



Oferta Trabajo Fin de Master (TFM):

Tutor/es: Carmen Rivas

e-mail tutor/es:mcarmen.rivas@usc.es

Centro/Institución/Empresa:CIMUS

Título: Implementación de la técnica de BiFC para estudiar el impacto de las proteínas celulares SUMO sobre la formación del complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del SARS-CoV-2.

Breve resumen del trabajo (< 100 palabras):

El SARS-CoV-2 es un virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva cuya replicación y transcripción depende del complejo de ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp). Tres de los componentes esenciales de este complejo son las proteínas no estructurales (NSP) del virus NSP7, 8 y 12. Resultados previos del laboratorio indican que la proteína celular SUMO se une a estas NSP, pero desconocemos si la interacción de SUMO a dichas proteínas tiene algún impacto en la formación del complejo proteico. En este proyecto se pretende abordar este objetivo empleando para ello la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC).

Actividades a desarrollar:

La realización de este proyecto implica llevar a cabo las siguientes actividades:

1. Clonar las regiones codificantes de NSP7, 8 y 12 fusionadas a la mitad N-terminal o C-terminal de YFP. En el caso de NSP8 se clonará también una construcción de NSP8 en la cual las lisinas posibles de SUMOilación se han mutado a arginina o bien se realizará mutagénesis dirigida de dichos residuos sobre la construcción ya clonada.
2. Llevar a cabo ensayos de BiFC: transfectando células con combinaciones de las distintas construcciones mencionadas en el apartado anterior.
3. Realizar la técnica de inmunofluorescencia para comprobar la expresión de los distintos componentes transfectados y sus niveles.
4. Analizar empleando microscopía confocal la formación del complejo proteico en las distintas condiciones evaluadas. Se determinará también la localización subcelular donde se detecta dicho complejo.
5. Una vez comprobado el funcionamiento del sistema con todos los controles adecuados, se estudiará el impacto de distintos compuestos que alteran la conjugación de proteínas tipo ubiquitina, incluida SUMO, sobre la formación de dichos complejos.