Grafikoek proteinen zein proportzio nukleoan (N), nukleo-zitoplasman (N-Z) edo zitoplasman (Z) aurkitzen zen erakusten dute. Lehenengo lerroan kontrol negatiboa (1.4-GFP), bigarren lerroan kontrol positiboa (WW1-NES) eta hirugarren lerroan BTG3-ren uNES-a (Rev-BTG3 uNES-GFP). Ezkerreko zutabeetan tratamendu gabeko laginak (- Act.D) eta eskuineko zutabeetan tratamendua jasotako laginak (+ Act.D) daude.

Kontrol negatiboan, Act.D tratamendua aplikatu aurretiko 246 zelula zenbatu ziren (5.taula). Gehiengoak kokapen nuklearra (%89,4) eta %10,6-ak kokapen nukleo-zitoplasmatikoa erakusten zuten (5.taula eta 17B.irudia). Act.D-rekin inkubatu ondoren 196 zelula zenbatu ziren (5.taula). Proteinen kokapen nuklearra zuten zelulak %4,7 jaitsi ziren, %84,7 batean geldituz eta nukleo-

zitoplasmatikoak %15,3-ra igo ziren (5.taula eta 17B.irudia). Kontrol positiboan (WW1), Act.D tratamendua aplikatu aurretiko 246 zelula zenbatu ziren (5.taula). Horien %84,6-ak kokapen zitoplasmatikoa, %15-ak kokapen nukleo-zitoplasmatikoa eta %0,4-ak kokapen nuklearra erakusten zuten (5.taula eta 17B.irudia). Act.D aplikatu ondoren 217 zelula zenbatu ziren (5.taula). Kokapen zitoplasmatikoaren eta nukleo-zitoplasmatikoaren portzentajeak jaitsi egin ziren (17B.irudia), %82-ra zitoplasmatikoaren kasuan eta %1,9-ra nukleo-zitoplasmatikoaren kasuan (5.taula). Rev-BTG3 NES-GFP-an, Act.D aplikatu aurretik 210 zelula zenbatu ziren. Kokapen nuklearra nagusitzen zen (%76,7), baina, kontrol negatiboarekin konparatuz, bikoiztu egin zen nukleo-zitoplasma kokapena, %21,9-ra iritsiz (5.taula eta 17B.irudia). Act.D aplikatu ondoren, 165 zelula zenbatu ziren (5.taula). %16,9 handiagotu zen proteinen kokapen nukleo-zitoplasmatikoa (%38,8). Kontrol negatiboarekin konparatuz, 2,5 aldiz kokapen nukleo-zitoplasmatiko gehiago behatu zen Act.D tratamendua aplikatu ondoren (5.taula eta 17B.irudia).

**5.taula: HeLa zeluletan, lagin bakoitzean, fusio proteinaren kokapen portzentajeak eta NES aktibitatearen puntuazioa.** Lagin bakoitzerako tratamendu aurreko (Act.D –) eta tratamendu ondorengo (Act.D 3h) proteinen kokapen zelularren portzentajeak. Totala, lagin bakoitzerako zenbatutako zelulen kopuru totala da. Aktibitatearen puntuazioa, Henderson eta Eleftheriou-ren irizpideak jarraituz NES aktibitatea neurtzeko erabiltzen da, 0-tik +9-rako balioak dira.

