



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Anexo II

TITULACIÓN: Grado en Biología

MEMORIA INICIAL DEL TRABAJO FIN DE GRADO

CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales

CURSO ACADÉMICO: 2014-15



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Sistema de expresión de proteínas a partir de productos de PCR sin necesidad de clonación previa en vectores de expresión eucariota.

1. DATOS BÁSICOS DE LA ASIGNATURA

NOMBRE: Trabajo Fin de Grado

CÓDIGO: 10216001

CARÁCTER: Obligatorio

Créditos ECTS: 12

CURSO: Cuarto

CUATRIMESTRE: Segundo

2. TUTOR/COTUTOR(en su caso)

Antonio José Caruz Arcos

3. VARIANTE Y TIPO DE TRABAJO FIN DE GRADO (Artículo 8 del Reglamento de los Trabajos Fin de Grado)

General / Experimental

4. COMPETENCIAS (*) Y RESULTADOS DE APRENDIZAJE

Competencias generales:

CG1, CG2, CG4, CG5, CG6, CG7, CG8, CG9, CG11, CG12

Competencias transversales:

CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT9, CT10

Competencias Específicas:

CE4, CE6, CE9, CE36, CE37, CE39, CE40, CE41

Resultados de aprendizaje

Resultado 216001A	Capacidad de integrar creativamente sus conocimientos para resolver un problema biológico real.
Resultado 216001B	Capacidad para estructurar una defensa sólida de los puntos de vista personales apoyándose en conocimientos científicos bien fundados.
Resultado 216001C	Destreza en la elaboración de informes científicos complejos, bien estructurados y bien redactados.
Resultado 216001D	Destreza en la presentación oral de un trabajo, utilizando los medios audiovisuales más habituales.
Resultado 216001E	Capacidad para realizar tareas especializadas en biología molecular y celular

5. ANTECEDENTES

Nuestro grupo ha desarrollado un método de expresión de productos de PCR directamente en el citoplasma de células de mamífero transfectadas, sin necesidad de clonar dicho producto en un plásmido de expresión eucariota. El método se basa en las siguientes premisas técnicas:



UNIVERSIDAD DE JAÉN

1. El extremo 5' de cualquier cebador de PCR puede aceptar un fragmento de ADN de secuencia no complementaria al fragmento a amplificar sin pérdida significativa de rendimiento en la amplificación. Esto puede incluir un promotor, dianas de enzimas de restricción o colas de poliadenina, etc...
2. Dos productos de PCR con una pequeña región solapante pueden ser mezclados y amplificados nuevamente con dos cebadores externos que se unen al extremo 5' del primer producto y extremo 3' del segundo. Generando un producto de fusión de ambos fragmentos de ADN.
3. Los denominados Internal Ribosome Entries (IRES) de varios virus con replicación citoplásmica permiten la traducción de ARNm en ausencia de un capping estándar en el extremo 5' del ARNm.
4. La ARN polimerasa del bacteriófago T7 puede ser eficientemente expresada funcionalmente en el citoplasma de células de mamífero.

Esta técnica permite la producción *in vitro* en cultivos celulares de la proteína env del VIH-1 para posteriormente poder determinar el tropismo viral del VIH-1 en el que no es necesario el uso de vectores de clonaje y, por tanto, simplifica dicho método. El método permite la amplificación del gen env, así como la producción funcional de la proteína correspondiente, a partir de una muestra aislada de un paciente infectado con el VIH-1, y lo hace de manera más directa y sencilla y en cantidades suficientes como para la determinación del tropismo viral en estudios de fusión célula-célula (formación de sincitios).

El método sencillo y se basa en 7 cebadores que son empleados en sucesivas reacciones de PCR. Las secuencias de dichos cebadores permiten la generación de un amplicón que comprende un promotor citoplásmico fuerte, una secuencia IRES, el gen env del VIH-1 y un poliA. El sistema requiere un tiempo de procesamiento inferior que el de los métodos conocidos en el estado de la técnica anterior y su coste es menor. Además, los métodos genotípicos usados hasta la fecha, como por ejemplo la secuenciación, son poco específicos. Tienen una especificidad baja con un 10% de las cepas virales incorrectamente diagnosticadas. A partir de este ADN copia y mediante PCR, se genera un fragmento de ADN artificial que comprende un promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 con actividad citoplásmica, una secuencia IRES, el gen env del VIH-1 que infecta al paciente en cuestión y una cola de poliadenina. Dicho fragmento de ADN se transfecta a una línea celular que contiene la polimerasa del bacteriófago T7, para que sea posible la expresión del gen env en estas células.

