

MARK4ren interakzioak USP21 deubikuitinasaren kokapen azpizelular dinamikoa erregulatzen du

(MARK4 interaction modulates the dynamic subcellular localization of USP21 deubiquitinase)

Iraia García-Santisteban^{1,2}, Anne Olazabal-Herrero^{1,3,4}, José Antonio Rodríguez^{1*}

¹ Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila (UPV/EHU)

² Biocruces-Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua (Barakaldo)

³ Department of Oncology, Georgetown University (Washington, DC)

⁴ Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine (New Haven, CT)

LABURPENA: USP21 deubikuitinasa nukleoaren eta zitoplasmaren artean translokatzeko da, eta zentrosoman ere koka daiteke, baina kokapen azpizelular konplexu hori nola modulatu den ezezaguna da. Proteomika-analisiaren bidez, MARK4 kinasa zentrosomala identifikatu da USP21 proteinaren balizko interaktore gisa. Lan honetan, USP21/MARK4 interakzioa balioztatzen dugu, eta USP21 proteinan MARK4 lotura-eskualdea identifikatu. Gure emaitzen arabera, MARK4ekiko interakzioak USP21en nukleoaren eta zitoplasmaren arteko kokapen dinamikoa erregula dezake, zitoplasmarekiko atxikipena areagotuz. Bestalde, gure datuek bi proteinen kokapen zentrosomala oso dinamikoa dela erakusten dute, eta USP21en dinamika zentrosomala MARK4en bidez modula daitekeela iradokitzen dute.

HITZ GAKOAK: USP21, MARK4, kokapen zentrosomala, garraio nukleo-zitoplasmikoa, proteina-proteina elkarrekintza.

ABSTRACT: *The deubiquitinase USP21 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and can also localize to the centrosome, but how this complex subcellular localization is modulated remains unknown. A proteomics analysis has identified the centrosomal kinase MARK4 as a potential USP21-interacting partner. In this work, we validate the USP21/MARK4 interaction, identifying the MARK4-binding region of USP21. Our results indicate that MARK4 interaction may regulate USP21 nucleocytoplasmic shuttling dynamics, increasing its retention in the cytoplasm. On the other hand, our data show that the centrosomal localization of both proteins is highly dynamic, and suggest that USP21 centrosomal dynamics might be modulated by MARK4.*

KEYWORDS: USP21, MARK4, centrosomal localization, nucleocytoplasmic transport, protein-protein interaction.

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

Nola aipatu / How to cite: García-Santisteban, Iraia; Olazabal-Herrero, Anne; Rodríguez, José Antonio (2022). «MARK4ren interakzioak USP21 deubikuitinasaren kokapen azpizelular dinamikoa erregulatzen du». *Ekaia*, 42, 2022, 193-206. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.22644>).

Jasotze-data: 2021, martxoak 22; Onartze-data: 2021, azaroak 8.

ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2022 UPV/EHU



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

1. SARRERA

Ubikuitinaren proteasa espezifikokoak (ingelesez *Ubiquitin Specific Proteases, USPs*) itu-proteina ugariren ubikuitinazio-maila modulatzeko entzima deubikuitinazailak (deubikuitinasak) dira. Entzima horiek hainbat funtzio zelularren funtsezko alderdiak erregulatzen dituzte, hala nola geneen adierazpena eta ziklo zelularren progresioa [1]. USP21 proteina familia honetako kidea da, eta zelularen konpartimentu desberdinetan kokatzen diren substratu ugari dauzka: nukleoan H2A histona [2] eta FOXM1 [3] transkripzio-faktorea deubikuitinatzen ditu, eta zitoplasman Rip1 [4] eta RIG-I [5] ituak ditu. Autore batzuek USP21ek mikrotubuluei eta zentrosomei lotutako funtzioen erregulazioan zeregin garrantzitsua betetzen duela deskribatu dute [6], adibidez Gli1 transkripzio-faktorea zentrosoman bahitzea eta egonkortzea [7].

USP21en funtzioaren eta erregulazioaren alderdi ugari oraindik ezezagunak dira. Haren substratuen kokapen heterogeneoa kontuan hartuta, litekeena da USP21en banaketa azpizelularra zehazten duten mekanismoek garrantzi handia izatea haren funtzioa erregulatzeko. Alde horretatik, USP21en domeinu amino-terminalak esportazio nuklearreko seinale bat (ingelesez *Nuclear Export Signal, NES*) duela erakutsi genuen [8]. Garraio-seinale horren bitartez, CRM1 (*chromosome region maintenance factor 1*) esportazio-hartzaileak USP21en banaketa nukleozitoplasmatiko dinamikoa modulatzeko du. Bestalde, USP21en kokapen zentrosomala ezaguna bada ere [6], oraindik ez dago argi USP21 molekulak zentrosomarekiko lotura egonkorra mantentzen duen, ala proteinaren kokapen zentrosomikoak ere izaera dinamikoa duen. Aipatzekoa da duela urte batzuk identifikatutako USP21en zentrosomara lotzeko motiboak [6] haren NESa ere biltzen duela [8]. Jakina da NES duten proteina batzuen kokapen zentrosomala NES seinaleak berak erregulatzen duela [9], USP21 proteinaren kokapen zentrosomala ere NES menpekota izan litekeela iradokiz.

