



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Auxinak induzitutako degron (AID)
sistemaren garapena funtzio
ezezaguna duen proteina baten
testuinguruan**

*Alejandro García-Aldama,
Endika De la Iglesia,
Asier Fullaondo, Jone Mitxelena
eta Ana María Zubiaga*

145-152 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.19>



Auxinak induzitutako *degron* (AID) sistemaren garapena funtzio ezezaguna duen proteina baten testuinguruan

García-Aldama, A.^{1*}; De la Iglesia, E.^{1*}; Fullaondo, A.¹; Mitxelena, J.² eta Zubiaga, A.M.¹

¹*Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*

²*Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Bizkaia*

**Egile hauen parte-hartzea berdina izan da
alejandro.garciad@ehu.eus*

Laburpena

Auxinak induzitutako *degron* (AID) sistema proteinen kantitatearen murrizketa modu kontrolatuan lortzeko teknologia da, proteinen funtzioa aztertzeko aukera ematen duena. AID sistemari esker, mAID domeinua fusionatuta duten proteinak modu azkarrean degradatu daitezke, auxina molekula gehituz gero. Auxina degradazio sistemaren aktibatzaile gisa erabiltzen da eta sistemaren kontrola ahalbidetzen du. Lan honetan, AID sistema martxan jartzea lortu da *TEDC2* genearen funtzioa ikertzeko asmoz. *TEDC2* endogenoari mAID-mClover3 etiketa gehitu zaio CRISPR/Cas9 teknologia erabilita eta *TEDC2*-mAID-mClover3 fusio proteina eratu da. *TEDC2*-mAID-mClover3 zentrioloetan kokatzen dela frogatu dugu, eta auxina gehitzean proteina modu kontrolatuan degradatzea lortu da.

Hitz gakoak: *degron*, proteinen degradazioa, auxina, genomaren edizioa, *TEDC2*.

Abstract

Auxin induced degron (AID) system is a technology that allows the conditional depletion of a protein, being particularly useful for the functional analysis of uncharacterised proteins. In cells expressing the OsTIR1 plant protein, it is possible to degrade mAID-fused proteins with a very short half-time in the presence of auxin. In this work, we have successfully developed the AID system using TEDC2 gene as an example, thanks to its tagging with mAID-mClover3 by CRISPR/Cas9. In this way, TEDC2 has turned out to be located in the centrioles and, at the same time, it has been possible to achieve its depletion by the addition of auxin.

Keywords: degron, protein degradation, auxin, genome editing, TEDC2.

1. Sarrera eta motibazioa

Giza Genoma Proiektuari (GGP) esker, gizakiaren genomak 20.000-25.000 gene aurkitu ziren (Naidoo et al., 2011), zelulen funtzionamenduaren eta oinarritzko egituren arduradunak direnak. Aldi berean, GGPak genetza hartzeko baldintzak betetzen zituzten beste DNA eskualde batzuk identifikatzeko aukera eman zuen, nahiz eta benetako geneak zirenetz jakin ez. Sekuentzia horiek, teorikoki itzuliak izateko potentzialtasuna dutenak, ORF (Irakurtarau Irekia) izenarekin ezagutzen dira. Transkriptomika esperimenduek ORF horien mRNA molekulak identifikatu dituzte eta proteomikakoek ORF horiei dagozkien peptidoak ere, beraz, ORF batzuetarako, froga nahiko daude benetazko gene funtzionalak direla esateko. Hala ere, askoren funtzioa ezezaguna da oraindik.

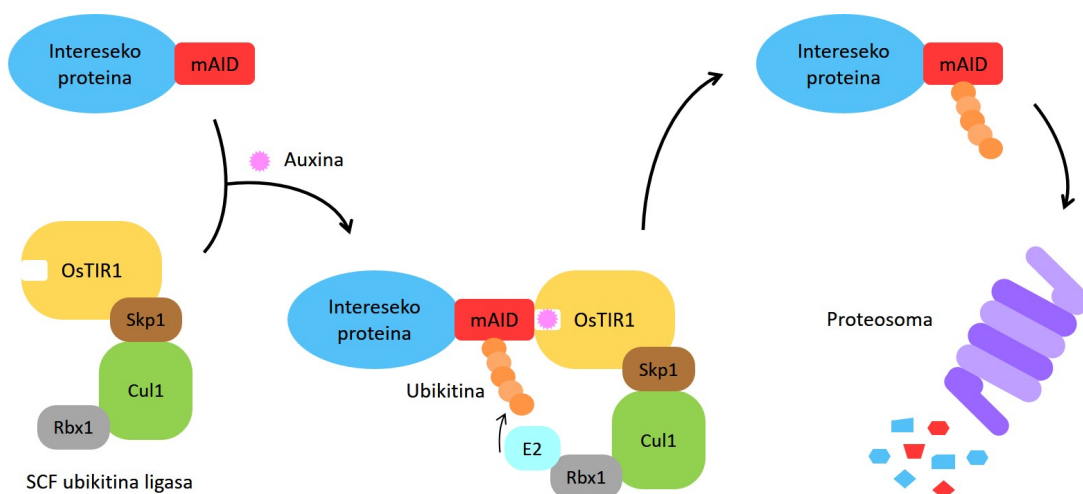
Geneen funtzioa karakterizatzeko gehien erabiltzen den estrategia, genearen isilarazpena da (Alberts et al., 2002). Isilarazpena, orokorrean *knock-down* izenarekin ezagutzen dena, gene produktuak modu itzulgarrian ezabatzea aukera ematen duen metodologia da. Horrela, isilarazpenaren ondorioz aldatzen den prozesu biologikoak ideia bat ematen digu isilarazitzeko genearen funtzioaz. Klasikoki interferentziazko RNAk (iRNA) erabili dira geneen adierazpen-maila murrizteko zeluletan aldaketa genetikorik eragin gabe (Agrawal et al., 2003). iRNA molekulen efektua intereseko genearen mRNA degradatzerakoan lortzen da. Denborarekin gene horren produktu proteikoa desagertuko da, proteina sintetizatzeko beharrezkoa den mRNA ez dagoelako. Teknika erraza izan arren, zenbait muga aurkeztu ditu: askotan isilarazpen partzialak lortzen dira, *off-target* efektuak gertatzen dira interesekoa ez den genea isilarazten

