

Interacción de la proteína TLP de *Plasmodium vivax* con células hepáticas y epiteliales como mediadora del **atravesamiento celular.**

Autor:

David Felipe Cardona Guarín

Trabajo de grado

Para optar el título de Bacteriólogo y Laboratorista
Clínico

Asesora interna: Gabriela Arévalo Pinzón Ph.D

Asesora externa: Jeimmy Johana Castañeda
Ramírez. M.Sc.



Fundación Instituto
de Inmunología de
Colombia



Universidad
Colegio Mayor de
Cundinamarca

MALARIA

Anopheles spp



Cinco especies del parásito intracelular *Plasmodium spp* infecta humanos

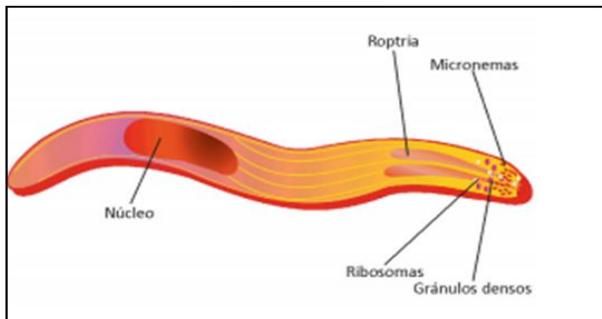
P. falciparum

P. ovale

P. vivax

P. malariae

P. knowlesi



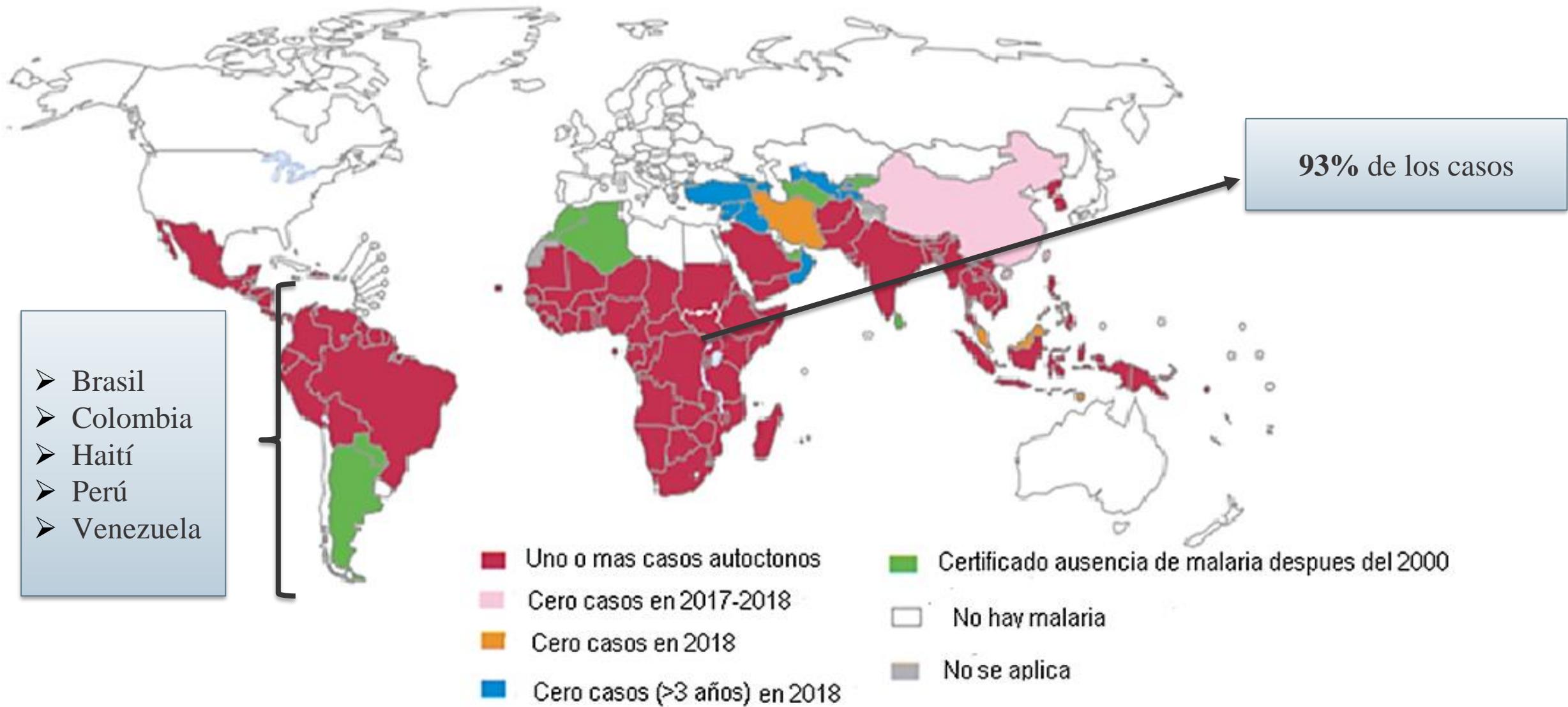
Esporozoíto estadio infeccioso

Manifestaciones clínicas:

- ❖ Regiones tropicales y subtropicales
- ❖ Mas grave en niños menores de 5 años y mujeres embarazadas

- ❖ Paroxismos febriles
- ❖ Anemia
- ❖ Esplenomegalia
- ❖ Fiebre
- ❖ Asintomáticos

