

Actividad de unión de la proteína adhesiva relacionada con trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2

Trabajo de Grado para optar por el Título
de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico.



FUNDACIÓN INSTITUTO DE
INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA

JULIANA ORTIZ GORDILLO



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR
DE CUNDINAMARCA

Actividad de unión de la proteína adhesiva relacionada con trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2

COORDINACIÓN

Gabriela Arévalo Pinzón., PhD

ASESORIA

Ruth Mérida Sánchez Mora., PhD



FUNDACIÓN INSTITUTO DE
INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR
DE CUNDINAMARCA

TABLA DE CONTENIDO

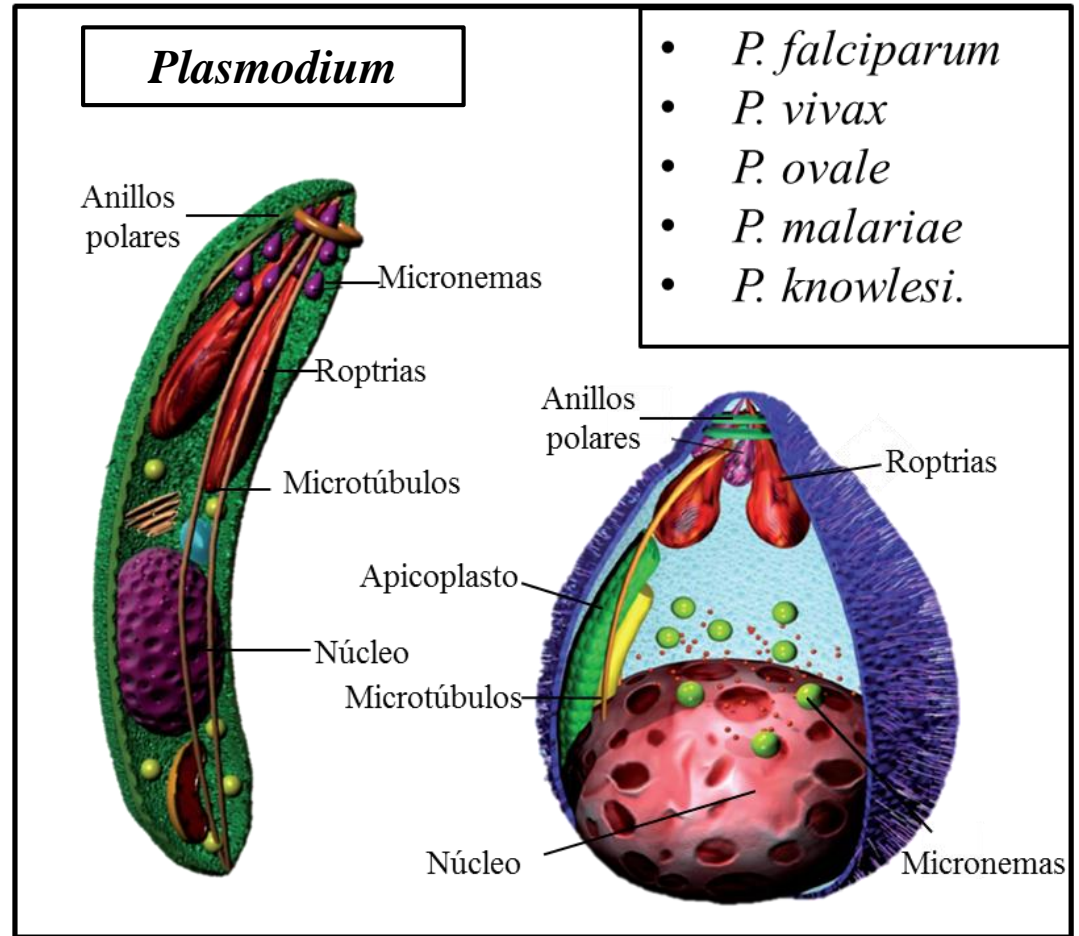
1. Introducción (Planteamiento-Justificación)
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados y discusión
5. Conclusiones

Malaria humana

Anopheles

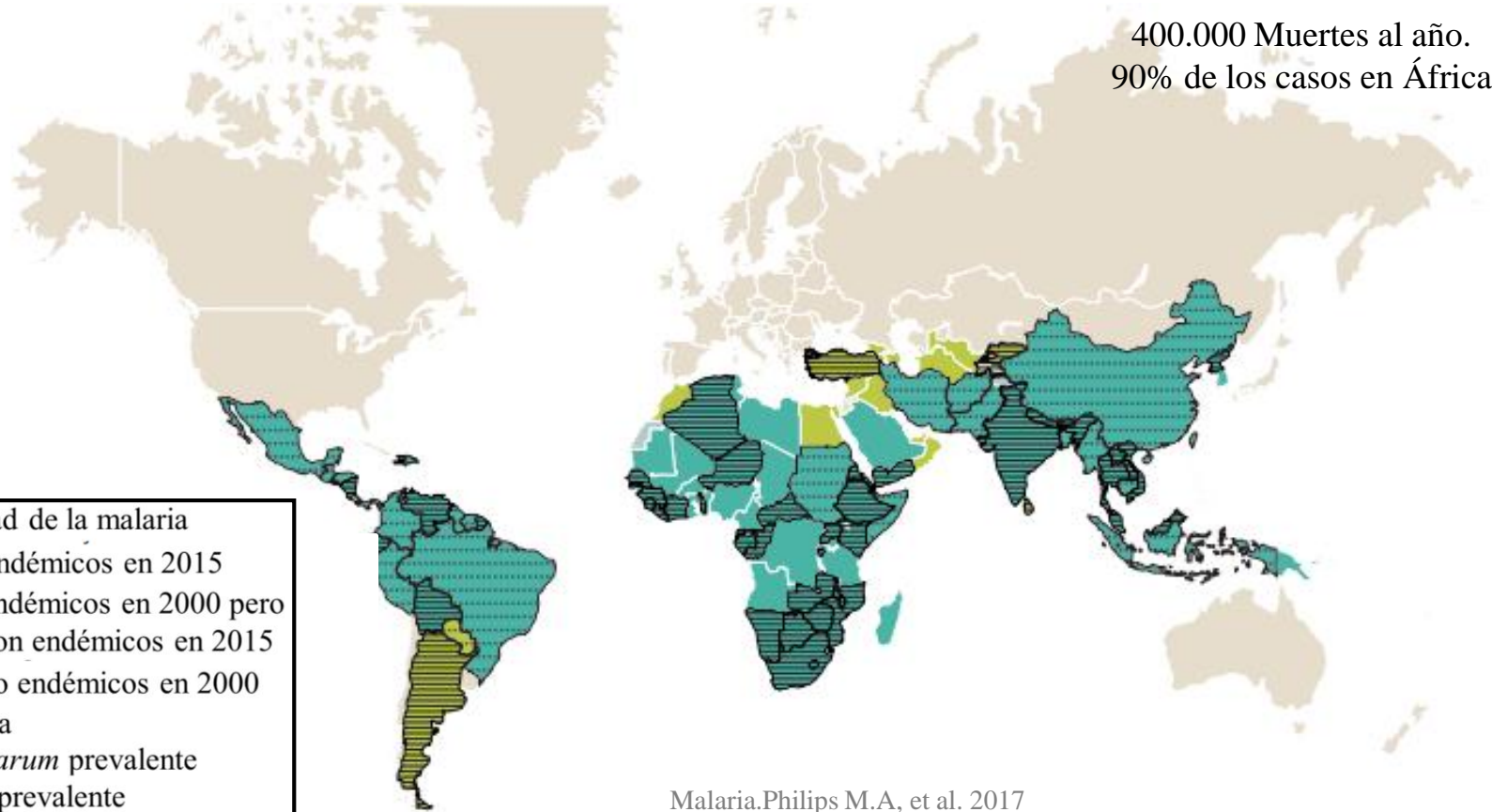
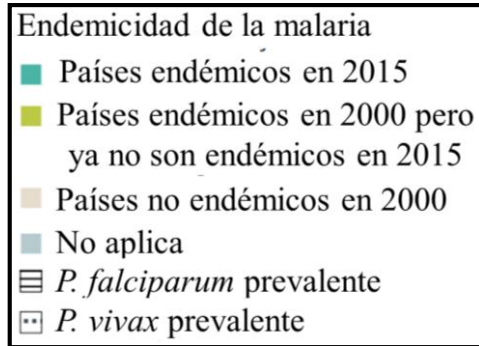


Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

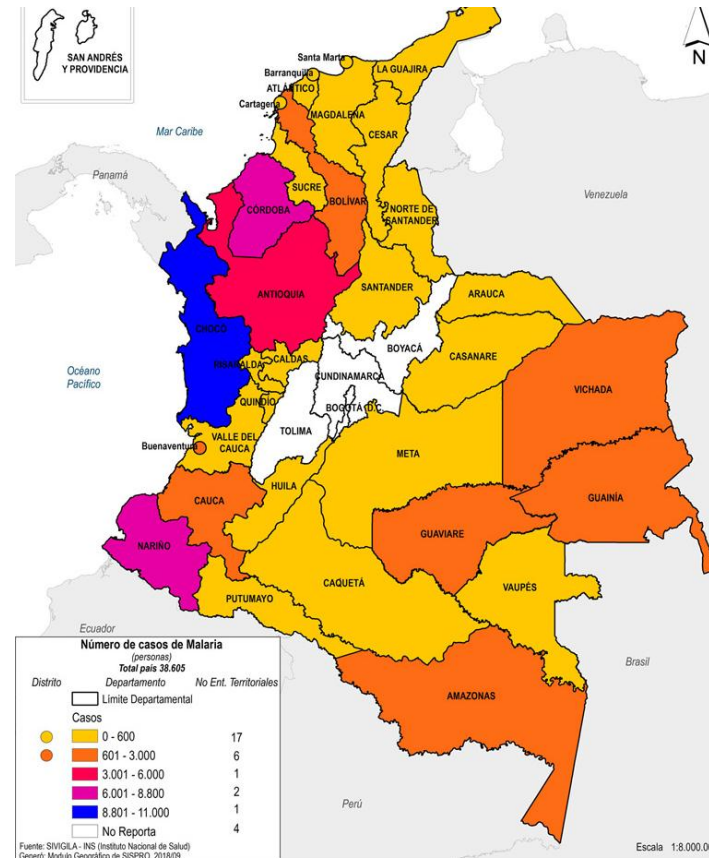


Malaria a nivel mundial

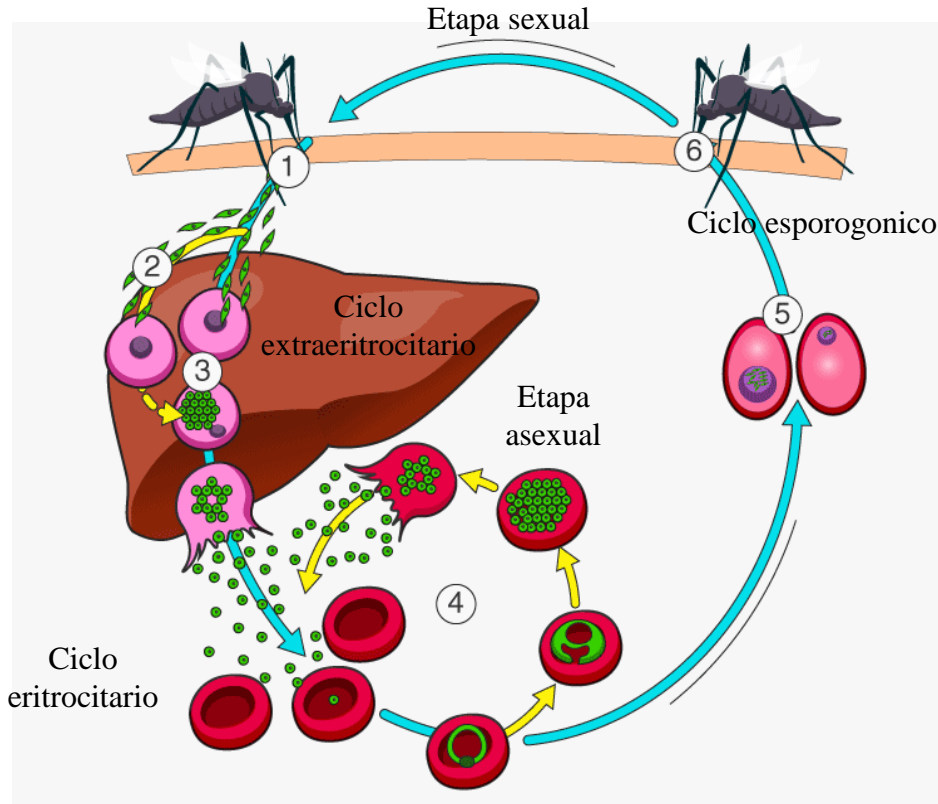
400.000 Muertes al año.
90% de los casos en África



Malaria en Colombia

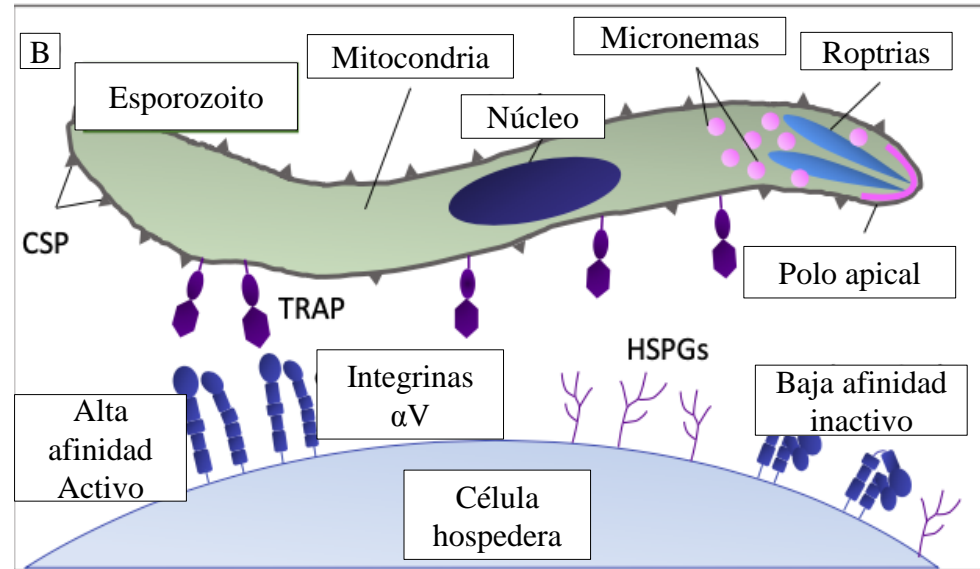
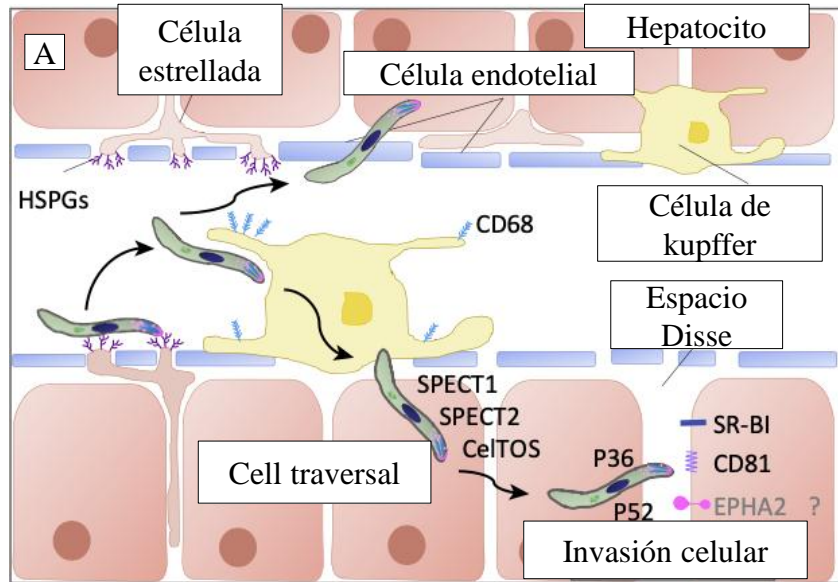


Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

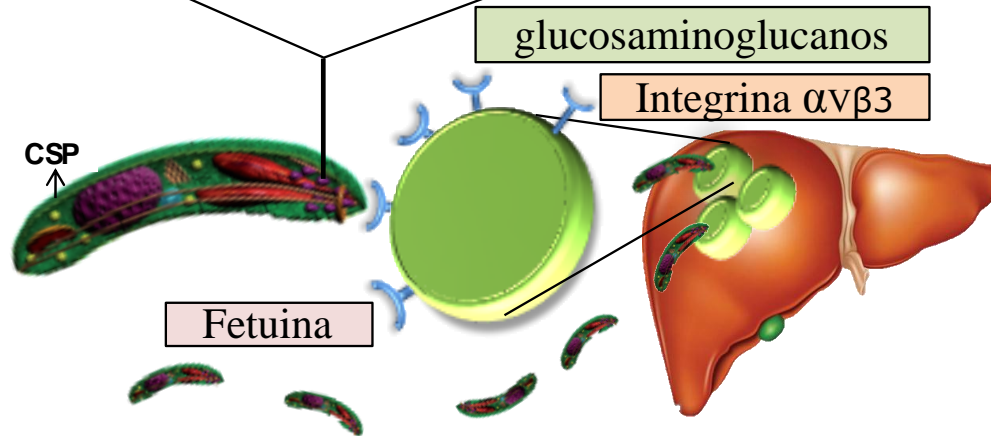
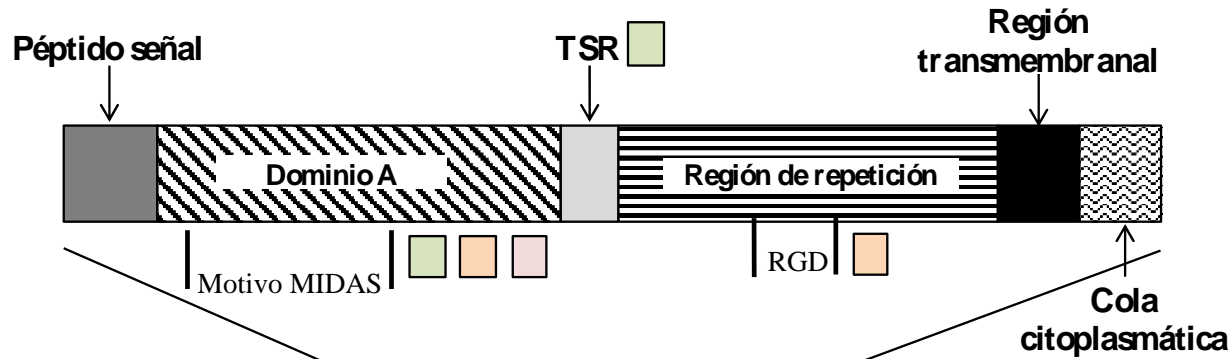


