

Konpartimentu espezifikoko gertuko biotinilazioa: XPO1en esportazio-kargoak identifikatzeko hurbilketa berria

(Compartment-specific proximity biotinylation: a new approach to identify nuclear export cargos of XPO1)

Maria Sendino¹, Juanma Ramírez², Ugo Mayor^{2,3}, Gorka Prieto⁴,
Miren Josu Omaetxebarria², Jose Antonio Rodríguez^{*1}

¹ Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila,
Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Leioa (UPV/EHU)

² Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea,
Leioa (UPV/EHU)

³ Ikerbasque Ikerkuntzarako Euskal Fundazioa, Bilbo

⁴ Komunikazioen Ingeniaritza Saila, Bilboko Ingeniaritza Eskola (UPV/EHU)

LABURPENA: Nukleo eta zitoplasmaren arteko banaketa da zelula eukariotoen ezaugarri bereizgarria. Konpartimentuok fisikoki banaturik egon arren, elkarren arteko komunikazioa etengabea da, eta horretarako estuki erregulatutako garraio-sistema dago, zeina zelularen homeostasia mantendu eta minbizia eta gisako gaixotasunak ekiditeko ezinbestekoa den. Garraio-sistema horretako pieza gakoa XPO1 esportina da, zeinak kargo deritzen proteina askoren nukleotik zitoplasmara esportazioa egikaritzen duen. Esportina horren eta minbiziaren arteko lotura maiz aipatu izan da, eta badira XPO1 inhibitzen duten agente terapeutikoak. XPO1en inhibizioak bere kargoen banaketa azpizelularrean aldatetako eragingo dituela espero daiteke. Alabaina, XPO1en kargo asko ezagunak badira ere, haren kargo bilduma osoa ez da zehaztu oraindik, eta horrek XPO1 ikerketa proteomikoetarako kandidatu oso interesgarri bilakatzen du. Hori horrela, estrategia proteomiko berri bat diseinatu dugu, zeinean APEX2 peroxidasa erabiliz konpartimentu espezifikoko gertuko biotinilazioa burutu dugun XPO1en kargo berriak bilatzeko. Horretarako, APEX2 zitoplasma eta nukleora ituratu dugu eta, biotinilatutako proteinak afinitate-purifikazioz isolatu ostean, masa-espektrometriaz identifikatu ditugu. Lan honetan azaldu-tako kontzeptu-froga esperimentuaren emaitzek erakusten dute estrategia hori, XPO1en inhibizio espezifikoarekin konbinatuz, kargo berriak identifikatzeko baliagarria izan daitekeela. Hurbilketa berri honek beraz, kargo gehiagoren identifikazioa erraztearekin batera, XPO1en mendeko garraioan sakondu eta terapeutikoki erabiltzen diren XPO1en inhibitzaileek zelula mailan duten eragina argitzeko ere balio dezake.

HITZ GAKOAK: XPO1, CRM1, garraio nukleozitoplasmatikoa, gertuko biotinilazioa, MS/MS, kargoa.

ABSTRACT: A major feature of eukaryotic cells is the separation between nucleus and cytoplasm. Although physically separated, these two compartments are in permanent communication through a transport system that must be precisely regulated to maintain cell homeostasis and avoid serious diseases, such as cancer. A crucial element in this transport system is the exportin XPO1, which exports many proteins (so-called cargoes) from the nucleus to cytoplasm. XPO1 alteration has been frequently associated with cancer and XPO1 is an important therapeutic target. The cellular effect of XPO1 inhibition is expected to be mediated by changes in the subcellular distribution of its cargoes. However, while many of XPO1 cargoes have been already identified, the complete set remains uncharacterized, making XPO1 a very interesting candidate for proteomic studies. Thus, we have designed a novel proteomics strategy, based on compartment-specific proximity biotinylation using the APEX2 peroxidase, to search for XPO1 cargoes. To this end, we have targeted APEX2 to cytoplasm and nucleus, isolated the biotinylated proteins by affinity purification, and identified them by mass spectrometry. The results of a proof-of-concept experiment reported here show that this strategy, combined with specific XPO1 inhibition, can lead to the identification of XPO1 cargoes. This novel approach, therefore, may advance our understanding of XPO1-dependent nuclear export by facilitating the identification of novel cargoes, and may also contribute to better characterize the cellular effect of therapeutically used XPO1 inhibitors.

KEYWORDS: XPO1, CRM1, nucleocytoplasmic transport, proximity biotinylation, MS/MS, cargo.

*** Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Jose Antonio Rodríguez. Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Leioa (UPV/EHU), Sarriena auzoa, zg (48940 Leioa). – josean.rodriguez@ehu.es – <https://orcid.org/0000-0002-2823-3733>

Nola aipatu / How to cite: Sendino, Maria; Ramírez, Juanma; Mayor, Ugo; Prieto, Gorka; Omaetxebarria, Miren Josu; Rodríguez, Jose Antonio (2021). «Konpartimentu espezifikoko gertuko biotinilazioa: XPO1en esportazio-kargoak identifikatzeko hurbilketa berria». *Ekaia*, 41, 2021, 151-169. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.22591>).

Jasotze-data: 2021, martxoak 11; Onartze-data: 2021, maiatzak 18.

ISSN 0214-9753 - eISSN 2444-3581 / © 2021 UPV/EHU



Lan hau Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-LanEratorririkGabe 4.0 Nazioartekoa lizentzia baten mende dago

1. SARRERA

1.1. Proteinen garraio nukleozitoplasmatikoa: prozesua bera eta minbiziaren garapenarekin duen lotura

Zelula eukariotoek unean uneko beharrianen arabera nukleo eta zitoplasma artean proteinak lekualdatzeko gai den garraio-sistema garatu dute. Proteinen nukleo eta zitoplasma arteko garraiorako bi hartzaille mota dira ezinbesteko: inportinak, kargo proteinak zitoplasmatik nukleora garraiatzen dituztenak, eta esportinak, kargoak nukleotik zitoplasmara garraiatzen dituztenak. Hartzailleok garraiatuko dituzten kargoen aminoazido segida laburrak diren seinale espezifikoak ezagutu eta lotuko dituzte: inportinek nukleora lokalizatzeko seinaleak (NLS), esportinek aldiz, nukleotik esportatzeko seinaleak (NES) [1].

Nukleo eta zitoplasma arteko garraio-sistema estuki erregulatuta egotea ezinbestekoa da zelulen homeostasia mantentzeko. Asaldurarik gertatuz gero, minbizia eta gisako gaixotasun larriak sor daitezke. Ikergai dugun XPO1 proteina (CRM1 izenez ere ezaguna) nukleotik zitoplasmazko proteinen garraioan aritzen den esportina da [2-5]. Ikerketa proteomikoen bidez aurreikusi da XPO1ek mila proteina ingururen esportazioa eragiten duela, hau da, mila kargo inguru dituela [6]. XPO1en kargo ugari jada eza-gunak badira ere, ez dugu oraindik XPO1en esportazio-kargo bilduma osoa, XPO1en esportoma, ezagutzen. XPO1ek minbiziarekin zerikusi estua ere badu: XPO1en gainadierazpena gaixoen prognosi okerrarekin erlazionatu da maiz [1-en berrikusia], eta XPO1en mutazio onkogenikoak ere aurkitu izan dira [7]. Horrek, XPO1 minbiziaren aurkako itxura terapeutiko garrantzitsu bihurtu du [8], eta berriki, XPO1en inhibitzailea den selinexor farmakoak mieloma anizkoitza tratatzeko oniritzia jaso du [9]. Selinexor farmakoak XPO1 kargoen NESetara lotzea eragozten du. Hortaz, XPO1en inhibizioak zelula mailan duen eragin zehatza ezagutu ez arren, kargo askoren banaketa aldatuko duela aurreikus daiteke. Kargo horiek zein diren jakiteak minbiziaren aurkako terapien garapenean garrantzi handia izan dezake. Horregatik guztiatik, XPO1 proteomikarako aztergai interesgarria da.