EPIDEMIOLOGIA



COLOMBIA

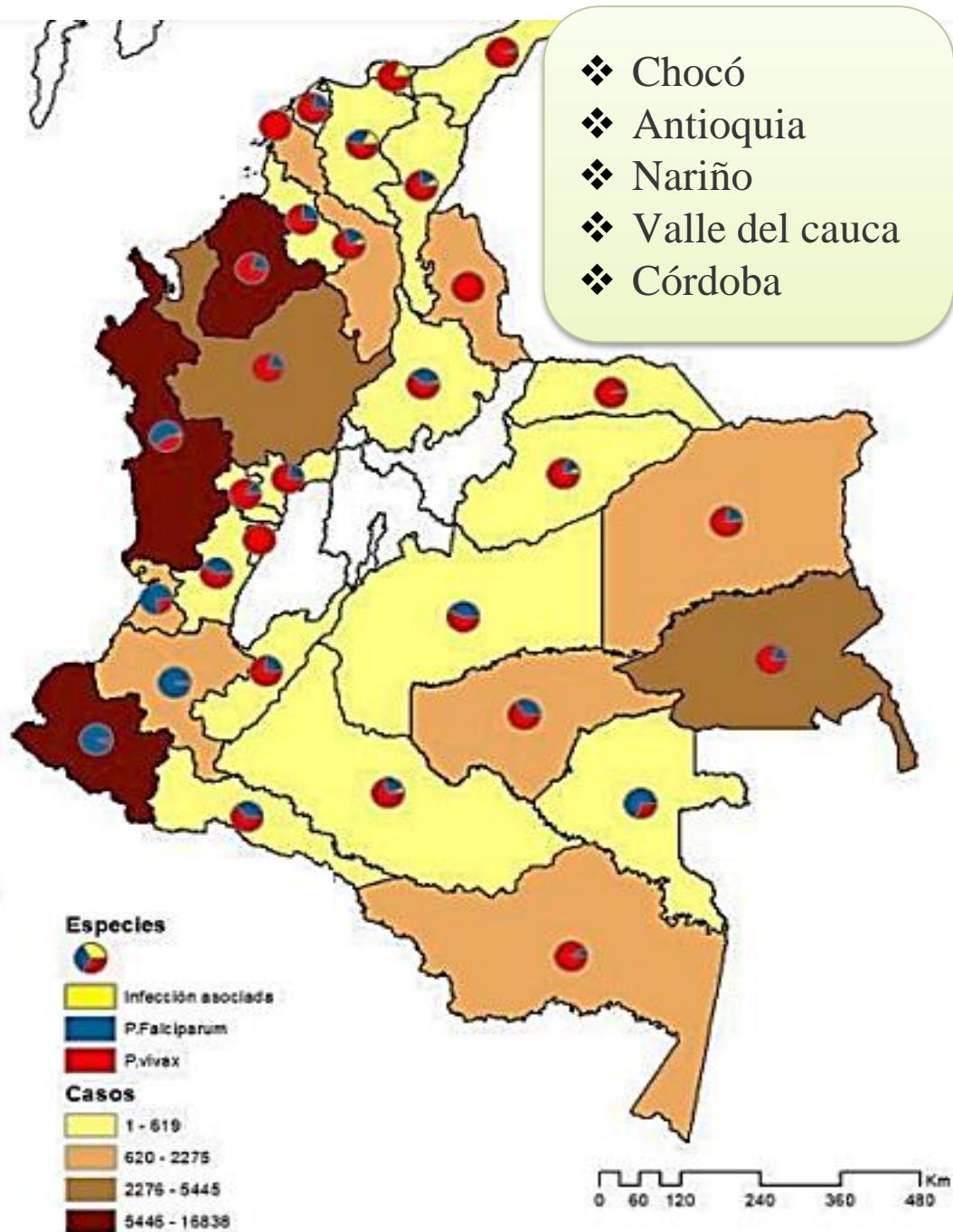
Semana epidemiológica 53 de 2020

Durante el 2020 se notificaron:

76958 Casos

P. vivax
38288

P. falciparum
38017

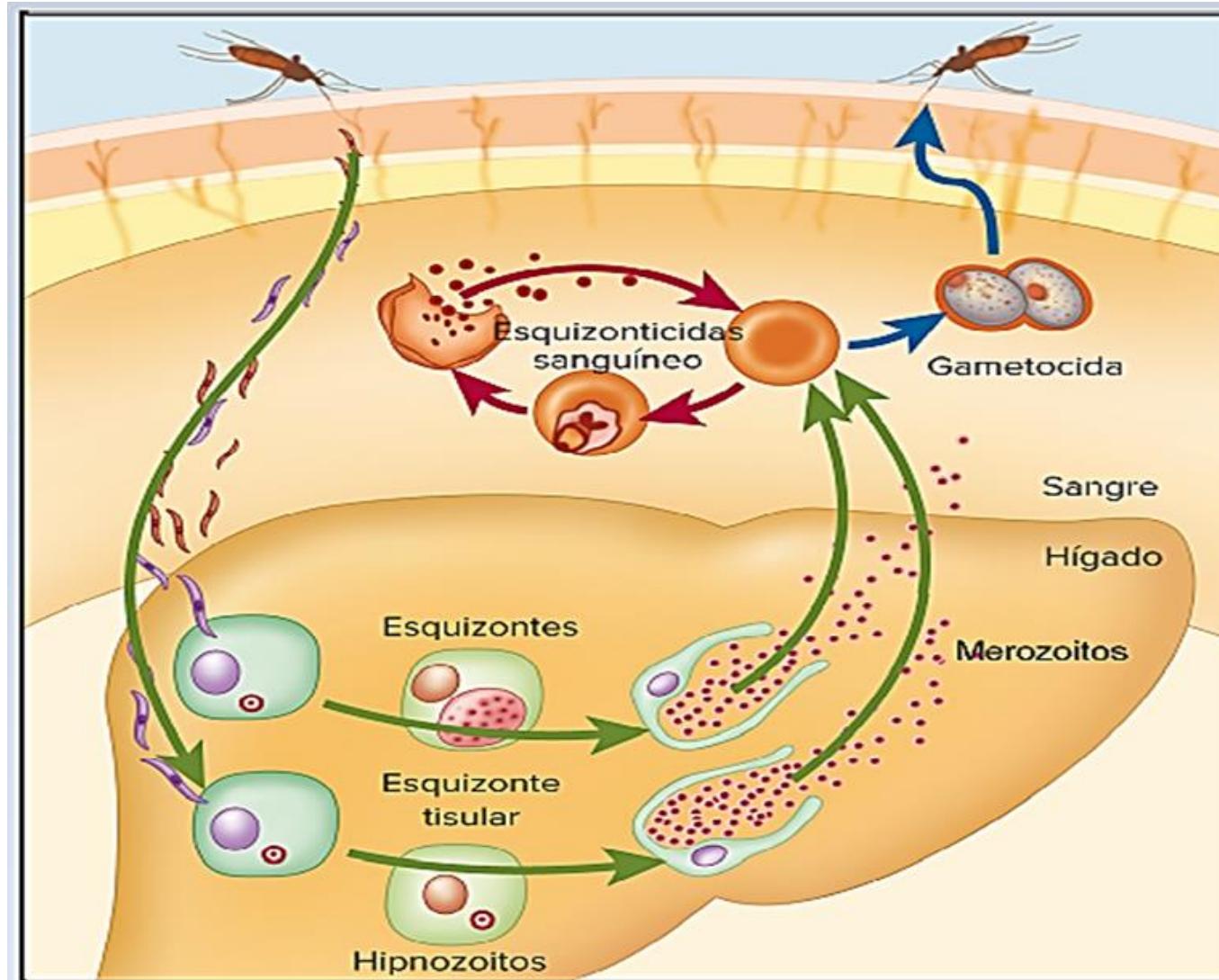


Plasmodium vivax

❖ Segunda causa más frecuente de malaria en Asia y Pacífico Occidental.