Garraio-seinaleen jardueraz gain, proteina baten kokapen zelularra konpartimentu azpizelular desberdinetako beste proteinekin duen interakzioen bidez ere modula daiteke. Eskala handiko proteomika azterketa batean, USP21 lotu dezaketen 17 proteina identifikatu zituzten [10], besteak beste MARK1-4 proteinak. MARK (*Microtubule Affinity Regulating Kinases*) proteinak mikrotubuluen afinitatea erregulatzen duten serina/treonina taldeko kinasak dira [11], eta zelularen prozesu desberdinen erregulazioan parte hartzen dute, hala nola mikrotubuluen dinamikan eta zelularen polaritatean [12]. Funtzio horietaz gain, USP21 deubikuitinasaren bidezko MARK kinasen egonkortzeak Hippo seinaleztapen bidea erregulatzen duela deskribatu da [13]. GFP-USP21ek MARK1, MARK2 eta MARK3ekin duen interakzioa berretsi da [6]. Hala ere, USP21en eta MARK4ren arteko interak-

zioa balioztatzeke dago. Gainera, oraindik ez da ikertu MARK proteinek USP21en kokapen-dinamikan izan dezaketen eragina.

Gure ikerketa honetan, USP21en kokapen zentrosomala oso dinamikoa eta NESarekiko independentea dela erakusten dugu. Gainera, MARK4ren eta USP21en arteko elkarrekintza balioztatzen dugu, eta MARK4 lotze-gunea USP21en eskualde amino-terminalean mapatu. Horretaz gain, MARK4 elkarrekintzak USP21en banaketa nukleozitoplasmikoa eta kokapen zentrosomala modulatzeko lagundu dezakeela erakusten dugu.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Plasmidoen eraikuntza

Flag-HA-etiketekin markatutako giza USP21 kodetzen duen plasmidoa J.W. Harper-en laborategitik lortu genuen (Harvardko Medikuntza Eskola) Addgenen bidez (#22574 plasmidoa). YFP-USP21 WT eta NESm kodetzen dituzten plasmidoen eraikuntza aurretik deskribatuta dago [8]. USP21 delezio-mutante multzoa sortzeko, USP21en 1-208, 71-565 eta 209-565 aminoazido eskualdeek kodetzen dituzten DNA zatiak PCR bidez amplifikatu genituen fideltasun handiko Pfu UltraII HS DNA polimerasa (Stratagene) erabiliz, eta pEYFP-C1 plasmidoan (Clontech) sartu genituen XhoI eta EcoRI errestrikzio-guneak erabiliz. MARK1, MARK2 eta MARK3ren cDNAak (HsCD00079951, HsCD00003690, HsCD00005836, hurrenez hurren) PlasmIDen erosi genituen, eta HA-MARK4 kodetzen duen plasmidoa D. Alessi-ren laborategitik (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee-ko Unibertsitatea) eskuratu genuen. Proteina horien YFP bertsioak kodetzen dituzten plasmidoak sortzeko, MARKen cDNAak PCR bidez amplifikatu genituen, eta pEYFP-C1 plasmidoan azpiklonatu genituen XhoI / EcoRI (MARK1), SalI / KpnI (MARK2), XhoI / KpnI (MARK3) edo HindIII / BamHI (MARK4) errestrikzio-guneak erabiliz. Eraikitako plasmidoak Sanger sekuentziazio bidez baieztatu ziren.

2.2. Zelulen kultiboa, transfekzioa eta tratamendua

HeLa eta HEK293T zelulak DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) medioan hazi genituen, % 10 idi-umeki seroa (ingelesez *fetal bovine serum*, FBS), 100 U/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizina (Invitrogen) gehituta. Transfekzioak X-tremeGENE9 transfekzio erreaktiboarekin (Roche Diagnostics) egin genituen fabrikatzailearen argibideei jarraituz. Adierazitako esperimentuetan, kultibo medioari 6 ng/ml leptomizina B (LMB) (Apollo Scientific) gehitu genion.

2.3. **Immunofluoreszentzia eta fluoreszentzia mikroskopia**

Beirazko estalkietan hazitako zelulen fixapena % 3,7 formaldehidoarekin 30 minutuz giro tenperaturan edo metanol hotza (-20°C) erabiliz 5 minutuz burutu genuen. Formaldehidoan fixatutako zelulak iragazkortze-soluzioarekin (% 0,2 Triton X-100, Sigma) inkubatu ziren 10 minutuz giro tenperaturan. Immunofluoreszentzia egiteko protokoloa aurretik deskribatu dugu [14]. Anti- γ -tubulina (Abcam, 1:200), anti-Flag (Sigma, 1:300) eta anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, 1:300) antigorputz primario gisa erabili genituen, eta Alexa Fluor 594 saguaren aurkako IgG (Invitrogen) antigorputz sekundario gisa. Hoechst 33285 DNA koloratzailea (Sigma) gehitu genuen nukleoak ikusteko. Estalkiak Vectashield-ekin (Vector Laboratories) muntatu genituen beirazko portetan. Prestakinak Zeiss Axioskop fluoreszentzia-mikroskopia edo Olympus Fluoview FV500 mikroskopia konfokala erabiliz aztertu genituen. Emisio espektroen gainjartzea saihesteko, fluorokromo bakoitzaren argazkiak banan-banan eskuratu genituen.

2.4. **Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) esperimentua**

HeLa zelulak 35 mm-ko ibiTreat kultibo-plaketan (Ibidi) hazi genituen. FRAP esperimentua transfekzioa egin eta 24 ordutara burutu genuen, LEICA LCS SP2 AOBS mikroskopiaoren 63 handipen-objektiboa erabiliz. Kitzikapen-laserraren potentzia % 10ean ezarri genuen, eta intereseko eskualdea % 100eko laser potentzia bidez zuritu zen. Kitzikapen aurreko hamar eta ondorengo berrogeita hamar irudi hartu genituen, 1.635 segundoko denbora tartearekin. Esperimentu bakoitzeko sei zelula indibidual aztertu genituen, eta esperimentuak gutxienez bi aldiz errepikatu genituen. Irudiak ImageJ softwarearen bidez prozesatu genituen, eta datuak Microsoft Excel eta GraphPad Prism programak erabiliz aztertu genituen. Berreskurapenaren denbora erdia ($t_{1/2}$) eta zatiki mugikorra (F_m) <http://www.embl.de/eamnet/frap/html/overview.html> webgunean azaltzen den moduan kalkulatu genituen.

