



Estudio preliminar de la expresión de un fragmento de la proteína hipotética PFL1395c de *Plasmodium falciparum* en un sistema heterólogo

**Yuri Tatiana Cárdenas Galindo
Jeymy Victoria Contreras Jiménez**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2019**



Estudio preliminar de la expresión de un fragmento de la proteína hipotética PFL1395c de *Plasmodium falciparum* en un sistema heterólogo

Edith del Carmen Hernández Rojas - MSc
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Asesora Interna

Gladys Thalía Cortés Cantín - cPh.D.
Docente Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia
Asesora Externa

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2019

MARCO TEÓRICO

MALARIA

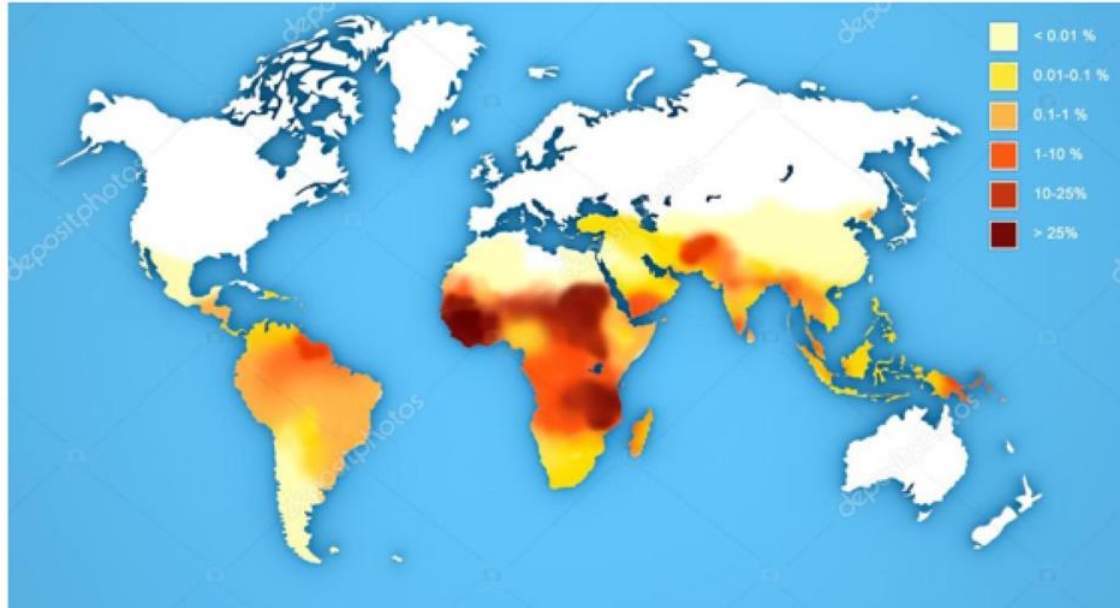
Enfermedad potencialmente mortal causada por **hemoparásitos** del genero *Plasmodium*

- *P. falciparum*
- *P. vivax*
- *P. ovale*
- *P. malariae*
- *P. knowlesi*



REPORTES

ÁREAS CON RIESGO DE MALARIA



Tomado de: <https://sp.depositphotos.com/19260235/stock-photo-malaria-disease-spread-map-areas.html>

BES notifico 29.442 casos de malaria por *P. falciparum* en el 2018

OMS en el 2017 estimo **445.000** muertes a nivel mundial a causa de esta enfermedad.

Plasmodium falciparum

Causa la forma más grave de la enfermedad



VIRULENCIA

- Capacidad de cito adherencia al sistema capilar de los órganos
- Rápida multiplicación
- Invasión de los eritrocitos

PROTEÍNAS DE *Plasmodium falciparum*

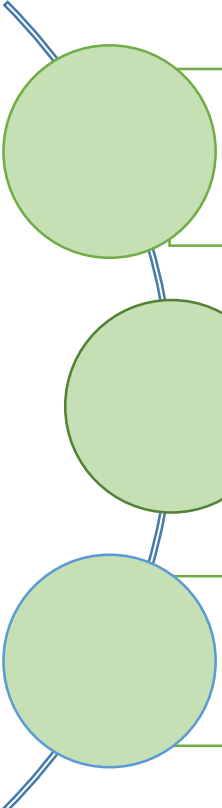
PROTEÍNA	FUNCIÓN
Membrana	Salida y entrada de sustancias Transporte entre compartimientos celulares.
Choque térmico	Minimizar los daños producidos por el estrés.
Enzimáticas	Biocatalizadores de las reacciones químicas del metabolismo celular.
Transporte celular	Regulan el movimiento de las moléculas solubles en agua
Hipotéticas conservadas	Diversidad

PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE *Plasmodium falciparum*

PFDG_02272	PFHG_01218	PFUGPA_04934	PFTANZ_01345
PFMALIP_01315	PFNF135_01392	PFFCH_05251	PFFVO_01290
PFDG_01793	PFDG_00228	PFHG_04183	PFUGPA_03099
PFUGPA_03130	PFTANZ_04541	PFTANZ_05637	PFMC_04555
PFMALIP_04451	PFFVO_04201	PFDG_03858	PFDG_03499
PFHG_0519	PFNF135_04764	PFHG_04913	PFMG_04278
PFUGPA_00875	PFL1385	PFUGPA_02000	PFAG_01258
PFBG_01289	PFMC_04157	PFDG_03964	PFL1395C