1.2. Proteomikaren bidezko XPO1en kargoen identifikazioa

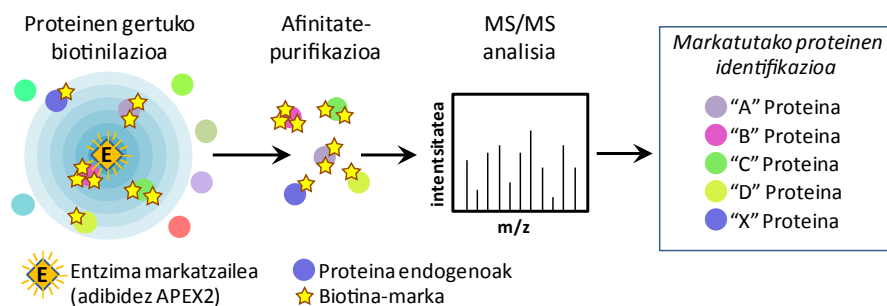
Proteomikak sistema biologikoetako proteinak identifikatzea, kuantifikatzea eta proteinen arteko elkarrekintzak ezagutzea ahalbidetzen du [10]. Proteomikan oinarritutako XPO1en esportomaren karakterizazioarako ikerketak ere badira [6, 11]. Ikerketa horietan, XPO1en kargoak identifikatzeko proteomikan oso ohikoak diren bi prozedura erabili dira: zelulen frakzionamendua [11] eta afinitate-purifikazioa [6].

Aipatutako bi prozedurok emaitza onak ematen dituzten arren, mugak ere badituzte. Zelulen frakzionamenduan, esaterako, purutasun handiko

frakzioak lortzea zaila da. Afinitate-purifikazioari dagokionez, ohikoa da amua den proteinari estuki lotzen ez zaizkion proteinak prozeduran zehar galtzea [12]. Azken horrek badu zuzeneko eragina XPO1en esportoma aztertzerakoan, XPO1 eta bere kargoen arteko lotura oso ahula izan ohi baita [13]. Muga horiek buruan, hurbilketa berriak garatu dira azkenaldian proteomika arloan, hala nola proteinen gertuko biotinilazioa (PGB) [14]. PGB XPO1en esportomaren karakterizaziorako prozedura baliagarria denetz aztertzeko artikulua honetan deskribatutako kontzeptu-froga ikertuta osatu dugu.

1.3. Proteinen gertuko biotinilazioa (PGB)

PGB prozedura entzima markatzaileen erabileran oinarritzen da. Entzima horiek zelula barneko intereseko organulu edo konpartimentura ituraturako dira, eta substratu egokiaren presentzian, gertuko proteinei biotina gehituko die. PGB bidez biotinilatutako proteinak bestelako proteinetatik bereizteko, laginetako zelulak jaso, proteinak erauzi eta biotina marka duten proteinak abidinan oinarritutako afinitate-purifikazioaren bidez isolatuko dira. Biotinaz markatutako proteinetan aberastutako frakzioa tandem masa-espektrometriaz (MS/MS) analizatuko da bertako proteinak identifikatzeko (1. irudia). Egun, biotina-ligasak (BirA* esaterako) [14, 15] eta peroxidasak (APEX2, esaterako) [16-18] dira entzima markatzaile erabiliak [12 eta 19-n berrikusia]. BirA* entzimak mediora gehitutako biotina substratutzat hartu, eta gertuko proteinak biotinilatzen ditu 15-24 orduko epean [20]. APEX2 peroxidasaren kasuan, zelulek 30 minutuz mediora gehitutako biotin-fenola barneratuko dute, jarraian APEX2a H_2O_2 -arekin aktibatu eta minutu bakar batean gertuko proteinen biotinilazio eraginkorra ematen da.

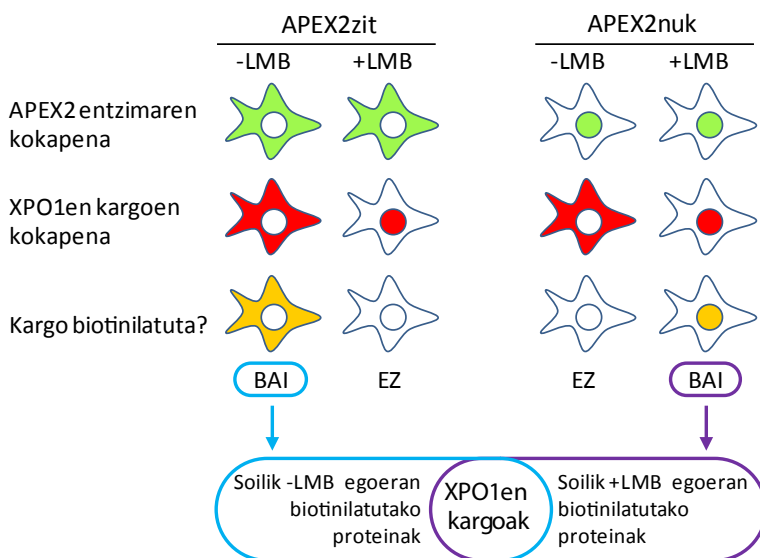


1. irudia. PGB bidezko proteinen identifikazioa. Entzima markatzailea beharrezko substratuaren presentzian inguruko proteinetan biotina-marka kobalenteak ezarriko ditu. Biotina-markei esker, entzimatik gertu dauden proteinak zelulako bestelako proteinetatik banatu ahal izango dira afinitate-purifikazioaren bidez. Azkenik, purifikatutako proteinak MS/MS bidez identifikatuko dira.

PGB prozedura ikergaiaren arabera egokitu daiteke, hots, ikergaia proteina baten interaktoma bada, entzima markatzailea proteina jakin horrekin fusionatuko da [21-24]. Ikergaia, ordea, konpartimentu bateko proteoma bada, entzima markatzailea intereseko kokapen horretara ituratuko da [14, 17, 25-27]. Guk dakigula, gure ikergaia den XPO1en esportoma ez da PGB bidez aztertu, eta beraz, ekarpen interesgarria egin dezakeelakoan, PGB testuinguru honetara egokitu dugu.

1.4. XPO1en kargo prototipikoak identifikatzeko konpartimentu espezifikoko PGB estrategia

XPO1en kargo prototipikoak bilatzeko orduan bi kontu aintzat hartu behar dira. Bata, proteinen nukleo eta zitoplasmaren arteko garraioa etengabekoa dela, eta, beraz, PGB azkar gertatzea beharrezkoa dela. Bestea, XPO1 inhibitzeak kargo askoren banaketa azpizelularra aldatuko duela. Lekualdaketa hori, partziala izan badaiteke ere, kargo prototipikoen kasuan erabatekoa izango da, hau da, egoera basalean kokapen zitoplasmatikoa baino ez dute izango, eta, XPO1 inhibitzean, ordea, nuklearra.



2. irudia. XPO1en kargo prototipikoak konpartimentu espezifikoko PGBaren bidez identifikatzeko estrategia. APEX2a zitoplasma edo nukleoan gainadieraztea XPO1en inhibizioarekin konbinatuko da hurrengo lau egoerak sortuz: (i) APEX2zit gainadierazita eta XPO1 aktibo, (ii) APEX2zit gainadierazita eta XPO1 inhibituta, (iii) APEX2nuk gainadierazita eta XPO1 aktibo eta (iv) APEX2nuk gainadierazita eta XPO1 inhibituta. XPO1en kargo prototipiko izateko baldintzak betetzen dituzten proteinak bai (i) eta bai (iv) egoeretan biotinilatzen direnak izango dira.

Lan honetan, PGB XPO1en kargo prototipikoak identifikatzeko baliagarria dela erakusten duen kontzeptu-froga deskribatzen dugu. Horretarako, APEX2 entzimaren bidezko konpartimentu espezifikoko PGB eta XPO1en inhibizioa uztartzen dituen estrategia garatu dugu (2. irudia). Zehazki, APEX2zit eta APEX2nuk markatzaileak sortu ditugu APEX2 entzima zitoplasmara eta nukleora ituratzeko, hurrenez hurren; bi markatzaile horien adierazpena XPO1en inhibitzaile espezifikoa den leptomizina B (LMB) tratamenduarekin konbinatu dugu.

2. MATERIAL ETA METODOAK

Plasmidoen prestaketa

APEX2zit eta APEX2nuk entzima markatzaileak kodetzen dituzten plasmidoak diseinatu eta sortu ditugu pEYFP-C1 (Clontech) plasmidoa erabilita. APEX2zit eratzeko aukeratutako seinalea XPO1ekiko independenteki esportatzen den RIP3 proteinaren NESa [28] izan da, eta proteina fluoreszentea, berriz, sinGFP4a [29]. Proteina horien sekuentzia kodetzailerak HindIII/EcoRI eta NheI/BglII murrizteguneak erabilita klonatu dira, hurrenez hurren. APEX2nuk eratzeko aukeraturiko seinaleak SV40 T antigeno luzearen 4 NLS izan dira; horietako bat NheI eta AgeI murrizteguneen artean klonatu da eta beste hirurak, berriz, BglII eta EcoRI guneen artean. Proteina fluoreszenteari dagokionez, plasmidoaren jatorrizko YFP mantendu da. APEX2 sekuentzia kodetzailea KpnI eta BamHI murrizteguneak erabilita klonatu da APEX2zit zein APEX2nuk plasmidoetan.

Bestalde, Myc-SBSN eta Myc-CK2 α ' proteinak gainadierazi ahal izateko, SBSN eta CK2 α ' kodetzen dituzten cDNA sekuentziak pMyc-MSC plasmidoan [30] klonatu ditugu BamHI eta HindIII murrizteguneen artean.

Zelulen hazkuntza, transfekzioa eta LMB tratamendua

HEK293T zelulak % 10 idi-umeki seruma, 100 U/ml penizilina eta 100 μ g/ml estreptomizina-dun DMEM medioan hazi ditugu (dena Gibco-koa) 37 °C-tan, % 5eko CO₂-dun atmosfera hezean. Transfekzioa egin baino 24 ordu lehenago, HEK293T zelulak estalkidun 12 putzutako edo 10 cm-ko Petri plakatan erein ditugu. Transfekziorako X-tremeGENE 9 transfekzio-agentea (Roche Diagnostics) erabili dugu, fabrikatzailearen argibideei jarraituz. Transfekziotik 24 ordura LMB (Apollo Scientific) 6 ng/ml-ko kontzentrazioan gehitu dugu mediora eta zelulak 3 orduz inkubatu ditugu.

Mikroskopiako laginen prestaketa eta proteinen kokapen azpizelularra aztertzeo irudi analisia

Zelulak % 3,7 formaldehido PBStan fixatu ditugu 30 minutuz. Myc etiketadun proteinak adierazten dituzten zelulak % 0,2 Triton X-100 PBStan iragazkortu ditugu 10 minutuz, eta ordubetez blokeatu ditugu % 3 BSA PBStan. Jarraian, saguaren anti-Myc antigorputzarekin (Cell Signaling Technology; 1:300) inkubatu ditugu laginok ordu bete; ondoren, PBStan garbitu eta saguaren antigorputzen kontrako AF594 antigorputzarekin (Invitrogen; 1:400) inkubatu ditugu beste ordubetez. Laginak DAPI-dun Vectashield muntaketa-medioa erabilita (Vector Laboratories) mikroskopiako portetan muntatu ditugu. sinGFP4a edo YFP fusio-proteinak adierazten dituzten zelulak fixatu eta garbitu ostean, zuzenean muntatu ditugu. Irudiak Zeiss Apotome2.0 fluoreszentzia-mikroskopioa eta Zen2.6 Blue Edition softwarea erabilita hartu ditugu UPV/EHUko SGIker mikroskopia-zerbitzuan.

Irudi-analisia Fiji softwarearako [31] gure taldeak ad hoc sortutako script bat [30] erabiliz egin dugu lagin bakoitzeko gutxienez 50 zelulatan.

APEX2 peroxidasaren bidezko PGB

PGB aurretik deskribatutako protokoloa [32] oinarritzat hartuta egin dugu. Petri plaka bakoitza 500 μ M biotin-fenol (BP; Iris Biotech) DMEM-tan inkubatu dugu 30 minutuz eta 37°C-tan. Ostean, plakei, markaketa-kontrolerako laginei salbu, H₂O₂-a (Riedel-deHaën) gehitu diegu 10 mM-eko amaierako kontzentrazioan. Minutu bakar bateko inkubazio-denbora igarotakoan, H₂O₂-aren efektua bertan behera geratzeko, plaka guztiak quencher-soluziotan [32] garbitu ditugu hiru aldiz. Azkenik, zelulak PBStan garbitu, plakatik desitsasteko tripsinarekin tratatu, eta 10 ml PBStan jaso ditugu; 1 ml western plapaketan erabili da, beste 9 ml-ak afinitate purifikazioan.

Western plapaketa

Zelulak bromofenol urdin gabeko 200 μ l Laemmli lisi-tanpoitan (125 mM Tris-HCl pH 6,8, % 20 glizerol, % 4 SDS) 10 minutuz eta 95°C-tan inkubatuta lisatu ditugu. Laginetako proteina kantitatea Lowry metodoaren bidez kuantifikatu eta lagin bakoitzetik 20 μ g proteina zamaratu dugu % 12ko SDS-PAGE geletan. Proteinak elektroforesiz banatu eta nitrozulosa-zko mintzetara transferitu ditugu. Mintzak blokeo-soluziotan (% 5 esne gaingabetua TTBStan) ordubetez inkubatu ostean, anti-Biotin-HRP antigorputzetan (Cell Signaling Technology; 1:1.000) inkubatu ditugu beste ordubetez. Amaitzeko, mintzak TTBStan garbitu eta Pierce ECL Plus detekzio-agentea (ThermoFisher Scientific) erabiliz errebelatu ditugu.

Biotinilatutako proteinen afinitate-purifikazioa

Afinitate-purifikaziorako laginak zentrifugatu, jalkinak proteasa inhibitzaile (PI; Roche) 2,9 ml lisi-tanpoitan (8 M urea, % 1 SDS, 50 mM N-etimaleimida (NEM) PBStan) berreseki, 30 minutuz 4°C-tan inkubatu eta zentrifugazioz jasotako gainjalkinak lotze-tanpoitan (3 M urea, 1 M NaCl, % 0,25 SDS, 50 mM NEM) orekatutako PD10 zutabeetan (Healthcare) zehar pasarazi ditugu. Eluzioa, 25X PIDun 250 µl lotze-tanpoitan egin dugu.

Afinitate-purifikazioa aurretik deskribatutako moduan [33] egin dugu. Laburbilduz, lotze-tanpoitan ditugun laginak 150 µl Pierce High Capacity NeutrAvidin agarosa bihitxoekin (ThermoFisher Scientific) inkubatu ditugu 3 orduz. Ondoren, bihitxoak sei garbiketa tanpoi (GT) desberdinetan [33] garbitu ditugu. Azken garbiketaren ostean, eta biotinilatutako proteinen eta bihitxoaren arteko interakzioak hausteko, bihitxoak 80 µl 100 mM DTTdun 4X Laemmli eluzio-tanpoitan inkubatu ditugu 5 minutuz eta 95°C-tan. Azkenik, bihitxoak biotinilatutako proteinetatik banantzeko, laginak Vivaclear Mini 0.8 µm PES filtrodun zutabeetan (Sartorius) zehar pasarazi ditugu. Jarraian lagineko proteinak SDS-PAGEz banatu eta gela GelCode Blue Stain tindaketa medioan (Thermo-Fisher Scientific) tindatu dugu. Hemendik aurrerako laginen prozesamendua UPV/EHUKo SGiker proteomika-zerbitzuan egin da.