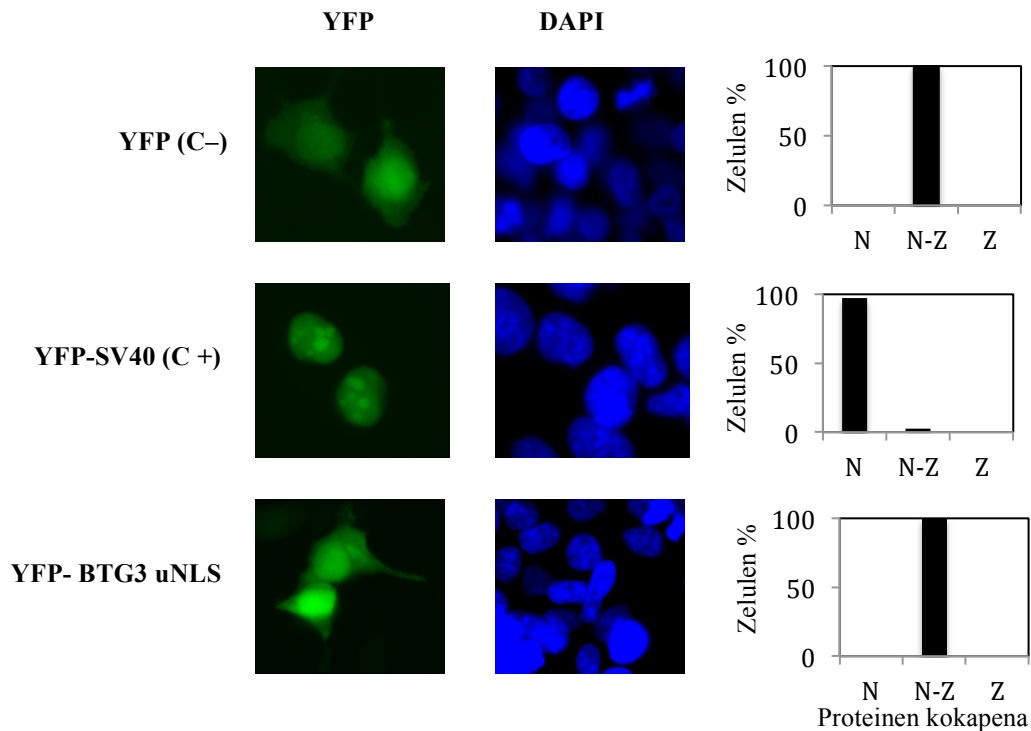
Lagina	Act.D	Nuklearra (%)	Nukleo-zitoplasmatikoa (%)	Zitoplasmatikoa (%)	Totala	Aktibitatearen puntuazioa
Rev	1.4 –	89,4	10,6	0	246	0
GFP	3h	84,7	15,3	0	196	
WW1	–	0,4	15	84,6	246	+9
	3h	16,1	1,9	82	217	
NES	–	76,7	21,9	1,4	210	+1
	3h	61,2	38,8	0	165	

Esportazio saiakeraren puntuazio sistema (Henderson & Eleftheriou, 2000) erabilia BTG3-ren NES-ak +1-eko aktibitatea zuela ikusi zen (5.taula). Beraz, nahiz eta ahula izan, BTG3-ren NES-a funtzionala da.

#### 4.4-BTG3-ren ustezko NLS-aren azterketa funtzionala

YFP-BTG3 uNLS plasmidoa, BTG3 proteinaren uNLS-aren azterketa funtzionala egiteko, 293T zeluletan transfektatu zen. Kontrol negatibo bezala, NLS aktiborik gabeko, YFP proteina erabili zen, nukleoan eta zitoplasman kokatzen zena (18.irudia). Kontrol negatiboan 111 zelula zenbatu ziren eta espero bezala, %100-ean kokapen nukleo-zitoplasmatikoa erakusten zuten (18.irudia). Kontrol positiboan (SV40-NES), 116 zelula zenbatu ziren eta proteinen %97,4-a nukleoan aurkitzen ziren (18.irudia). Intereseko proteinaren (YFP-BTG3 uNLS) 115 zelula zenbatu ziren eta proteinen %100-a

nukleo-zitoplasman behatu ziren, kontrol negatiboa bezala (18.irudia). uNLS-a aktiboa balitz, fusio proteinaren portzentaje handiago bat nukleoan behatuko zen.



**18.irudia: NLS-aren azterketa funtzionalaren emaitzak.** Lagin bakoitzerako berdez (YFP), proteina fluoreszenteak ditugu. Soilik nukleoan (YFP-SV40 C+), edo nukleo eta zitoplasman (YFP C- eta YFP-BTG3 uNLS) aurkitu daitezke. Urdinez (DAPI), DAPI-rekin tindatutako nukleoak ditugu. Hirugarren zutabean, lagin bakoitzerako proteinen kokapen zelularra agertzen da ehunekotan (N: nukleoan, N-Z: nukleo eta zitoplasman, Z: zitoplasman).