NCBI 6.079

PROTEÍNA PFL1395c

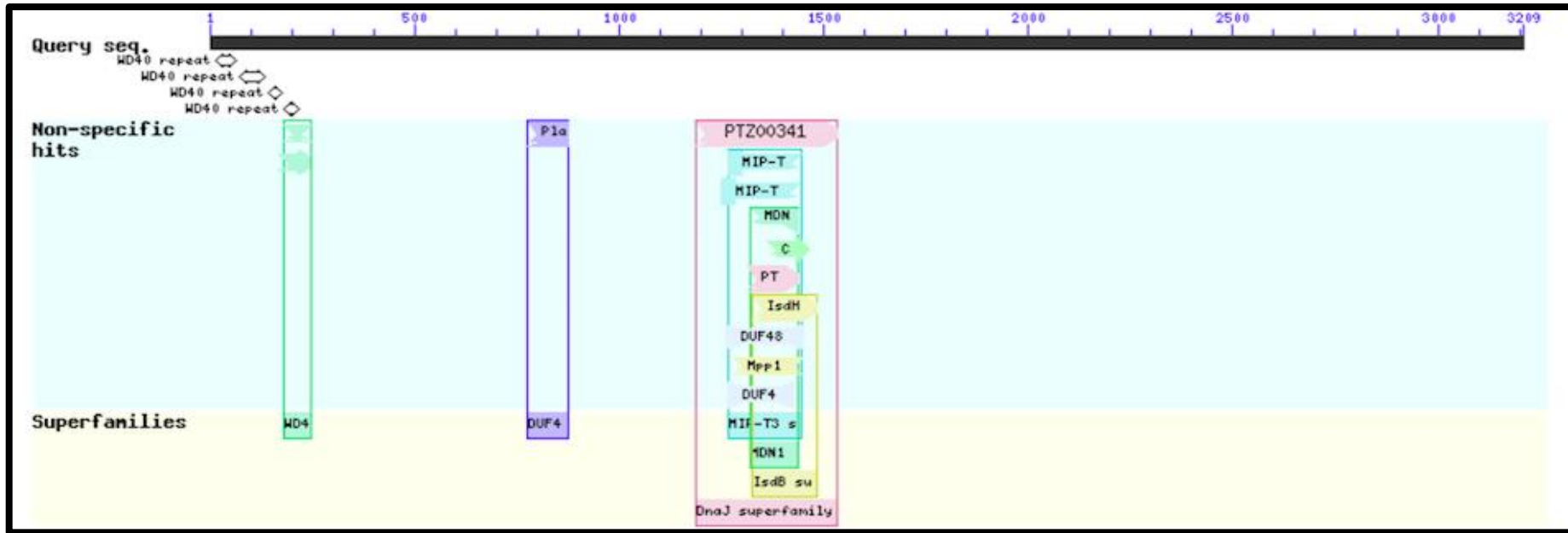


Proteína hipotética de función desconocida
conservada en los parásitos del género
Plasmodium

Cromosoma 12. 3209 aa

Peso molecular : 214397.24

DOMINIOS DE LA PROTEÍNA PFL1395c



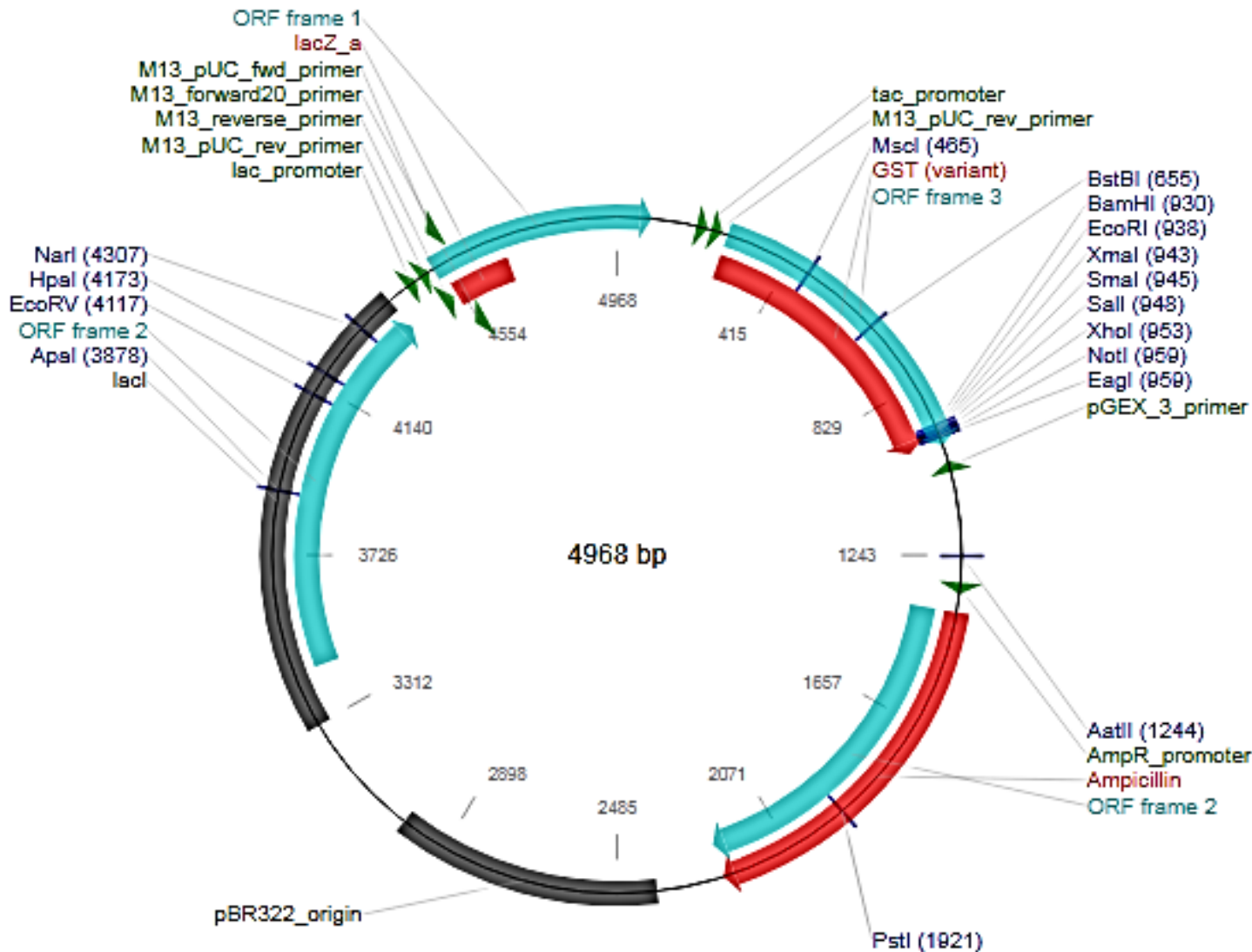
Tomado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=XP_001350685.1