Masa-espektrometria analisisia

Geletik APEX2 exogenoari, abidinari eta fronteari dagozkien bandak baztertu dira. Gainontzeko intereseko gel zatietan geleango proteinen digestio tripsina entzima erabiliz egin da [34]. Digestioan lortutako peptido triptikoen soluzioa gatzgabetzeko C18 (3M Empore C18) mikrozutabeetan zehar pasarazi dugu.

Peptidoak Acclaim PepMap RSLC (75 µm × 25 cm, Thermo Scientific) zutabe analitiko batera konektatutako Acclaim PepMap100 (75 µm × 2 cm, Thermo Scientific) aurre-zutabe batean zamatuta dira. Peptidoak % 2,4-% 80 azetonitrilo-gradientean banatu dira. Masa-espektrometria analisiak nanospray flex ioi-iturri baten bidez konektatuta dauden EASY-nLC 1.200 likido-kromatografiako sistema eta Q Exactive HF-X masa-espektrometroan (Thermo Scientific) egin dira. Masa-espektrometroa ioi positibo funtzioan erabili da, eta 375-1.800 m/z tarteko MS *scan* osoak jaso dira 200 m/z-tan 60 000ko bereizmenarekin. Seinalerik handieneko 10 ioiak fragmentatu eta MS/MS espektroak 200 m/z-tan 15 000ko bereizmenean jaso dira. Datuak Xcalibur softwarea (Thermo Scientific) erabilita jaso dira.

Datuak MaxQuant (v.1.6.0.16) [35] erabilita prozesatu dira UniProtKB SwissProt Human (v 2017-11) datu basea erabilita, non APEX2dun proteinen sekuentziak gehitu diren. Bilaketetarako hurrengo parametroak era-

bili dira: prekursoreen eta fragmentuen tolerantziak 8 eta 20 ppm-koak hurrenez hurren, tripsinak gehien jota bi mozketak egin gabe uztea, oxidazioa eta azetilazioa modifikazio aldakor kontsideratzea, eta karbamidometilazioa modifikazioa, finko. Peptido eta proteinen FDRa (*false discovery rate*) % 1ean ezarri da.

Identifikatutako proteina-zerrenden kudeaketa eta analisia

Identifikatutako proteinen sei zerrenda ditugu, horietako bi kontrol laginei ($-H_2O_2$) dagozkie, beste laurak 2. irudian azaldutako egoerei. Egoera horiei dagozkien laginetan zein proteina identifikatu den aztertzeko lehen urratsa zeluletan berez biotinilatzen diren proteinak zerrendetatik kentzea da. Horretarako kontrol laginean identifikatutako proteinak beste zerrendetatik ezabatu ditugu.

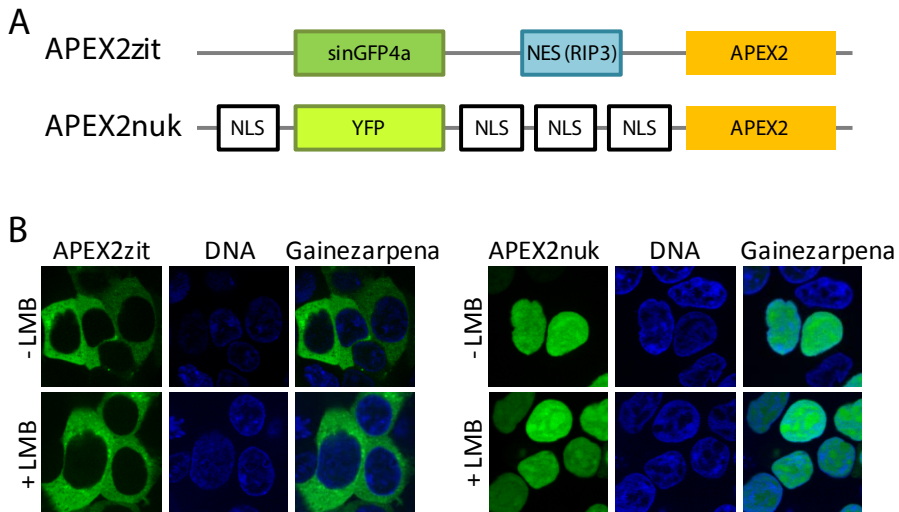
Identifikatutako proteinekin bi analisi mota egin dira. Batetik, laginen arteko konparaketak egin dira Venn diagramak erabiliz [36]. Bestetik, UniProtKB datu-baseko [37] (2020-10-22ko bertsioa) *Subcellular location* sailkapenaren arabera egoera basalean identifikatu ditugun proteinak aurretiaz zein konpartimentutan deskribatu diren azertu dugu.

3. EMAITZAK

3.1. APEX2zit eta APEX2nuk plasmidoen diseinua, eta APEX2 entzimaren kokapen nukleozitoplasmatikoa

Lehenik eta behin, zitoplasma eta nukleora ituratuko diren APEX2zit eta APEX2nuk proteina-markatzaileen plasmidoak diseinatu ditugu. Proteina kimeriko horiek hiru osagai dituzte; APEX2 peroxidasa, APEX2 intereseke konpartimentura ituratzeko seinalea (NES edo NLSak) eta kokapenaren jarraipena ahalbidetuko duen proteina fluoreszente bat (3A irudia). 2. irudiko estrategia eraginkorra izateko, ezinbestekoa da APEX2zit proteina zitoplasman baino ez adieraztea egoera guztietan. Horretarako, APEX2 zitoplasma ituratzeko XPO1en menpekoez den RIP3 proteinaren NESa [28] aukeratu dugu. Helburu berarekin, sinGFP4a erabili dugu proteina fluoreszente bezala, GFP bertsio hori YFP baino astiroago translokatzeko baita nukleora [29]. APEX2nuk proteinaren diseinurako, ordea, SV40 T antigeno luzearen NLSaren lau kopia eta ohikoa den YFP proteina fluoreszentea erabili ditugu.

APEX2zit eta APEX2nuk proteinak kodetzen dituzten plasmidoak HEK293T zeluletan transfektatutakoan, gainadierazitako proteinen kokapena fluoreszentsia-mikroskopiaren bidez azertu dugu. APEX2zit proteinak kokapen zitoplasmatikoa du egoera basalean zein XPO1 inhibituriko egoeran, eta APEX2nuk proteinak, aldiz, nuklearra (3B irudia).

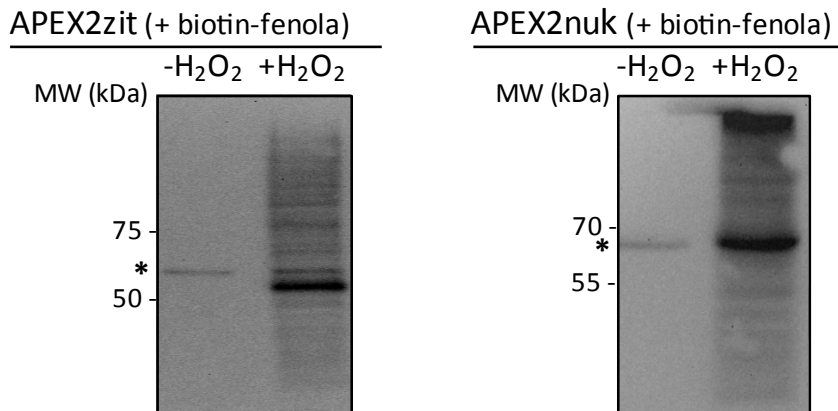


3. irudia. APEX2dun plasmidoen eraketa eta proteinaren kokapenaren baliocapena. A) APEX2dun plasmidoen irudi eskematikoak. Goialdean, APEX2zit plasmidoan sinGFP4a, RIP3 proteinaren NESa eta APEX2 sekuentziak duten kokapenaren irudia. Behealdean, APEX2nuk plasmidoan YFP, lau NLS eta APEX2 sekuentziak dutena. B) APEX2zit eta APEX2nuk proteina-markatzaileak HEK293T zeluletan gainadierazitakoan hartzen duten kokapenaren fluoreszentzia-irudiak.

