

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB-12/v0
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	Página	1/1

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): JOSE FABIAN APELLIDOS: CARDONA HERNANDEZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: NOMBRE(S): MARCELO AQUILES APELLIDOS: CATALAN GAETE

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LAS MUTANTES (Y817C, S460C, T405C, R456C) DEL INTERCAMBIADOR ANIONICO AE4 (SLC4A9)

RESUMEN

Se sabe que la célula lleva a cabo procesos para mantener estables sus actividades metabólicas en procesos importantes para mantenimiento celular, una de las actividades importantes es el intercambio de iones a través de la membrana plasmática de las células.

Este intercambio se da partir de unas proteínas localizadas en la membrana que reconocen sustancias específicas permitiendo la entrada y salida de estas. El intercambiador ae4 funciona como transportador de membrana $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ , se le atribuye gran aporte en el proceso de regulación de pH y está asociado a enfermedades como la acidosis tumoral renal, que se describió que se debe a un cambio específico en su secuencia de aminoácidos, también reportaron que se expresa en la glándulas salivales de ratón donde tiene una función importante de secreción y absorción de saliva. Se desconoce la estructura de este intercambiador por lo que se realizó un modelo 3D por homología del cotransportador NCBe1 y a partir de este modelo se realizaron las mutaciones, donde se observa que su funcionamiento se ve alterado en gran manera.

Las mutantes fueron evaluadas funcionalmente a través de la medición del pH , se realizó con la incubación de la sonda BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(-6)-carboxifluoresceína en la forma acetoxi-metil éster) que internaliza en la célula y la razón de fluorescencia 490/440 se grafica en función del tiempo y la actividad de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ se obtiene del componente lineal del cambio de pH , al cual se le ajusta una función recta.

PALABRAS CLAVE: CELULA, IONES, MEMBRANA GLANDULAS.
CARACTERISTICAS:

PÁGINAS: 174 PLANOS: 0 ILUSTRACIONES: 0 CD ROOM: 1

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014
a		a		a	

COPIA NO CONTROLADA

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LAS MUTANTES (Y817C, S460C, T405C,
R456C) DEL INTERCAMBIADOR ANIONICO AE4 (SLC4A9)

JOSÉ FABIÁN CARDONA HERNÁNDEZ

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

2019

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LAS MUTANTES (Y817C, S460C, T405C,
R456C) DEL INTERCAMBIADOR ANIONICO AE4 (SLC4A9)

JOSÉ FABIÁN CARDONA HERNÁNDEZ

Proyecto presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico

Director

PhD. MARCELO AQUILES CATALÁN GAETE

Doctor En Ciencias Biomédicas

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

2019

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 12 ABRIL DE 2019

HORA: 08:00 A.M

LUGAR: SALA CREAD 4

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS MUTANTES (Y817C, S460C, T405C, R456C) DEL INTERCAMBIADOR ANIONICO AE4 (SLC4A9)."

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: LUCIANO LÓPEZ BARRERA
LILIANA YANET SUÁREZ CONTRERAS
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

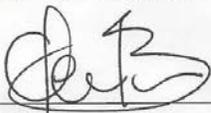
ENTIDAD: UNIVERSIDAD ARTURO PRAT

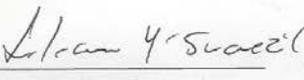
DIRECTOR: MARCELO AQUILES CATALÁN GAETE

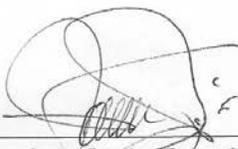
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
JOSE FABIAN CARDONA HERNANDEZ	1610991	4.4

OBSERVACIONES: APROBADO.

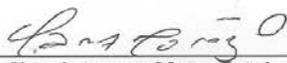
FIRMA DE LOS JURADOS


German Luciano López Barrera


Liliana Yanet Suárez Contreras


Juan Carlos Ramírez Bermudez

Vo.Bo Coordinador Comité Curricular


Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza

DEDICATORIA

A Dios, porque reconozco que todo lo que soy, todo lo que tengo y lo que seré es por él y para él.

A mis padres Jhon Jairo Cardona Gómez, Melva Hernandez Reyes y mi hermana Ana Yurley Cardona por el apoyo que me han dado y la confianza que han puesto en mi para cumplir esta meta que me propuse, mis abuelos Ana, Eladio y todos mis tíos y primos que hicieron parte de este proceso de crecimiento académico y personal sobre todo su apoyo moral y emocional, reconozco su esfuerzo para ayudarme en este gran proceso, por eso este triunfo es para ellos también y todos los que creyeron en mí, gracias por ayudar a hacerlo posible.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres cada esfuerzo económico para cumplir con cada semestre, no tengo como pagarles todo lo que han aportado para mi educación y crecimiento personal.

Agradezco a Dios por la oportunidad de hacer realidad este proyecto, también agradezco a la universidad francisco de paula Santander y la universidad Arturo Prat por apoyar este intercambio el cual culmino con este proyecto de grado.

Al Dr. Marcelo catalán y su esposa la Dra Yasna Jaramillo por su orientación, paciencia y apoyo en el desarrollo del proyecto, fue para mí un gran privilegio, también a los compañeros de laboratorio de fisiología epitelial Nuria, Briam y Melisa por contribuir a un ambiente de trabajo agradable, un montón de risas que compartimos.