Dominio J

Dominio DUF 47- Domain of Unfunction Function 47

Dominio WD40 - Dipéptido compuesto por triptófano y ácido aspártico

VECTOR pGEX 4T-3



Tomado de: <https://www.addgene.org/vector-database/2878/>

Características:

- Ori
- Promotor_Lac
- alelo promueve la sobreexpresión del represor
- promotor Tac (inducible por IPTG)
- GST (Gen que codifica la glutation S transferasa).
- Promotor amOR

OBJETIVOS

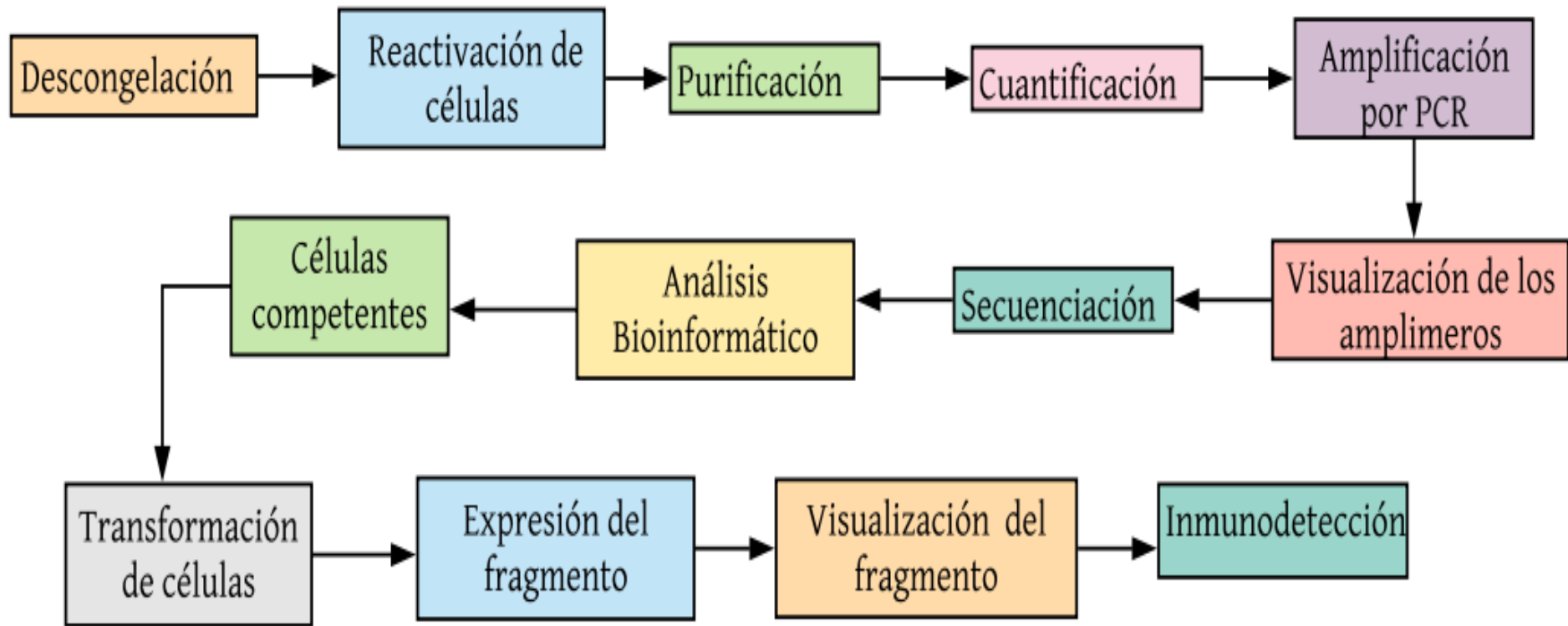
General

Realizar un estudio preliminar de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c en un sistema de expresión heterólogo.

Específicos

- Estandarizar un método de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c utilizando para esto expresión heteróloga
- Determinar la presencia de un fragmento de la proteína PFL1395c de *P. falciparum* expresada en un sistema heterólogo a través de un inmonoblot tipo Dot blot

