

Anexo II TITULACIÓN: Grado en Biología MEMORIA INICIAL DEL TRABAJO FIN DE GRADO CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales		 UNIVERSIDAD DE JAÉN <i>Facultad de Ciencias Experimentales</i>
Título del Trabajo Fin de Grado: Expresión y purificación parcial de la Metionina Sulfóxido Reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>		
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)		
Juan Bautista Barroso Albarracín y Raquel Valderrama Rodríguez		
3. VARIANTE Y TIPO DE TRABAJO FIN DE GRADO (Artículo 8 del Reglamento de los Trabajos Fin de Grado)		
Variante: Específico. Tipo: Experimental		
4. COMPETENCIAS (*) Y RESULTADOS DE APRENDIZAJE		
Competencias generales: CG6. Realizar análisis crítico de trabajos científicos y familiarizarse con su estructura. CG7. Utilizar las fuentes de información dentro del ámbito de las Ciencias de la Vida. CG9. Aplicar los principios básicos del pensamiento y del método científico.		
Competencias transversales: CT1. Adquirir capacidad de gestión de la información, análisis y síntesis CT3. Ser capaz de comunicarse correctamente de forma oral y escrita en la lengua materna CT4. Conocer una lengua extranjera CT6. Desarrollar actitudes críticas basadas en el conocimiento CT7. Ser capaz de realizar aprendizaje autónomo para el desarrollo continuo profesional CT8. Ser capaz de adaptarse a nuevas situaciones y de tomar decisiones CT9. Tener sensibilidad hacia temas de índole social y medioambiental		
Competencias Específicas:		
* Estas son las competencias mínimas. Añadir las competencias necesarias para cada Trabajo Fin de Grado propuesto		
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.

5. ANTECEDENTES

La oxidación de metioninas por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) (1,2) conduce a la formación de sulfóxido de metionina (3), lo que puede alterar tanto la actividad como la conformación de muchas proteínas (4, 5, 6). Este daño oxidativo es reversible porque la metionina sulfóxido reductasa (MSR) cataliza la reducción de los sulfóxidos de metionina generando de nuevo metionina. Hay dos clases de MSR no relacionadas estructuralmente denominadas MSRA y MSRB que catalizan la reducción de los enantiómeros “S” o “R” del sulfóxido de metionina a metionina, respectivamente (5, 3). Las MSR se han relacionado con la respuesta de las plantas al estrés oxidativo (4, 5, 7) y al óxido nítrico (NO) (6).

Una de las isoformas con abundancia relativa en *Arabidopsis thaliana* es la MSRB7, cuyos niveles de expresión en raíces son superiores a los detectados en hojas, ya que sus transcritos son relativamente abundantes en raíces (5), aunque también hay expresión en otros órganos como en las hojas de *Arabidopsis* (7). Además, se ha visto la implicación de esta isoforma en la respuesta de plantas de *Arabidopsis* a la exposición a metil viológeno 20 μ M, incrementando sus niveles de expresión génica. Por otra parte, las líneas celulares mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el gen *msb7* son sensibles al estrés oxidativo provocado por la exposición a metilviológeno (20 μ M) o a peróxido de hidrógeno (20 mM), mientras que las líneas que sobreexpresan dicho gen se muestran tolerantes a dicho tratamiento (7). También se ha descrito la participación de moléculas derivadas de NO, como el nitrosoglutatión (GSNO), en la inducción de los genes de MSR (8).

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo consiste en iniciar al alumno en técnicas básicas de expresión y purificación de proteínas recombinantes.

7. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES A REALIZAR

7.1.- Revisión bibliográfica actualizada: Antecedentes.

7.2.- Metodología y plan de trabajo.

A nivel experimental, para llevar a cabo la expresión y purificación parcial de la Metionina Sulfóxido Reductasa B7 (MSRB7) de *Arabidopsis thaliana* se irán abordando secuencialmente las siguientes fases que a continuación se detallan:

7.2.1. Transformación de células competentes de *E. coli* con el gen *msrb7* y selección de las bacterias que contengan el inserto.

A partir de la secuencia de ADN publicada en la base de datos de *Arabidopsis*

thaliana (TAIR) se diseñarán cebadores para amplificar el gen *msrb7* que codifica para la proteína objeto de este estudio. Mediante PCR se amplificará el gen y posteriormente se clonará en el vector de propagación GEM®-T Easy Vector (PROMEGA). Tras comprobar la correcta amplificación y clonación mediante secuenciación se proseguirá clonando de nuevo el gen en el vector de expresión pFLAG-ATS Expression Vector (SIGMA Catalog Number E5769).