3.2. Markatzaileen aktibitate entzimatikoa eta MS/MSrako laginen prestaketa

Bi markatzaileen kokapen egokia berretsita, gertuko proteina endogenoen biotinizazioa eragiteko gai diren aztertu dugu. Horretarako, APEX2zit eta APEX2nuk gainadierazten dituzten zelulen proteina erauzkinak erabiliz biotinaren kontrako western plapaketa egin dugu (4. irudia); APEX2 peroxidasa aktibatu gabeko ($-H_2O_2$) kontrol laginei dagozkien kaleetan, APEX2zit edota APEX2nuk proteinen autobiotinizazioari [32] dagozkien bandak baino ez dira ageri. APEX2a aktibatutako ($+H_2O_2$) laginetan, ordea, proteina endogeno ugari biotinilatu direla adierazten duten banda ugari osatzen duten arrastoak ageri dira. Hau da, APEX2zit eta APEX2nuk proteina endogenoak biotinilatzeko gai dira.

APEX2zit eta APEX2nuk proteinen kokapena (3B irudia) zein biotinizazio ahalmena (4. irudia) berretsita, MS/MSrako laginak prestatu, eta UPV/EHUko SGiker proteomika-zerbitzura bidali ditugu.



4. irudia. APEX2zit eta APEX2nuk bidezko PGB. APEX2zit eta APEX2nuk proteina erauzkinekin biotinaren kontrako western plaketak: APEX2 aktibatutako laginetan (+H₂O₂) tamaina ezberdineko proteina bilduma zabalak biotinilatu direlako seinale diren banda ugari osatzen duten arrastoak ageri dira. APEX2 peroxidasa aktibatu gabeko laginetan (-H₂O₂) gainadierazitako proteinaren autobiotinilazioari dagokion intentsitate baxuko banda baino ez da ageri (*).

3.3. MS/MS analisien emaitzak: kontsiderazio orokorrak

MS/MS analisian, guztira, 2053 proteina identifikatu ditugu gutxienez peptido batekin (1. taula). Markatzaile bakoitzeko erauzkinetan identifikatutako proteina kopurua antzekoa izan da; APEX2zit erauzkinean 1248 proteina, APEX2nuk erauzkinean, ordea, 1318. Era berean, egoera basalean zein XPO1 inhibitutako egoeran identifikatutako proteina kopurua ere antzekoa izan da APEX2zit zein APEX2nuk erauzkinetan; egoera basalean 1884 proteina, XPO1 inhibitutako egoeran, ordea, 1757. Emaitza hauek iradokitzen dute markatzaile bien aktibitate biotinilatzailea antzekoa dela, LMB tratamenduak ez duela aktibitate hori nabarmen eraldatzen eta lagin guztien prozesamendua antzekoa izan dela.

1. taula. MS/MS analisiaren emaitzen laburpena.

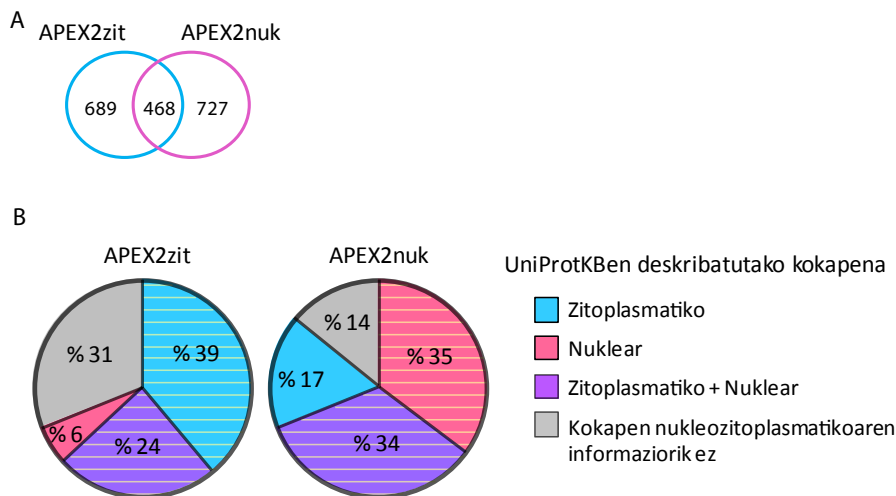
APEX2zit eta APEX2nuk proteina-markatzaileak gainadierazitako zelulen erauzketan gutxienez peptido batekin identifikatutako proteina kopurua, egoera basalean (–LMB) eta XPO1 inhibiturik dagoela (+LMB). «Guztira» izeneko zutabea, egoera basalean edo XPO1 inhibiturik dagoen egoeran identifikatutako proteinen erredundantzia gabeko batura da. Era berean, «guztira» izeneko lerroa APEX2zit edo APEX2nuk markatzaileekin prestatutako erauzketan identifikatutako proteinen batura ez erredundantea da.

	APEX2zit	APEX2nuk	Guztira
–LMB	1157	1195	1884
+LMB	995	1156	1757
Guztira	1248	1318	2503

3.4. Konpartimentu espezifikoko proteinen identifikazioa egoera basalean

Identifikatutako proteina kopurua aztertu ostean, APEX2zit markatzaileak markatutako proteinak zitoplasmatikoak diren eta APEX2nuk markatzaileak markatutako proteinak nuklearrak diren aztertu dugu. Lehenik eta behin, egoera basalean APEX2zit erauzkinean identifikatutako 1 157 proteinak APEX2nuk erauzkinean identifikatutako 1195 proteinekin erkatu ditugu. APEX2zit erauzkinean eskusiboki identifikatu direnak 689 izan dira, APEX2nuk erauzkinekoak, 727; bestelako 468 proteinak, ordea, bi erauzketan identifikatu dira (5A irudia). Emaitza horiek markatzaile bakoitzarekin markatutako proteinak, neurri batean behintzat, ezberdinak direla erakusten dute. Jarraian, UniProtKB datu-basea erabiliz identifikatutako proteinak aurretik zein kokapenetan deskribatu diren aztertu dugu.

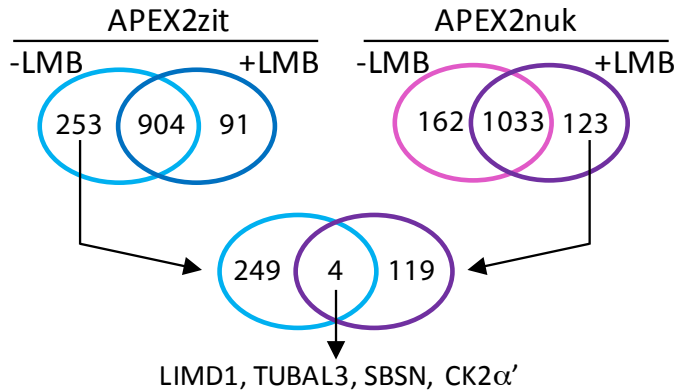
UniProtKBn identifikatutako proteina gehienek kokapenaren gaineko informazioa badago: APEX2zit erauzkineko proteinen % 63 zitoplasmatiko (edo zitoplasmatiko eta nuklear) gisa dago deskribatuta, APEX2nuk erauzkinean identifikatutako proteinen kasuan, % 69 da nuklear (edo nuklear eta zitoplasmatiko) gisa deskribatutakoa (5B irudia). Datu horiek agerian uzten dute APEX2zit eta APEX2nuk konpartimentu espezifikoko biotinilaziorako markatzaile baliagarriak direla.