METODOLOGÍA

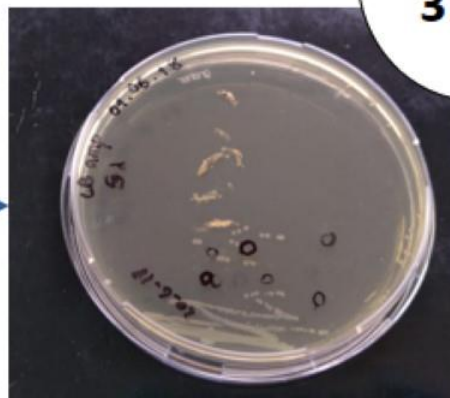


Reactivación, purificación y cuantificación

E. coli XL1- Blue +
pGEX4T-3



- 80° C



16 H
37° C



12 muestras

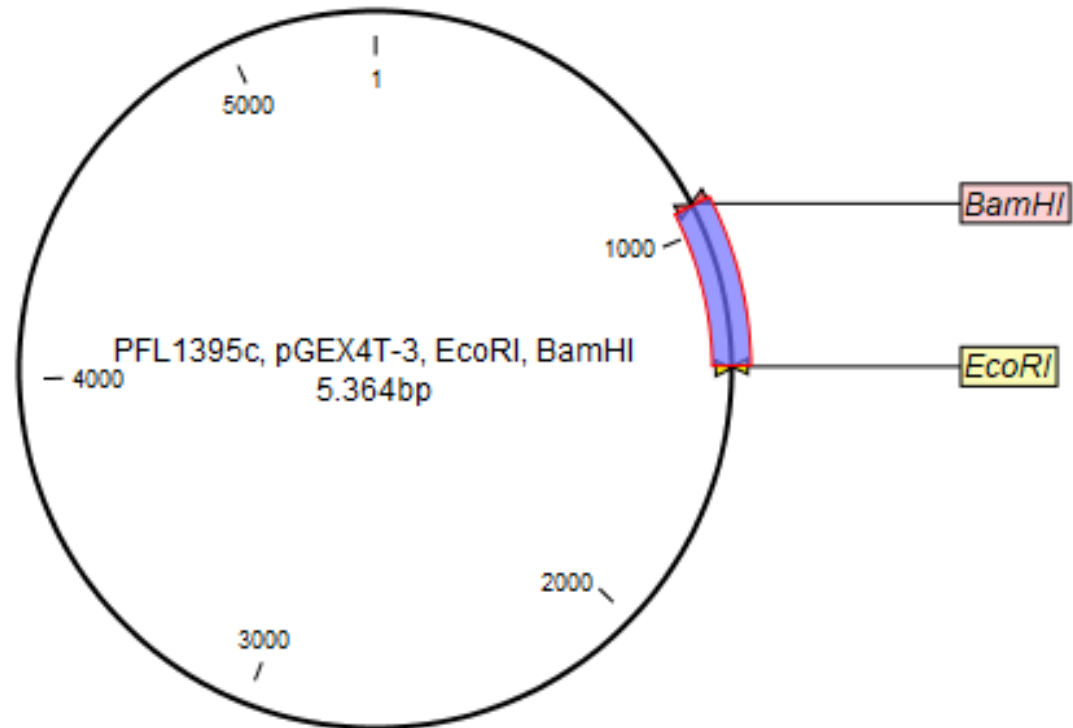
Miniprep



NanoDrop
2000c

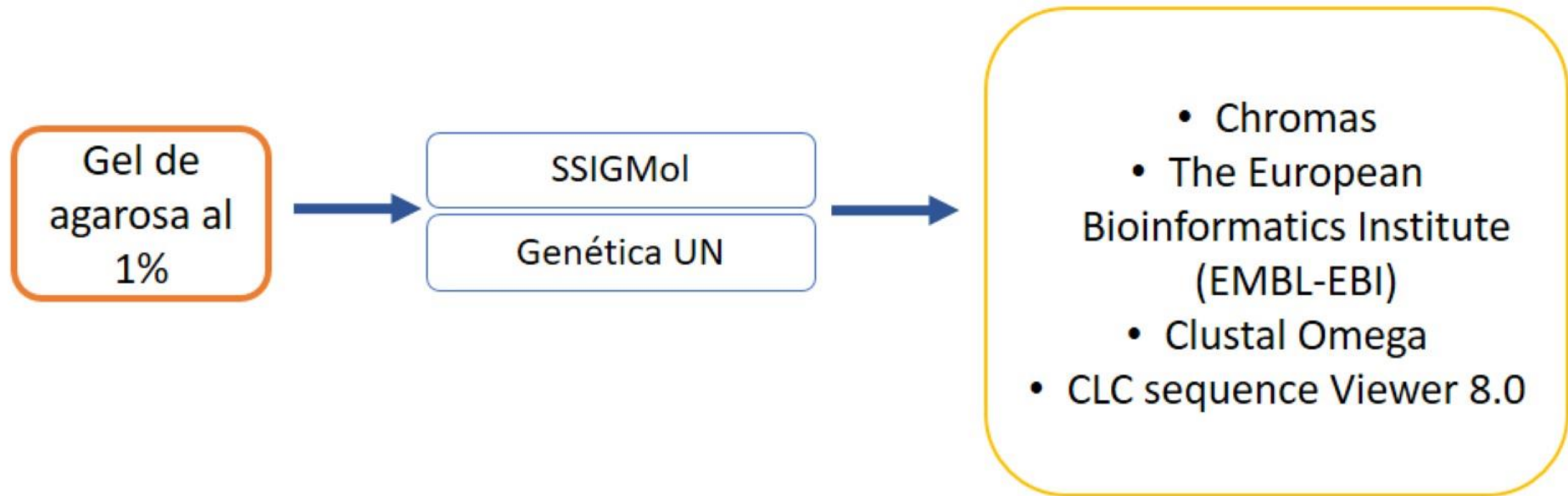
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Dr. Claudio Gómez
UNAL



Primer	Secuencia	Amplimero esperado
P ₁ (forward)	5' CGT <u>GGATCC</u> ATTATCGATGATACAGAAC 3'	403 pb
P ₂ (reverse)	5' GTAGACTATATAATTGTCGT <u>CTTAAG</u> CCC 3'	

EGA y secuenciación



Gel de
agarosa al
1%

SSIGMol

Genética UN

- Chromas
- The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)
- Clustal Omega
- CLC sequence Viewer 8.0

Transformación de células

E. coli BL21
(DE3)



- 80° C



16 H
37° C



Choque térmico

Hielo 35'
42 °C por 80''
Hielo 5'