Beraz, BTG3-ren aztertutako sekuentziak (184-198) ez dauka NLS aktibitaterik.

## 5-EZTABAIDA

Hainbat ikerketetan ikusi da, TOB/BTG familiako proteinek hazkuntza zelularra inhibitzeko, CCR4-Not konplexuko parte den Caf1 proteinarekin interakzionatzen dutela. Horrela, Caf1 proteinaren eta CDK-ren arteko interakzioa oztopatzen dute (Ikematsu *et al.*, 1999). TOB/BTG proteinen eta Caf1-en arteko interakzioa emateko, bi proteinak zelularen leku berdinean kokatu behar dira. TOB/BTG proteinek, hazkuntza zelularra G0/G1 faseetik S fasera igarotzean inhibitzen dutenez (Yoshida *et al.*, 2003), Caf1-ekin interakzioa momentu horretan emango da. Caf1 proteina, G0/G1 faseetan nagusiki nukleoan dago (Collart, 2016). Beraz, TOB/BTG proteinak nolabait nukleora garraiatu behar dira. Aurreko ikerketetan garraio nukleo-zitoplasmatikoa errazten duten seinaleak identifikatu dira TOB/BTG familiako bi kideetan: TOB1 eta BTG1 (Rodier *et al.*, 2001; Kawamura-Tsuzuku *et al.*, 2004). Lan honetan, beste hiru kideen (TOB2, BTG2 eta BTG3), garraio nukleo-zitoplasmatikoaren seinaleak aztertu dira.

Analisi bioinformatiko baten bidez, hainbat uNES eta uNLS identifikatu genituen. TOB2-ren uNLS eta uNES-ak, amino terminalean kokatzen dira. Beste ikerketa batzuetan, TOB1-en identifikatutako NLS eta NES-ak ere amino terminalean kokatzen dira (Kawamura-Tsuzuku *et al.*, 2004), eta amino terminala oso kontserbatua dago TOB/BTG proteina familiaren artean (Yuan *et al.*, 2011). Hala ere, TOB2 eta TOB1-en arteko NLS eta NES sekuentzien aminoazidoak desberdinak dira.

BTG2 proteinan, ez zen uNLS-ik aurkitu, soilik uNES-ak aurkitu ziren analisi bioinformatikoetan. Hala ere, proteina hori nukleoan agertzen da egoera batzuetan, adibidez, iskemiak eragindako istripu zerebrobaskularra (tronboak edo enboloak) jasan duten pertsonen neuronetan (Slevin *et al.*, 2008). Beraz, BTG2 proteinak nukleora garraiatzeko moduren bat izan behar du.

BTG3-ren uNES eta uNLS-ek programen arteko parekamendu gehien eta puntuazio altuenak zituzten analisi bioinformatikoetan. Beraz, metodo molekularren bidez BTG3-ren uNES eta uNLS-en aktibitatea aztertzea erabaki genuen. Datozen ikerketetan TOB2 eta BTG2 proteinen uNES eta uNLS-ak aktiboak diren aztertu beharko da.

BTG3-ren ustezko garraio seinaleen funtzioa aztertzeko, uNESa eta uNLSa klonatu ziren proteina fluoreszente batekin (GFP edo YFP) fusionatuta. Rev-BTG3 uNES-GFP arazorik gabe klonatu genuen. Aldiz, YFP-BTG3 uNLS klonatzeko lau saiakera beharrezkoak izan ziren. Ez dago argi klonazio arazo horren arrazoia.

BTG3-ren NES-aren bidez Rev-BTG3 uNES-GFP fusio proteina zitoplasmara garraiatu zen. Rev-BTG3 uNES-GFP fusio proteinaren kokapen nuklearra kontrol negatiboan baino txikiagoa zen eta neurri handiago batean kokapen nukleo-zitoplasmatikoa erakusten zuen. NES horren aktibitatea +1 zen. Beraz, BTG3 proteinaren nukleotik zitoplasmarako esportazioa NES bidez eman daiteke. Ondorengo ikerketetan, berriki identifikatutako NES horren garrantzia BTG3 proteina osoaren kontestuan aztertu beharko da.

BTG3-ren NLS-aren bidez YFP-BTG3 uNLS fusio proteina ez zen nukleora garraiatu. Fusio proteinaren kokapena, kontrol negatiboan bezala, %100-ean nukleo-zitoplasmatikoa izan zen. BTG3-ren uNLS-a inaktiboa zen eta fusio proteina nukleora difusioz sartu zen. NLS aktiboa izan balitz, proteinaren kokapena neurri handiago batean nuklearra izango litzateke. Beraz, BTG3-ren nukleorako inportazioa beste bide batzuen bidez eman behar da. Jarraian bi aukera proposatzen dira. Inportazioa NPC-an zehar energiaren beharrik gabe (pasiboki) eman daiteke. Izan ere, 60 kDa baino txikiagoak diren molekulak pasiboki garraiatuak izan daitezke (Ding *et al.*, 2010) eta BTG3 proteinak 29 kDa-eko tamaina dauka (UniProt). Inportaziorako beste aukera bat, BTG3 proteinak NLS aktiboa duen beste proteina batekin interakzionatzea izango litzateke. BTG3 proteinaren egitura antzekoa duen

BTG1 proteinan, nukleorako inportazioa B kutxaren bidez ematen da (Rodier *et al.*, 2001). B kutxak nukleorako inportazioa bideratzen du, baina bertan ez da NLS-ik aurkitzen (Rodier *et al.*, 2001). Beraz, B kutxak NLS aktibo bat duen beste proteina batekin interakzionatuko luke nukleorako inportazioa bideratzeko. BTG1 eta BTG3 proteinen artean B kutxa oso kontserbatuta dagoenez (Yuan *et al.*, 2011), posible da BTG3-ren nukleorako inportazioa ere B kutxaren bidez ematea. Hala ere, B kutxarekin interakzionatzen duen beste proteina hori ez da oraindik identifikatu. Datozen ikerketetan BTG3-ren garraioa pasiboki edo B kutxaren bidez ematen den aztertu beharko da. B kutxaren bidez ematekotan, B kutxak nola eta zein proteinarekin interakzionatzen duen jakitea ere garrantzitsua izango da.

Laburtuz, lan honetan analisi bioinformatikoen bidez TOB2 eta BTG2-n uNES eta uNLS-ak aurkitu dira, eta metodo molekularren bidez BTG3-n zitoplasmatik nukleorako garraio bideratu dezakeen NES berri bat identifikatu da 24-42 posizioan. Beraz, hasi gara, TOB2, BTG2 eta BTG3 proteinen garraio nukleo-zitoplasmatikoaren mekanismoak aztertzen. Ikerketa honen jarraipenek, proteina horien hazkuntza inhibitzaile funtzioa nola gertatzen den hobeto ulertzen lagunduko dute.

## 6-BIBLIOGRAFIA

- Ajima R., Ikematsu N., Ohsugi M., Yoshida Y., Yamamoto T. 2000. Cloning and characterization of the mouse *tob2* gene. *Gene*. 253, 215-220.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Wilson J., Hunt T. 2010. *Biología molecular de la célula*. 5.edizioa. Ediciones Omega.
- Collart M.A. 2016. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*.
- Ding Q., Zhao L., Hong G., Zheng A.C. 2010. The Nucleocytoplasmic Transport of Viral Proteins. *Virologica Sinica*. 25, 79-85.
- Doidge R., Mittal S., Aslam A., Winkler G.S. 2012. The Anti-Proliferative Activity of BTG/TOB Proteins Is Mediated via the Caf1a (CNT7) and Caf1b (CNOT8) Deadenylation Subunits of the Ccr4-Not Complex. *PLoS One*. 7.
- Fischer U., Huber J., Boelens W.C., Mattaj I.W., Lührmann R. 1995. The HIV-1 Rev Activation Domain Is a Nuclear Export Signal That Accesses an Export Pathway Used by Specific Cellular RNAs. *Cell*. 82, 475-483.
- Garcia-Santisteban I., Zorroza K., Rodriguez J.A. 2012. Two Nuclear Localization Signals in USP1 Mediate Nuclear Import of the USP1/UAF1 Complex. *PLoS One*. 7.
- Henderson B.R., Eleftheriou A. 2000. A Comparison of the Activity, Sequence Specificity, and CRM1-Dependence of Different Nuclear Export Signals. *Experimental Cell Research*. 256, 213-224.
- Ikematsu N., Yoshida Y., Kawamura-Tsuzuku J., Ohsugi M., Onda M., Hirai M., Fujimoto J., Yamamoto T. 1999. Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG family member, associated with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene*. 18, 7432-7441.