- 1 Transmisión al humano
- 2 Ingreso de los esporozoítos e infección del hepatocito
- 3 Ruptura de las células hepáticas y liberación de merozoítos
- 4 Ciclo intra-eritrocitario
- 5 Ciclo sexual
- 6 Transmisión al mosquito

Cell traversal e invasión de esporozoitos



Proteína adhesiva relacionada con trombospodina de *Plasmodium falciparum* (PfTRAP)



Akhouri RR, et al. 2008

Jethwaney D, et al. 2005

Dundas K et al. 2018

Proteína adhesiva relacionada con trombospodina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP)

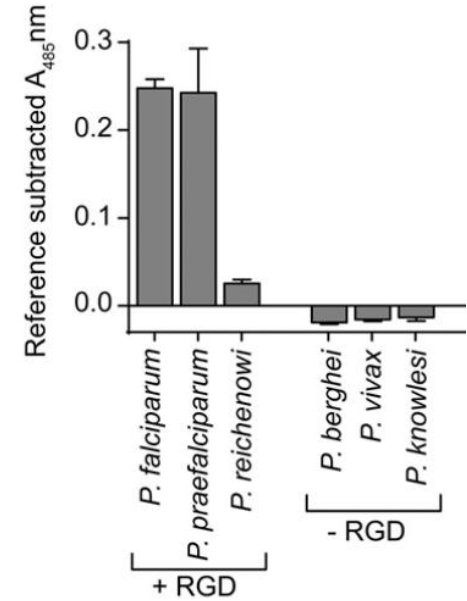
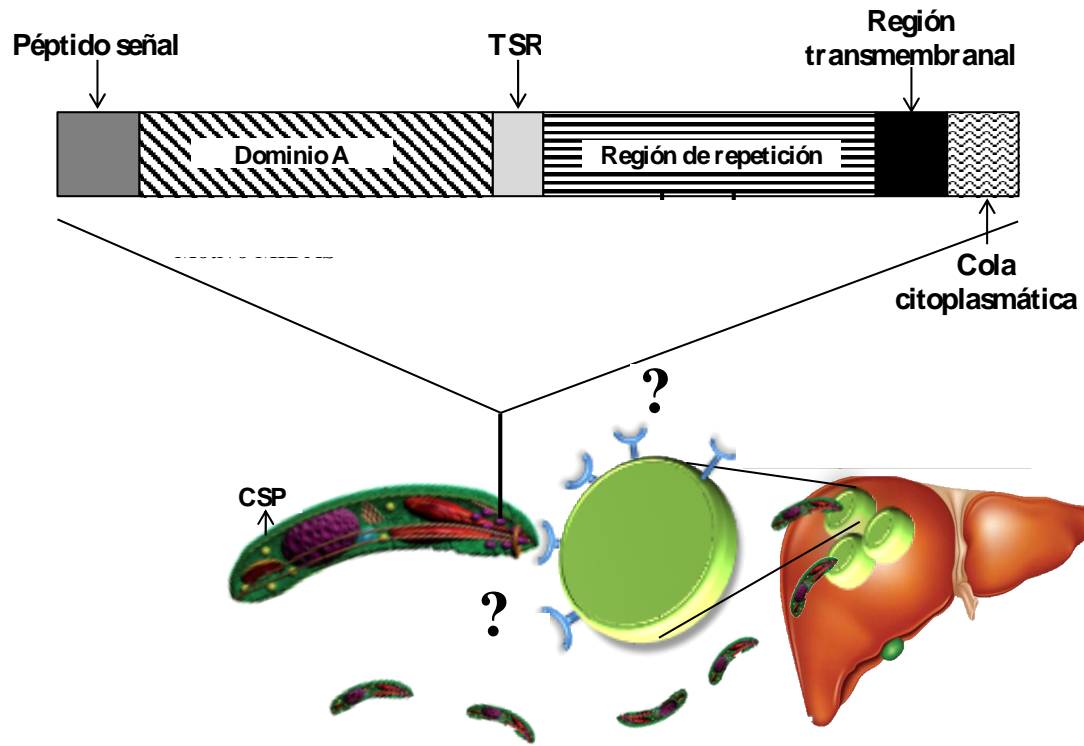


TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción (Planteamiento-Justificación)
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados y discusión
5. Conclusiones

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células hepáticas HepG2

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseño, obtención y purificación en el sistema de expresión de Baculovirus del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
2. Diseño y obtención en el sistema de expresión de Baculovirus de los dominio vonWillebrand (vWA) y trombospondina (TSR) de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
3. Determinar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción (Planteamiento-Justificación)
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados y discusión
5. Conclusiones

Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación

ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

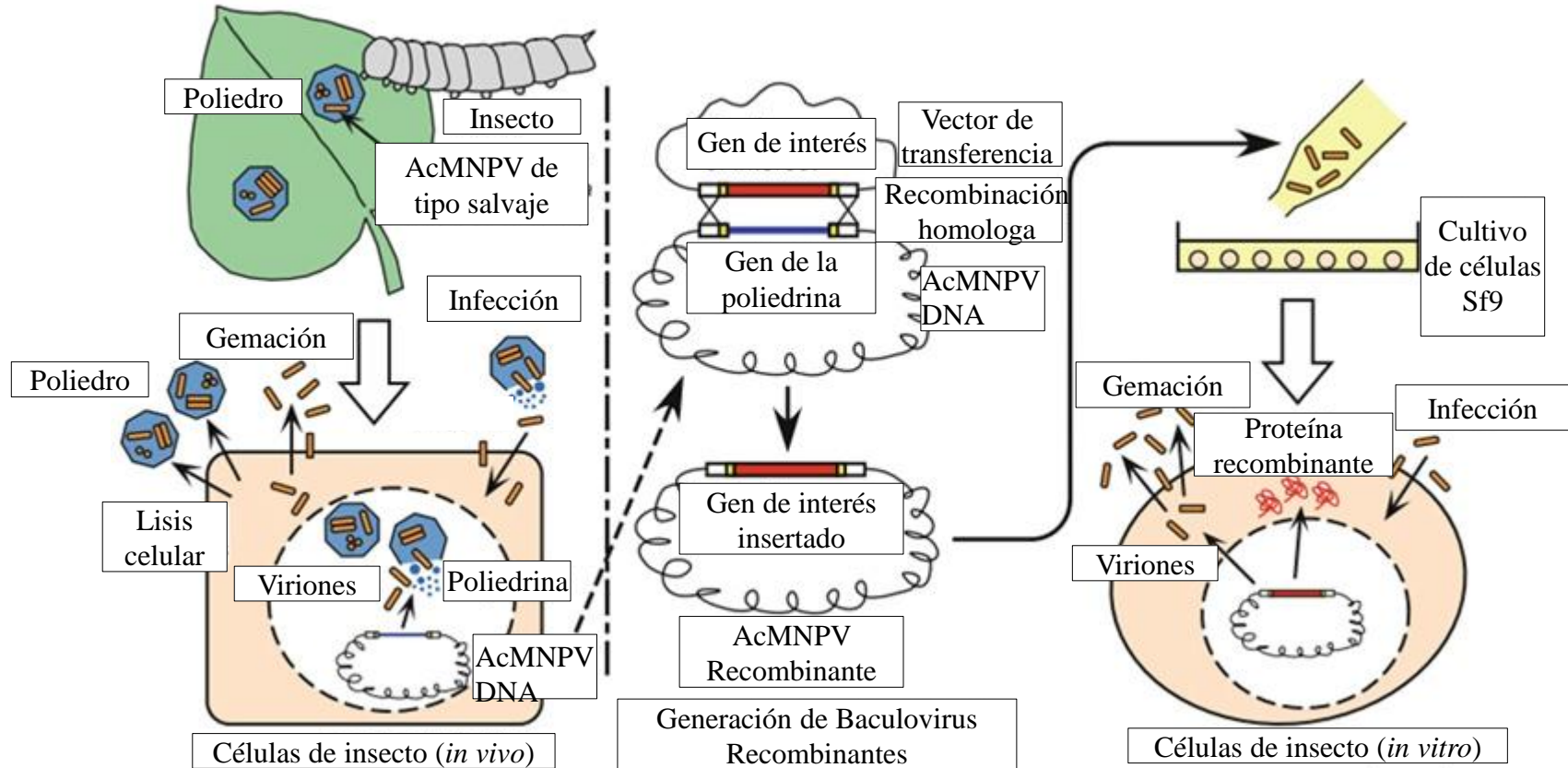
OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospodina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células hepáticas HepG2