5. irudia. PGB-MS/MS bidez konpartimentu espezifiko proteinen identifikazioa. A) Egoera basalean APEX2zit eta APEX2nuk erauzkinetan identifikatutako proteinen Venn diagrama. B) Ikerketa honetan identifikatutako proteinek UniProtKB datu-basearen arabera duten kokapena erakusten duten sektore-diagramak. Ehuneko handi batean, gure analisiaren arabeko kokapena eta UniProtKBen arabekoak bat egiten dute (marra horizontalek adierazita).

3.5. XPO1en balizko kargoen identifikazioa

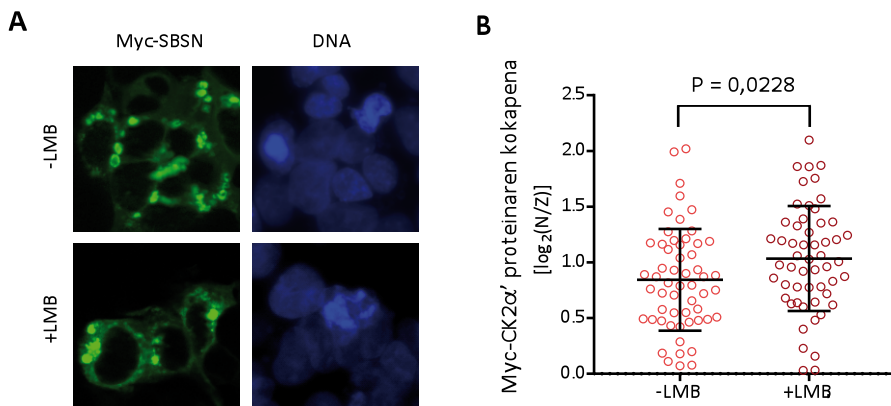
APEX2zit eta APEX2nuk bidezko markaketaren egokitasuna berretsita, XPO1en balizko kargoak bilatzeari ekin diogu. Horretarako, 2. irudiko estrategiari jarraikiz, APEX2zit gainadierazitako erauzkinetan eta egoera basalean identifikatutako proteinak APEX2nuk gainadierazitako erauzkinetan eta XPO1 inhibitutako egoeran identifikatutako proteinek in erkatu ditugu. Egoera basalean, 253 proteina identifikatu dira eskusiboki APEX2zit erauzkinean. XPO1 inhibitutako egoeran, 123 proteina identifikatu dira eskusiboki APEX2nuk erauzkinean. Proteina-zerrenda bi horiek erkatzean, lau proteina komun aurkitzen dira; LIMD1 (*LIM domain containing protein 1*), TUBAL3 (*tubulin alpha chain-like 3*), CK2 α' (*casein kinase II subunit alpha'*) eta SBSN (*suprabasin*) proteinaren bigarren isoforma (6. irudia). LIMD1 eta TUBAL3 proteinak XPO1en kargo gisa deskribaturik daude jada [38,39], eta CK2 α' balizko kargotzat proposatu zen aurreko analisi proteomiko batean [6], proteina honen XPO1en mendeko esportazioa oraindik konfirmatu ez bada ere. Emaiza horiek gure prozeduraren eta strategiaren bermetzat har ditzakegu. Gauzak horrela, XPO1en kargotzat deskribatu gabe dauden CK2 α' eta SBSN proteinen banaketa nukleozitoplasmatikoa aztertu nahi izan dugu.



6. irudia. PGBaren bidezko XPO1en kargoen identifikazioa. Egoera basalean eta XPO1 inhibitutako egoeran APEX2zit eta APEX2nuk erauzkinetan identifikatutako proteinak konparatzen dituen Venn diagrama sorta. Soilik APEX2zit erauzkinean egoera basalean eta soilik APEX2nuk erauzkinean XPO1 inhibitutako egoeran identifikatutako proteinak erkatzean (beheko aldea) XPO1en lau balizko kargo aurkitzen dira; LIMD1, TUBAL3, SBSN eta CK2α'.

3.6. CK2α' eta SBSN proteinen banaketa nukleozitoplasmatikoaren azterketa

Myc-CK2α' eta Myc-SBSN proteinak HEK293T zeluletan gainadierazi ditugu. Myc-SBSN proteinaren kokapenak ez du XPO1en mendekotasunik erakusten; zitoplasman eta jariatze-besikulak izan daitezkeen egituretan metatzen da egoera basalean zein XPO1 inhibiturik dagoenean (7A irudia). Behatutako kokapen hori literaturan deskribatutakoarekin bat dator, SBSN jariatze-proteina legez deskribatuta baitago [40, 41]. Myc-CK2α'ren kokapenari dagokionez, egoera basalean zein XPO1 inhibiturik dagoenean nukleozitoplasmatikoa da. Alabaina, LMB tratamenduak nukleoranzko lekualdaketa txikia eragiten duela atzeman dugu. Kokapen-aldaketa hau irudi-analisi semikuantitatiboa eginez egiaztatu dugu (7B irudia). Gauzak horrela, CK2α' XPO1en kargo berria izan daitekeela proposatzen dugu.



7. irudia. CK2α' eta SBSN proteinen banaketa nukleozitoplasmatikoen azterketa. A. Myc-SBSN HEK293T zeluletan gainadieraztean hartzen duen kokapenaren irudi adierazgarriak. Myc-SBSN proteinak ez du XPO1en mendeko kokapenik agertzen, XPO1 aktibo zein inhibiturik egon, zitoplasman eta jariatze besikulak izan daitezkeen egituretan metatzen da. B. Myc-CK2α' proteinak HEK293T zeluletan erakusten duen kokapen nukleozitoplasmatikoa irudi-analisiaren bidez aztertu dugu, bai egoera basalean eta bai XPO1 inhibituriko egoeran. Zirkulu bakoitzak adierazten du zelula bakar baten nukleoan eta zitoplasman antzematen den fluoreszentiaren arrazioa 2 oinarriko logaritmoan [log₂(N/Z)]. Lagin bakoitzaren log₂(N/Z)-ren batezbestekoa eta desbiderapen estandarrak adierazten dira, baita Mann-Whitney U estatistikoa erabiltzean lortutako p balioa ere. Aztertutako bi egoeretan Myc-CK2α' proteinak kokapen gehienbat nuklearra erakusten badu ere, XPO1en inhibizioak CK2α' nukleoan egoera basalean baino gehiago metatzea eragiten du.

4. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK

XPO1 esportinak mila inguru kargo-proteinen nukleotiko esportazioa bideratzen du [6]. XPO1 zelularen homeostasisirako gako izateaz gain, minbiziaren tratamenduan izan dezakeen rola geroz eta ozenago aipatzen ari da azken urteetan [1-en berrikusia]. XPO1en mendeko garraioaren nondik norakoak ulertu eta minbizian duen garrantzia argitzeko, aurrerapauso handia izango litzateke XPO1en esportoma ondo karakterizatzea. Bide horretan, hurbilketa berri bat planteatu dugu zeinak konpartimentu espezifiko PGB, XPO1en inhibizioa, afinitate-purifikazioa eta MS/MS analisiak uzartzen dituen.

Hurbilketa berri honen erronkarik handiena PGB eragingo duten markatzaileen diseinua izan da, zitoplasmako eta nukleoko proteinen bildumak era bereizian markatzea berebizikoa baita emaitza esanguratsuak lortuko

baditugu. Hori horrela, APEX2 peroxidasan oinarritutako bi proteina markatzaile kimeriko berri sortu ditugu: APEX2zit eta APEX2nuk. Gainadierazitako APEX2zit zitoplasman eta APEX2nuk nukleoan kokatzen direla berretsita, diseinatu dugun hurbilketa osoa proteomikako kontzeptu-froga erako esperimentu baten bidez balioetsi dugu.