- Iwanaga K., Sueoka N., Sato A., Sakuragi T., Sakao Y., Tominaga M., Suzuki., Yoshida Y., K-Tsuzuku J., Yamamoto T., Hayashi S., Nagasawa K., Sueoka E. 2003. Alteration of expression or phosphorylation status of Tob, a novel Tumor suppressor gene product, is an early event in lung cancer. *Cancer Letters*. 202, 71-79.
- Kalderon D., Bruce L.R., William D.R., Alan E.S. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 39, 499-509.
- Kawamura-Tsuzuku J., Suzuki T., Yoshida Y., Yamamoto T. 2004. Nuclear localization of Tob is important for regulation of its antiproliferative activity. *Oncogene*. 23, 6630-6638.
- Mauxion F., Chen C., Séraphin B., Shyu A. 2009. BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends in Biochemical Sciences*. 34, 640-647.
- Pemberton L.F., Paschal B.M. 2005. Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. *Traffic*. 6, 187-198.
- Rodier A., Rochard P., Berthet., Rouault JP., Casas F., Daury L., Busson M., Magaud JP., Wrutniak-Cabello C., Cabello G. 2001. Identification of functional domains involved in BTG1 cell localization. *Oncogene*. 20, 2691-2703.
- Shapouri F., Saeidi S., Iongh R. U., Casagrande F., Western P.S., McLaughlin E., Sutherland J.M., Hime G.R., Familiari M. 2016. Tob1 is expressed in developing and adult gonads and is associated with the P-body marker, Dcp2. *Cell Tissue Research*. 364, 443-451.
- Slevin M., Sanfeliu C., Turu M.M., Grau-Olivares M., Ferrer I., Boluda S., Marti-Fabregas J., Kumar S., Krupinski J. 2008. B-Cell Translocation Gene 2 Is Over-Expressed in Peri-Infarct Neurons after Ischaemic Stroke. *Pathobiology*. 76, 129-135.
- Winkler G. Sebastiaan. 2010. The Mammalian Anti-Proliferative BTG/Tob Protein Family. *Journal of Cellular Physiology*. 222, 66-72.
- Xu D., Farmer A., Chook Y.M. 2010. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- $\beta$  proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 20, 782-790.
- Yoshida Y., Matsuda S., Ikematsu N., Kawamura-Tsuzuku J., Inazawa J., Umemori H., Yamamoto T. 1998. ANA, a novel member of Tob/BTG1 family, is expressed in the ventricular zone of the developing central nervous system. *Oncogene*. 16, 2687-2693.
- Yoshida Y., Nakamura T., Komoda M., Satoh H., Suzuki T., Tsuzuku J., Miyasaka T., Yoshida E., Umemori H., Kunisaki R., Tani K., Ishii S., Mori S., Suganuma M., Noda T., Yamamoto T. 2003. Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Genes and Development*. 17, 1201-1206.
- Yuan J., Cao J., Tang Z., Wang N., Li K. 2011. Molecular Characterization of Tob1 in Muscle Development in Pigs. *International Journal of Molecular Sciences*. 12, 4315-4326.
- Zhao L., Zheng C. 2012. The First Identified Nucleocytoplasmic Shuttling Herpesviral Capsid Protein: Herpes Simplex Virus Type 1 VP19C. *PLoS One*. 7.