Expresión, visualización e inmunodetección

IPTG



SDS-PAGE

Gel concentrador
5%

Gel separador 15%

Inmunodetección

Memb. De
nitrocelulosa

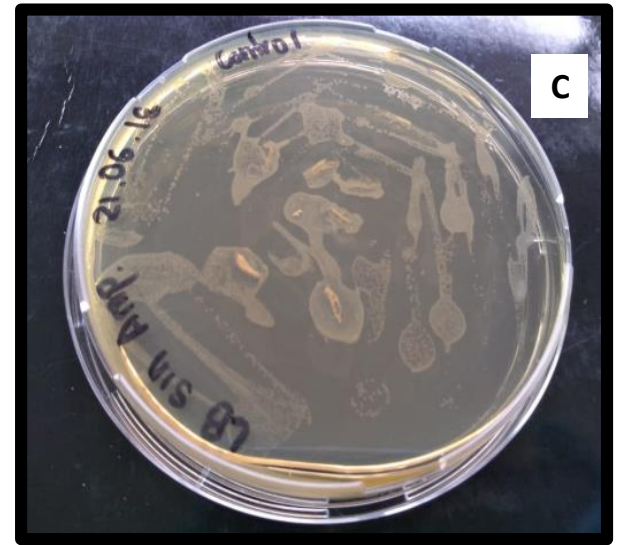
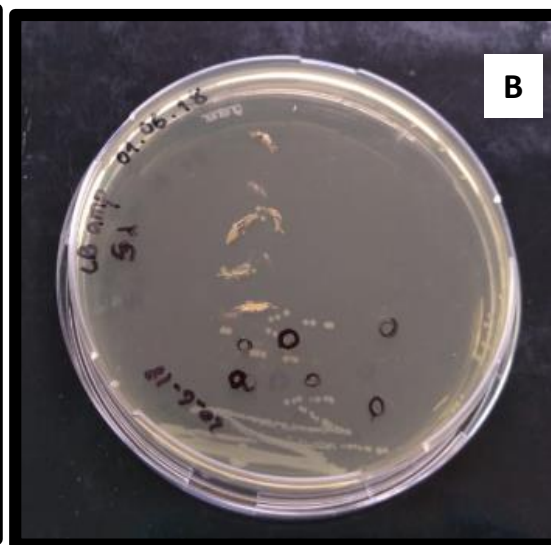
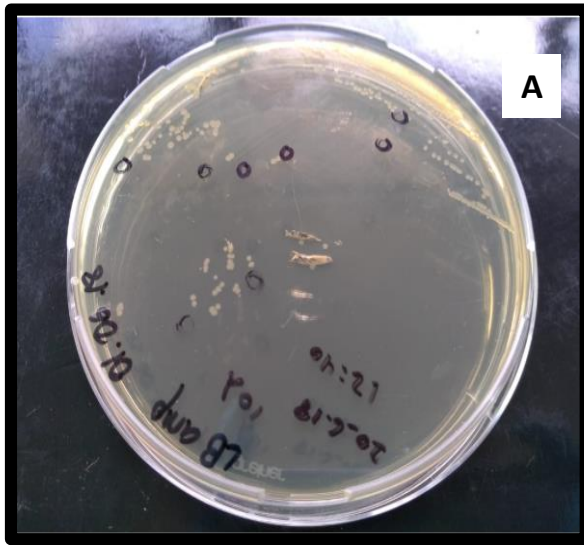
Ac. Secundario +
FA

AcM7

Aproximación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación de células *E. coli* XL1-Blue



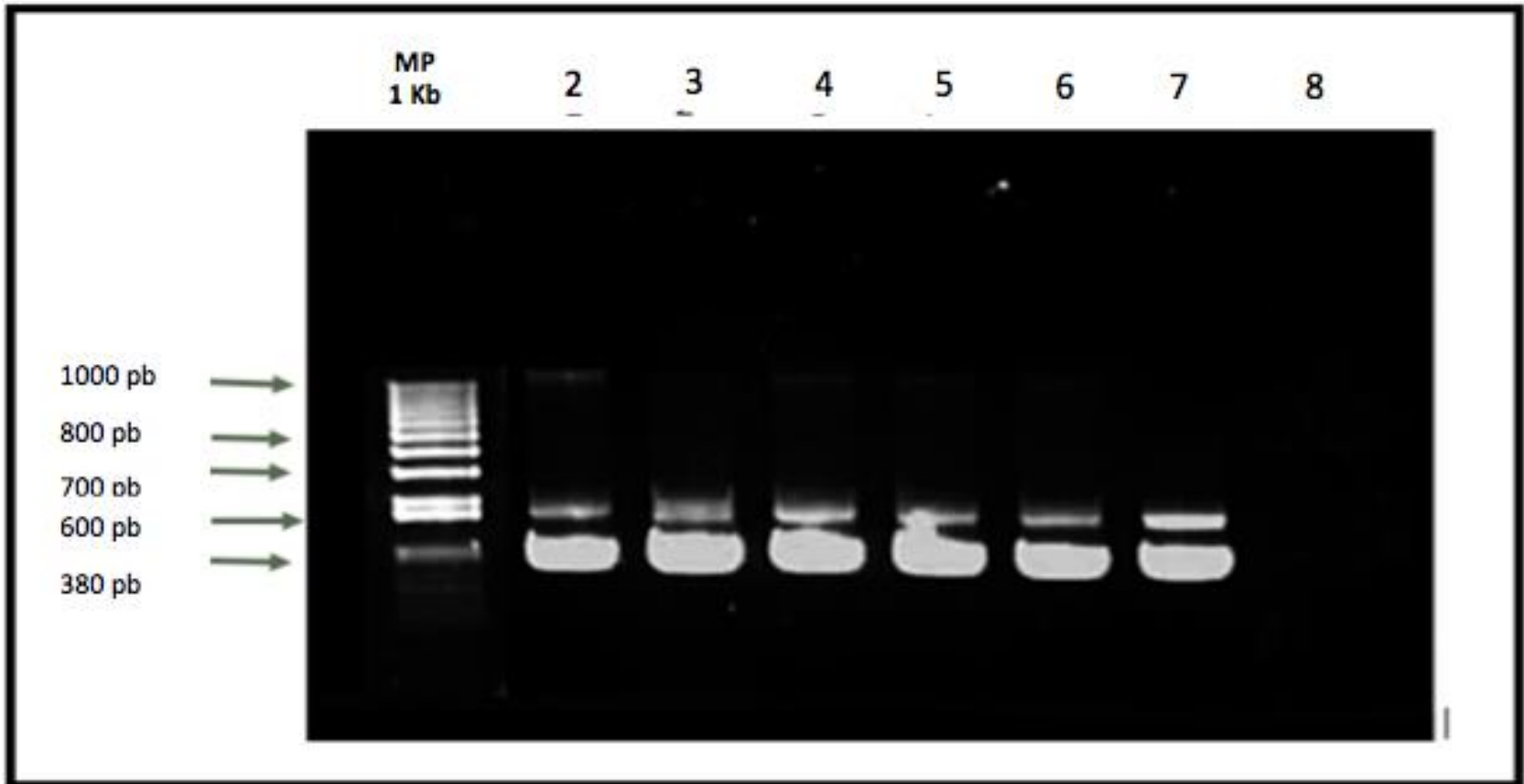
- A. Medio LB/amp, crecimiento de células *E. coli* XL1-Blue
- B. Medio LB/amp, crecimiento de células *E. coli* XL1-Blue
- C. Medio LB , crecimiento *E. coli* XL1-Blue