Esperimentuaren diseinua sinplifikatze aldera, aztertutako egoeren erreplika bana eta ez ohikoak diren hiru erreplikak analizatu dugu. Jakitun gara horrek proteina-identifikazioen ziurgabetasuna emendatzen duela; halere, egoera basalean egindako esperimentuen emaitzek erakusten dute ziurgabetasun horrek ez duela hurbilketa bera baliogabetzen. Izan ere, APEX2zit eta APEX2nuk erauzkintan identifikatutako proteina sortak neurri handi batean ezberdinak badira ere, badira komunak diren beste hainbat proteina ere (5A irudia). Emaitza horrek APEX2zit eta APEX2nuk-ek bideratutako PGB arrakastatsua izan dela ematen digu aditzera, batetik APEX2zit eta APEX2nuk-ekin proteina bilduma ezberdinak markatzea aurreikusi eta lortu dugulako, eta bestetik proteina ugari konpartimentu bietan agertzea aurreikus daitekeelako [42]. Are gehiago, APEX2zit eta APEX2nuk erauzkintan identifikatutako proteinak UniProtKB datu-basean proteinok duten zelula-kokapenaren deskribapenarekin bat datoz neurri handi batean (5B irudia). Aipaturikoa kontuan hartuta, guk diseinatu eta esperimentalki testatutako proteina markatzaileek konpartimentu espezifikoko PGBrako egokiak direla deritzogu.

Identifikatutako proteina bildumei oniritzia emanda, XPO1en balizko kargoak bilatzen hasitakoan erreplika bakarrarekin lan egiteak dakarren beste muga topatu dugu: erreplika bakarreko datuekin ez dago analisi kuantitatiborik egiterik; ondorioz, kargo prototipikoak baino ezin izan ditugu bilatu. Bilaketa horren emaitza lau proteina izan dira: LIMD1, TUBAL3, CK2 α ' eta SBSNren bigarren isoforma, alegia. LIMD1 eta TUBAL3 aurretik ere XPO1en kargotzat deskribatuta egoteak [38,39] gure estrategiari nolabaiteko bermea ematen diola deritzogu. SBSN eta CK2 α ' balizko kargoen nukleo eta zitoplasman arteko garraioaren gaineko informaziorik, guk dakigula, eskuragarri ez dagoenez, proteinok HEK293T zeluletan gainadierazi eta XPO1 inhibitzean erakusten duten kokapen nukleozitoplasmatikoa aztertu dugu. SBSN proteinaren kasuan ez dugu XPO1en inhibitzioaren menpeko kokapenaren aldaketarik behatu. CK2 α ' aztertzean, berriz, XPO1 inhibitzean CK2 α ' proteinaren nukleoranzko aldaketa partzial bat behatu dugu (7A eta B irudiak). Emaitzak ikusita, CK2 α ' XPO1en kargotzat proposatzen dugu eta planteatutako hurbilketa berria XPO1en kargoak identifikatzeko prozedura aproposa dela planteatzen dugu.

Deskribatutako hurbilketa, beraz, XPO1en esportomaren ezagutzan sakontzeko eta klinikan erabiltzen diren eta XPO1en inhibitzioa helburu duten agente terapeutikoei, selinexor kasu [9], zelula mailan duten eragina ikeritzeko erabilgarria izan daitekeela planteatzen dugu.

5. ESKER ONAK

Lan honetako mikroskopia- eta proteomika-analisiak UPV/EHUko mikroskopia- eta proteomika-zerbitzuetan (SGIker) egin dira, hurrenez hurren. Lan hau Espainiako Gobernuaren MINECO-FEDER (SAF2014-57743-R eta SAF2016-76898-P), Eusko Jaurlaritzaren (IT1257-19) eta Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV-EHU) (UF111/20) finantziazioei esker egin da. Baita Eusko Jaurlaritzak (MS-ri) emandako dirulaguntzari esker ere. Gure taldea PROTEOSTASIS BM1307 COST Action-eko kide da, European Cooperation in Science and Technology-k lagunduta.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SENDINO, M., OMAETXEBARRIA, M. J., RODRÍGUEZ, J. A. 2018. «Hitting a moving target: inhibition of the nuclear export receptor XPO1/CRM1 as a therapeutic approach in cancer». *Cancer Drug Resistance*, **1**, 138-163.
- [2] STADE, K., FORD, C. S., GUTHRIE, C., WEIS, K. 1997. «Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor». *Cell*, **90**, 1041-1050.
- [3] OSSAREH-NAZARI, B., BACHELEIRE, F., DARGEMONT, C. 1997. «Evidence for a Role of CRM1 in Signal-Mediated Nuclear Protein Export». *Science*, **278**, 141-144.
- [4] FORNEROD, M., VAN DEURSEN, J., VAN BAAL, S., REYNOLDS, A., DAVIS, D., MURTI, K. G., FRANSEN, J., GROSVELD, G. 1997. «The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88». *EMBO Journal*, **16**, 807-816.
- [5] FUKUDA, M., ASANO, S., NAKAMURA, T., ADACHI, M., YOSHIDA, M., YANAGIDA, M., NISHIDA, E. 1997. «CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal». *Nature*, **390**, 308-311.
- [6] KIRLI, K., KARACA, S., DEHNE, H. J., SAMWER, M., PAN, K. T., LENZ, C., URLAUB, H., GÖRLICH, D. 2015. «A deep proteomics perspective on CRM1-mediated nuclear export and nucleocytoplasmic partitioning». *eLife*, **4**, e11466.
- [7] TAYLOR, J., SENDINO, M., GORELICK, A. N., PASTORE, A., CHANG, M. T., PENSON, A. V., GAVRILA, E. I., STEWART, C., MELNIK, E. M., HERREJON CHAVEZ, F., BITNER, L., YOSHIMI, A., LEE, S. C.-W., INOUE, D., LIU, B., ZHANG, X. J., MATO, A. R., DOGAN, A., KHARAS, M. G., CHEN, Y., WANG, D., SONI, R. K., HENDRICKSON, R. C., PRIETO, G., RODRIGUEZ, J. A., TAYLOR, B. S., ABDEL-WAHAB, O. 2019. «Altered nuclear export signal recognition as a driver of oncogenesis». *Cancer Discovery*, **9**, 1452-1467.
- [8] MAHIPAL, A., MALAFA, M. 2016. «Importins and exportins as therapeutic targets in cancer». *Pharmacology and Therapeutics*, **164**, 135-143.
- [9] SYED, Y. Y. 2019. «Selinexor: first global approval». *Drugs*, **79**, 1485-1494.
- [10] AEBERSOLD, R., MANN, M. 2003. «Mass spectrometry-based proteomics». *Nature*, **422**, 198-207.