Tras realizar las pertinentes comprobaciones se proseguirá obteniendo grandes cantidades del vector pFLAG-ATS::MSRB7 para transformar las células competentes de *E. coli* BL21 y DH5a.

7.2.2. Expresión de la proteína MSRB7 por las cepas de *E. coli* transformadas previa inducción.

Una vez transformadas con dicho plásmido y comprobadas mediante técnicas moleculares, se procederá a la expresión por parte de dichas células de la proteína MSRB7 siguiendo las indicaciones del fabricante del vector de expresión (SIGMA). En este caso, se realizará una inducción en el medio indicado en el protocolo de dos horas en presencia de IPTG a una concentración de 0.5 mM. Una vez terminado el protocolo de inducción se comprobará la cantidad de proteína obtenida en las cepas de *E. coli* transformadas con el vector de expresión y sus correspondientes controles mediante el método colorimétrico Quick Start™ Bradford Protein Assay y mediante SDS PAGE.

7.2.3. Purificación y aislamiento de la proteína MSRB7 del extracto total de proteínas presentes en *E. coli*.

Una vez optimizado y realizado el protocolo de expresión, se procederá al aislamiento y purificación de la MSRB7 del extracto total de proteínas. En primer lugar, se realizará un protocolo de obtención y aislamiento de proteínas periplásmicas (ya que la proteína en cuestión se expresará junto con un péptido señal que la transportará a dicho espacio). Posteriormente, se procederá al desarrollo de un protocolo de purificación mediante inmunoprecipitación. Dicho proceso se realizará usando el ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se recogerán diferentes fracciones tras eluir la proteína del gel, las cuales se analizarán mediante Western Blot.

7.3.- Elaboración y defensa de la Memoria del TFG según las directrices y orientaciones aprobadas por la Facultad de Ciencias Experimentales de la UJA.

8. DOCUMENTACIÓN/BIBLIOGRAFÍA

1. John, G.S., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. et al. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 9901–9906.
2. Alvarez, B. and Radi, R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25: 295–311.
3. Boschi-Muller, S., Gand, A. and Branlant, G. (2008) The methionine sulfoxide reductases: catalysis and substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* 474: 266–273.
4. Dos Santos, C.V., Cuine, S., Rouhier, N. and Rey, P. (2005) The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol.*



UNIVERSIDAD DE JAÉN

138: 909–922.

5. Rouhier, N., Santos, C.V.D., Tarrago, L. and Rey, P. (2006) Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynth. Res.* 89: 247–262.
6. Hsu, Y.T. and Lee, T.M. (2012) Nitric oxide up-regulates the expression of methionine sulfoxide reductase genes in the intertidal macroalga *Ulva fasciata* for high light acclimation. *Plant Cell Physiol.* 53: 445–456.
7. Li, C.W., Lee, S.H., Chieh, P.S., Lin, C.S., Wang, Y.C. and Chan, M.T. (2012) Arabidopsis root abundant cytosolic methionine sulfoxide reductase B genes MsrB7 and MsrB8 are involved in tolerance to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 53: 1707–1719.
8. Begara-Morales J.C.; Sánchez-Calvo B.; Luque F.; Leyva-Pérez M.O.; Leterrier M.; Corpas F.J. y Barroso J.B. (2014) Differential transcriptomic analysis by RNA-Seq of GSNO-responsive genes between *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Cell Physiol.* 55 (6): 1080-1095.

9. CRONOGRAMA PROVISIONAL

Las horas de trabajo correspondientes al TFG se ajustarán a la disponibilidad del alumno.

10. IMPLICACIONES ÉTICAS

El TFG requiere autorización de la Comisión de Ética: ☐ Sí ☒ No

En caso afirmativo, es preceptivo adjuntar la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Jaén o, en su defecto, la solicitud realizada a dicha Comisión.

Nota informativa: Para completar este Anexo II se recomienda consultar la guía docente de la asignatura del Trabajo Fin de Grado que está disponible en el siguiente enlace:

https://uvirtual.ujaen.es/srv/es/informacionacademica/catalogoguiasdocentes/p/2014-15/2/102A/10216001/es/2014-15-10216001_es.html

Más información:

<http://www10.ujaen.es/conocenos/centros/facexp/trabajofingrado>