

Proyecto: Desarrollo de estrategias novedosas para la degradación dirigida de proteínas en plantas mediante dTAG y HaloTag.

Investigadores: Lidia Orea Ordóñez y Jorge Lozano Juste.

Los PROTACs (PROteolysis Targeting Chimeras) son moléculas químicas capaces de degradar proteínas de manera dirigida. Constan de 3 partes: una que se une a la proteína diana, otra que se une a una E3-ligasa y un linker conectando ambas partes. Los PROTACs aproximan la proteína diana a la E3-ligasa, desencadenando su ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Estas moléculas ofrecen una alternativa muy ventajosa frente a los inhibidores tradicionales y aunque se conocen ampliamente en biomedicina, los PROTACs aún no se han aplicado en plantas.

En este proyecto de TFM se explorarán los sistemas **dTAG** y **HaloTag** (Fig. 1) como herramientas de degradación dirigida de proteínas en plantas. El sistema **dTAG** se basa en la fusión de la proteína diana a una variante de la proteína FKBP12 (**FKBP12^{F36V}**). El compuesto químico AP1867, presenta afinidad nanomolar por FKBP12^{F36V} y se ha combinado con pomalidomida para generar dTAG13, un PROTAC comercial. Este induce la formación del complejo ternario **proteína diana-FKBP12^{F36V} + dTAG13 + E3-ligasa (CRBN)** (Fig. 1A) y la posterior ubiquitinación y degradación de la proteína de fusión en modelos animales. Hemos obtenido resultados preliminares en protoplastos de *Arabidopsis* que muestran que la proteína de fusión **GFP-FKBP12^{F36V}** se degrada en un plazo de 4 horas tras el tratamiento con 50 nM de dTAG13, en colaboración con el Prof. Marco Trujillo (Hamburgo, Alemania).

Por otro lado, el sistema **HaloTag** es la segunda plataforma basada en etiquetas más utilizada para el desarrollo de PROTACs. HaloTag es una proteína que se une de manera muy eficiente e irreversible a compuestos con cloroalcanos. Estos compuestos se han combinado con pomalidomida para generar **HaloPROTACs**, que inducen la degradación de proteínas fusionadas a HaloTag (Fig. 1B).

En este TFM se utilizarán líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan GFP fusionada a las etiquetas dTAG (**35S::GFP-FKBP12^{F36V}**) y HaloTag (**35S::GFP-HaloTag**) para analizar la degradación de GFP (Fig. 1). Los niveles de GFP se analizarán mediante western-blot con anticuerpos específicos y microscopía confocal, tras el tratamiento con dTAG13 y HaloPROTAC. El uso de mutantes y tratamientos con inhibidores del proteasoma ayudará a confirmar los resultados. Además, se llevará a cabo el clonaje y validación de nuevas fusiones con las etiquetas dTAG y HaloTag y se estudiará su producción como proteínas recombinantes.

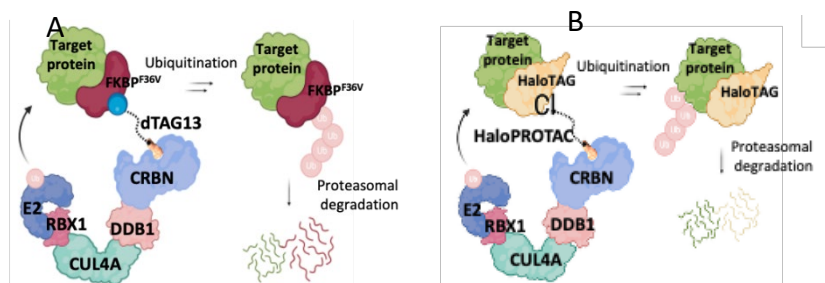


Figura 1. Representación de los sistemas de degradación dirigida de proteínas dTAG (A) (Nabet *et al.*, 2018) y HaloTag (B) (Ody *et al.*, 2023).

Información de contacto: lioror1@ibmcp.upv.es