

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER



BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS

RESUMEN TRABAJO DE GRADO



AUTOR(ES):

NOMBRE(S): ERIKA ALFAYUSET APELLIDOS: OCHOA CHACÓN

FACULTAD: DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PROGRAMA ACADÉMICO: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR(ES):

NOMBRE(S): PAMELA APELLIDOS: CRIBB

TITULO DEL TRABAJO (TESIS): ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B DE *Trypanosoma cruzi*(TcHMGB)

RESUMEN

Las proteínas “High Mobility Group” B constituyen una familia de proteínas que llevan a cabo diversas funciones nucleares mediante el remodelado de la cromatina. En el laboratorio de Biología y Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* se identificó una proteína perteneciente a esta familia en *Trypanosoma cruzi* denominada TcHMGB. La TcHMGB presenta 2 dominios HMG box al igual que sus ortólogas en mamíferos, pero carece de la región carboxilo-terminal acídica típica de esta familia de proteínas y tiene, en cambio, una región amino-terminal única de las HMGBs de tripanosomátidos. Este extremo amino-terminal contiene una señal de localización nuclear (NLS) putativa y un dominio DEK-C de unión al ADN predichas por métodos bioinformáticos.

Para estudiar las posibles funciones de estas regiones, se expresaron en forma soluble la región amino-terminal (Nterm-TcHMGB), y la proteína con dicha región deletada (TcHMGB- Δ N), como fusiones a GST y se realizaron ensayos de interacción con el ADN in vitro. Al igual que TcHMGB completa, tanto Nterm-TcHMGB que contiene el dominio DEK-C, como TcHMGB- Δ N compuesta por los 2 dominios HMG box, son capaces de unirse a estructuras distorsionadas del ADN. Esto demuestra la presencia de un dominio adicional de interacción con el ADN en las HMGBs de tripanosomátidos.

PALABRAS CLAVE: *T. cruzi*, proteína, interacción, clonado, expresión.

CARACTERISTICAS

No de páginas: 84 PLANOS: _____ ILUSTRACIONES: 21 CD-ROM: 1

ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B DE *Trypanosoma cruzi*
(TcHMGB)

ERIKA ALFAYUSET OCHOA CHACÓN

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA

2015

**ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B DE *Trypanosoma cruzi*
(TcHMGB)**

ERIKA ALFAYUSET OCHOA CHACÓN

**Proyecto de grado presentado para optar al título de
Ingeniero Biotecnológico**

Directora

PAMELA CRIBB

Ph. D en Ciencias Biológicas

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA**

2015

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 27 DE ABRIL DEL 2015

HORA: 10:00 A.M.

LUGAR: CREAD SALA DE FOTOGRAFÍA

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TÍTULO: ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B DE TRYPANOSOMA CRUZI (TcHMGB).

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: LAURA YOLIMA MORENO ROZO
NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS
HENRY ALFONSO ROJAS SARMIENTO

DIRECTOR: PAMELA CRIBB


NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
ERIKA ALFAYUSET OCHOA CHACÓN	1610621	4.7

OBSERVACIONES: MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:





Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular 

A las fuerzas físicas que mantienen en movimiento este universo, por haberme llevado tan lejos para cumplir esta meta tan importante para mi formación profesional.

A mis padres Sandra Yanet Chacón Castro y Luis Hernando Ochoa Forero, por el inmenso apoyo, por toda la paciencia, por la ayuda y la constancia conmigo a través de mi carrera y principalmente durante el desarrollo de este proyecto de investigación, que sin ellos no hubiera sido posible de ninguna manera. Gracias papitos, siempre les estaré en deuda.

A mis hermanas Sandra Michel Ochoa Chacón y Karen Michel Ochoa Chacón, por la compañía y por el apoyo durante todo este tiempo, gracias por las risas y el amor que me ayudó a mantenerme firme. Y a mi sobrina Emily Sophia Ochoa, por las sonrisas y las pocas palabras que me decía, que siempre me ayudaron mientras estaba lejos realizando este proyecto.

A mis demás familiares, mi nona Carmen, mi tío Henry, Toño, Taly, a mis primas Karla, Dasly, Yendy y Michel, a Yolima, muchas gracias por el apoyo recibido durante todo este tiempo, este triunfo también es de ustedes.

A mis compañeros y amigos Cueshitar, Mime, Helen, Freddy, Luz, Clau, Yeyi, Ishva, Boti, Pacy, Aleja, Mai, Shor y Pipe, que de una u otra forma contribuyeron con su granito de arena para hacer todo esto posible, gracias y siempre los voy a llevar en mi corazón.

Y, finalmente, a Jonathan José Acosta Bayona, gracias por ser tan incondicional y paciente conmigo, tu apoyo durante todos estos 5 años ha sido fundamental, gracias por ser uno de los pilares que siempre me mantuvo en pie cuando estuve a punto de caer, gracias por acompañarme en este triunfo, gracias por tu amor y por tu amistad.

Erika Alfayuset Ochoa Chacón.

AGRADECIMIENTOS

La autora de este trabajo le expresa su agradecimiento a:

A la Doctora Pamela Cribb, por darme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo, por su excelente dirección, por su gran labor investigativa y sobre todo por ser un gran ejemplo de trabajo con un gran sentido humano.

Al Doctor Esteban Serra, por haberme permitido trabajar en el laboratorio bajo su dirección, por su excelente trabajo, por su valiosa asesoría y por compartir incondicionalmente su conocimiento que fue fundamental para este trabajo.

A Carla, Viky, Vir, Romi e Isa, por haberme ayudado cuando lo necesité, por asesorarme en muchos momentos, por el tiempo compartido en la mesada y por las charlas que siempre hicieron llevadero todo esto.

A Lucho, por todo lo que me aguantó durante en todo este proceso, por toda la ayuda que recibí de su parte, por todo lo que me enseñó y por todo el gran apoyo que siempre supo darme.

A la Doctora Julia Cricco y a su grupo de trabajo: Marce, Brenda, Lucas y Jero, gracias por las risas, el apoyo y el conocimiento compartido.

RESUMEN

Las proteínas “High Mobility Group” B constituyen una familia de proteínas que llevan a cabo diversas funciones nucleares mediante el remodelado de la cromatina. En el laboratorio de Biología y Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* se identificó una proteína perteneciente a esta familia en *Trypanosoma cruzi* denominada TcHMGB. La TcHMGB presenta 2 dominios HMG box al igual que sus ortólogas en mamíferos, pero carece de la región carboxilo-terminal ácida típica de esta familia de proteínas y tiene, en cambio, una región amino-terminal única de las HMGBs de tripanosomátidos. Este extremo amino-terminal contiene una señal de localización nuclear (NLS) putativa y un dominio DEK-C de unión al ADN predichas por métodos bioinformáticos.

Para estudiar las posibles funciones de estas regiones, se expresaron en forma soluble la región amino-terminal (Nterm-TcHMGB), y la proteína con dicha región deletada (TcHMGB- Δ N), como fusiones a GST y se realizaron ensayos de interacción con el ADN *in vitro*. Al igual que TcHMGB completa, tanto Nterm-TcHMGB que contiene el dominio DEK-C, como TcHMGB- Δ N compuesta por los 2 dominios HMG box, son capaces de unirse a estructuras distorsionadas del ADN. Esto demuestra la presencia de un dominio adicional de interacción con el ADN en las HMGBs de tripanosomátidos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. EL PROBLEMA	17
1.1. TÍTULO	17
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.4. JUSTIFICACIÓN	18
1.5. OBJETIVOS	19
1.5.1. Objetivo general.	19
1.5.2. Objetivos específicos.	19
1.6. ALCANCES Y LIMITACIONES	20
1.6.1. Alcances.	20
1.6.2. Limitaciones.	20
1.7. DELIMITACIONES	21
1.7.1. Delimitación espacial.	21
1.7.2. Delimitación temporal.	21
1.7.3. Delimitación conceptual.	21
2. MARCO REFERENCIAL	22
2.1. ANTECEDENTES	22
2.2. MARCO TEÓRICO	25
2.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .	25