❖ 75% América

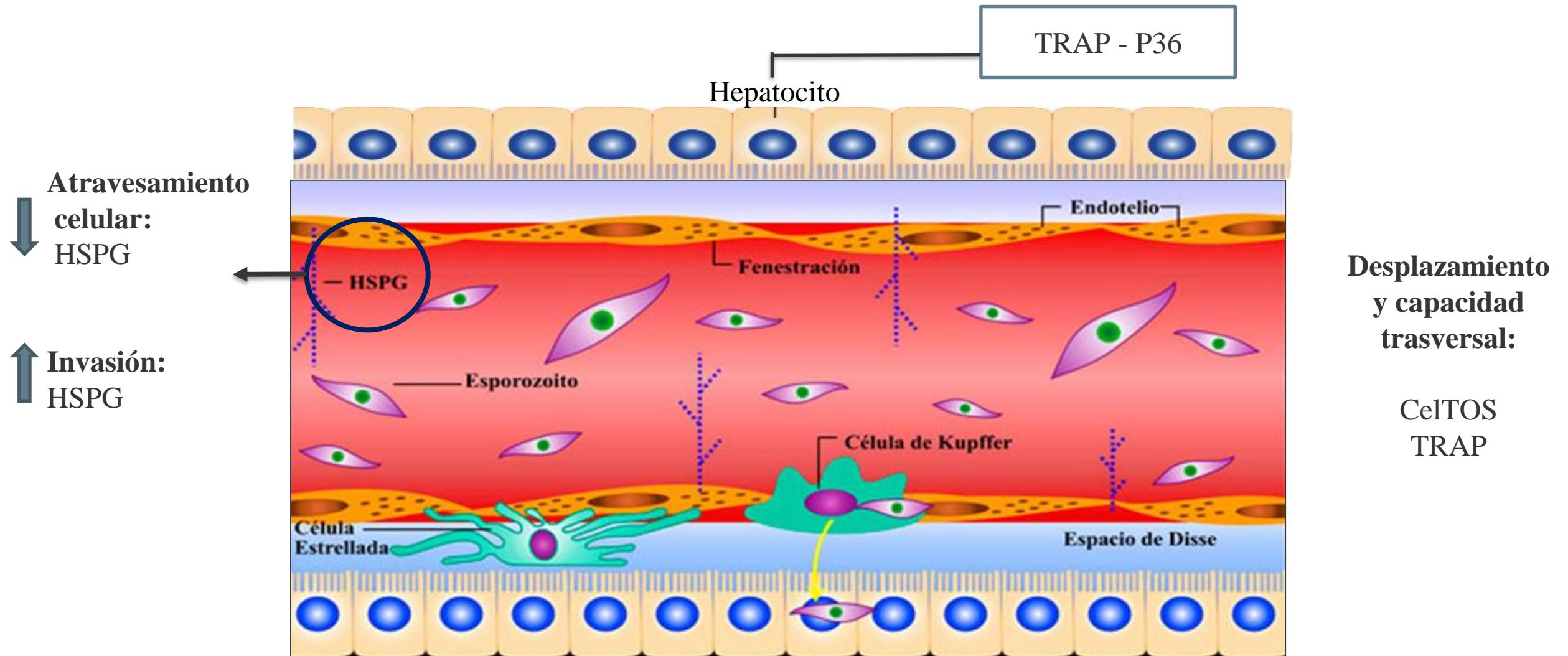
Conocer la biología del parásito



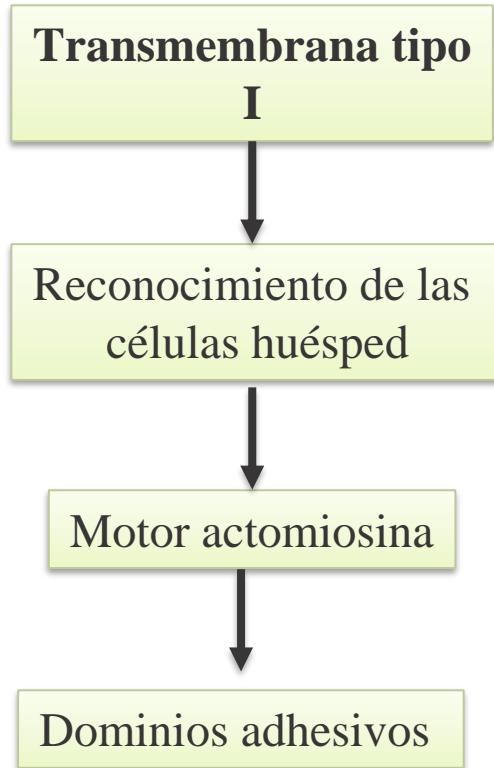
Particularidades

- Hipnozoítos
- Producción temprana de gametocitos.
- Invasión a reticulocitos

PROCESO DE INVASIÓN AL HEPATOCITO



MIEMBROS DE LA FAMILIA TRAP

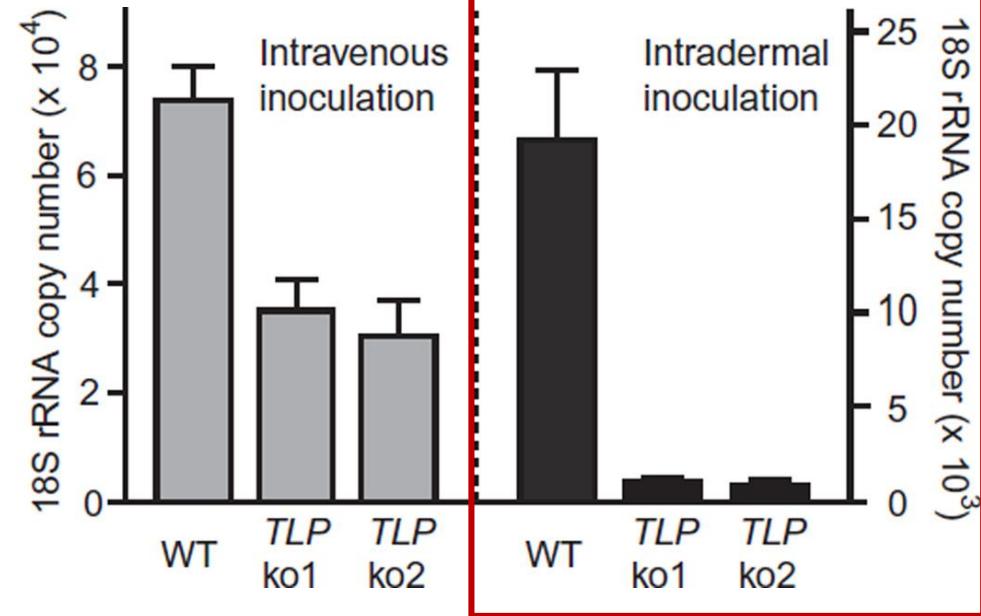
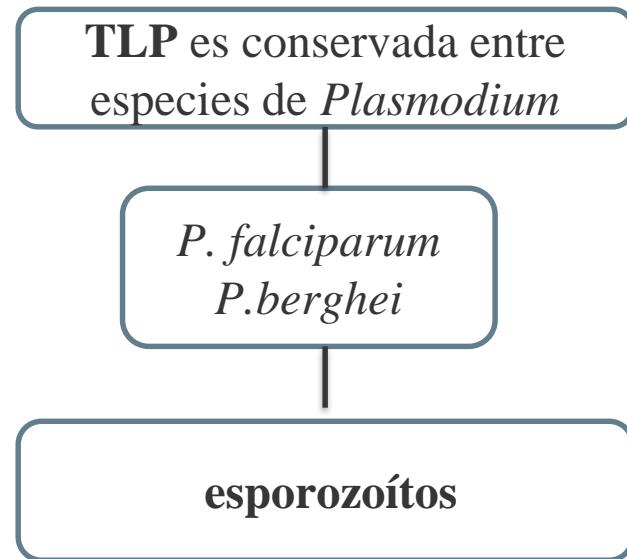