denean, isilarazpena iragankorra da eta iRNA bide endogenoaren neurritz gaineko aktibazioak albo-ondorioak eragin ditzake (Fellmann eta Lowe, 2014).

iRNA teknikaren mugak gaintzeko asmoz, azken hamarkadetan geneen adierazpena guztiz ezabatzeko teknika berriak agertu dira. Horien artean, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein-9 nuclease* (CRISPR/Cas9) nabarmentzen da. Genomak editatzeko teknika honek *knockout* deituriko lerro zelularrak sortzeko aukera ematen du, non intereseko genearen adierazpena erabat desagertarazten den (Mali et al., 2013). Hala ere, gene batzuk zelulen bideragarritasunerako funtsezkoak dira edo garrantzi handiko prozesuetan inplikaturik daude, hala nola ziklo zelularrean, eta beraz, ezin daitezke modu iraunkorrean isilarazi (Natsume et al., 2016). Kasu hauetan, proteina kantitatearen murrizketa baldintzatua baliagarria izan daiteke analisi funtzionalak egiteko.

Proteina kantitatearen murrizketa baldintzatua *degron* izeneko domeinu desegonkortzaile bat fusionatuz lor daiteke. Hainbat *degron* domeinu mota daude, modu ezberdinetan kontrolatu daitezkeenak, hala nola, beroa edo molekula txikiak erabilita (Kanemaki, 2013). Existitzen diren *degron* teknologien artean, auxinak indusitutako *degron* (AID) teknologia dago (Nishimura et al., 2009), arrozaren TIR1 (OsTIR1) proteinan eta mini-AID (mAID) izeneko *degron* domeinuan oinarritzen dena (1. irudia). OsTIR1 proteina SCF (Skp1-Cullin-F-box) ubiquitina ligasa konplexuaren parte da, eta aktibatzeko auxinaren beharra du. Behin aktibo, mAID domeinua duten proteinetara lotu eta poliubikitinatu ondoren, proteosomara bideratuko ditu, bertan degradatuak izan daitezkeen. Hortaz, intereseko proteinari mAID domeinua fusionatuko balitz, posiblea litzateke modu indusigarri, itzulgarri eta azkarrean proteina ezabatzea, 10-20 minutuko bataz besteko bizitzarekin (Holland et al., 2012).

1. irudia. AID sistemaren funtzionamendua. Auxina dagoenean, SCF ubiquitina ligasak mAID domeinua duten proteinak poliubikitinatuko ditu, ondoren proteosoman degradatuko direnak.



Lan honen helburua AID sistema martxan jartzea da, funtzio ezezaguneko proteina bat aztertzeko asmoz. Adibide bezala, *TEDC2* (Tubulina Epsilon eta Delta Konplexu 2) genea aukeratu da, lehenago *C16orf59* deiturikoa. Momentuz, informazio gutxi dago ORF honi buruz, bakarrik dakigu gainadieraztean zentrioloetan kokatzen dela eta bere *knockout*-ak zentrioloetako ezeگونkortasuna eragiten duela (Breslow et al., 2018).

AID sistemak *TEDC2* rekin arraskasta izanez gero, metodologia klasikoaren bitartez aztertzeko zailak diren funtzio ezezaguneko ORFak karakterizatzeko ate berri bat irekiko litzateke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helbururik garrantzitsuenak ORF baten funtzioa aztertu ahal izateko AID sistema martxan jartzea da. Kasu honetan, *TEDC2* genearen produktu endogenoa fluoreszentiarekin markatuko da. Aldi berean, *TEDC2* endogenoa mAID domeinuarekin fusionatuko da degradazio indusigarria eta itzulgarria lortzeko. Artikulu honetan AID sistemaren garapenerako

metodologia zehatza azalduko da, beharrezkoak diren zelulen lorpenarekin hasita, sistemaren funtzionamendua ziurtatzeko analisietara iritsi arte. Gainera, *TEDC2* endogenoaren kokapen zelularra zehaztuko da.