2.5. **Ko-immunoprezipitazioa (ko-IP) eta immunoplapaketa**

IP Lysis buffer (Pierce) erabiliz, zelulak lisatu, eta GFPren aurkako immunoprezipitazioa GFP-Trap_M erreaktibo (Chromotek) erabiliz burutu genuen, fabrikatzailearen argibideei jarraituz. Immunoprezipitatutako proteinek immunoplapaketaren bidez aztertu genituen. Horretarako, proteina laginak % 10eko SDS-PAGE geletan kargatu, elektroforesiaren bidez banatu eta nitrozululosa mintzera transferitu genituen. Mintzak TTBStan disolbatutako % 5eko gantzik gabeko esnetan blokeatu genituen ordu batez, eta anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, 1:400, gauean zehar 4°C -tan) edo anti-GFP (Chromotek, 1:1000, ordu bat giro-tenperaturan) antigorputz primarioekin inkubatu genituen. Mintzak peroxidasarekin konjugatutako antigorputz sekundario batekin inkubatu genituen (Amersham edo Santa-Cruz,

1:3.000). Garbitu ondoren, mintzak ECL edo Femto kimiolumineszentzia erreaktiboak erabiliz (Thermo Scientific) errebelatu genituen.

2.6. Analisi estatistikoak

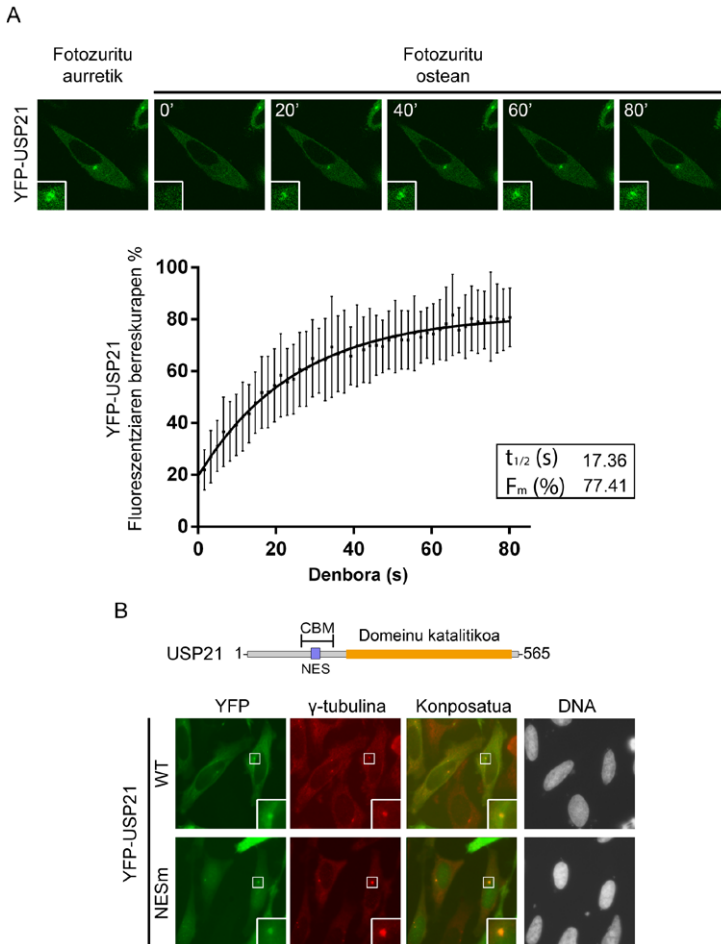
Artikuluko esperimentu bakoitzaren erreplika kopurua dagokion irudiarnean oinarrituta dago. Analisi estatistikoak Student-en t-testaren bidezko konparaketaren bidez burutu dira; P-balioa <0.05 denean esangura estatistikoa dagoela kontsideratu da.

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

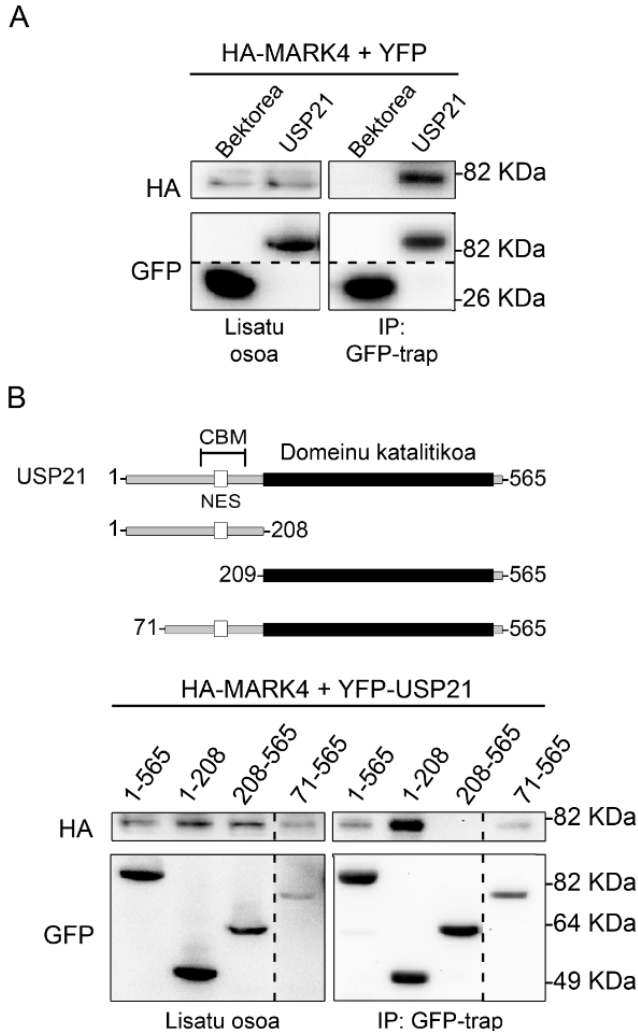
3.1. USP21en kokapen zentrosomala oso dinamikoa eta NESarekiko independentea da