Parasite stage	Protein	Schematic representation	Refs
Merozoite	M-TRAP PF10_0281		[11]
Ookinete	CTR PFC0640w		[12-14]
Sporozoite	TRAP PF13_0201		[3]
	TLP PFF0800w		[1,2]
	S6 PF14_0404		[15]

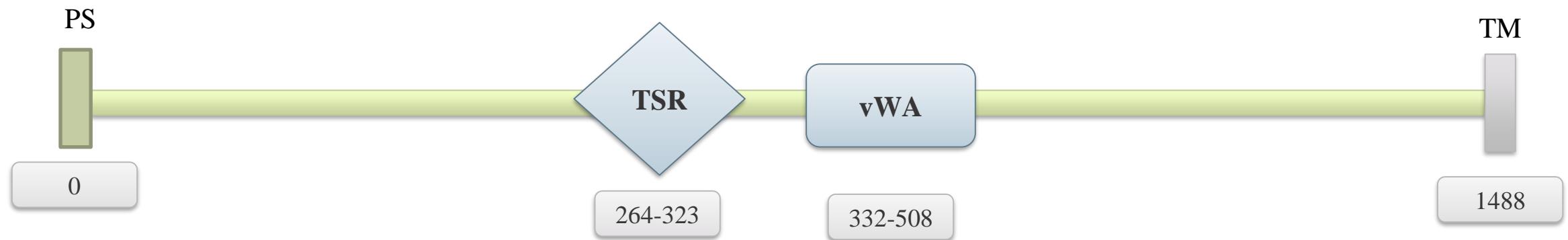
Key:

- Thrombospondin type-I repeat
- Integrin-like A domain
- ≈40 residue C terminus with a distal tryptophan residue
- Transmembrane domain
- Signal peptide sequence

PROTEÍNA TLP



*Pv*TLP



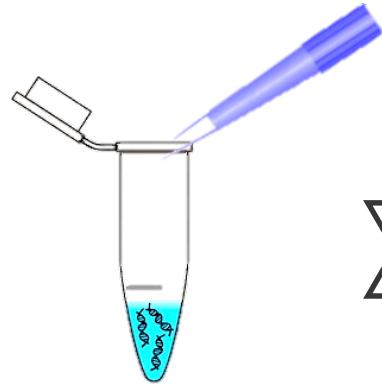
Objetivo General

- Evaluar la interacción de la proteína similar a TRAP (TLP) de *Plasmodium vivax* en células hepáticas y epiteliales como mediadora del atravesamiento celular.

Objetivos Específicos

- Obtener la proteína TLP de *Plasmodium vivax* de forma recombinante en un sistema procariota.
- Evaluar la interacción de la proteína recombinante PvTLP a la línea celular hepática HepG2 y epitelial HeLa
- Determinar la región crítica de interacción entre la proteína recombinante PvTLP y la célula hospedera.