3. Ikerketaren muina

3.1. DLD1 OsTIR *TEDC2*-mAID-mClover3 zelulen lorpena CRISPR/Cas9 erabiliz

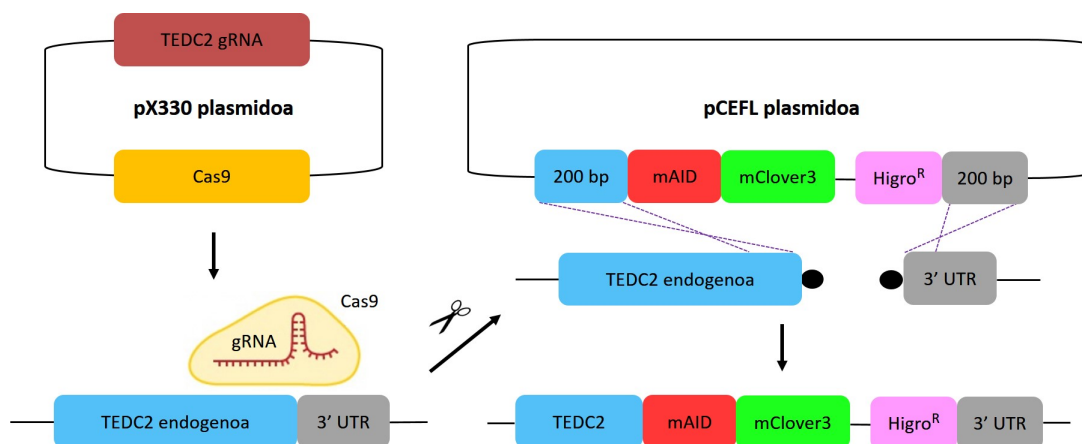
AID sistema martxan jartzeko, jadanik OsTIR1 transgenea genomari sartuta zuten DLD1 zelulak aukeratu ziren. Zelula hauek ondesteko minbizi batetik eratorritako giza-zelulak dira, kariatipo egonkorra mantentzeagatik nabarmentzen direnak.

mAID domeinua *TEDC2* proteinari fusiionatu ahal izateko, CRISPR/Cas9 erabili zen. Horretarako, gRNA molekula bat diseinatu zen, *TEDC2*ren amaierako kodoiaren alboan kokatzen den sekuentzia batekiko osagarria. BbsI murrizketa-entzima erabilita, gRNA hori, Cas9 entzima kodetzen duen pX330 plasmidoaren barruan txertatu zen.

Plasmido horrez gain, bigarren plasmido bat ere diseinatu zen CRISPR/Cas9 sisteman erabiltzeko. Bigarren plasmido horretarako, *TEDC2*ren amaierako kodoitik ur gora eta ur behera dauden 200 nukleotidoak aukeratu ziren, pCEFL plasmidoaren barruan sartu zirenak AgeI eta NotI murrizketa-entzimak erabilita. Hurrengo pausua, mAIDren sekuentzia kodetzailea pCEFL plasmidoan sartzea izan zen. Horretarako, intereseko DNA egitura PCR bidez klonatu zen, mAID domeinuaz aparte beste bi elementu zituen: mClover proteina fluoreszentearen genea eta higromizinarekiko erresistentzia-genea. Lortutako DNA sekuentzia (mAID-mClover3-Higro^R) pCEFL plasmidoaren barruan sartu zen BamHI murrizketa-entzima erabilita.

Behin klonazioekin amaituta, DLD1-OsTIR1 zelulak diseinatutako bi plasmidoekin (pX330 eta pCEFL) transfektatu ziren (2. irudia). Modu horretan zera espero da, pX330 plasmidotik transkribatutako gRNAk, Cas9 entzima *TEDC2*ren azken exoira gidatzea, eta entzimak DNAa moztea. Sortutako bi muturrak berriro lotzeko, eta beraz, DNA egitura konpontzeko, zelulak pCEFL plasmidoa erabiliko luke txantilo gisa, bere baitan *TEDC2*ren azken 200 nukleotidoak eta 3'UTRaren (*untranslated region*) lehenengo 200 nukleotidoak baitaude. Konponketaren ondorioz mAID-mClover-Higro^R etiketa *TEDC2* genearen atzean ezarriko litzateke, horrela fusio-proteina bat sortuz, *TEDC2*-mAID-Clover-Higro^R, hau da, *TEDC2* genea etiketatua, eta baita higromizinarekiko erresistentzia ematen duen genea ere. Transformatutako zelulen hautespena burutzeko, zelulak higromizinarekin tratatu ziren (100µg/ml). *TEDC2* genea etiketatua zuten zelulak antibiotikoarekiko erresistenteak izango lirateke eta beraz horiek soilik haziko lirateke. DLD1 zelulak diploideak direnez, biziraun dezaketen zelulak bi motatakoak izan daitezke: homozigotoak (*TEDC2*ren alelo biak etiketa daramatenak) edo heterozigotoak (alelo bakarria etiketatua eta bestea alelo basatia dutenak).