USP21 deubikuitinasa mikrotubuluetan, zitoeskeletoan eta zentrosoman koka daitekeela frogatu da aurretiaz [6]. Zelula bizien azterketa zinetikoek agerian utzi dute zentrosomako hainbat proteina (adibidez, γ -tubulina) zentrosoman egonkor mantentzen diren bitartean [15] beste batzuk (adibidez, BARD1) etengabe ari direla zentrosomara joan eta etorri [16]. USP21en kokapen zentrosomalaren dinamika ikertzeko, zelula bizien FRAP azterketa egin genuen YFP-USP21ekin transfektatutako HeLa zeluletan. 1A irudian agertzen den bezala, kitzikapenaren osteko YFP-USP21 fluoreszentzia zentrosomala azkar berreskuratu zen. Berreskurapenaren denbora erdia ($t_{1/2}$) 17,36 segundokoa izan zen, eta zatiki mugikorra (Fm) % 77,41koa. Datu hauen arabera, YFP-USP21en kokapen zentrosomala oso dinamikoa da, eta proteina guztiaren parte txiki bat (~% 23) bakarrik geratzen da zentrosomarekin egonkor lotuta. Beraz, gure taldeko aurreko datuen [8], eta ikerketa honetako emaitzen arabera, USP21 zelularen konpartimentu desberdinen, hau da, nukleoaren, zitoplasmaren eta zentrosomaren artean etengabe garraiatzen den proteina da.

1B irudian azaltzen den moduan, zentrosoma lotzeko motiboak (ingelesez, *centrosome binding motif*, CBM, 122-174 amino azidoak) [8] USP21en NESa (134-152 amino azidoak) [9] biltzen du. Jakina da NES motiboek proteina batzuk, hala nola nukleofosmina, BARD1 eta RGS14, zentrosomara bideratzen dituztela [9, 16, 17]. Izan ere, NESetan eragindako mutazio inaktibatzaileek proteina hauen kokapen zentrosomala asko murrizten dute [9, 16, 17]. USP21en NESa inaktibatzen duten bi mutazio puntualak (L142A / L144A) [8], ordea, ez zuten haren kokapen zentromala indargabetu (1B irudia). Beraz, gure datuen arabera, NESa duten beste proteina zentrosomal batzuek ez bezala, USP21ek ez du CRM1en menpeko NES funtzionalik behar bere kokapen eta dinamika zentrosomala mantentzeko. Horrela, zentrosoma lotzeko motiboa eta USP21en NESa, fisikoki gainjarriak diren arren, funtzionalki independenteak direla esan dezakegu.



1. irudia. USP21en kokapen zentrosomala oso dinamikoa eta NESarekiko independentea da. (A) YFP-USP21 dinamika zentrosomala aztertzeko FRAP analisia. Goiko argazkiek YFP-USP21 proteina fluoreszentea erakusten dute, kitzikapenaren aurretik eta kitzikapenaren ostean; lauki txikien barneko irudiek zentrosomari dagokion fotozuritutako zatia handipen gehiagoz erakusten dute. Beheko grafikoa berreskurapen-kurba eta FRAP parametroak agertzen dira: berreskurapenaren denbora erdia ($t_{1/2}$) eta zatiki mugikorra (F_m). Grafiko eta parametroen balioak hiru esperimentu independentetan aztertutako 18 zelulatik eratorritakoak dira. (B) Goiko irudiak USP21 proteinaren irudikapen eskematikoa erakusten du: esportazio nuklearreko seinalearen (NES, 134-152 aa), zentrosoma lotzeko motiboa (CBM, 122-174 aa) eta domeinu katalitikoa adierazten dira. Beheko argazkiek erakusten dute bai YFP-USP21 WT, eta bai YFP-USP21 NESm ere zentrosoman kokatzen direla γ -tubulina endogenoaren batera. Zentrosomari dagokion zatia handipen gehiagoz erakusten da lauki txikietan. Zelulen nukleoak Hoechstekin tindatu genituen (DNA panelak).



2. irudia. USP21en eskualde amino-terminalak MARK4rekin lotzeko eremua biltzen du. (A) Irudiek HEK293T zelulen GFP-trap bidezko ko-immunoprezipitazio analisiaren emaitzak erakusten dituzte. HA-MARK4 YFP-USP21ekin batera transfektatu zen edo, kontrol negatibo gisa, YFP-bektorearekin. HA-MARK4k YFP-USP21ekin batera immunoprezipitatu du, baina ez YFP kontrolarekin. Puntuako lerroek panelak gel bereko bi irudiek osatutako konposatuak direla adierazten dute. (B) Irudiek MARK4 lotzeko gunea mapatzeko erabili ditugun USP21 delezio-mutanteen irudikapen eskematikoa erakusten dute. Azpian, immunoprezipitazio-analisiaren emaitzak, 1-208 eta 71-565 USP21 zatiek, baina ez 209-565 zatiak, HA-MARK4rekin interakzionatzen dutela erakusten dutenak. Puntuako lerroek adierazten dute panelak gel bereko bi irudiek osatutako konposatuak direla.