También Dr Gaspar Peña, Marcelo Delgado, Denito, Fernanda, Lisandra, Pamela, Cristian y Ella Matamala todos parte del laboratorio de fisiología celular de la universidad austral de chile en Valdivia, por su paciencia para responder cada pregunta y duda que tenía, gracias por sus palabras en la despedida me ayudaron a fortalecer mi ánimo en este proceso, sobre todo el gesto que tuvieron en mi cumpleaños no lo esperaba fue muy especial compartir con ustedes.

Mis compañeros de último año de clase, resaltando a Juan Manuel arenas, cristina umbarila y Mary Ferreira a quien agradezco enormemente por su disposición para colaborar con los trámites burocráticos realizados en la universidad, al cuerpo docente y administrativo del plan de estudios de ingeniería en biotecnología que hicieron parte de este proceso educativo.

No alcanzo a nombrar a todas las personas que conocí en Chile mientras desarrollaba este trabajo, pero me siento muy honrado de conocerles y agradecido por sus tratos especiales para conmigo, por ese ánimo y confianza que me transmitieron, especialmente a Amandine Andre por su apoyo, comprensión y compañía incondicional.

RESUMEN

Se sabe que la célula lleva a cabo procesos para mantener estables sus actividades metabólicas en procesos importantes para mantenimiento celular, una de las actividades importantes es el intercambio de iones a través de la membrana plasmática de las células.

Este intercambio se da partir de unas proteínas localizadas en la membrana que reconocen sustancias específicas permitiendo la entrada y salida de estas. El intercambiador ae4 funciona como transportador de membrana $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ , se le atribuye gran aporte en el proceso de regulación de phi y está asociado a enfermedades como la acidosis tumoral renal, que se describió que se debe a un cambio específico en su secuencia de aminoácidos, también reportaron que se expresa en las glándulas salivales de ratón donde tiene una función importante de secreción y absorción de saliva. Se desconoce la estructura de este intercambiador por lo que se realizó un modelo 3D por homología del cotransportador NCBel y a partir de este modelo se realizaron las mutaciones, donde se observa que su funcionamiento se ve alterado en gran manera.

Las mutantes fueron evaluadas funcionalmente a través de la medición del phi, se realizó con la incubación de la sonda BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína en la forma acetoxi-metil éster) que internaliza en la célula y la razón de fluorescencia 490/440 se grafica en función del tiempo y la actividad de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ se obtiene del componente lineal del cambio de pH, al cual se le ajusta una función recta.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	13
1 EL PROBLEMA	15
1.1 TITULO	15
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.3 FORMULACION DEL PROBLEMA	17
1.4 JUSTIFICACIÓN	17
1.5 OBJETIVOS	19
1.5.1 OBJETIVOS GENERALES	19
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 MARCO REFERENCIAL	20
2.1 ANTECEDENTES	20
2.2 MARCO TEORICO	22
2.2.1 ESTRUCTURA DEL INTERCAMBIADOR DE ANIONES (AE4)	22
2.2.2 TRAFICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA	23
2.2.3 MEMBRANA PLASMATICA	23
2.2.4 MODELADO DE ESTRUCTURA	24
3 METODOLOGIA	25
3.1 MODELAMIENTO DE PROTEINA	25

3.2	CULTIVO CELULAR	27
3.3	TRANSFECCIONES	28
3.4	ENSAYOS FUNCIONALES	29
3.5	ANALISIS ESTADISTICO	31
4	RESULTADOS	32
4.1	MODELO ESTRUCTURAL DEL INTERCAMBIADOR DE ANIONES (AE4)	32
4.2	ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL INTERCAMBIADOR (AE4)	34
5	DISCUSIÓN	36
	CONCLUSIONES	39
	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	40
	ANEXOS	8

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** La familia de transportadores de bicarbonato de SLC4 descrito por (Romero et al., 2013). 13
- Figura 2.** (Liu et al., 2015) describio la siguiente estructura general de los SLC4. 22
- Figura 3.** Porcentaje de identidad con base en la secuencia del AE4 alineado en BLAST para busqueda por homologia de una posible estructura 3D en la base de datos PDB, el mayor porcentaje de identidad lo tiene el transportador NBCel. 25
- Figura 4.** La estructura 3D del NBCel en la biblioteca del PDB que cuenta con mayor porcentaje de homologia en su secuencia. 26
- Figura 5.** Es un modelo predictivo de una estructura 3D realizado en el servidor I-TASSER para el intercambiador de aniones (AE4). 32
- Figura 6.** La estructura predictiva del intercambiador de aniones con las mutaciones descritas y señaladas en la posible estructura. 33
- Figura 7.** Mediciones de pHi realizadas en celulas HEK 293 cargadas con la sonda BCECF-AM. 34
- Figura 8.** Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos seis celulas HEK 293 por experimento, los datos expresados para hWT y R456C es significativamente mayor en comparacion con T405C, S406C y Y817C que muestra una disminucion o ninguna en la actividad del intercambiador (AE4) ($P < 0.05$, ANOVA). 35