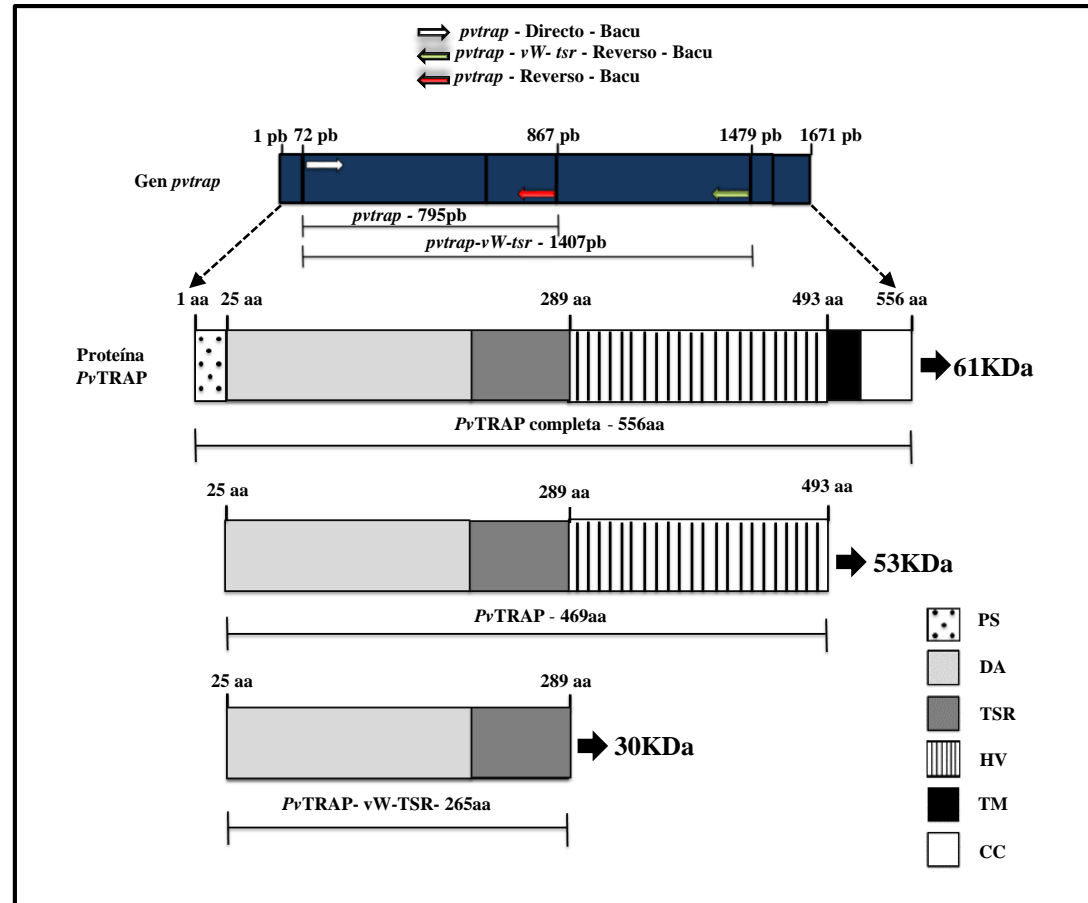
OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseño, obtención y purificación en el sistema de expresión de Baculovirus del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospodina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
2. Diseño y obtención en el sistema de expresión de Baculovirus de los dominio vonWillebrand (vWA) y trombospodina (TSR) de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospodina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
3. Determinar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospodina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2

Ciclo de vida de Baculovirus



Esquema del gen *pvtrap* y la proteína PvTRAP

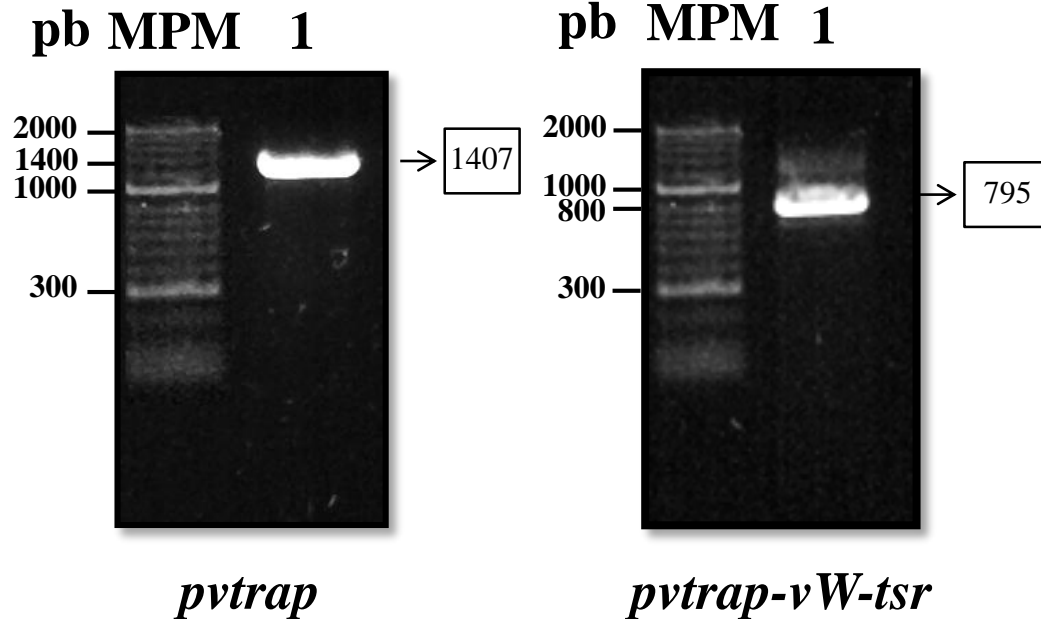


Amplificación del gen *pvtrap* y *pvtrap-vW-tsr*

Vivax Colombian
Guaviare-1
(VCG-1)

```
CG GGATCC CTGACGAAAAGGTTGTGGACG
GC TCTAGA TTTTGTAGCCATTATTTGATGA
GC TCTAGA TCAGAGGCTCAGGTTCCAC
```

pvtrap- Directo-Bacu
pvtrap- Reverso-Bacu
pvtrap-vW-tsr- Reverso-Bacu



Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Amplificación del gen

Generación de plásmidos recombinantes

Secuenciación

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

Generación de Bácmidos recombinantes

Transfección de células de insecto

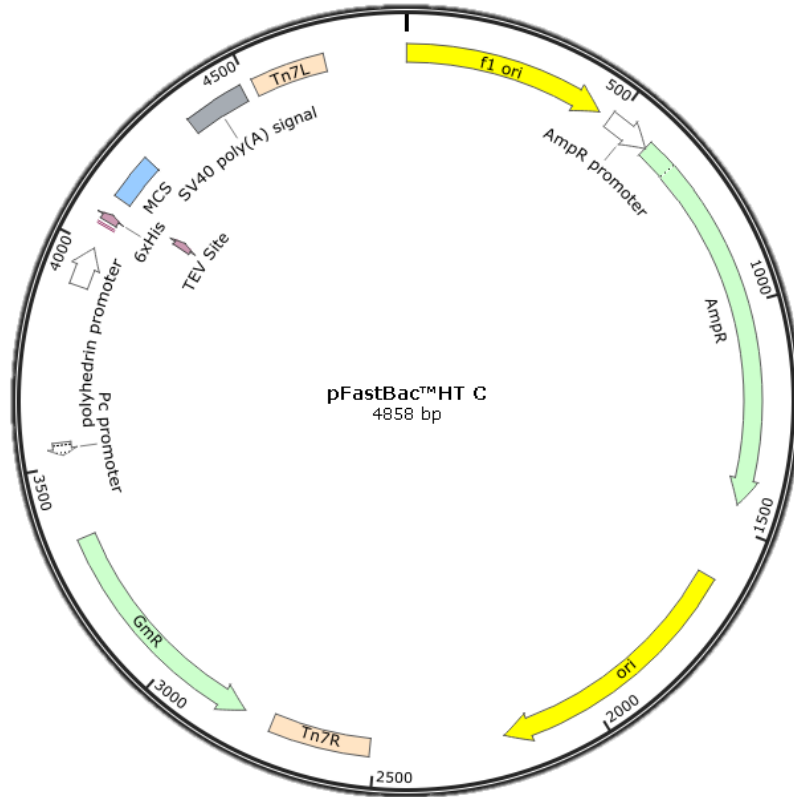
Generación de stocks virales

Extracción y purificación

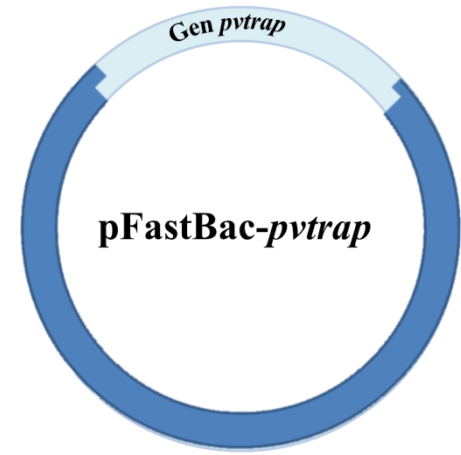
ENSAYO DE UNIÓN

Citometría de flujo

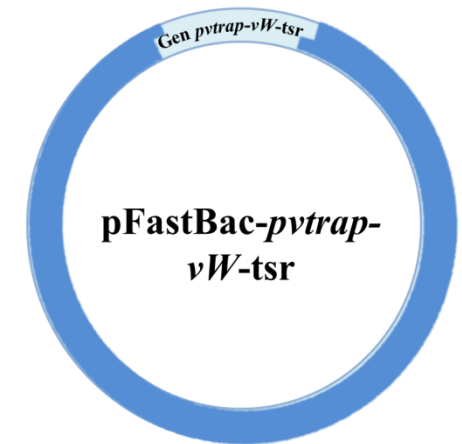
Tratamiento y ligación de los genes *pvtrap* y *pvtrap-vW-tsr* con el vector pFASTBac-HT-C.