A diferencia de otros métodos de producción de la proteína env *in vitro*, este sistema lo produce en el citoplasma celular, sin necesidad de que el ADN transfectado sea importado al núcleo, aumentando el rendimiento del proceso. Adicionalmente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 tiene una altísima capacidad de procesamiento que genera un volumen mucho mayor de ARNm que otros sistemas basados en promotores eucariotas clásicos como aquellos dependientes del promotor del CMV (citomegalovirus).

La presencia en el fragmento de ADN transfectado de una secuencia IRES permite la traducción del mensajero por el ribosoma sin necesidad de que el ARNm tenga las señales clásicas de capping en el extremo 5', ni secuencias 5'UTR especiales.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Con las células transfectadas se puede realizar una caracterización funcional de la proteína env y determinar in vitro su capacidad para interactuar con células que expresan los receptores virales CD4, CXCR4 y CCR5.. Para ello se requiere co-cultivar las células anteriores con otra línea celular que tenga algún gen marcador bajo el control de la LTR del VIH-1, el receptor CD4 y, o bien el correceptor CCR5, o bien el correceptor CXCR4.

El resultado del co-cultivo puede ser la presencia o la ausencia de fusión. La presencia de sincitios es consecuencia de la fusión mediada por la interacción de la del gen env con el receptor CD4 y el correceptor adecuado. Además, debido a la fusión de las dos células, la proteína transactivadora de la actividad viral puede interactuar con las LTR que flanquean el gen marcador y permitir su transcripción y traducción, lo que permite la detección de la fusión mediante tinción coloreada o luminiscente del gen marcador.

En caso de no darse fusión, esto implica que el correceptor que presentan las células no permite la correcta interacción entre la proteína del gen env del VIH-1 del paciente, el CD4 y el correceptor.

Para determinar la actividad funcional de la proteína env del VIH-1 se puede realizar una tinción β -galactosidasa y/o una medida de la luminiscencia de la β -galactosidasa. O bien utilizar cualquier otro gen marcador como luciferasa, proteína verde fluorescente, etc... Con la tinción se puede determinar visualmente mediante el uso de un microscopio invertido pues las células que formen sincitios presentarán una coloración azul característica del procesamiento del sustrato de la β -galactosidasa.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Determinar la capacidad del sistema de expresión de proteínas a partir de productos de PCR sin clonación previa, para la producción de otras proteínas diferentes de la envuelta VIH, y en diferentes contextos celulares.

7. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES A REALIZAR

Generar fragmentos de ADN por PCR de fusión que incluyan el promotor de T7 polimerasa con IRES y poli A de los genes reporter luciferasa, beta galactosidasa y Proteína Verde Fluorescente (GFP). Evaluar la capacidad del sistema de expresión de producción de dichas proteínas reporter en varios tipos de cultivos celulares como HELA, U373, U937, Vero, y linfocitos primarios de donantes sanos. Para ello se utilizará luminiscencia, fluorimetría y tinción in situ.

8. DOCUMENTACIÓN/BIBLIOGRAFÍA

CARUZ, A. Método de determinación de tropismo del VIH-1 y kit asociado. Patente de invención con examen previo. Oficina española de patentes y marcas. Julio 2014.

LIN, N. H. et al. The design and validation of a novel phenotypic assay to determine HIV-1 coreceptor usage of clinical isolates. Journal of Virological Methods. Octubre 2010, Vol. 169, Nº 1, páginas: 39-46.

JENKINSON, S. et al. Development of a novel high-throughput surrogate assay to measure HIV envelope/CCR5/CD4-mediated viral/cell fusion using BacMam baculovirus technology. Journal of Biomolecular Screening. Agosto 2003, Vol. 8, Nº 4, páginas 463-470.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

KIRCHHERR, J. L. et al. High throughput functional analysis of HIV-1 env genes without cloning. *Journal of Virological Methods*. Julio 2007, Vol. 143, N° 1, páginas: 104-111
TROUPLIN, V. et al. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using as recombinant phenotypic assay. *Journal of Virology*. Enero 2001, Vol. 75, N° 1, páginas: 251-259.

9. CRONOGRAMA PROVISIONAL

En función de la disponibilidad del alumno y del laboratorio, este trabajo será realizado en horario de mañana o tarde.

El cronograma semanal provisional puede establecerse de la siguiente forma:

Semanas I -III: producción de los fragmentos de ADN de fusión de los genes reporter

Semanas IV - V: cultivos celulares: descongelación y expansión de los mismos

Semanas VI-XIII: Transfecciones en diferentes tipos celulares y cuantificación de la producción de las proteínas reporter

Semana XIV: Análisis de los resultados. Elaboración de las conclusiones. Redacción final, corrección, impresión y presentación del trabajo.