TRANSFORMACIÓN DE *E.coli* JM109 CON PQE30-*Pv*TLP



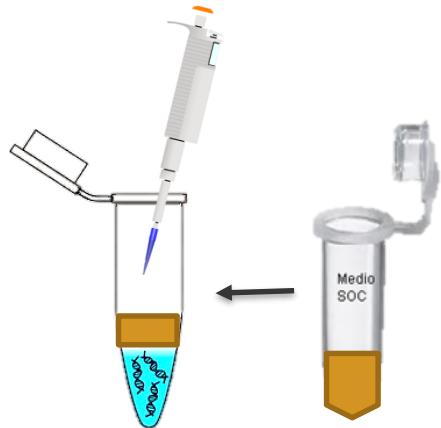
JM109 y PQE30-*Pv*TLP



20 min a 4 °C



Choque Térmico



Medio SOC



1h a 37°C

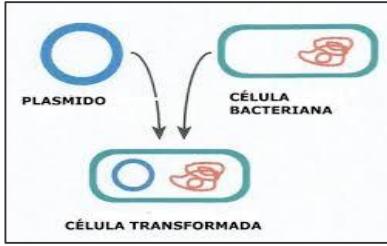


Se plaqueo



O.N a 37°C

TRANSFORMACIÓN DE *E.coli* JM109 CON PQE30-*Pv*TLP



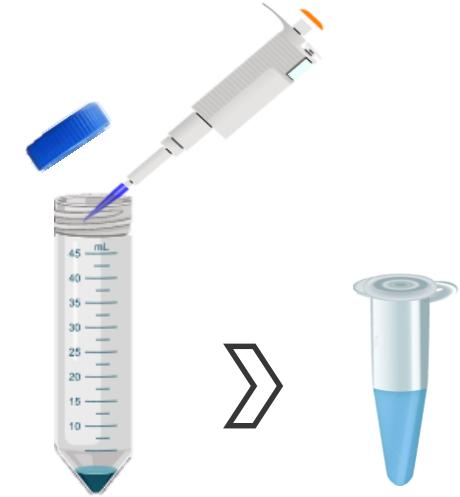
Colonias transformadas



Medio LB con ampicilina



Se centrifugó



Se trató el pellet con buffer laemmlli



Vortex



5 min a 4°C

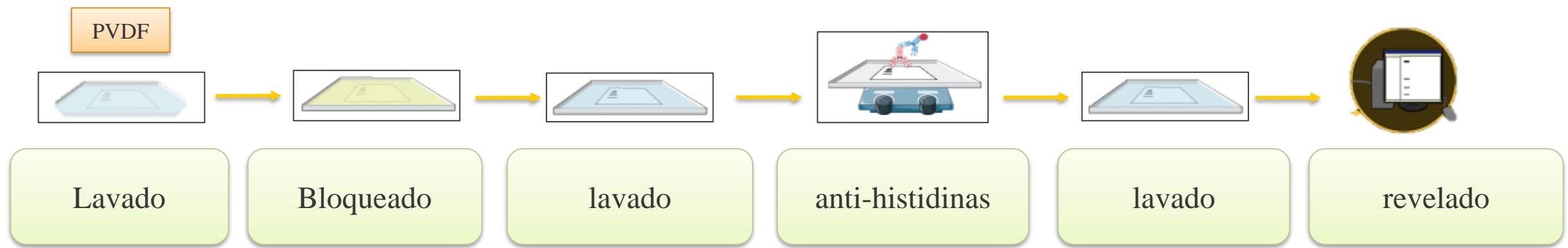
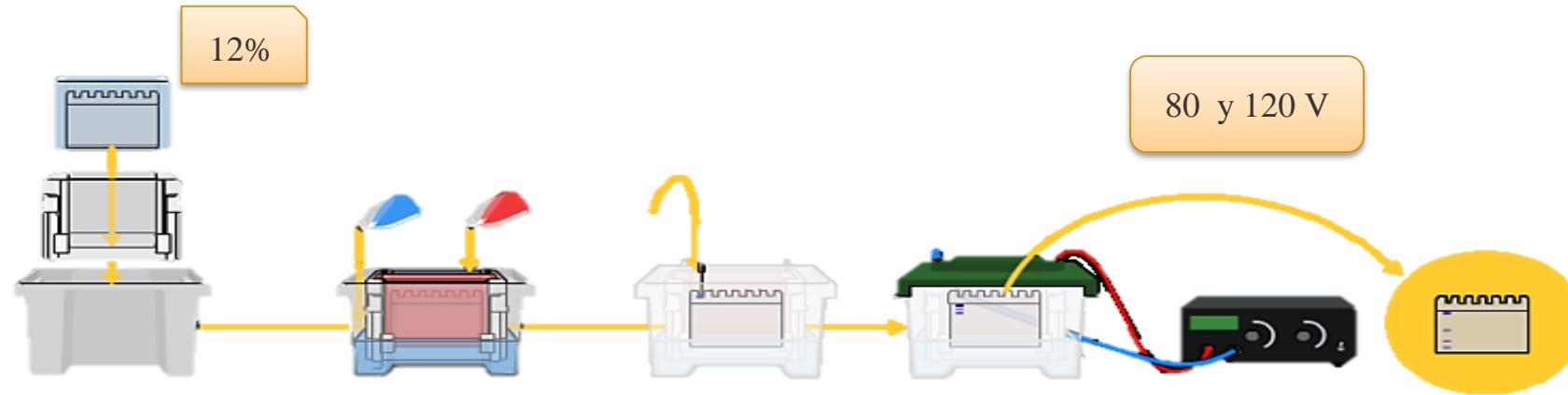


Sobrenadante y
buffer Laemmlli



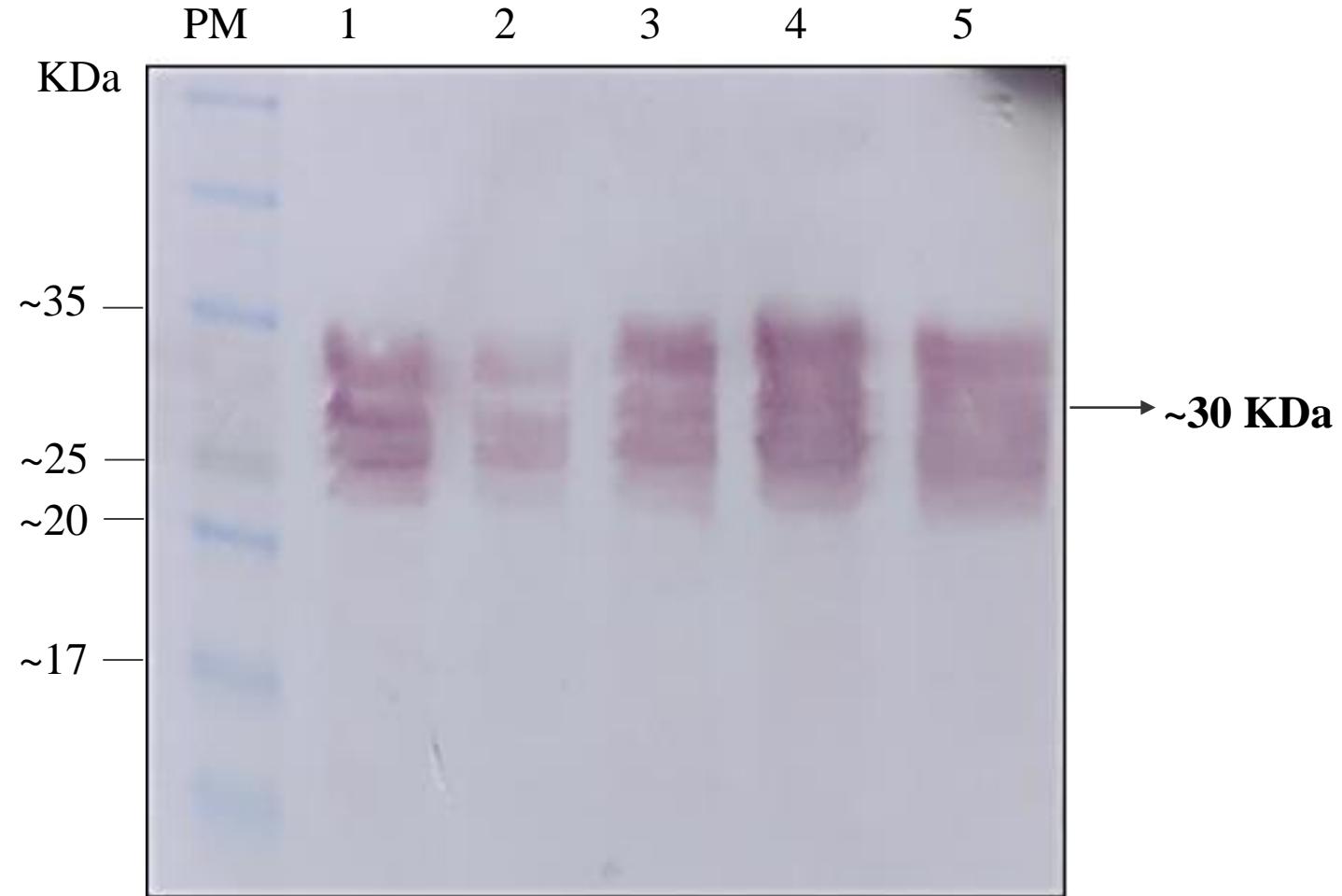
5 min

SDS- PAGE Y WESTERN BLOT



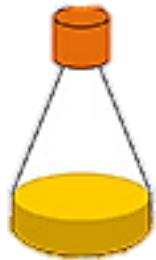
COLONIAS SELECCIONADAS

A.



EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PvTLP

TN



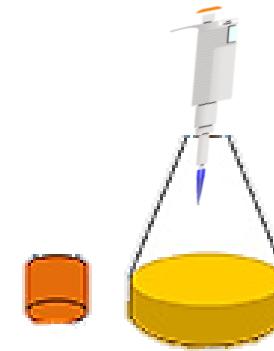
Medio LB, D-Glucosa y ampicilina



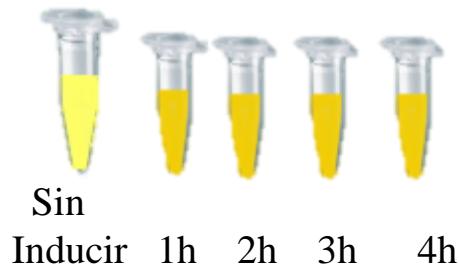
Agitación 37°C



Medio LB, Ampicilina y D-glucosa .



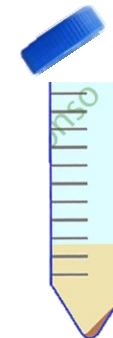
IPTG



Sin Inducir 1h 2h 3h 4h



3500 rpm por 15 min



Buffer de extracción A-Inhibidores de proteasas- EDTA -Lisozima

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PvTLP

TN



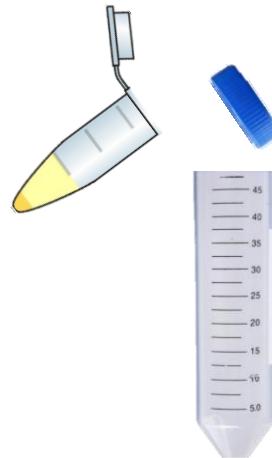
Agitación constante a 4°C



Eppendorf .