2. irudia. DLD1 OsTIR1 zelulak eraldatzeko erabilitako CRISPR/Cas9 sistema. gRNAk *TEDC2*ren azken exoira gidatuko du Cas9 bertan mozteko. Sortutako kaltea konpontzeko, zelulak pCEFL plasmidoa erabiliko du txantilo gisa eta mAID-mClover3-Higro^R *TEDC2*ren ostean sartuko da.

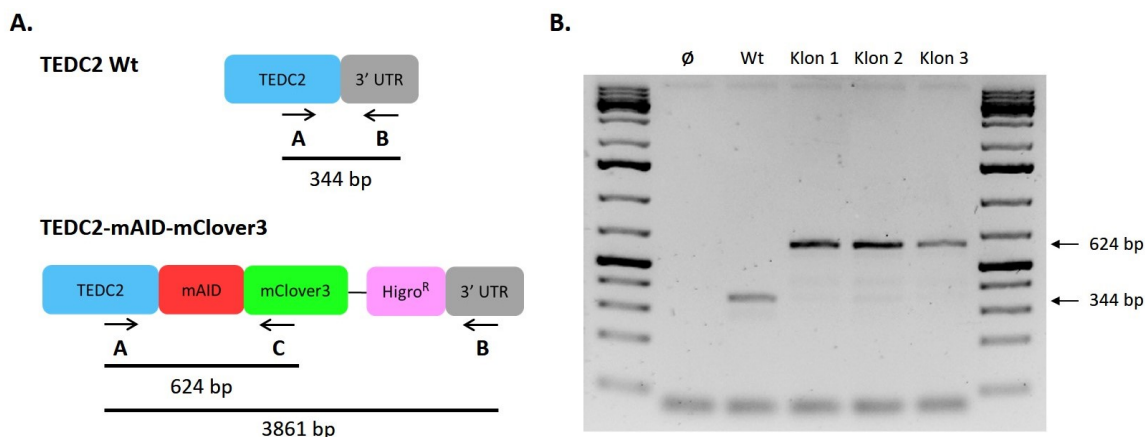


Zelula homozigotoen kopurua aberasteko asmoz erabili zen estrategia ondorengoa izan zen: Zelula homozigotoek *TEDC2* alelo biak etiketatuta dituztenez, espero da beraien mClovererrek ematen duen fluoreszentzia-seinalea bikoitza izatea. Beraz, fluoreszentzia-seinale handia duten zelulak aukeratuz, zelula horiek homozigotoak izateko aukerak emendaturik daude. Achucarro zentroko *Cell Sorting* zerbitzua erabiliz, fluoreszentzia-seinale berde altuena zuten zelulak aukeratu ziren. Zelula horietatik hasita mugako-diluzio bat burutu zen 96-putzuko plaketan, hau da, putzuko zelula bakarra ereinik. Zelulak bi astez utzi ziren hazten eta zelula-kopuruak handitu ahala plaka handiagoetara pasatu ziren.

3.2. PCR bidezko klonen karakterizazioa

Gehien hazi ziren klonak karakterizatzeko, haien DNA genomikoa DirectPCR (Viagen Biotech) izeneko lisi tanpoiarekin eta K proteinasa (0,4 mg/ml) gehituz erauzi zen, 55°C 6h eta 85°C 45min inkubazio-denborak erabiliz. Behin DNA genomikoa erauzita, PCRa burutu zen hiru hasle ezberdinekin: “A”, *TEDC2*ren azken exoira lotzen dena; “B”, *TEDC2*ren 3'UTRarekiko osagarria dena; eta “C”, mClover sekuentziara lotzeko gai dena (3A. irudia). Hortaz, zelula batek *TEDC2* genea etiketuta badauka, “A” eta “C” hasleek 624 base-pareko (bp) PCR produktu bat emango lukete. Berriz, *TEDC2* basatia kontserbatzen duten zeluletan, “A” eta “B” hasleak erabilita, 344 bp-ko banda bat anplifikatuko litzateke. Printzipioz, “AB” hasleek badute etiketatutako *TEDC2* geneari lotzeko gaitasuna, baina PCRa ez da anplifikaziorik lortzen orokorrean, produktua handiegia delako (3861bp).

3. irudia. Klonen DNArekin burututako PCRa. A. *TEDC2* basatia (Wt) eta *TEDC2*-mAID-mClover3 bereizteko diseinatutako hasleak eta horiekin esperotako anplikoia. B. Etiketarik gabeko DLD1 zeluletan (Wt) *TEDC2* basatiaren banda (344bp) bakarrik agertzen den bitartean, aukeratutako hiru klonak 624bp-ko banda aurkezten dute, eta beraz, *TEDC2*-mAID-mClover3 fusio-proteinarako homozigotoak dira.