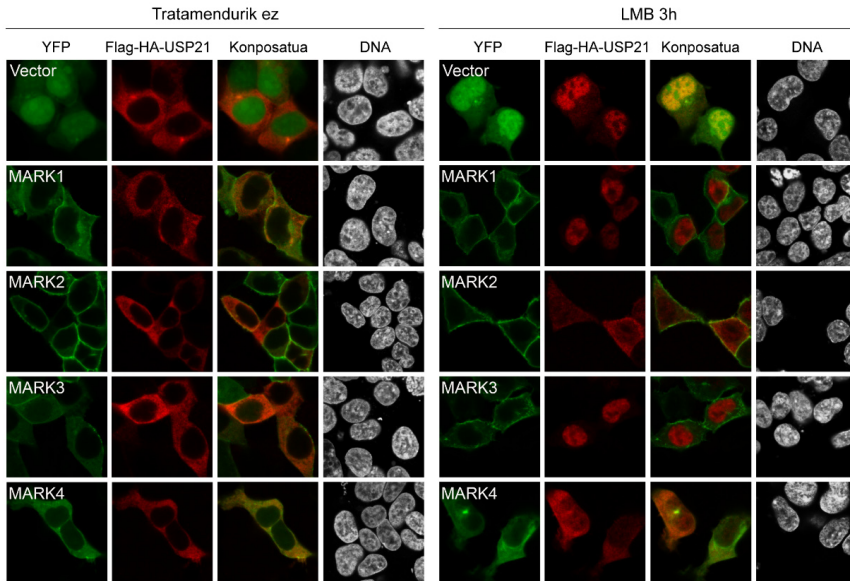
3.2. MARK4 interakzio-gunea USP21en eskualde amino-terminalean kokatzen da

Proteomikako analisi global baten bidez, deubikuitinasen interaktoma (hau da, entzima hauekin interakziona dezakeen proteina multzoa) deskribatu da [10]. Analisi honek USP21ekin lotu daitezkeen 17 proteina identifikatu zituen, eta haien artean mikrotubuluen afinitatea erregulatzen duten kinasen familiako lau kideak (MARK1-4) aurkitzen dira. Eskala handiko azterketa proteomikoak proteina baten interaktoma ezagutzen hasteko balioetsuak diren arren, aurkikuntzak modu independentean baieztatu behar dira. Izan ere, deubikuitinasen interaktoman zerrendatutako «konfiantza handiko kide» potentzialen % 30 inguru ezin izan zen metodo independente bat erabiliz balioztatu [10]. Alde horretatik, USP21ek MARK1-3rekin duen elkarrekintza baieztatu den arren [6], USP21 eta MARK4ren arteko elkarrekintza oraindik ere balioztatzeke dago. 2A irudian erakusten den bezala, transfektatutako HEK293T zeluletan HA-MARK4 proteina YFP-USP21ekin batera immunoprezipitatu zen, eta ez YFP-bektorearekin. Emaidza horiek proteomikako datuak berresten dituzte, eta MARK4 proteina USP21en interaktore gisa balioztatzen dute. USP21en MARK4 lotzeko gunea identifikatzeko, ko-IP esperimenduak egin genituen YFP-USP21 delezio-mutante sorta batekin (2B irudia). Gure emaitzen arabera, MARK4 lotzeko eskualdea USP21 domeinu katalitikoaren kanpoaldean dago, eta 71-208 aminoazidoen segmentua biltzen du. Aurreko behaketekin konbinatuta, gure aurkikuntzek USP21en eremu amino-terminala bere kokapena eta beste proteina batzuekin duen elkarrekintza erregulatzen duen eskualde kritikoa dela diote.

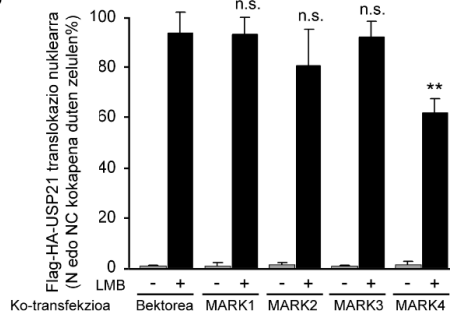
3.3. MARK4k USP21en banaketa nukleozitoplasmikoa modulatzeko du

MARK proteinak zitoplasman eta mintzetan koka daitezke [11, 18-21] eta MARK4, USP21en antzera, zentrosoman eta mikrotubuluen zitoeskeletoan ere koka daitekeela jakinarazi da [22]. Hori jakinda, geure buruari galdetu genion ea MARK proteinak, eta bereziki MARK4, USP21en kokapena modulatzeko gai ziren. MARK proteinen elkarrekintzak USP21en mugimendu nukleozitoplasmiko dinamiko modulatzeko gaitasuna ebaluatzeko asmoz, YFP-MARK1-4 proteinak Flag-HA-USP21ekin batera adierazi genituen HEK293T zeluletan. Kontrol negatibo gisa, Flag-HA-USP21 YFP-bektorearekin batera adierazi genuen. Proteina bakoitzaren kokapen nukleozitoplasmikoa fluoreszentsia mikroskopiaren bidez zehaztu genuen, bai tratatu gabeko zeluletan, bai leptomizina B (LMB) konposatuarekin tratatutako zeluletan. LMBk CRM1ek eragindako esportazio nuklearra inhibitzen du [23]. Aurreko ikerketen emaitzekin bat eginez [11, 18-21], YFP-MARK proteinak zitoplasman ageri ziren, eta YFP-MARK1-3 mintz plasmatikoa ere koka zitezkeela zirudien, batez ere YFP-MARK2 (3A irudia). LMB tratamenduak ez zuen YFP-MARK1-4 metaketa nuklearra eragin, CRM1ek eragindako esportazio nuklearrak proteina horien kokapen zitoplasmatikoa bitartekaritza parte hartzen ez duela iradokiz.

