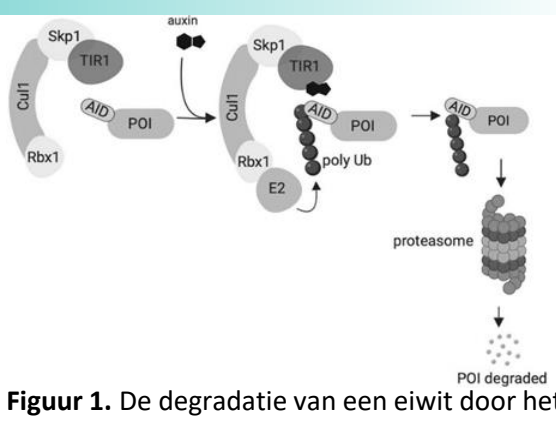
Een histon-chaperonne taggen voor eiwit degradatie met behulp van CRISPR-Cas

Joost Hoppener , Aleyna Urun, Adriaan Veuger en Katryn Kampen
S1131081, S1120733, S1126161 en S1130300
PRO groep 48
17 januari 2023

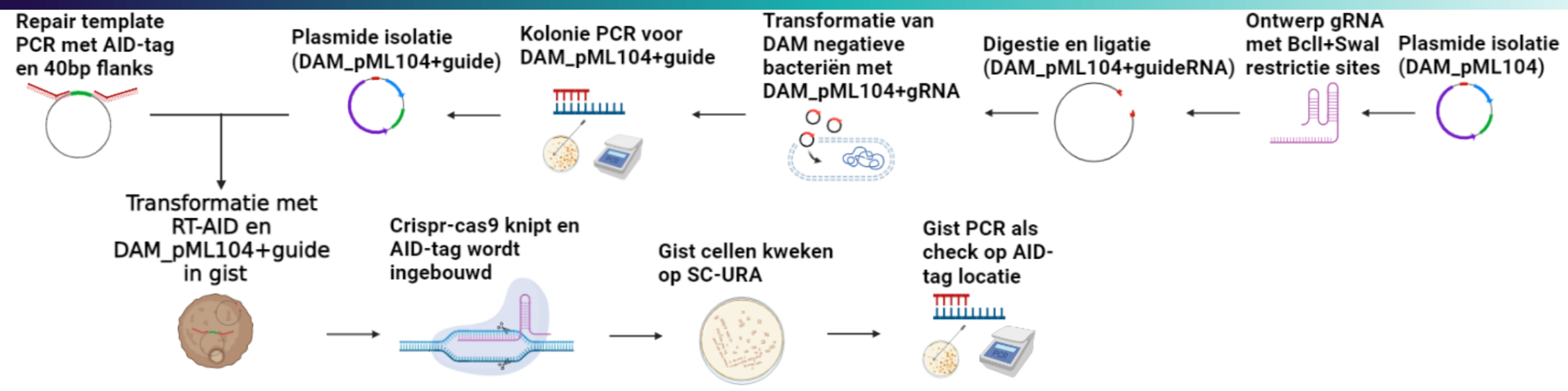
Inleiding

Een veel gebruikte manier om eiwitten te bestuderen is het reguleren ervan en het effect van de afwezigheid van deze eiwitten te bestuderen. Auxine-inducible degron system (AID) is een techniek waarbij een combinatie van AID en Transport inhibitor respons 1(TIR1) gekloneerd wordt in een gistcel[1]. AID-tag functioneert als een herkenningseiwit en wordt door middel van crispr-cas9 op de juiste plek bij het protein of interest(POI) ingebouwd[2/3]. Vervolgens is auxine nodig, dit is een hormoon dat voorkomt in planten en activeert de binding tussen TIR1 en de AID-tag. Aan TIR1 bindt het E3 ubiquitin ligase SCF complex (wat beide geconserveerd is in gist) aan de AID-tag. Dit resulteert in ubiquitinatie van een lokalisatie sequentie voor het proteasoom. Hierdoor vindt proteasoom gemedieerde degradatie plaats. In dit project wordt er een fusie eiwit gemaakt van chromatin assembly complex 1(CAC1) en AID-tag. CAC1 is een histon chaperon die een belangrijke rol speelt bij de opbouw van histonen, echter is er niet veel over bekend en moet er dus meer onderzoek naar gedaan worden[4/5]. Hieruit luidt de onderzoeksvraag, kan de AID-tag gebruikt worden als degradatie-systeem om onderzoek te doen naar de functies van het CAC1-gen?