Cuantificación de ADN

Muestra	260/280	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μl)
1	1,9	337
3	1,89	442
5	1,97	468
6	1,92	403
7	1,96	390
8	1,93	1.046
11	1,97	346
12	1,96	468

Columna 1: Muestras de 1-12
Columna 2: Relación 260/280 del ADN
Columna 3: Concentración de ácidos nucleicos

Visualización de los amplímeros



Carril 1: Marcador de peso molecular
Carriles 2-7: Respectivas muestras
Carril 8: Control

Congreso C2B2.
Colombia, 2018.

Cortés GT. Colombia.
Proceso de sustentación

Alineamiento

Clon5RVc	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTCTGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	480
Clon6RVc	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTCTGAAGAAAAGGAGAAAGAAAAAATAAAGGT	166
Clon6FW	-----AATAAAGGT	9
PFL1395c(Contro11)	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTCTGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	63
pGEX_396(contro12)	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTCTGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	63

Clon5RVc	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAATTAAATAATGAAACACTTAAGGAA	540
Clon6RVc	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAATTAAATAATGAAACACTTAAGGAA	226
Clon6FW	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAATTAAATAATGAAACACTTAAGGAA	69
PFL1395c(Contro11)	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAATTAAATAATGAAACACTTAAGGAA	123
pGEX_396(contro12)	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAATTAAATAATGAAACACTTAAGGAA	123

Clon5RVc	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	600
Clon6RVc	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	286
Clon6FW	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	129
PFL1395c(Contro11)	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	183
pGEX_396(contro12)	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	183

Clon5RVc	CAGATTTTATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	660
Clon6RVc	CAGATTTTATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	346
Clon6FW	CAGATTTTATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	189
PFL1395c(Contro11)	CAGATTTTATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	243
pGEX_396(contro12)	CAGATTTTATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	243

Clon5RVc	TTAATAAGAACAAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACgCAA	720
Clon6RVc	TTAATAAGAACAAAGTCGTACCAGCAACATTGT-----	379
Clon6FW	TTAATAAGAACAAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	249
PFL1395c(Contro11)	TTAATAAGAACAAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	303
pGEX_396(contro12)	TTAATAAGAACAAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	303
	***** ** * * *	

Marco de lectura abierta del clon 6

ORF1 (201 nt)

Display ORF as...

Unmark

ORF1 CDS translation

```
1 ATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAAATAATGAAACACTT
  M K N Y N V S K K L N N E T L
46 AAGGAAGATGATAATATATATAATATAACATTTAGAAGATCATAAT
  K E D D N I Y N I H L E D H N
91 AAAATAGAAGATATATATAATCAGATTTTCATATAATGAATATGAA
  K I E D I Y N Q I S Y N E Y E
136 CCAAATAATCTAAAACCATCAGGCATACGTCCTAAATTAATAAGA
  P N N L K P S R I R P K L I R
181 ACAAATTCGTTACCAGCAACA
  T N S L P A T *
```

Congreso C2B2.
Colombia. 2018.

Cortés GT. Colombia.
Proceso de sustentación

Análisis Bioinformático

Basic Local Alignment Search Tool (BLASTx) del clon 6

WD repeat-containing protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]