A



B



3. irudia. MARK4k USP21en mugimendu nukleozitoplasmikoa modulatu du. (A) Argazkiek Flag-HA-USP21 (gorria) eta YFP-bektorea edo YFP-MARK1-4 proteinak (berdeak) kodetzen dituzten plasmidoekin transfektatutako HEK293T zelulen adibide adierazgarriak erakusten dituzte, tratatu gabeko eta LMBrekin tratatutako zeluletan. Zelulen nukleoak Hoechstekin tindatu genituen (DNA panelak). (B) A ataleko esperimentuaren azterketa semikuantitatiboa. Grafikoak Flag-HA-USP21en lokalizazio nuklearra (N) edo nukleozitoplasmikoa (NC) erakusten du, ehunekotan (%). Barra bakoitzak gutxienez 3 esperimentu independenteren batez bestekoa (\pm desbideraketa estandarra) adierazten du. Lagin bakoitzeko gutxienez 200 transfektatutako zelula ebaluatu ziren. Izartxoek YFP-MARK4 ko-adierazpenak Flag-HA-USP21en lekualdatze nuklearra nabarmenki murriztu duela adierazten dute ($p = 0,006$; Studenten t-testa). MARK1-3 ko-adierazpenaren eragina Flag-HA-USP21en lekualdatze nuklearrean ez zen esanguratsua izan (ns).

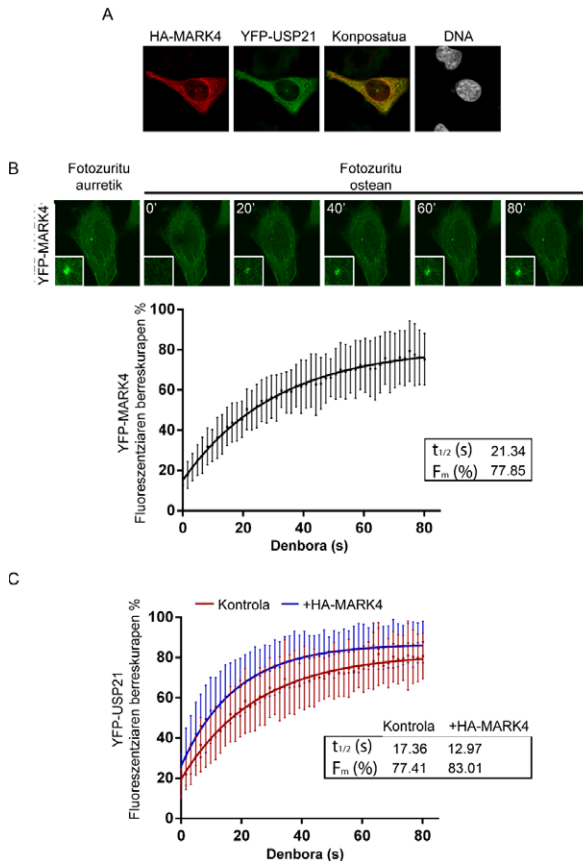
Flag-HA-USP21en banaketa nukleozitoplasmikoan, berriz, desberdintasunak nabarmenak ziren, eta modu semikuantitatiboan aztertu genuen (3B irudia). Flag-HA-USP21 tratatu gabeko zelulen zitoplasman soilik zegoen kokatuta, YFP-MARK proteinen antzera. Aurreko ikerketen datuekin bat etorri [8], LMBk modu eraginkorrean eragin zuen Flag-HA-USP21en nukleorako lekualdatzea YFP kontrolarekin ko-transfektatutako zeluletan. Flag-HA-USP21 YFP-MARK1 edo YFP-MARK3ekin ko-adieraztean, antzeko lekualdatze nuklearra ikusi genuen LMBrekin tratatutako zeluletan. YFP-MARK2 adierazten duten zeluletan, aldiz, Flag-HA-USP21en lekualdatze nuklearra nolabait oztopatuta dagoela dirudi, baina YFP kontrolarekin konparatu ondoren, desberdintasuna ez zen esangura estatistikora iritsi ($p = 0,231$). Aitzitik, YFP-MARK4 adierazten duten zeluletan Flag-HA-USP21en lekualdatze nuklearra nabarmenki murriztu zen ($p = 0,006$).

Datu horien arabera, MARK4k USP21 proteinarekin kokapen nuklearra oztopatzen du, ziurrenik zitoplasman duen atxikipena handituz. Horretaz gain, aurkikuntza hauek ere iradokitzen dute MARK4k lotura egonkorragoa duela USP21ekin MARK familiako gainerako kideekin baino.

3.4. MARK4 zentrosomako proteina dinamikoa da, eta USP21en kokapen zentrosomala modulatu lagundu dezake

MARK familian, MARK4 da zentrosoman koka daitekeen kide bakarra [22]. Mikroskopia konfokaleko analisiek (4A. irudia) berretsi zuten bai HA-MARK4 eta bai YFP-USP21 egitura azpizelular horietan kokatzen direla metanolarekin fixatutako HeLa zeluletan. Gainera, YFP-MARK4ekin transfektatutako HeLa zeluletan egindako FRAP esperimenduek (4B irudia) proteina honen kokapen zentrosomala dinamikoa dela erakutsi zuten, YFP-USP21en antzeko berreskurapen parametroekin ($t_{1/2} = 21,34$ segundo eta $F_m = \% 77,85$).