- [11] THAKAR, K., KARACA, S., PORT, S. A., URLAUB, H., KEHLENBACH, R. H. 2013. «Identification of CRM1-dependent nuclear export cargos using quantitative mass spectrometry». *Molecular and Cellular Proteomics*, **12**, 664-678.
- [12] BOSCH, J. A., CHEN, C. L., PERRIMON, N. 2021. «Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: An update». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **10**, e392.
- [13] KUTAY, U., GÜTTINGER, S. 2005. «Leucine-rich nuclear export signals: born to be weak». *Trends in Cell Biology*, **15**, 121-124.
- [14] ROUX, K. J., KIM, D. I., RAID, M., BURKE, B. 2012. «A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells». *Journal of Cell Biology*, **196**, 801-810.
- [15] CHOI-RHEE, E., SCHULMAN, H., CRONAN, J. E. 2004. «Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase». *Protein Science*, **13**, 3043-3050.
- [16] MARTELL, J. D., DEERINCK, T. J., SANCAK, Y., POULOS, T. L., MOOTHA, V. K., SOSINSKY, G. E., ELLISMAN, M. H., TING, A. Y. 2012. «Engineered ascorbate peroxidase as a genetically-encoded reporter for electron microscopy». *Nature Biotechnology*, **30**, 1143-1148.
- [17] RHEE, H.-W., ZOU, P., UDESHI, N. D., MARTELL, J. D., MOOTHA, V. K., CARR, S. A., TING, A. Y. 2013. «Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially-restricted enzymatic tagging». *Science*, **339**, 1328-1331.
- [18] LAM, S. S., MARTELL, J. D., KAMER, K. J., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H., MOOTHA, V. K., TING, A. Y. 2015. «Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proteomics». *Nature Methods*, **12**, 51-54.
- [19] ZHOU, Y., ZOU, P. 2021. «The evolving capabilities of enzyme-mediated proximity labeling». *Current Opinion in Chemical Biology*, **60**, 30-38.
- [20] KWON, K., BECKETT, D. 2000. «Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases». *Protein Science*, **9**, 1530-1539.
- [21] ZUZOW, N., GHOSH, A., LEONARD, M., LIAO, J., YANG, B., BENNETT, E. J. 2018. «Mapping the mammalian ribosome quality control complex interactome using proximity labeling approaches». *Molecular Biology of the Cell*, **29**, 1258-1269.
- [22] HUANG, X., LEDUC, R. D., FORNELLI, L., SCHUNTER, A. J., BENNETT, R. L., KELLEHER, N. L., LICHT, J. D. 2019. «Defining the NSD2 interactome: PARP1 PARylation reduces NSD2 histone methyltransferase activity and impedes chromatin binding». *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 12459-12471.
- [23] LI, Y., MERKEL, C. D., XU, M., HEIER, J. A., CANTRELL, P. A. S., SUN, M., STOLZ, D. B., WATKINS, S. C., YATES, N. A., KWIATKOWSKI, A. V. 2019. «The N-cadherin interactome in primary cardiomyocytes as defined by quantitative proximity proteomics». *Journal of Cell Science*, **132**, jcs221606.
- [24] AMER, Y. O., HEBERT-CHATELAIN, E. 2020. «Insight into the interactome of intramitochondrial PKA using biotinylation-proximity labeling». *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 8283-8295.

- [25] MICK, D. U., RODRIGUES, R. B., LEIB, R. D., ADAMS, C. M., CHIEN, A. S., GYGI, S. P., NACHURY, M. V. 2015. «Proteomics of primary cilia by proximity labeling». *Developmental Cell*, **35**, 497-512.
- [26] BERSUKER, K., PETERSON, C. W. H., TO, M., SAHL, S. J., SAVIKHIN, V., GROSSMAN, E. A., NOMURA, D. K., OLZMANN, J. A. 2018. «A proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes». *Developmental Cell*, **44**, 97-112.
- [27] YOUN, J. Y., DUNHAM, W. H., HONG, S. J., KNIGHT, J. D. R., BASHKUROV, M., CHEN, G. I., BAGCI, H., RATHOD, B., MACLEOD, G., ENG, S. W. M., ANGERS, S., MORRIS, Q., FABIAN, M., CÔTÉ, J. F., GINGRAS, A. C. 2018. «High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies». *Molecular Cell*, **69**, 517-532.
- [28] YANG, Y., MA, J., CHEN, Y., WU, M. 2004. «Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): Identification of novel nuclear export and import signals in RIP3». *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 38820-38829.
- [29] FREY, S., REES, R., SCHÜNEMANN, J., NG, S. C., FÜNFELD, K., HUYTON, T., GÖRLICH, D. 2018. «Surface properties determining passage rates of proteins through nuclear pores». *Cell*, **174**, 202-217.
- [30] OLAZABAL-HERRERO, A., SENDINO, M., ARGANDA-CARRERAS, I., RODRÍGUEZ, J. A. 2019. «WDR20 regulates shuttling of the USP12 deubiquitinase complex between the plasma membrane, cytoplasm and nucleus». *European Journal of Cell Biology*, **98**, 12-26.
- [31] SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J.-Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P., CARDONA, A. 2012. «Fiji - an Open platform for biological image analysis». *Nature Methods*, **9**, 676-682.
- [32] HUNG, V., UDESHI, N. D., LAM, S. S., LOH, K. H., COX, K. J., PEDRAM, K., CARR, S. A., TING, A. Y. 2016. «Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2». *Nature Protocols*, **11**, 456-475.
- [33] FRANCO, M., SEYFRIED, N. T., BRAND, A. H., PENG, J., MAYOR, U. 2011. «A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development». *Molecular and Cellular Proteomics*, **10**, M110.002188.
- [34] SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. 1996. «Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels». *Analytical Chemistry*, **68**, 850-858.
- [35] COX, J., MANN, M. 2008. «MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification». *Nature Biotechnology*, **26**, 1367-1372.
- [36] BARDOU, P., MARIETTE, J., ESCUDIÉ, F., DJEMIEL, C., KLOPP, C. 2014. «jvenn: an interactive Venn diagram viewer». *BMC Bioinformatics*, **15**, 293-300.

- [37] UNIPROT CONSORTIUM. 2019. «UniProt: A worldwide hub of protein knowledge». *Nucleic Acids Research*, **47**, D506-D515.
- [38] SHARP, T. V., MUNOZ, F., BOURBOULIA, D., PRESNEAU, N., DARAI, E., WANG, H. W., CANNON, M., BUTCHER, D. N., NICHOLSON, A. G., KLEIN, G., IMREH, S., BOSHOFF, C. 2004. «LIM domains-containing protein 1 (LIMD1), a tumor suppressor encoded at chromosome 3p21.3, binds pRB and represses E2F-driven transcription». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 16531-16536.
- [39] SCHWARZEROVÁ, K., BELLINIA, E., MARTINEK, J., SIKOROVÁ, L., DOSTÁL, V., LIBUSOVÁ, L., BOKVAJ, P., FISCHER, L., SCHMIT, A. C., NICK, P. 2019. «Tubulin is actively exported from the nucleus through the Exportin1/CRM1 pathway». *Scientific Reports*, **9**, 5725-5738.
- [40] MATSUI, T., HAYASHI-KISUMI, F., KINOSHITA, Y., KATAHIRA, S., MORITA, K., MIYACHI, Y., ONO, Y., IMAI, T., TANIGAWA, Y., KOMIYA, T., TSUKITA, S. 2004. «Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine- α - β and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1». *Genomics*, **84**, 384-397.
- [41] MOFFATT, P., SALOIS, P., ST-AMANT, N., GAUMOND, M. H., LANCTÔT, C. 2004. «Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins». *Gene*, **334**, 123-131.
- [42] THUL, P. J., ÅKESSON, L., WIKING, M., MAHDESSIAN, D., GELADAKI, A., BLAL, H. A., ALM, T., ASPLUND, A., BJÖRK, L., BRECKELS, L. M., BÄCKSTRÖM, A., DANIELSSON, F., FAGERBERG, L., FALL, J., GATTO, L., GNANN, C., HOBER, S., HJELMARE, M., JOHANSSON, F., LEE, S., LINDSKOG, C., MULDER, J., MULVEY, C. M., NILSSON, P., OKSVOLD, P., ROCKBERG, J., SCHUTTEN, R., SCHWENK, J. M., SIVERTSSON, Å., SJÖSTEDT, E., SKOGS, M., STADLER, C., SULLIVAN, D. P., TEGEL, H., WINSNES, C., ZHANG, C., ZWAHLEN, M., MARDINOGLU, A., PONTÉN, F., VON FEILITZEN, K., LILLEY, K. S., UHLÉN, M., LUNDBERG, E. 2017. «A subcellular map of the human proteome». *Science*, **356**, eaal3321.