pFASTBac-HT-C



pFastBac-*pvtrap*

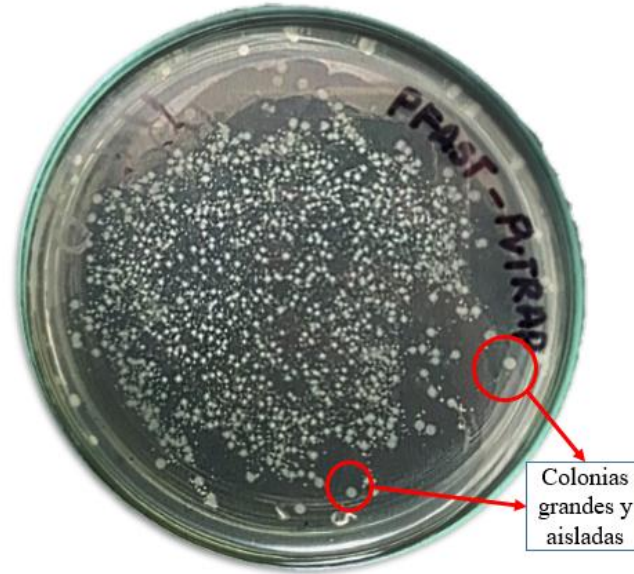


pFastBac-*pvtrap-vW-tsr*

Clonación

Resistencia a Ampicilina

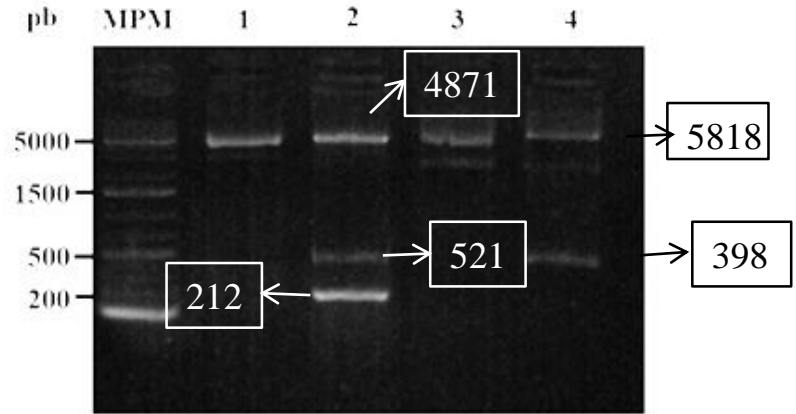
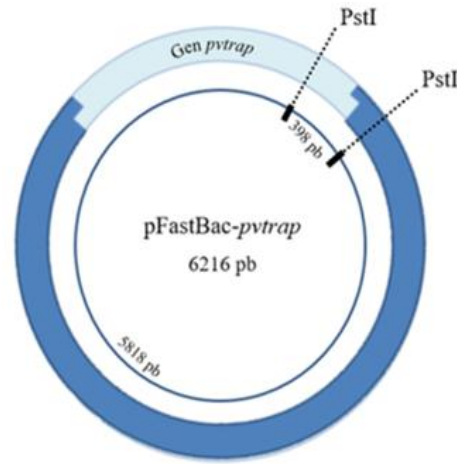
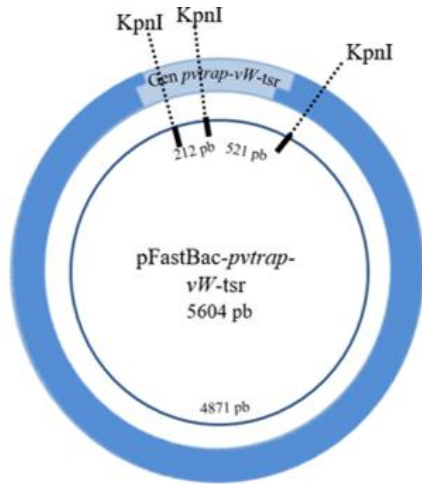
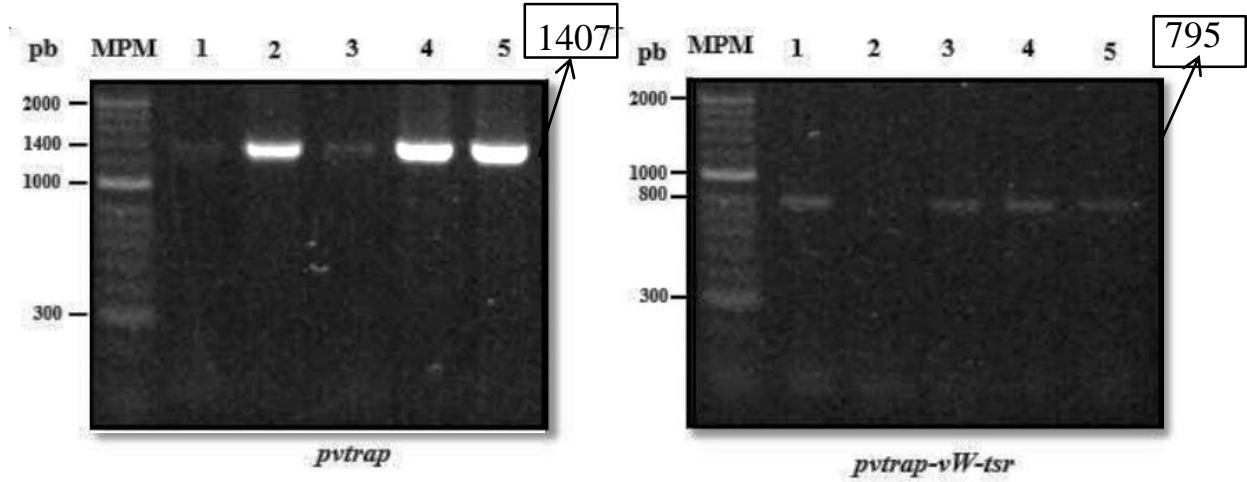
pFASTBac-HT-C



Células *E. coli* TOP 10 competentes

transformación.

Análisis de los plásmidos



Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

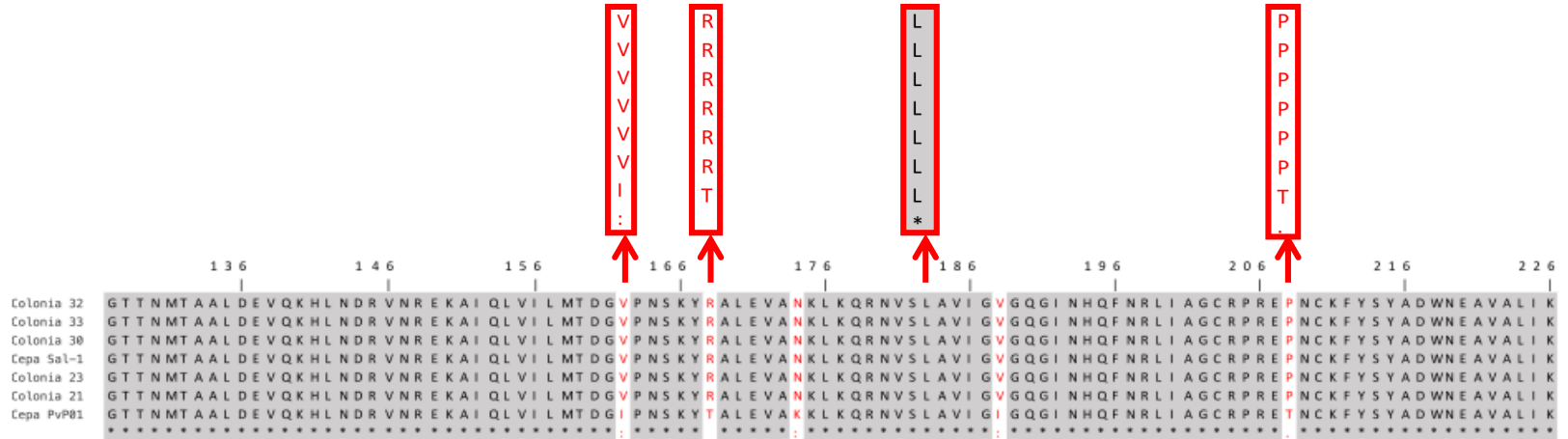
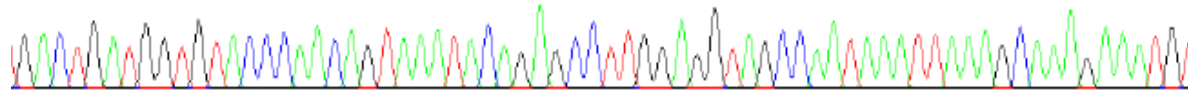
- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación

ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

Secuenciación

380 390 400 410 420 430 440
 :GACTGATGGTGTACCCAACAGTAAATACAGAGCCTTGAGGTAGCCAATAAATTTAAAGCAAAGAAATG:



Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

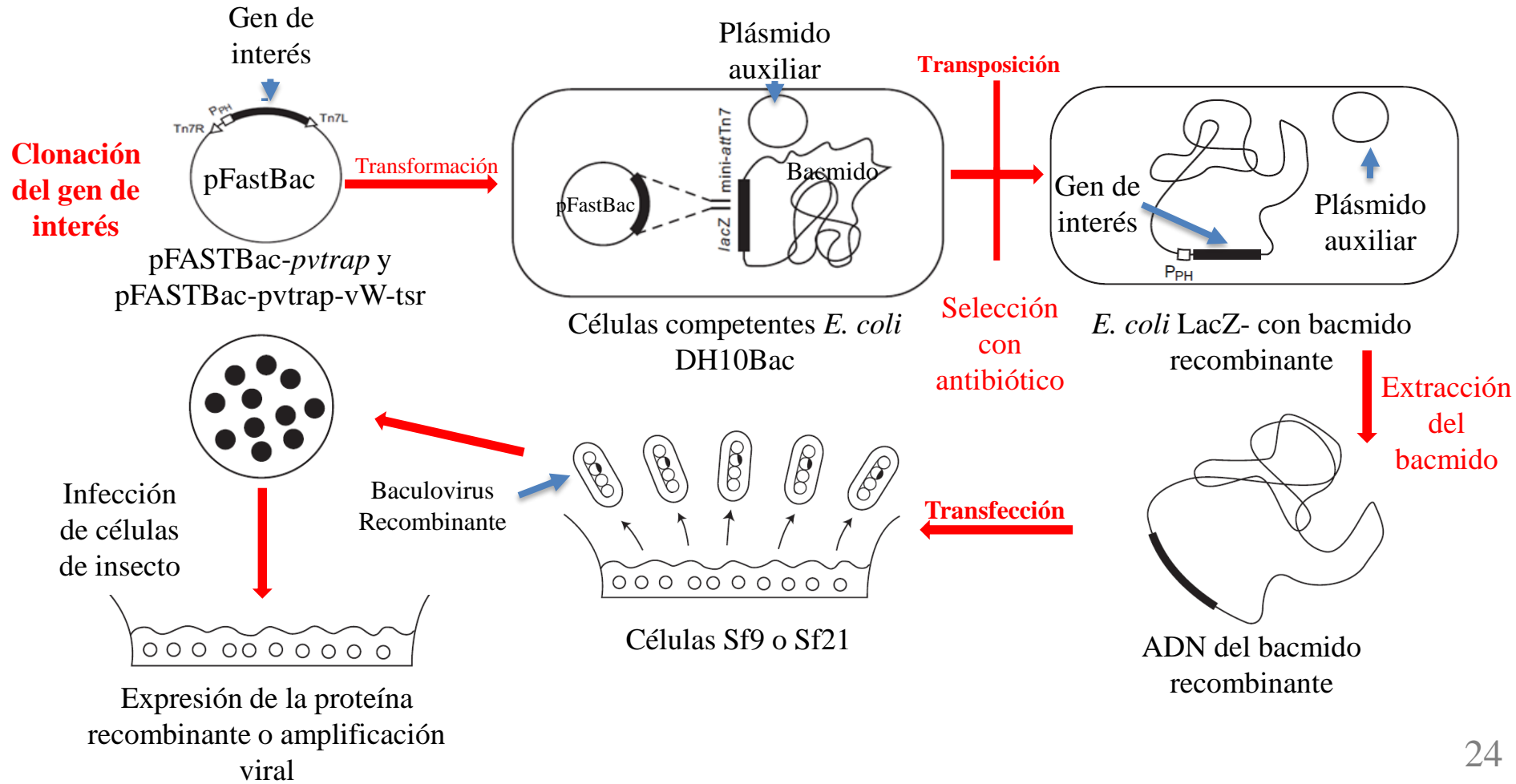
- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Báculos recombinantes**
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación

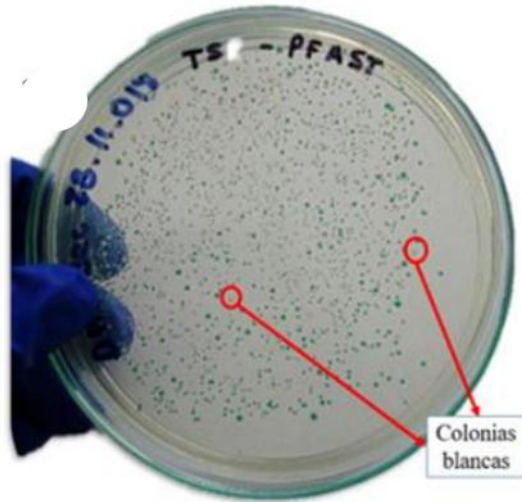
ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

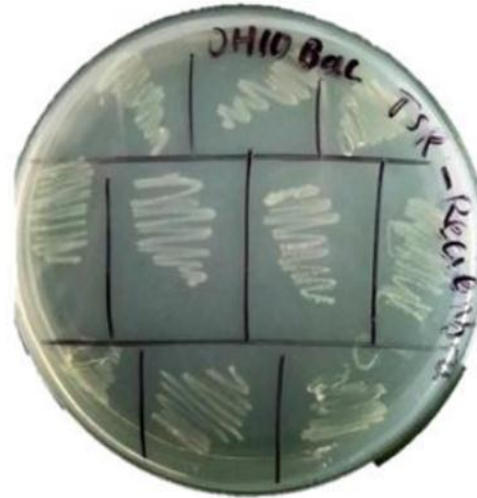


Generación de bácmidos recombinantes

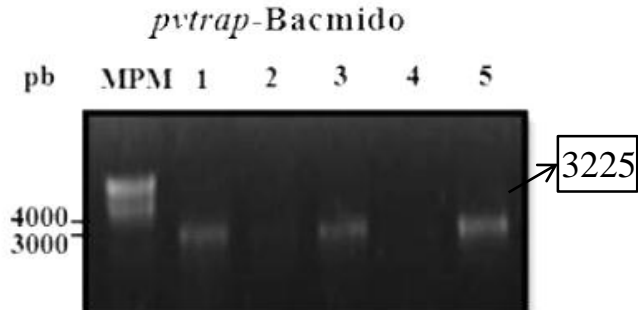
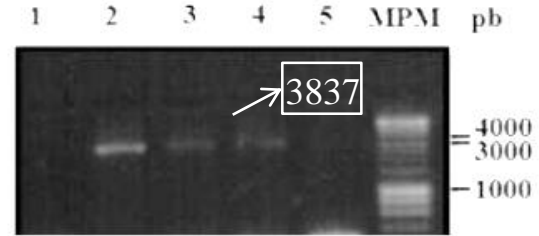
Resistencia a
Tetraciclina, Kanamicina
y Gentamicina



No hidrolisis de
X-gal



Células *E. coli* DH10Bac



pvtrap-vW-tsr-Bacmido

Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

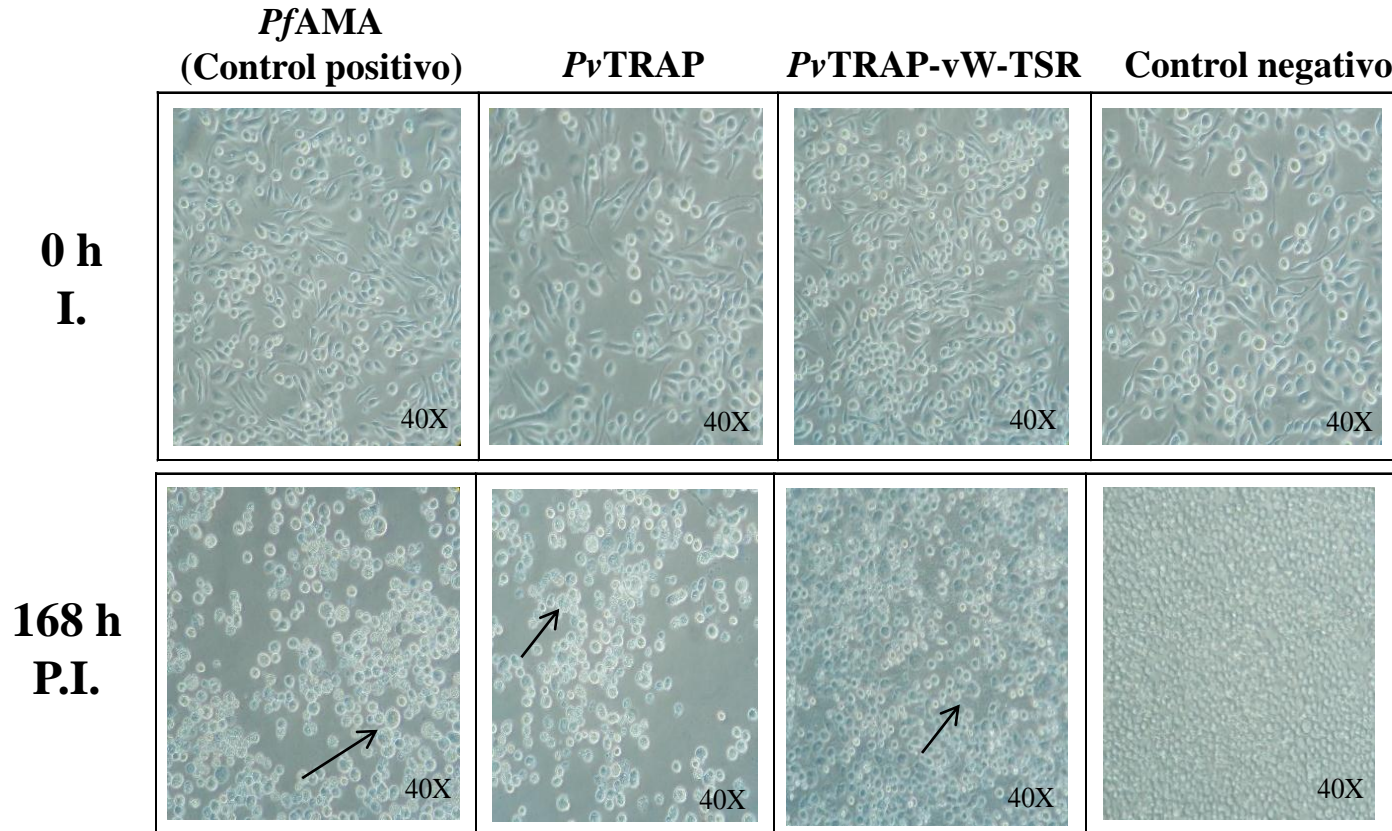
OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto**
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación

ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

Transfección de células de insecto



Efecto
citopático

Línea celular de insecto SF9

Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

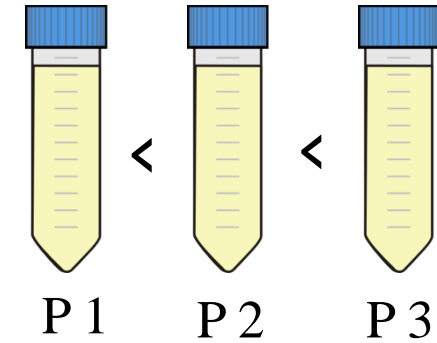
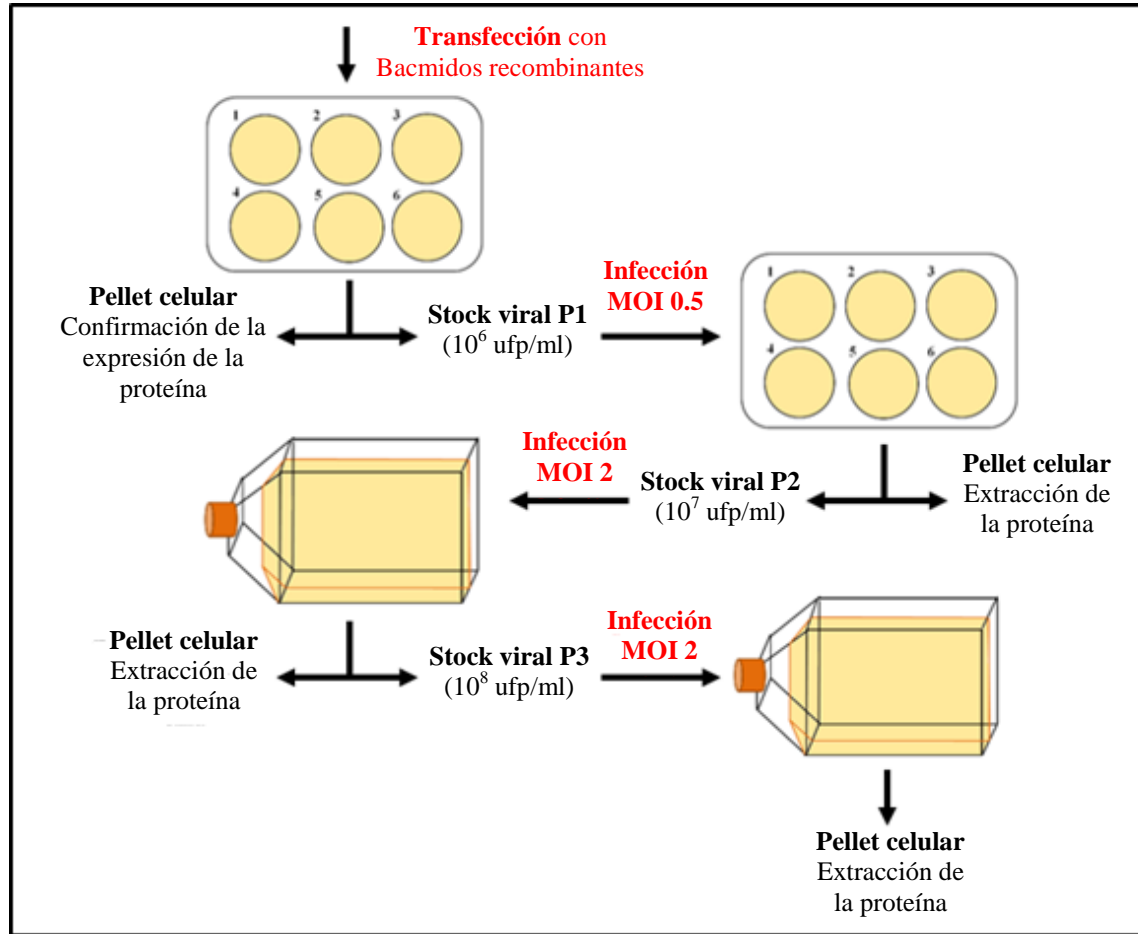
OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales**
- Extracción y purificación

ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

Generación de stocks virales



Pellet celular con proteína de interés

Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

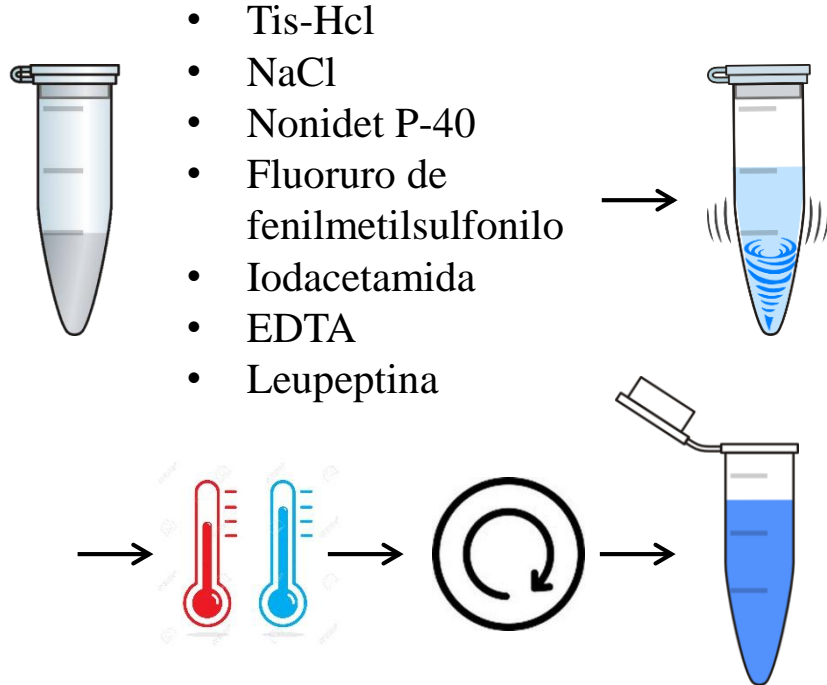
OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación**

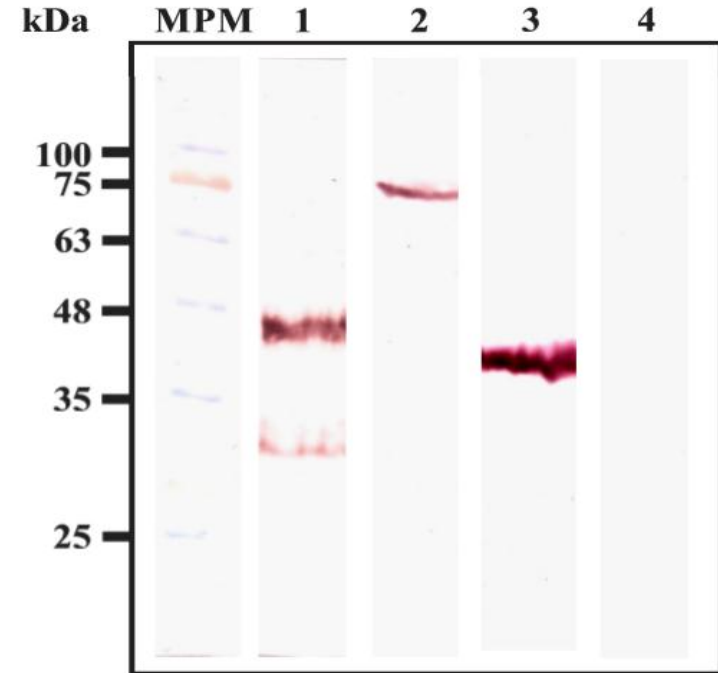
ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