Aurretik (3. irudian) aurkeztutako emaitzek MARK4k USP21en garraio nukleozitoplasmikoa modulatu duela adierazten dutenez, MARK4k USP21en dinamika zentrosomala ere erregula dezakeen aztertu genuen. Horretarako, MARK4 endogenoa adierazten duten eta HA-MARK4 ektopikoa gainadierazten duten HeLa zeluletan USP21en dinamika zentrosomala ebaluatu genuen, FRAP teknikaren bidez. Transfektzioaren eraginkortasunaren kontrol gisa, lagin paralelo batean zehaztu genuen YFP-USP21 adierazten duten zelulen $\% 75$ ek HA-MARK4 ere adierazten zutela. 4C irudian ageri den moduan, HA-MARK4 gainadierazten duten zeluletan elkartruke azkarragoa ($t_{1/2} = 12,97$ vs $17,36$) eta zatiki mugikor handiagoa ($F_m = \% 83,01$ vs $\% 77,41$) izateko joera erakutsi zuen YFP-USP21ek. Desberdintasun horiek ez zuten esangura estatistikoa lortu ($p = 0,135$ $t_{1/2}$ -rako, eta $p = 0,403$ F_m -rako), baina YFP-USP21/HA-MARK4 ko-adierazpenaren eraginkortasuna $\% 100$ ekoa ez denez, litekeena da HA-MARK4ren eragina gutxietsia izatea esperimendu hauetan. Ohar tekniko hori kontuan hartuta, YFP-USP21 dinamika zentrosomala, neurri batean, MARK4 bidez modula daitekeela iradokitzen dugu.



4. irudia. MARK4 proteinek kokapen dinamikoaren erakusten du zentrosoman, eta USP21en kokapen zentrosomala modula dezake. (A) Mikroskopia konfokaleko irudiek HA-MARK4 eta YFP-USP21 proteinen ko-lokalizazioa erakusten dute metanolarekin fixatutako HeLa zeluletan. (B) YFP-MARK4ren dinamika zentrosomala ikertzen duen FRAP analisia. Goiko irudiek YFP-MARK4 proteina fluoreszentea erakusten dute kitzikapenaren aurretik eta kitzikapenaren ondoren; zentrosomari dagokion fotozuritutako zatia handipen gehiagorekin erakusten da lauki txikietan. Beheko grafikoan berreskurapen-kurba eta FRAP parametroak agertzen dira: berreskurapenaren denbora erdia ($t_{1/2}$) eta zatiki mugikorra (F_m). Grafikoa eta parametroen balioak bi esperimentu independentetan aztertutako 12 zelulatik eratorritakoak dira. (C) YFP-USP21en dinamika zentrosomala ikertzeko FRAP analisia, MARK4 endogenoa soilik adierazten duten zeluletan (kontrola, lerro gorria) edo HA-MARK4 ektopikoa gainadierazten duten zeluletan (lerro urdina). Hiru esperimentu desberdinetan aztertutako 18 zelularen datuak adierazi dira. Berreskurapen-kurbek eta FRAP parametroen balioek adierazten duten moduan, HA-MARK4 gainadierazten duten zeluletan, YFP-USP21k $t_{1/2}$ laburragoa eta F_m handiagoa erakutsi zuen. Desberdintasunak ez ziren esangura estatistikora heldu, Studenten t-testaren arabera ($p = 0,135$ $t_{1/2}$ rako eta $p = 0,403$ F_m rako).

Laburbilduz, hemen aurkeztutako datuek MARK4 balioztatzen dute USP21ekin interakzionatzen duen kide gisa, bi proteina hauen kokapen zentrosomikoaren izaera dinamikoa agerian uzten dute, eta MARK4 elkarrekintza identifikatzen dute USP21en banaketa nukleozitoplasmikoa modulatzeko duen mekanismo berri gisa, eta haren kokapen zentrosomalean ere eragin dezake. Horrela, gure datuek USP21 deubikuitinasaren dinamika azpizelularra hobeto ezagutzen laguntzen dute. Azkenik, USP21 eta MARK4 proteinek zelularen seinaleztapenean parte hartzen dutela kontuan hartuta, Hippo bidezidorrean adibidez [13], etorkizuneko ikerketek determinatuko dute zeintzuk diren proteina hauen kokapen azpizelularren erregulazioak seinalizazio-bideetan izan ditzakeen ondorioak.

4. ESKER ONAK

Lan hau Eusko Jaurlaritzak (ETORTEK BioGUNE2010 eta IT1257-19), Espainiako Gobernuak (MICINN BFU2009-13245) eta Euskal Herriko Unibertsitateak (UFI11/20) lagundu zuten. IG-Sk Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Saileko beka batek, eta AO-H UPV/EHUko beka batek lagundu zuten. Gure taldea PROTEOSTASIS BM1307 COST Action-eko kide da, European Cooperation in Science and Technology-k laguntzen duena. J.W. Harper doktoareari (Harvardko Medikuntza Eskola) eta D. Alessi doktoareari (Dundee-ko Unibertsitatea) eskerrak eman nahi dizkiegu plasmidoak emateagatik. Beric Henderson doktoareari (Sydneyko Unibertsitatea, Australia) eskerrak eman nahi dizkiogu FRAP azterketari buruz emandako aholkua. SGIker-UPV/EHU bereizmen handiko mikroskopia-instalazioak emandako laguntza teknikoak ere eskertu nahiko genuke.

BIBLIOGRAFIA

- [1] CLAGUE, M. J., URBÉ, S., KOMANDER, D. 2019. «Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**, 338-352.
- [2] NAKAGAWA, T., KAJITANI, T., TOGO, S., MASUKO, N., OH DAN, H., HISHIKAWA, Y., KOJI, T., MATSUYAMA, T., IKURA, T., MURAMATSU, M., ITO, T. 2008. «Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation». *Genes and Development*, **22**, 37-49.
- [3] ARCECI, A., BONACCI, T., WANG, X., STEWART, K., DAMRAUER, J. S., HOADLEY, K. A., EMANUELE, M. J. 2019. «FOX M1 Deubiquitination by USP21 Regulates Cell Cycle Progression and Paclitaxel Sensitivity in Basal-like Breast Cancer». *Cell Reports*, **26**, 3076-3086.e6.

- [4] XU, G., TAN, X., WANG, H., SUN, W., SHI, Y., BURLINGAME, S., GU, X., CAO, G., ZHANG, T., QIN, J., YANG, J. 2010. «Ubiquitin-specific peptidase 21 inhibits tumor necrosis factor α -induced nuclear factor κ B activation via binding to and deubiquitinating receptor-interacting protein 1». *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 969-978.
- [5] FAN, Y., MAO, R., YU, Y., LIU, S., SHI, Z., CHENG, J., ZHANG, H., AN, L., ZHAO, Y., XU, X., CHEN, Z., KOGISO, M., ZHANG, D., ZHANG, H., ZHANG, P., JUNG, J. U., LI, X., XU, G., YANG, J. 2014. «USP21 negatively regulates antiviral response by acting as a RIG-I deubiquitinase». *Journal of Experimental Medicine*, **211**, 313-328.
- [6] URBÉ, S., LIU, H., HAYES, S. D., HERIDE, C., RIGDEN, D. J., CLAGUE, M. J. 2012. «Systematic survey of deubiquitinase localization identifies USP21 as a regulator of centrosome-and microtubule-associated functions». *Molecular Biology of the Cell*, **23**, 1095-1103.
- [7] HERIDE, C., RIGDEN, D. J., BERTSOULAKI, E., CUCCHI, D., DE SMAELE, E., CLAGUE, M. J., URBÉ, S. 2016. «The centrosomal deubiquitylase USP21 regulates Gli1 transcriptional activity and stability». *Journal of Cell Science*, **129**, 4001-4013.
- [8] GARCÍA-SANTISTEBAN, I., BAÑUELOS, S., RODRÍGUEZ, J. A. 2012. «A global survey of CRM1-dependent nuclear export sequences in the human deubiquitinase family». *Biochemical Journal*, **441**, 209-217.
- [9] WANG, W., BUDHU, A., FORGUES, M., WANG, X. W. 2005. «Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication». *Nature Cell Biology*, **7**, 823-830.
- [10] SOWA, M. E., BENNETT, E. J., GYGI, S. P., HARPER, J. W. 2009. «Defining the Human Deubiquitinating Enzyme Interaction Landscape». *Cell*, **138**, 389-403.
- [11] DREWES, G., EBNETH, A., PREUSS, U., MANDELKOW, E. M., MANDELKOW, E. 1997. «MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption». *Cell*, **89**, 297-308.
- [12] MATENIA, D., MANDELKOW, E. M. 2009. «The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton». *Trends in Biochemical Sciences*, **34**, 332-342.
- [13] NGUYEN, H. T., KUGLER, J. M., LOYA, A. C., COHEN, S. M. 2017. «USP21 regulates Hippo pathway activity by mediating MARK protein turnover». *Oncotarget*, **8**, 64095-64105.
- [14] RODRÍGUEZ, J. A., HENDERSON, B. R. 2000. «Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1». *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 38589-38596.
- [15] KHODJAKOV, A., RIEDER, C. L. 1999. «The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules». *Journal of Cell Biology*, **146**, 585-596.

- [16] BRODIE, K. M., MOK, M. T. S., HENDERSON, B. R. 2012. «Characterization of BARD1 targeting and dynamics at the centrosome: The role of CRM1, BRCA1 and the Q564H mutation». *Cellular Signalling*, **24**, 451-459.
- [17] CHO, H., KIM, D. U., KEHRL, J. H. 2005. «RGS14 is a centrosomal and nuclear cytoplasmic shuttling protein that traffics to promyelocytic leukemia nuclear bodies following heat shock». *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 805-814.
- [18] HUROV, J. B., WATKINS, J. L., PIWNICA-WORMS, H. 2004. «Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity». *Current Biology*, **14**, 736-741.
- [19] GÖRANSSON, O., DEAK, M., WULLSCHLEGER, S., MORRICE, N. A., PRESCOTT, A. R., ALESSI, D. R. 2006. «Regulation of the polarity kinases PAR-1/MARK by 14-3-3 interaction and phosphorylation». *Journal of Cell Science*, **119**, 4059-4070.
- [20] WATKINS, J. L., LEWANDOWSKI, K. T., MEEK, S. E. M., STORZ, P., TOKER, A., PIWNICA-WORMS, H. 2008. «Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18378-18383.
- [21] MORAVCEVIC, K., MENDROLA, J. M., SCHMITZ, K. R., WANG, Y. H., SLOCHOWER, D., JANMEY, P. A., LEMMON, M. A. 2010. «Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids». *Cell*, **143**, 966-977.
- [22] TRINCZEK, B., BRAJENOVIC, M., EBNETH, A., DREWES, G. 2004. «MARK4 Is a Novel Microtubule-associated Proteins/Microtubule Affinity-regulating Kinase That Binds to the Cellular Microtubule Network and to Centrosomes». *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 5915-5923.
- [23] SENDINO, M., OLAZABAL-HERRERO, A., RODRIGUEZ, J. A., OMAETXEARRIA, M. J. 2020. «XPO1en bidezko garraio nukleozitoplasmikoa: oinarritzko mekanismoak eta hurbilketa esperimentalak». *Ekaia*, **37**, 221-239.