PCR erreakzioa aurrera eramateko ondoko baldintzak erabili ziren: 50ng DNA genomiko, 0,2µM “A” haslea, 0,3µM “B” haslea, 0,1µM “C” haslea, 0,5mM dNTPak, 50mU/µl DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher), Taq polimerasa tanpoia (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl), 0,5mM MgCl₂ eta 0,13M betaina; 50µl-tan. Anplifikazioa burutzeko Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) termozikladorea erabili zen 30 zikloz: 95°C 1min, 60°C 1min eta 72°C 40s-ko baldintzak erabilita. Kontrol gisa, jatorrizko DLD1 OsTIR1 zeluletatik erauzitako DNA genomikoa eta DNArak gabeko laginak erabili ziren.

Anplifikatuak %1,5 agarosadun geletan migratu ziren (3B. irudia). Espero bezala, DNArak gabeko kontrol negatiboak (Ø) ez zuen inolako bandarik aurkeztu, kutsadurarik ez egotearen seinale. Bestalde, eraldatu gabeko DLD1 OsTIR1 zelulek *TEDC2* alelo basatiaren banda baino ez zuten aurkeztu (344bp). Hortaz, erabilitako bi kontrolak esperotako emaitza eman zuten. Aztertutako zelula-klon guztiek 624bp-ko banda erakutsi zuten, CRISPR/Cas9 teknikaren bitartez etiketa gehituta zutenaren frogara. Gainera, 344bp-ko banda aurkeztu ez zutenez, homozigotoak direla ondorioztatu genuen, hau da, *TEDC2*ren bi aleloek mAID-mClover3-Higro^R etiketa zutela.

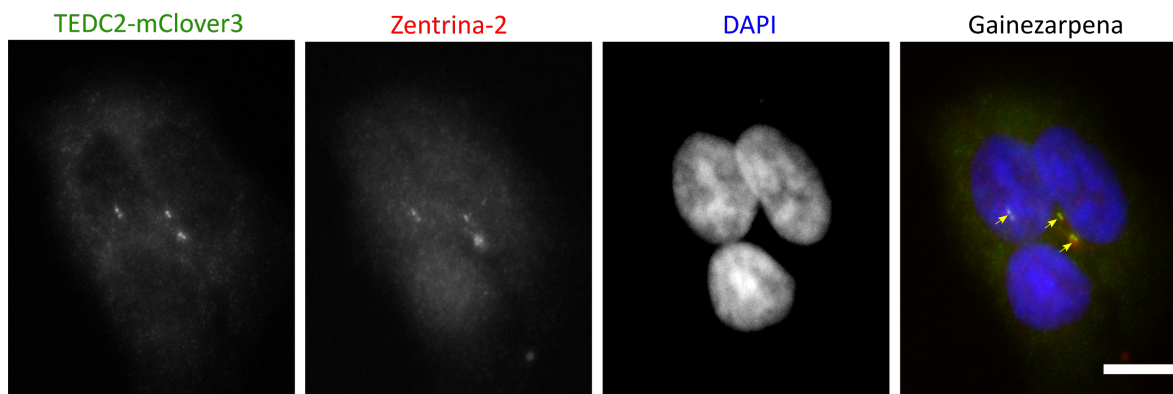
Emaitza hauek sistema prest zegoela adierazi zuten. Honek ahalbidetuko luke bai TEDC2ren kokapena finkatzea eta bai klon hauei auxina gehituz gero, TEDC2ren degradazioa bultzatzea.

3.3. TEDC2-mAID-mClover3ren kokapenaren eta degradazioaren azterketa fluoreszentsiako mikroskopia erabilita

TEDC2 proteinaren kokapen zelularra ikuskatzeko, zelulak mikroskopia behatzeko prestatu ziren. TEDC2 endogenoa mClover3-rekin markatuta zegoenez mClover detektatzen zuen antigorputza erabili zen tindaketan. Zelulak -20°C metanolarekin fixatu ziren 5 minutuko izotz inkubazioarekin, zitoeskeletoaren egitura zuzena mantentzeko. Fixatu ondoren, zelulak ordu batez blokeatu ziren %3 BSA zuen PBStan. Blokeatu eta gero, immunofluoreszentzia tindaketarako bi antigorputz erabili ziren, anti-GFP (PABG1; Chromotek), mClover3 detektatzen zuena, eta anti-Zentrina-2 (04-1624; Millipore), zentrioloen mutur distalaren markatzailea dena. Antigorputzak ordubetez inkubatu ziren, eta ondoren antigorputz sekundarioekin inkubazio berdina egin zen. Kasu honetan anti-sagu-AlexaFluor594 (Invitrogen) eta anti-untxi-AlexaFluor488 (Invitrogen), zentrina eta mClover3 tindatzeko, hurrenez hurren. Mikroskopiako muntaketa egiteko VectaShield-DAPI (VectorLabs) erabili zen. Laginak Nikon Eclipse E400 fluoreszentsia-mikroskopiorekin aztertu ziren.