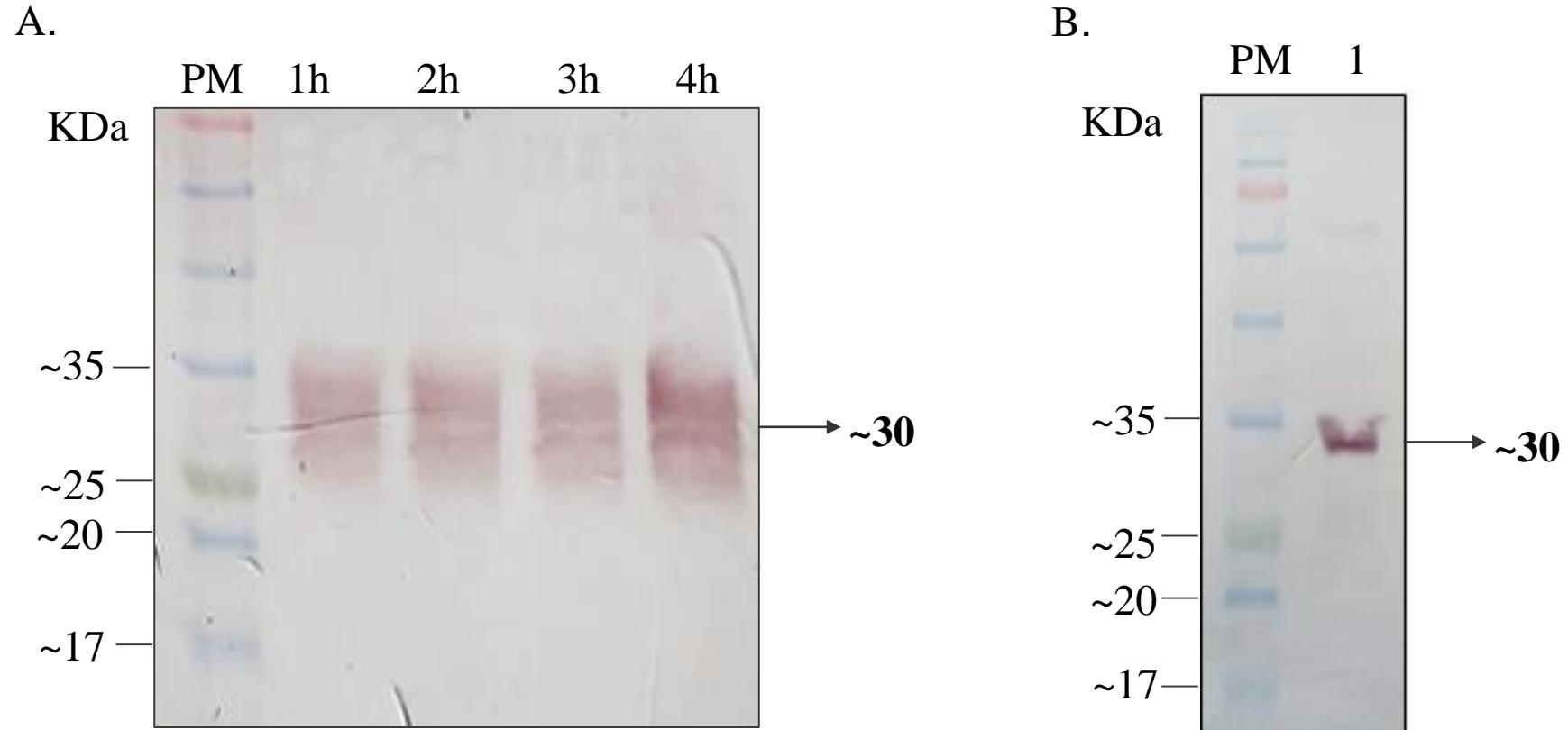


15 min a 4 °C



Recuperación de la
proteína

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PvTLP

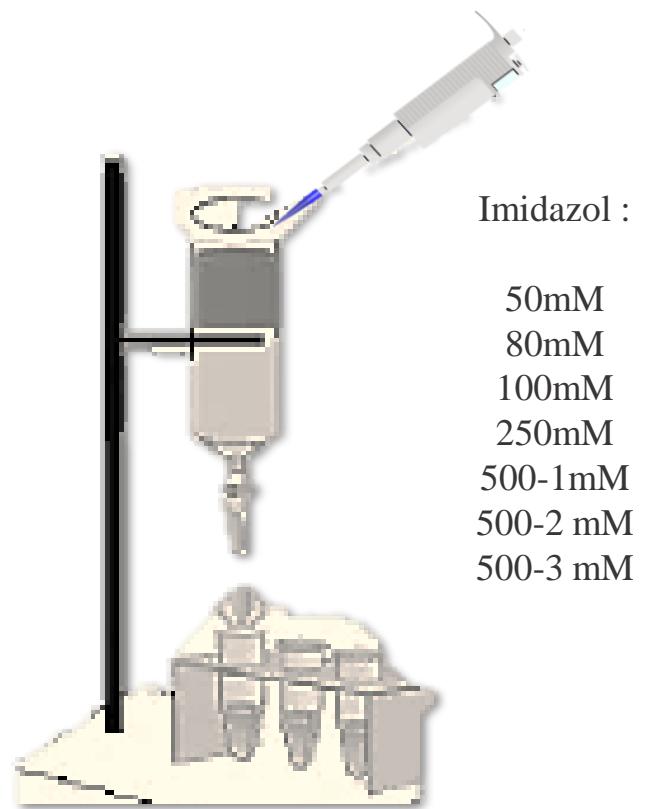


Expresión durante las primera 4 horas

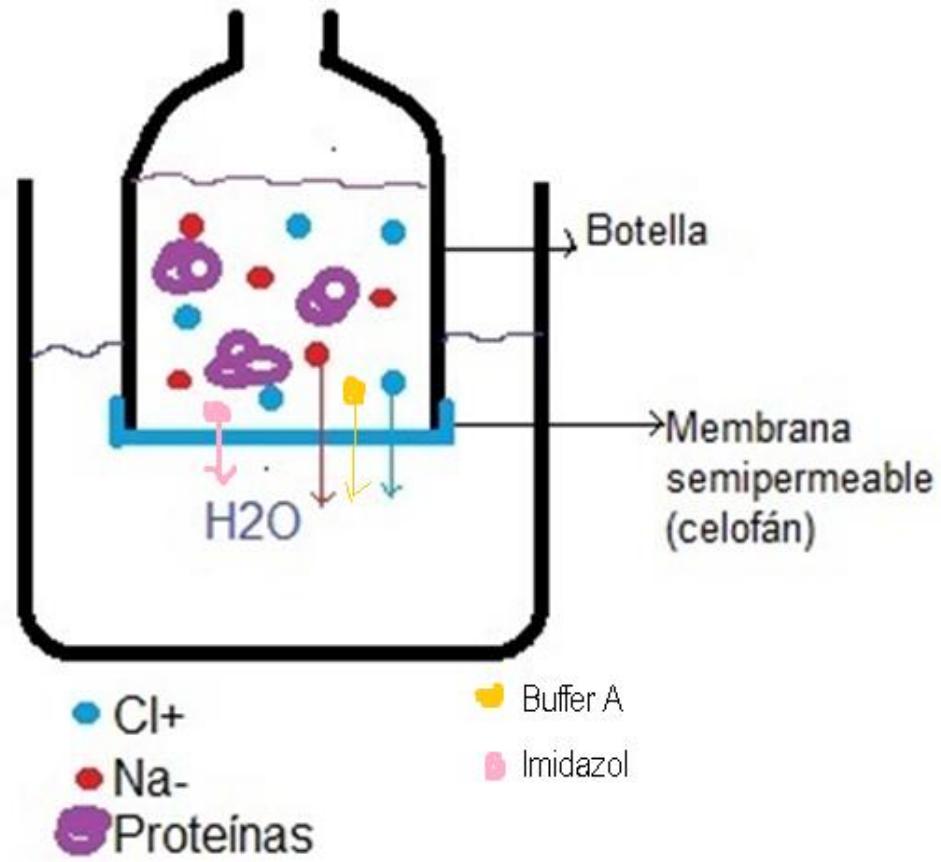
PURIFICACIÓN Y DIÁLISIS DE PvTLP



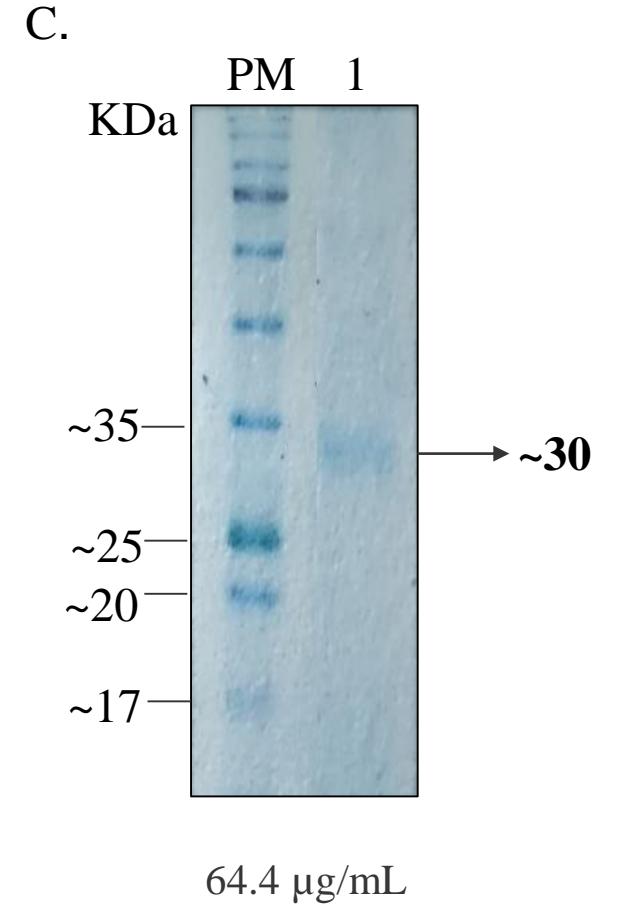
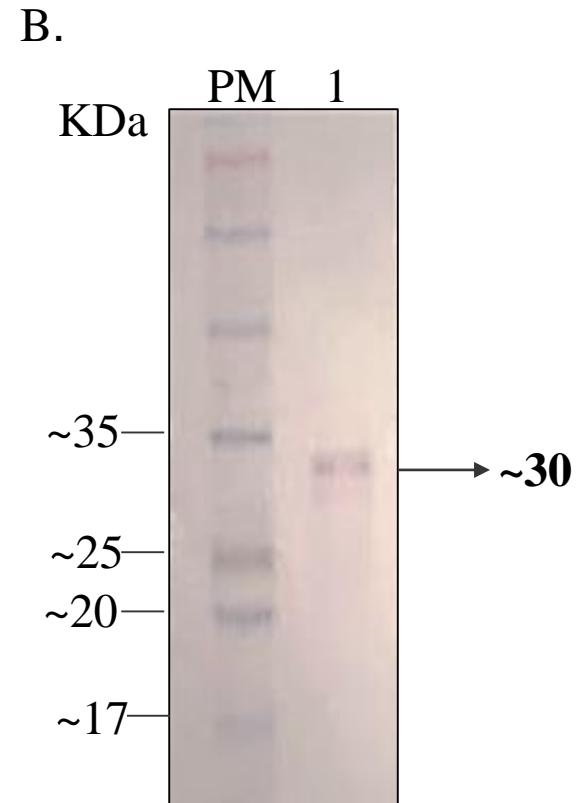
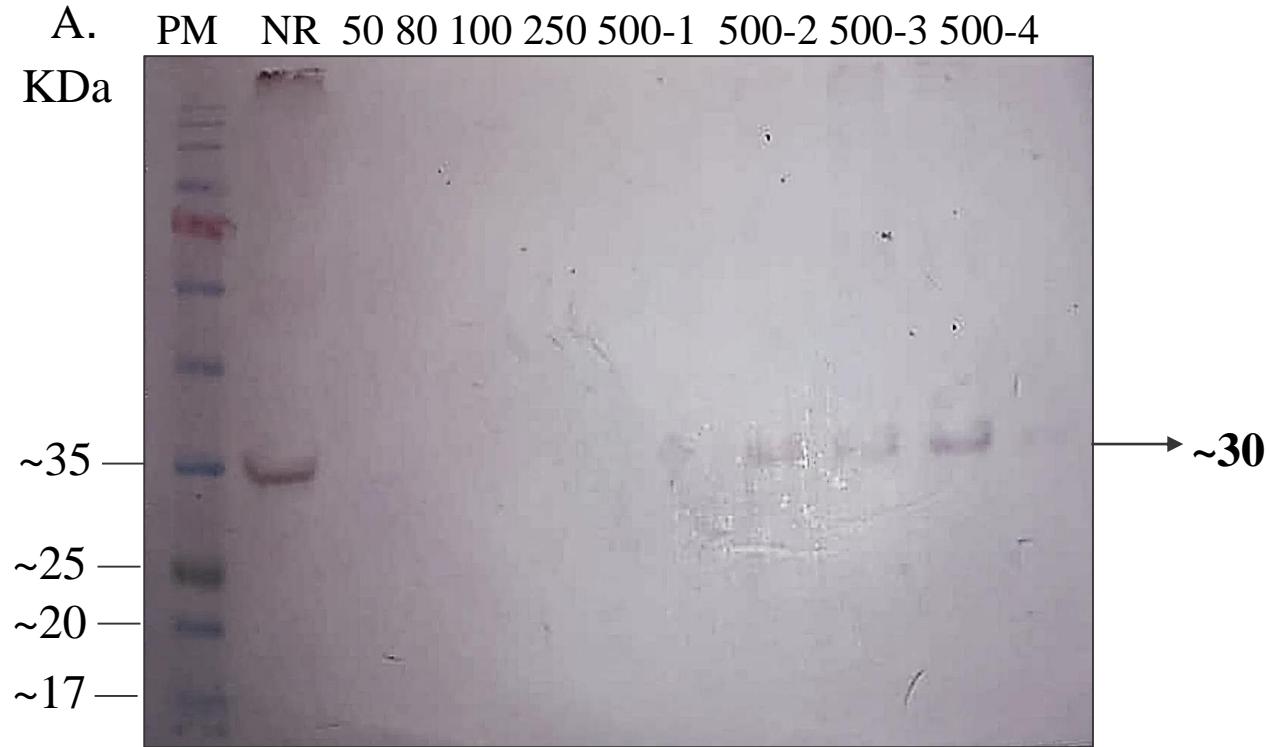
PURIFICACIÓN