Sequence ID: [XP_001350685.1](#) Length: 3209 Number of Matches: 1

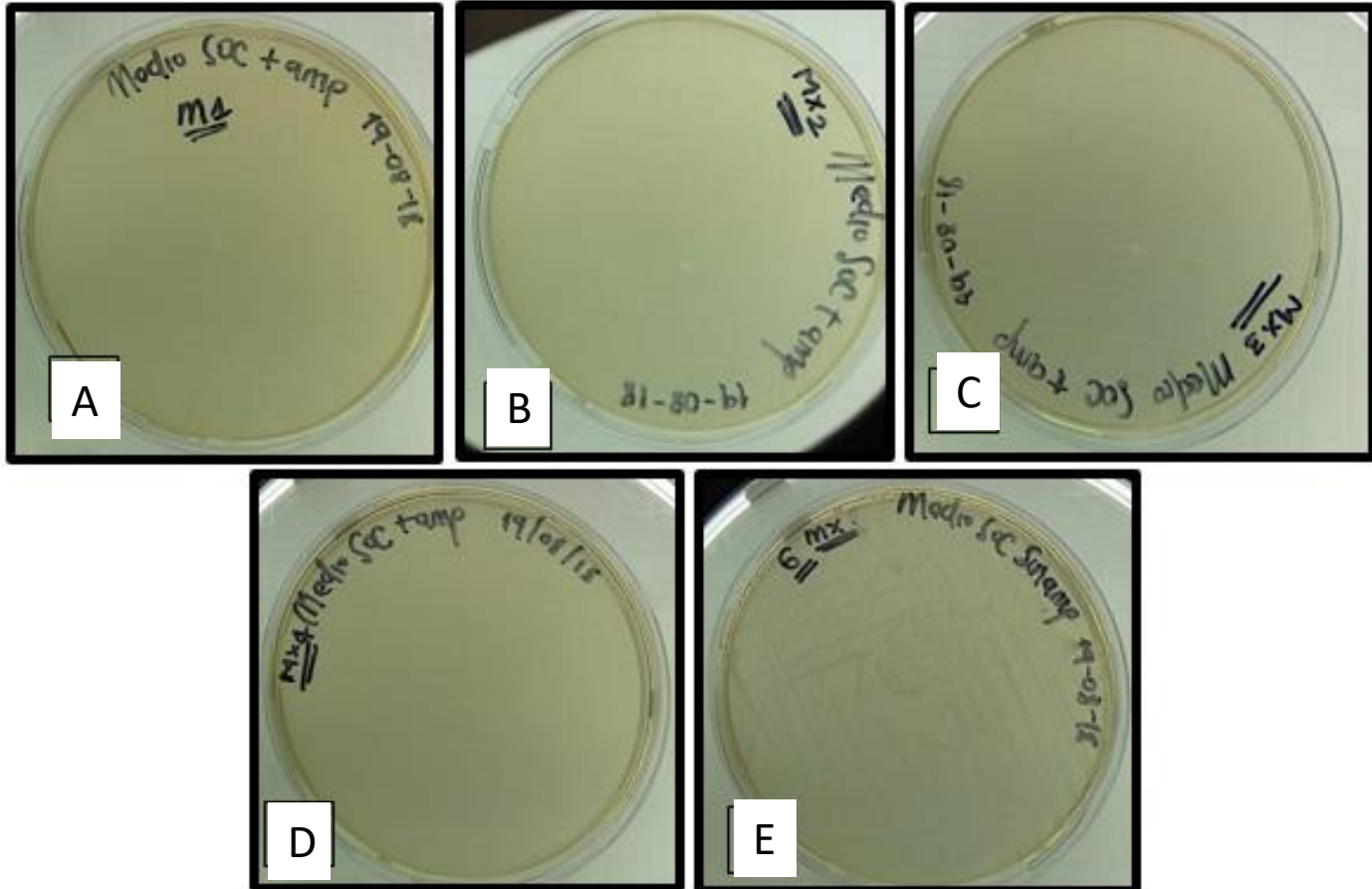
Range 1: 2788 to 2854 [GenPept](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
135 bits(340)	1e-37()	Compositional matrix adjust.	67/67(100%)	67/67(100%)	0/67(0%)	

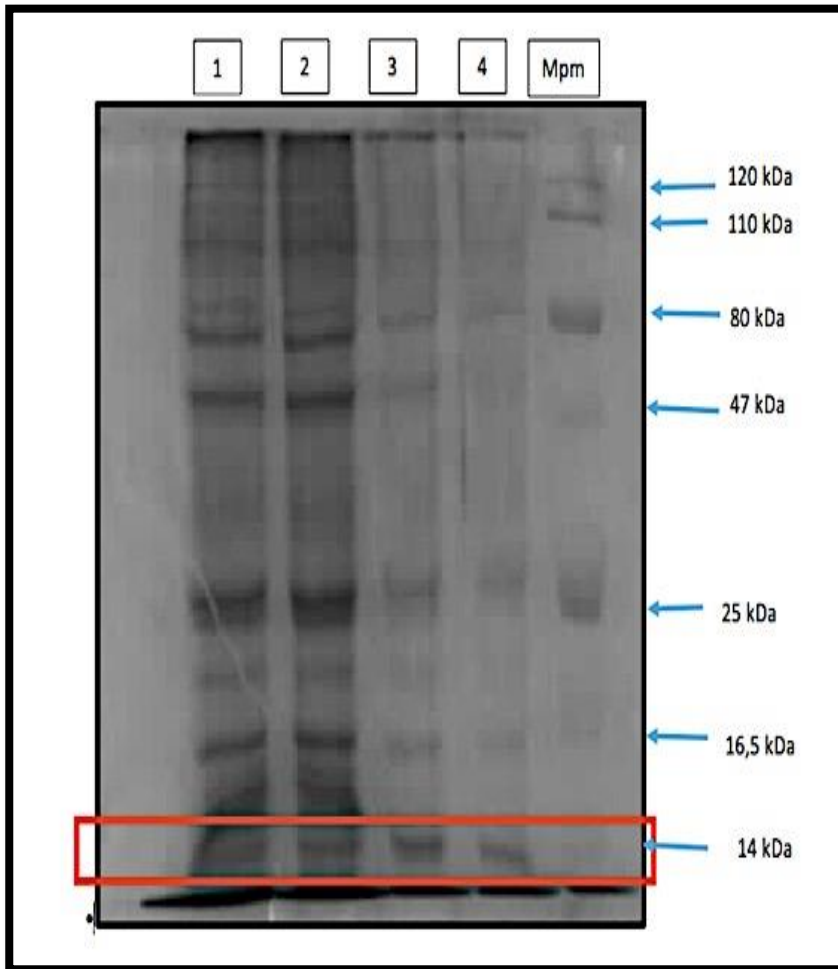
Query	1	MKNYNVSKKLNNETLKEDDNIYNIHLEDHNKIEDIYNQISYNEYEPNNLKPSRIRPKLIR	60
		MKNYNVSKKLNNETLKEDDNIYNIHLEDHNKIEDIYNQISYNEYEPNNLKPSRIRPKLIR	
Sbjct	2788	MKNYNVSKKLNNETLKEDDNIYNIHLEDHNKIEDIYNQISYNEYEPNNLKPSRIRPKLIR	2847
Query	61	TNSLPAT	67
		TNSLPAT	
Sbjct	2848	TNSLPAT	2854

Transformación de células competentes *E. coli* BL21(DE3)



A y B. Células transformadas mx 5 y 6 en SOC/Amp
C. Células transformadas con la muestra pGEX 396(2)
D. pGEX sin ADN insertado en medio SOC/Amp
E. pGEX sin ADN insertado en medio SOC