2.2.2. Ciclo de vida	26
2.2.3. Morfología y estructuras celulares.	27
2.2.4. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Estructura de la cromatina y expresión génica.	30
2.2.5. Las proteínas HMG y la expresión génica.	32
2.2.6. High Mobility Group B.	33
2.2.7. TcHMGB.	34
2.3. REFERENTES TEÓRICOS	35
2.3.1. Clonado por recombinación.	35
2.3.2. Cromatografía de afinidad.	36
2.3.3. Dominio protéico HMGbox.	36
2.3.4. Ensayos <i>In vitro</i> .	36
2.3.5. Ensayos <i>In vivo</i> .	37
2.3.6. Expresión de proteínas heterólogas en <i>Escherichia coli</i> .	37
2.3.7. Microscopía de fluorescencia.	38
2.3.8. Proteína recombinante o proteína de expresión heteróloga.	38
2.3.9. Proteínas truncadas.	38
2.3.10. Transfección.	38
2.4. MARCO CONTEXTUAL	39
2.5. MARCO LEGAL	39
3. DISEÑO METOLÓGICO	40
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	40
3.2. HIPÓTESIS	40
3.3. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	41
3.3.1. Fuentes primarias.	41
3.3.2. Fuentes secundarias.	41

3.4.	TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	41
3.5.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS	41
4.	FASES DE LA INVESTIGACIÓN	43
4.1.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRUNCAS DE TcHMGB CON FUSIÓN A GLUTATION S TRANSFERASA (GST)	43
4.1.1.	Optimización de las condiciones de expresión de TcHMGB fusionada a Glutation S Transferasa (GST) en <i>Escherichia coli</i> .	43
4.1.2.	Obtención de una versión trunca correspondiente a la NLS (Señal de localización o Nuclear LocalizationSignal) de TcHMGB de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	44
4.1.3.	Optimización de las condiciones de expresión de NLS TcHMGB fusionada a Glutation S Transferasa (GST) en <i>Escherichia coli</i> .	47
4.1.4.	Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST.	48
4.1.5.	Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida.	49
4.1.6.	Concentración de proteínas purificadas.	51
4.1.7.	Determinación de la concentración de proteínas fusionadas a GST.	51
4.2.	ANÁLISIS DE LAS CAPACIDADES DE INTERACCIÓN CON EL ADN DE LAS VERSIONES TRUNCAS DE TcHMGB.	52
4.2.1.	Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay) con ADN plasmídico superenrollado y lineal.	52
4.2.2.	Trabajo con ADN marcado con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP y ensayos de unión al ADN cruciforme <i>in vitro</i> .	53
4.3.	CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA EL ESTUDIO DE LA POSIBLE SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE TcHMGB EN <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
4.3.1.	Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.	56
4.3.2.	Clonado por recombinación.	56
4.3.3.	Transformación de bacterias por electroporación.	57
4.3.4.	Chequeo por PCR de los clones positivos de pTcGFPC de ΔN , NLS, DEK-C y Ntérmino-TcHMGB.	57
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	58

5.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRUNCAS DE TcHMGB CON FUSIÓN A GLUTATION S TRANSFERASA (GST)	58
5.1.1. Optimización de las condiciones de expresión de TcHMGB fusionada a Glutation S Transferasa (GST).	58
5.1.2. Obtención de la proteína trunca del NLS (Signal Localitation Nuclear) de TcHMGB de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	60
5.1.3. Optimización de las condiciones de expresión de NLS TcHMGB fusionada a Glutation S Transferasa (GST) en <i>Escherichia coli</i> .	61
5.1.4. Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST.	62
5.1.5. Determinación de la concentración de las proteínas fusionadas a GST.	64
5.2. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON EL ADN DE LAS VERSIONES TRUNCAS DE TcHMGB	66
5.2.1. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay) con ADN plasmídico super-enrollado y lineal.	67
5.2.2. Ensayos de cambio en la corrida electroforética con ADN cruciforme marcado con ³² P.	68
5.2.3. Ensayo de competición con sonda cruciforme y doble hebra frías.	71
5.3. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA EL ESTUDIO DE LA POSIBLE SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE TcHMGB DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	83