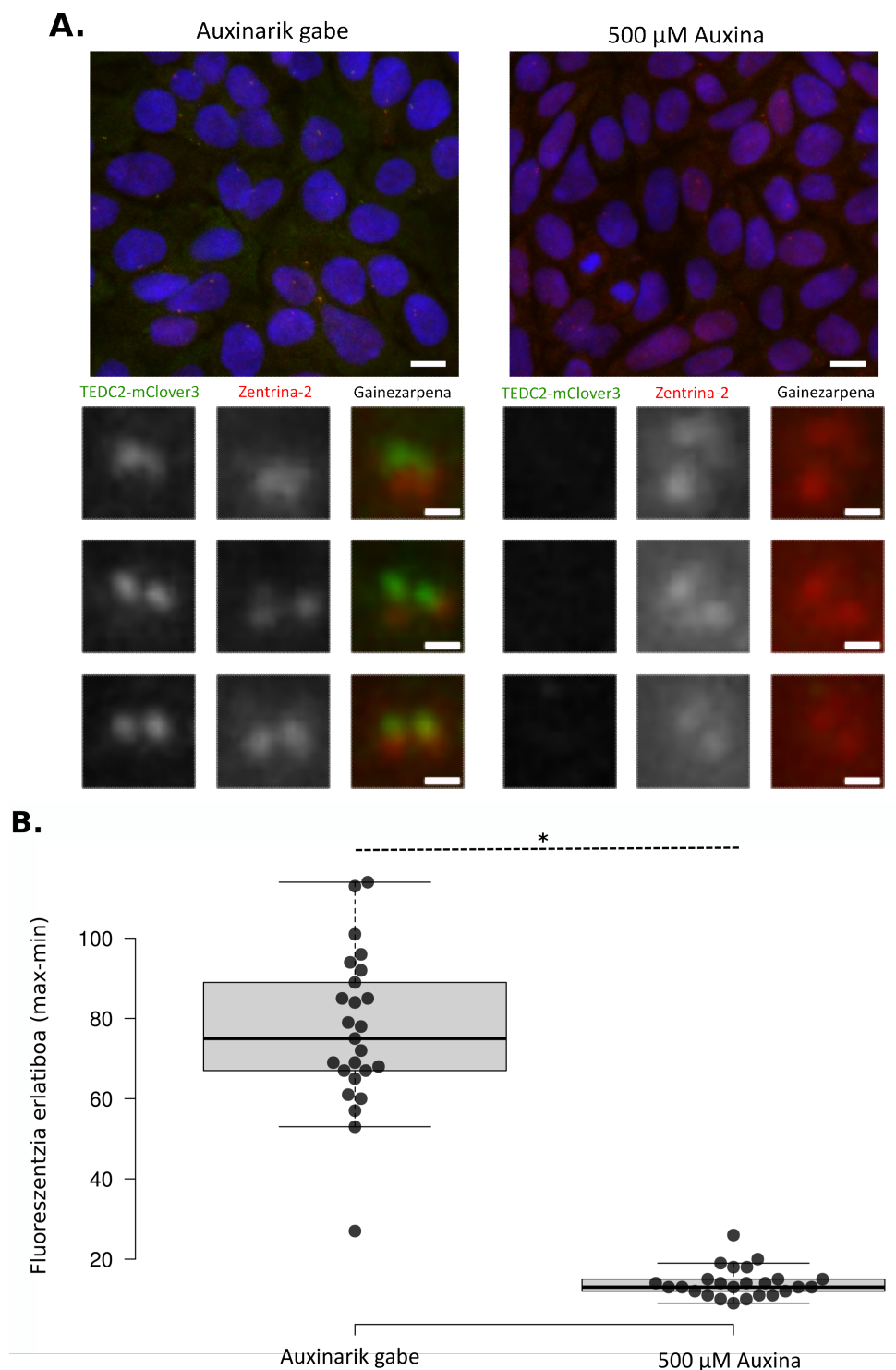
Mikrografietan seinale berdea (TEDC2 seinalea) eta gorria (zentrina-2 seinalea) batera ikusten ziren (4. irudia). Hortaz, TEDC2 endogenoa, ordura arte ez zena inoiz ikusi (antigorputzik ez baitago), zentrioloetan kokatzen zela frogatu ahal izan zen; etiketa fluoreszente batekin gainadieraztean ikusi zen bezala (Breslow et al., 2018). Hala ere, zentrinaren eta TEDC2ren arteko kolokalizazioa partziala baino ez zen, TEDC2k zentrinak baino kokapen proximalagoa zuela zirudielako, zentrina zentrioloen atal distalean aurkitzen den proteina baita. Beraz, TEDC2 zentrioloen atal proximalean kokatzen dela ondorioztatu daiteke. Gainera, zentriolo bikote osoa berdez ikusteak adierazten du TEDC2 kokatzen dela ama eta alaba diren zentriolo parean.

4. irudia. TEDC2 endogenoa zentrioloetan kokatzen da. Argazkiak 40x handipenarekin atera ziren: 600ms esposizioarekin kanal berdea, 600ms gorria eta 10ms urdina. Eskala-barra: 10µm. Gezi horiek zentriolo bikoteak nabarmentzen dituzte. TEDC2k zentrinak baino kokapen proximalagoa dauka ama eta alaba zentrioloetan.