Extracción de la proteína

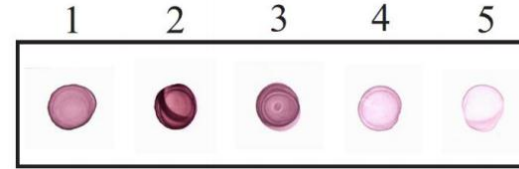
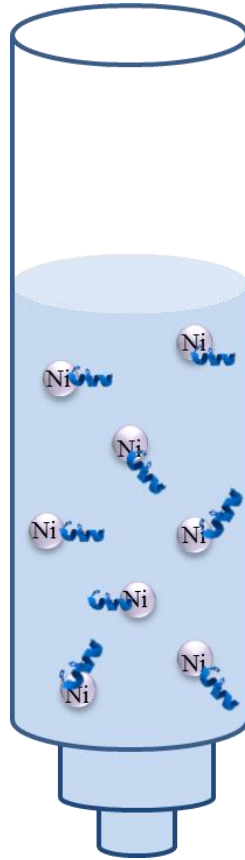


SDS-PAGE, Western Blot

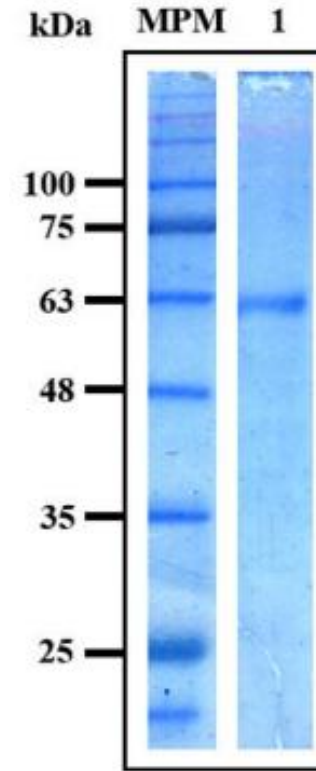


1. Control positivo: PfAMA
2. rPvTRAP con un peso ~75 kDa
3. rPvTRAP-vW-TSR con un peso ~ 40 kDa
4. Control negativo: Células SF9 transfectadas sin vector

purificación



rPvTRAP



Cromatografía de afinidad, Dot Blot, tinción con azul de Coomassie

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células hepáticas HepG2

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseño, obtención y purificación en el sistema de expresión de Baculovirus del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).

2. Diseño y obtención en el sistema de expresión de Baculovirus de los dominio vonWillebrand (vWA) y trombospondina (TSR) de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).

3. Determinar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2

Actividad de unión de PvTRAP a células HepG2

GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

- Amplificación del gen
- Generación de plásmidos recombinantes
- Secuenciación

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA

- Generación de Bácmidos recombinantes
- Transfección de células de insecto
- Generación de stocks virales
- Extracción y purificación

ENSAYO DE UNIÓN

- Citometría de flujo

Ensayo de unión



2×10^6 de células HepG2
+
25 μ g de rPvTRAP



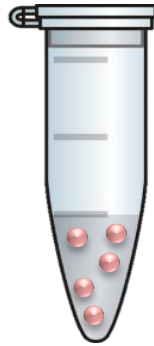
Proteína unida

+ Anti-histidinas
conjugado con APC

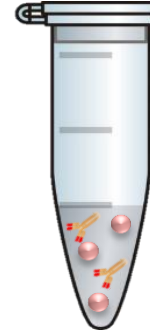


Anticuerpo unido a la
cola de histidinas

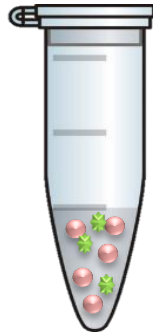
Ensayo de unión



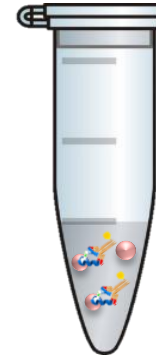
Control negativo
Células HepG2



Control APC
Células HepG2
+Anti-his-APC



Control PI
Células HepG2+PI



Ensayo de unión
Células HepG2+ 25 μ g de
rPvTRAP +Anti-His-APC

Citometría de flujo

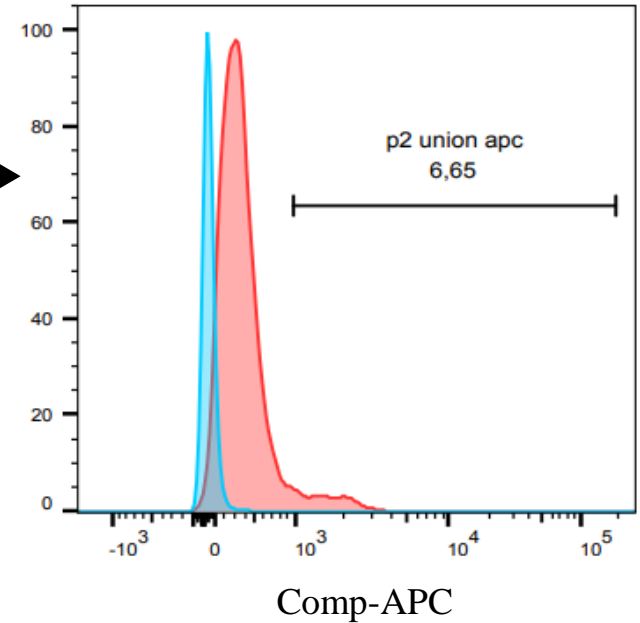
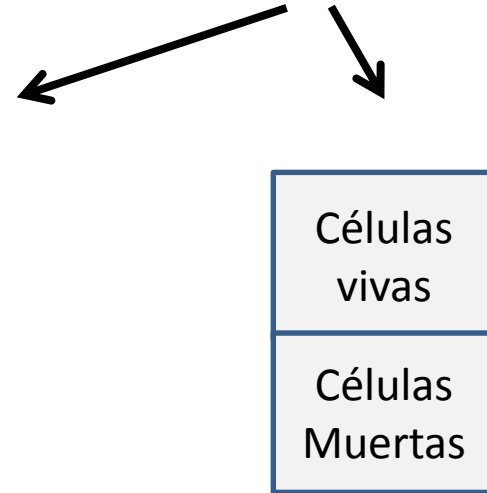
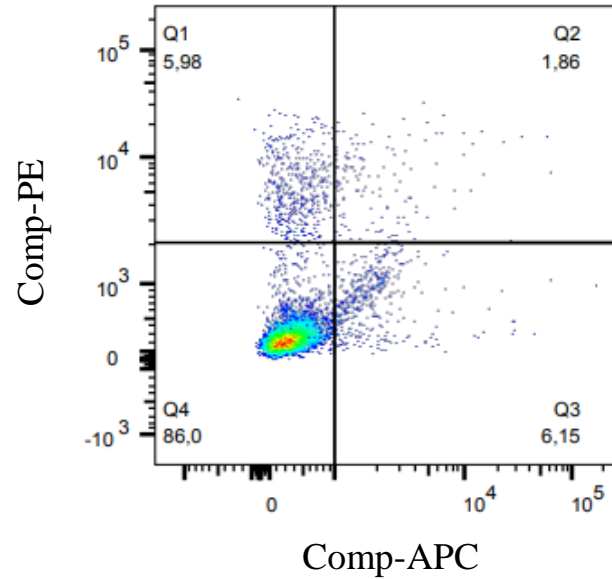
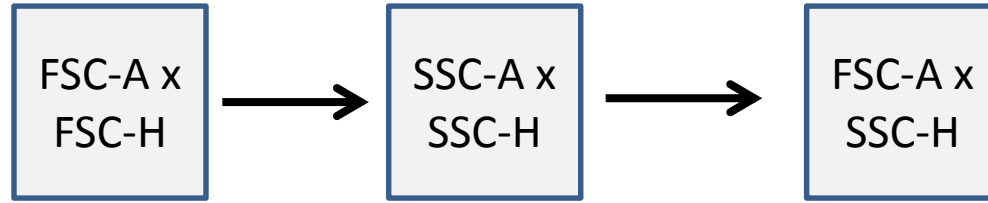


TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción (Planteamiento-Justificación)
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados y discusión
5. Conclusiones

CONCLUSIONES

- Los cebadores *pvtrap*-Directo-Bacu, *pvtrap*-Reverso-Bacu y *pvtrap-vW-tsr*-Reverso-Bacu amplificaron el fragmento correspondiente al ectodominio y a los dominios funcionales von Willebran y TSR de la PvTRAP
- Mediante transformación en *E. coli* TOP 10 competente se logró obtener plásmidos recombinantes con el gen de interés usando el vector pFASTBac.
- La PvTRAP de la cepa VCG-1 presentó cambios en comparación con una de las cepas de referencia de *P. vivax* denominada PvP01 de origen Asiático, debido posiblemente a la distribución geográfica y a mutaciones que usa para la distracción del sistema inmune en el hospedero.

CONCLUSIONES

- Las células Sf9 derivadas de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* transfectadas con Báculos recombinantes generados en células *E. coli* DH10Bac expresaron exitosamente la rPvTRAP.
- La rPvTRAP purificada se une a receptores presentes en la superficie de la línea celular hepática ATCC® HB-8065, confirmando su función biológica e importancia en el proceso de invasión.

Recomendación

- Hacer un mapeo mas fino de la proteína TRAP con el fin de identificar la especificidad de la unión.
- Determinar si los dominios von Willebrand y TSR son los encargados de interactuar con los receptores presentes en la superficie del hepatocito
- Determinar la naturaleza del receptor

GRACIAS