



1. DATOS BÁSICOS DEL TFG:

Título: Puesta a punto de un ensayo miniaturizado de alto rendimiento para el estudio de la especificidad de unión en dominios WW

Descripción general (resumen y metodología):

El trabajo que se propone se enmarca en una línea de investigación cuyo objetivo general es el desarrollo de antivirales de amplio espectro dirigidos contra mecanismos de gemación comunes a numerosos virus, incluyendo retrovirus (VIH, HTLV), filovirus (Ebola, Marburgo), rhabdovirus (Rabia) y arenavirus (Lassa). Concretamente, se pretende poner a punto un ensayo miniaturizado para evaluar la especificidad de unión de posibles antivirales de amplio espectro previamente identificados en cribados de alto rendimiento en el contexto de todos los dominios WW en el proteoma humano.

El trabajo se realizará de forma conjunto con el Departamento de Química Física de la UGR y el Departamento de Cribado y validación de dianas de la Fundación MEDINA, para lo que se hará uso de técnicas estándar en bioquímica y biofísica de proteínas así como de metodologías miniaturizadas para el cribado de alto rendimiento.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

1.- Purificación de dominios WW de interés. El estudiante realizará la purificación de proteínas (dominios WW humanos) en formato miniaturizado de 96 pocillos. En una primera etapa se seleccionarán los cuatro dominios más relevantes para los estudios de especificidad. Una vez puestos a punto los ensayos y si el tiempo lo permite, se abordará la purificación de hasta 25 dominios WW en formato miniaturizado para la realización de los ensayos.

2.- Identificación de ligandos universales para las distintas familias de dominios WW y diseño de construcciones adecuadas para las técnicas AlphaScreen y HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence). Se diseñarán distintos tipos de ligandos que se expresarán y purificarán mediante cromatografía de afinidad a Níquel.

3.- Comprobación de la interacción con los dominios WW purificados en (1) mediante AlphaScreen y HTRF. Selección de las mejores construcciones e identificación de las condiciones óptimas para el estudio de especificidad. Para ello se realizarán distintos experimentos variando el tipo de construcción, así como las concentraciones y tiempos de incubación.

4.- Análisis de la especificidad de unión a dominios WW de candidatos prometedores como antivirales de amplio espectro previamente seleccionados frente a la diana humana NEDD4-WW3.

Tipología: Trabajos experimentales, de toma de datos de campo o de laboratorio.

Objetivos planteados:

1. Expresión y purificación de dominios WW humanos en formato miniaturizado de 96 pocillos
2. Poner a punto el ensayo de desplazamiento tipo AlphaScreen que permita analizar de forma universal la interacción con todos los dominios, evaluando distintas construcciones
3. Poner a punto el ensayo de desplazamiento tipo HTRF que permita analizar de forma universal la interacción con todos los dominios, evaluando distintas construcciones
4. Realización de ensayos piloto con ligandos peptídicos conocidos y evaluación de su especificidad

Bibliografía básica:

Huang, H. & Siddhu, S. (2011) "Studying binding specificities of peptide recognition modules by high-throughput phage display selections", Methods Mol. Biol. 781, 87-97
Otte, L. Et al. (2003) "WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensites of 42 WW domains", Protein Science, 12(3), 491-500
Clifton, N.J. (2016) "AlphaScreen-based Assays: Ultra high-throughput screening for molecule inhibitors of challenging enzymes and protein-protein interactions", Methods in Molecular Biology, 1439, 77-98

Recomendaciones y orientaciones para el estudiante:

Conocimientos de inglés a nivel B2 para la lectura y comprensión de artículos relacionados con la temática del trabajo
Interés en estudios biofísicos y biología estructural de proteínas

Plazas: 1

2. DATOS DEL TUTOR/A:

Nombre y apellidos: IRENE LUQUE FERNÁNDEZ

Ámbito de conocimiento/Departamento: QUÍMICA FÍSICA

Correo electrónico: iluque@ugr.es

3. COTUTOR/A DE LA UGR (en su caso):

Nombre y apellidos:

Ámbito de conocimiento/Departamento:

Correo electrónico:

4. COTUTOR/A EXTERNO/A (en su caso):

Nombre y apellidos: Francisco Javier Castillo Correa

Correo electrónico: francisco.castillo@medinaandalucia.es

Nombre de la empresa o institución: Fundación MEDINA

Dirección postal: Avenida del Conocimiento, 34 Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18016 Granada

Puesto del tutor en la empresa o institución: Científico Senior Departamento de Screening y Validación de Dianas

5. DATOS DEL ESTUDIANTE:

Nombre y apellidos:

Correo electrónico: