

Сравнение систем OsTIR1 и AtAFB2 ауксин-зависимой деградации белков хроматина в клетках млекопитающих

Научный руководитель – Юнусова Анастасия Маратовна

Афонникова Светлана Дмитриевна

Студент (бакалавр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия
E-mail: sweta-da@mail.ru

В последнее время системы ауксин-зависимой деградации белков набирают все большую популярность среди исследователей [1]. Такие системы удобны для изучения функций белков - простое добавление растительного гормона ауксина в культуральную среду позволяет достичь быстрого и эффективного удаления интересующего белка, который должен быть слит со специальным доменом для деградации.

Самые популярные варианты таких систем созданы на основе ауксин-связывающих растительных белков F-боксов (AFB-белки): OsTIR1 и AtAFB2 [1], [2]. Их экспрессию также необходимо обеспечить в клетках. Эти системы показали высокую эффективность деградации на различных модельных объектах.

В нашем исследовании мы использовали обе системы для ауксин-зависимой деградации белков комплексов когезина и конденсинов Rad21 и SMC2, соответственно. Мы проанализировали динамику их деградации в эмбриональных стволовых клетках мыши (mRad21, mSMC2, mCapH, mCapH2) и в гаплоидной линии человека HAP1 (hRad21, hSMC2).

В наших условиях система AtAFB2 показала наибольшую эффективность для обоих типов клеток. Уже через 30-60 минут мы наблюдали почти полное снижение количества целевых белков. Однако мы обнаружили, что по мере культивирования эффективность деградации белков снижается из-за увеличения доли клеток, нечувствительных к ауксину. Мы показали, что это происходит из-за уменьшения уровня экспрессии AFB-белков. Даже встройка кассет, кодирующих AFB-белки, в локус AAVS1 не обеспечивала стабильность их экспрессии.

Также мы показали влияние pH культуральной среды на степень деградации белков при использовании системы AtAFB2. При значениях pH больше 8,6 система ингибируется, из-за чего деградации целевого белка не происходит. В то же время, при низких значениях pH (в условиях стандартного закисления среды при культивировании) мы наблюдали незначительный уровень деградации целевых белков даже при отсутствии ауксина.

Таким образом, в нашей работе мы показали необходимость периодической культивирования клеточных линий в среде с селективным антибиотиком для предотвращения снижения экспрессии AtAFB2 и восстановления чувствительности клеток к ауксину.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00840

Источники и литература

- 1 K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, and M. Kanemaki, "An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells," Nat. Methods, vol. 6, no. 12, pp. 917–922, 2009, doi: 10.1038/nmeth.1401.
- 2 S. Li, X. Prasanna, V. T. Salo, I. Vattulainen, and E. Ikonen, "An efficient auxin-inducible degron system with low basal degradation in human cells," Nat. Methods, vol. 16, no. 9, pp. 866–869, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0512-x.