SDS-PAGE

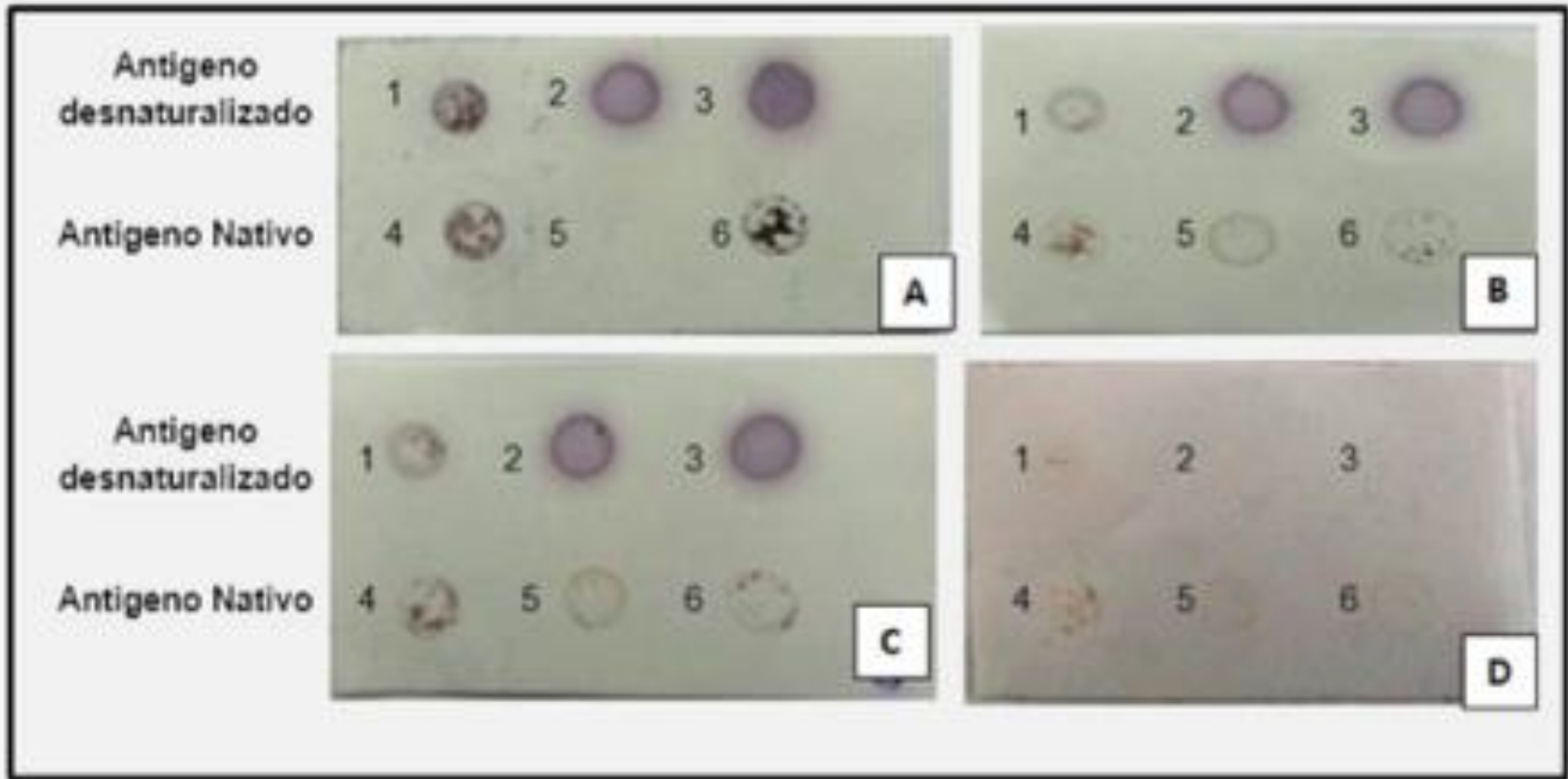


1- 4. Solubilizado Tritón X
5. Marcador de peso molecular

LaCount et al. USA.2005

Cho et al. República de
Corea.2016

Inmunoblot tipo Dot_Blot



A y B. AcM 7 diluido 1:2
C. AcM7 diluido 1:10
D. Control negativo

Cortés et al. USA. 2003.

- Detección de la proteína HSP70-2 por el AcM7

Hafeez U et al. Australia. 2018

- Herramientas útiles para el diagnóstico y tratamiento de diferentes patologías.

CONCLUSIONES

- La secuencia de la proteína expresada tiene una homología del 100 % con la secuencia que codifica para la proteína *WD repeat- containig protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]*.
- Se estandarizó un método de expresión para un fragmento de aproximadamente 201 pb localizado en la región C-terminal de la proteína de función desconocida PFL1395c, a través de células transformadas *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido de expresión y clonación pGEX 4T-3.
- Se evidenció el reconocimiento de la proteína HSP70 por parte del AcM7

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darnos la fuerza y sabiduría para lograr finalizar con éxito este trabajo de grado.
- A nuestros padres por su apoyo y motivación diaria.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por todo el apoyo y comprensión recibidos.
- A la Universidad Nacional de Colombia por habernos brindado la oportunidad de realizar este trabajo de grado en sus instalaciones y especialmente a nuestro grupo de investigación, Biología Celular por todo el aprendizaje brindado durante el desarrollo del mismo.
- A nuestra asesora, la Dra. Gladys Thalia Cortés Cantín, por su paciencia, confianza y aprendizaje brindado.
- A nuestra asesora Edith Hernández Rojas por la dirección del mismo, nuestros más sinceros agradecimientos por todo su apoyo, orientación y comprensión durante la realización de éste trabajo.
- A la Dra. Gabriela Arévalo por su colaboración, comprensión y aportes durante el desarrollo de nuestro trabajo de grado.