Figuur 1. De degradatie van een eiwit door het AID systeem. Toevoeging van Auxine leidt tot polyubiquitinatie van de AID tag, waardoor het eiwit verplaatst wordt naar het proteasoom. En daar afgebroken wordt.

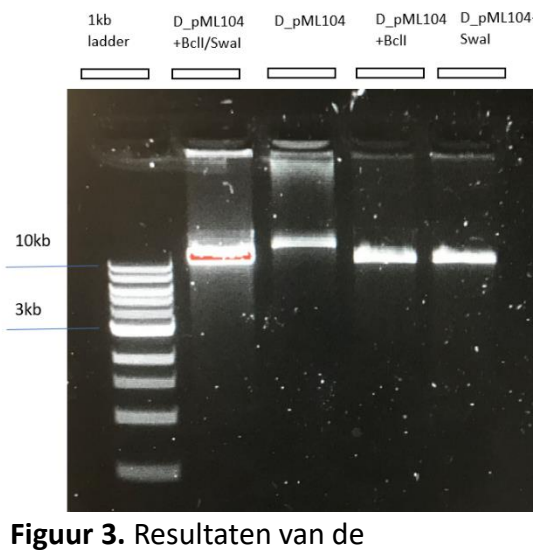
Onderzoeksstrategie



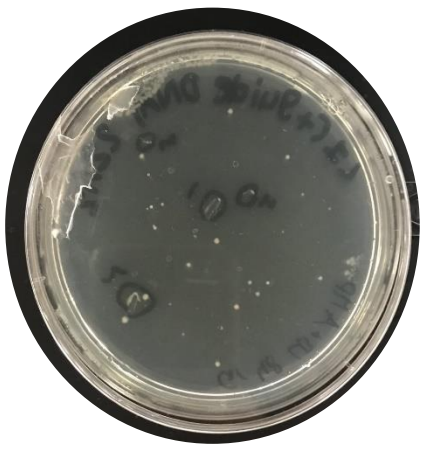
Figuur 2. Flowschema van de PRO praktijken

Digestie, ligatie en transformatie van DAM_PML104

- In figuur 3 is te zien dat BclI en SwaI het plasmide succesvol hebben opengeknipt, hierdoor kan het gRNA in het plasmide geligeerd worden
- In figuur 4 is kolonie groei te zien, na transformatie met DAM_pMl104+gRNA



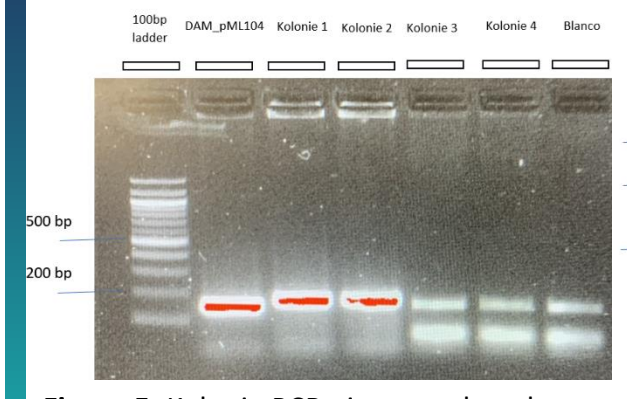
Figuur 3. Resultaten van de digestie op DAM_pML104 na het runnen van een 1% agarose gel.