Auxinak induzitutako TEDC2ren murrizketa aztertzeko, mikroskopiako esperimentua errepikatu zen. Kasu honetan bi lagin jarri ziren, bata auxinarik gabe eta bestea 500µM auxinarekin, eta 24 ordu ondoren, mikroskopiako prestaketa egin zen. Lagin bi hauen analisirako baldintza berdinak erabili ziren (600ms-tako esposaketa eta 4.5 gain). Emaitza argia zen: TEDC2 endogenoa guztiz degradatzen zen auxina gehitzerakoan, seinale berdea ia osorik desagertzen zelako (5A. irudia). Hortaz, AID sistema TEDC2 zentrioloetatik oso modu eraginkorrean degradatzeko gai da. Grafikoan (5B. irudia) ikusten den moduan (Fiji softwarearen bidezko fuoreszentziaren kuantifikazioa erabiliz), auxinak kontroleko hondo-zarataren pareko maila batera jaisten du TEDC2ren seinalea.

5. irudia. Auxina gehitzean TEDC2 endogenoa degradatzen da. A. 40x handipenarekin ateratako argazkiak: 600ms esposizioarekin kanal berdea, 600ms gorria eta 10ms urdina. Eskala-barra: 10µm; zoom-a 600nm. B. Seinale berdearen intentsitatea hondo-zarataren aurka.



Emaitza hauetatik atera daitekeen ondorio nagusia ondokoa da: ezezaguna den edozein proteina endogeno CRISPR/Cas9 erabiliz markatu daiteke, eta gainera, mAID-rekin etiketa izanik, modu eraginkorrean eragin daiteke bere degradazioa.

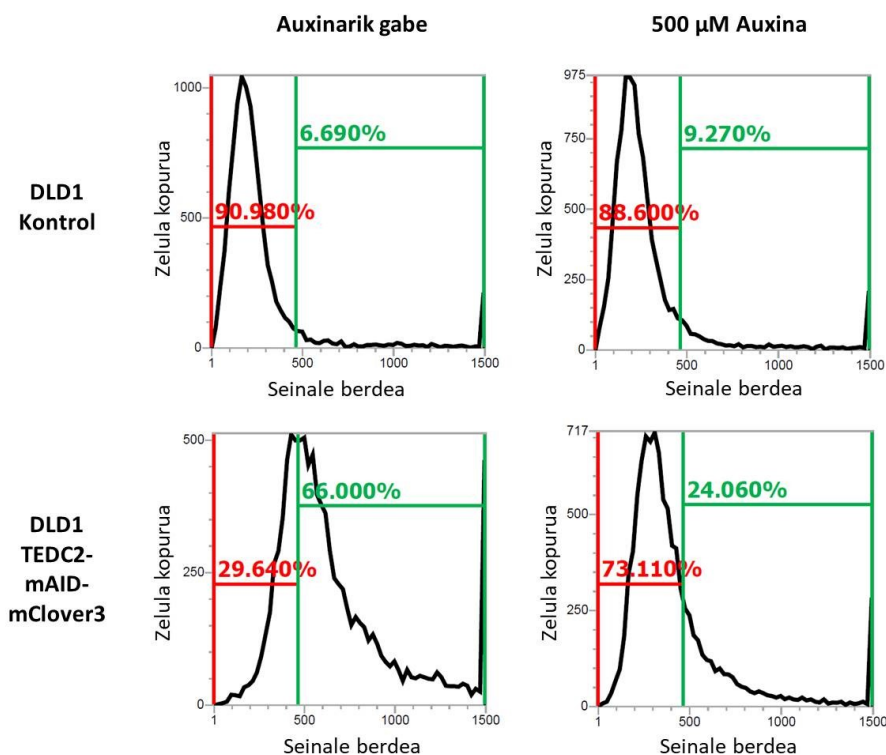
3.4. TEDC2-mAID-mClover3ren degradazioaren baieztapena fluxu-zitometroaren bitartez

Mikroskopiazko analiziaz gain, AID sistemaren efizientzia fluxu-zitometroaren bitartez frogatu zen ere (6. irudia). Horretarako, eraldatu gabeko DLD1 OsTIR zelulak (kontrola) eta

TEDC2 etiketatuta zuten zelula monoklonal homozigotoak plakeatu ziren, bi putzu bakoitzeko. Horietako batean 500 μ M auxina gehitu zen, beste putzuan tratamendurik ez. 24h geroago, zelulak %70 etanoleko PBStan fixatu ziren 4°C-tara. 10 minutuko inkubazioa eta gero, Attune NxT Flow (Invitrogen/Thermo Fisher) zitometrotik pasatu ziren, laserrak seinale berdea detektatzeko (λ_{ex} : 488 $\pm$ 5 nm) baldintzak erabiliz. Guztira, 2x10⁴ zelula inguru aztertu ziren.