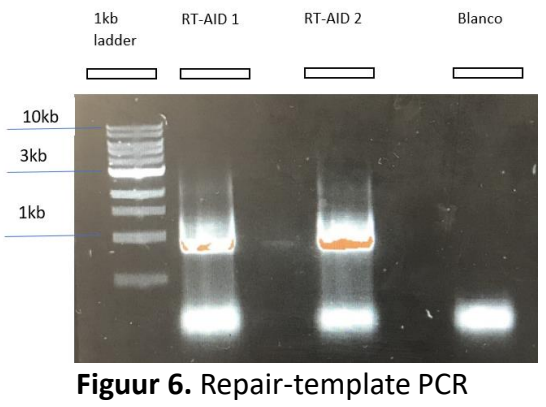
Figuur 4. Transformatie van DAM(-)DH5alpha cellen met DAM_pML104 + gRNA

Kolonie-PCR en repair template PCR

- De ligatie is op DNA-niveau gecontroleerd met een kolonie PCR
- In figuur 5 is te zien dat kolonies 1/2 een hoger bandje hebben dan het plasmide zonder de guide
- In figuur 6 is een bandje op ongeveer 1kb te zien, dit is de verwachte grootte van het AID-tag PCR product

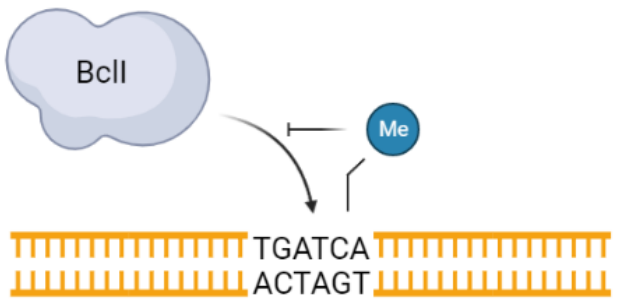


Figuur 5. Kolonie PCR uitgevoerd op de getransformeerde kolonies uit figuur 4 en DAM_pML104 zonder het gRNA



Figuur 6. Repair-template PCR waarbij een AID-tag PCR product is gevormd

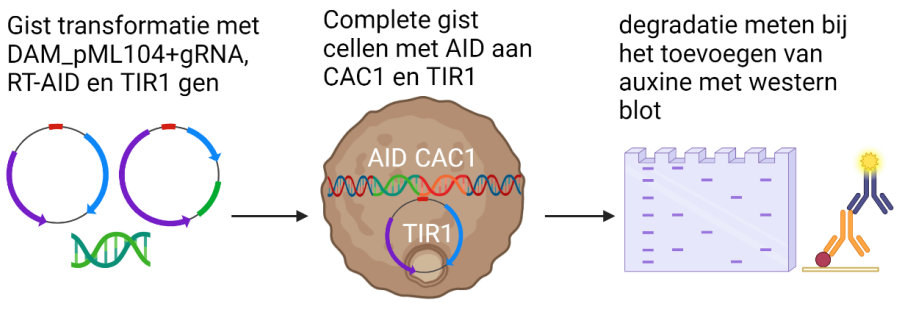
Discussie en vervolgonderzoek



Figuur 7. Methylatie(Me) op de restrictie site voor BclI, waardoor BclI niet kan knippen.

- pMl104 was geïsoleerd uit DAM(+) DH5a-cellen, resulteerde in een gemethyleerde restrictie site voor BclI
- Hierdoor kon BclI niet knippen
- De oplossing hiervoor was pML104 transformeren in <u>DAM(-) DH5a-cellen</u>

- DAM_pMl104+gRNA, RT-AID en TIR1 moeten nog getransformeerd worden in gist cellen
- Door middel van een western blot kan de werking van



Figuur 8. Flowschema voor het vervolgonderzoek

Conclusie

Er kan nog geen antwoord worden gegeven op de onderzoeksvraag, wel is er een kloneer strategie van het gRNA in DAM_pML104 gemaakt. Voordat er een antwoord op de onderzoeksvraag geformuleerd kan worden moet het eerder benoemde vervolgonderzoek uitgevoerd worden.

Referenties

1. Shetty A, et al. Current protocols in molecular biology 2019;**128**:e104.
2. Botstein D, et al. Science. 1997;**277**:1259-60.
3. Akhmetov A, et al. Bio-protocol 2018;**8**:e2765.
4. Mattiroli, F., Et Al. eLife, 2017, *6*, e22799.
5. Sauer, P. V., Gu, Y., Liu, W. H. Et Al. M. E. 18-09-2018. *NAC*, *46*(19), 9907–9917.