Kontrollean, zelulen %6,69-ak fluoreszentzia berdearen seinale positiboa agertzen zuen, eta auxina gehitzerakoan antzera mantendu zen portzentajea (%9,27 positiboak). DLD1 OsTIR TEDC2-mAID-mClover3 zeluletan, ordea, seinale berdea %66,00-ra igo zen, etiketa fluoreszentea edukitzearen ondorio. Gainera, zelula hauek auxinarekin tratatzean seinale berdearen galera handia nabaritu zen, %24,06ra jaitsi baitzen, kontrollean gertatzen ez zena. Hortaz, auxinak TEDC2-mAID-mClover3ren proteinaren mailaren degradazioa eragiten du modu nabarmenean, mikroskopiako emaitzekin bat datorrena.

6. irudia. DLD1 TEDC2-mAID-mClover3 zelulen seinale berdea % 66,00-tik % 24,06-ra murrizten da auxinarekin, kontrollean ezberdintasunak askoz txikiagoak izanda.



4. Ondorioak

AID sistema, CRISPR/Cas9rekin batera, oso tresna erabilgarria da edozein generen funtzioa aztertzeko. Izan ere, funtzio ezezaguneko ORFak karakterizatzeko abantaila asko aurkeztzen ditu, besteak beste:

- Gene endogenoa proteina fluoreszente batekin markatzen bada, modu erraz batean detektatu daiteke.
- mClover3ren (edo beste etiketa fluoreszente baten) seinalea mikroskopiarekin eta zitometroarekin detektagarria da, eta horrek analisi funtzionalen azterketa errazten du.
- Lortutako proteinaren degradazioa espezifiko eta azkarra da eta, CRISPR/Cas9 *knockout*-ak ez bezala, indusagarria eta itzulgarria ere.

Lan honen bitartez, AID sistemak ORFak aztertzeko balio duela frogatu da lehenengo aldiz. Bestalde eta adibide bezala, TEDC2 proteina endogenoaren kokapen fisiologikoa zentrioloak direla frogatu da, gainadierazpenarekin aurkitu zen berdina (Breslow et al., 2018).

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

TEDC2rekin jarraituz, etorkizuneko lan batean proteina horren funtzioa zein den ikertu beharko litzateke, baita zer nolako erlazioa daukan zentrioloen egonkortasunarekin. Interesgarria izango litzateke TEDC2ren degradazioaren zinetika bat egitea epe labur eta luzean, proteina horren faltak denboran zehar eragiten duen fenotipoa aztertzeke. Era berean, ziklo zelularrean zehar zer nolako erregulazioaren menpe dagoen ikertu daiteke. Bestalde, TEDC2k parte-hartzen duen bidezidorra zehazteko, bere interaktoreak ezagutzea lagungarria izan liteke, *GFP-Trap* bidezko mClover3-ren immunoprezipitazioarekin eta masa espektrometroarekin proteomika esperimentua eginez zehaztu litezkeenak. Azkenik, behin AID sistema optimizatuta, edozein ORF klona liteke TEDC2rekin burututako antzeko azterketa sakona eta zehatza egiteko.

6. Erreferentziak

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. eta Mukherjee, S. K. (2003): RNA interference: biology, mechanism and applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657-685.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. eta Walter, P. (2002): *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York.
- Breslow, D. K., Hoogendoorn, S., Kopp, A. R., Morgens, D. W., Vu, B. K., Kennedy, M. C., Han, K., Li, A., Hess, G. T., Bassik, M. C., Chen, J. K. eta Nachury, M. V. (2018): A CRISPR-based screen for Hedgehog signaling provides insights into ciliary function and ciliopathies, *Nature Genetics*, 50(3), 460-471.
- Fellmann, C. eta Lowe, S. W. (2014): Stable RNA interference rules for silencing, *Nature Cell Biology*, 16(1), 10-18.
- Holland, A. J., Fachinetti, D., Han, J. S. eta Cleveland, D. W. (2012): Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), E3350-3357.
- Kanemaki, M. T. (2013): Frontiers of protein expression control with conditional degrons, *Pflugers Archive: European Journal of Physiology*, 465(3), 419-425.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. eta Church, G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, 339(6121), 823-826.
- Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D. N. eta Ku, C. (2011): Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome, *Human Genomics*, 5(6), 577-622.
- Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y. eta Kanemaki, T. (2016): Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors, *Cell Reports*, 15(1), 210-218.
- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. eta Kanemaki, M. (2009): An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells, *Nature Methods*, 6(12), 917-922.

7. Eskerrak eta oharrak

DLD1 OsTIR1 zelulak Daniele Fachinettiren eskutik lortu ditugu. Ana María Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación RTI2018-097497-B-I00) eta Eusko Jaurlaritzako (Hezkuntza Saila. Erref.:IT1257-19) dirulaguntzak jaso ditu. Alejandro García-Aldama Eusko Jaurlaritzako doktoretza aurreko dirulaguntza baten jabea da (PRE 2020) eta Endika De La Iglesiak Espainiako Jaurlaritzako doktoretza aurreko dirulaguntza jaso du (FPU 2017). Jone Mitxelenak Ikerbasque *research fellow* (2020) doktoretza ondoko kontratua dauka.