DIALISIS



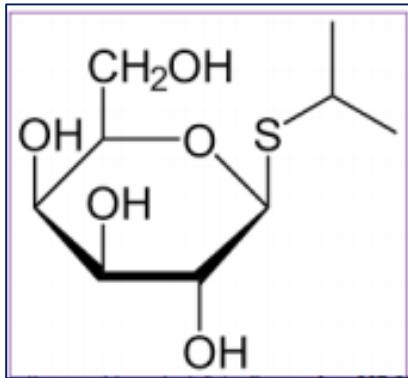
PURIFICACIÓN Y DIÁLISIS DE *Pv*TLP



JM109

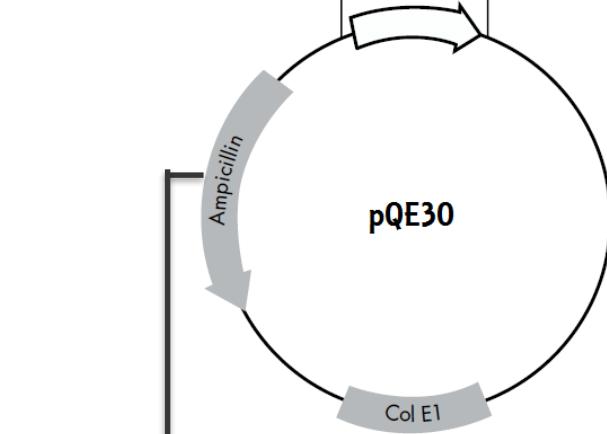
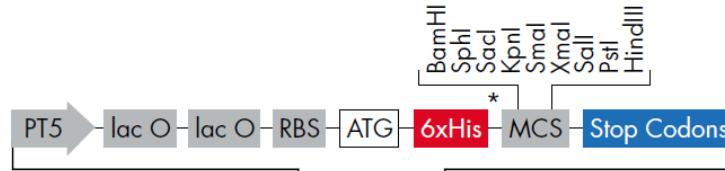


Fue apropiada en el proceso de producción.



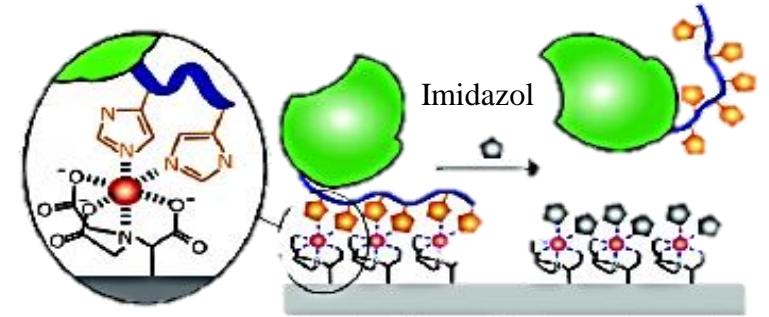
IPTG

PQE30-*Pv*TLP

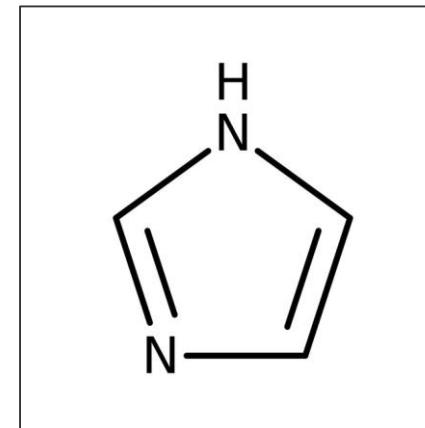


Resistencia a ampicilina

RESINA DE NIQUEL



Imidazol



Altas concentraciones:

La obtención de la proteína etiquetada con histidinas fue de manera integra

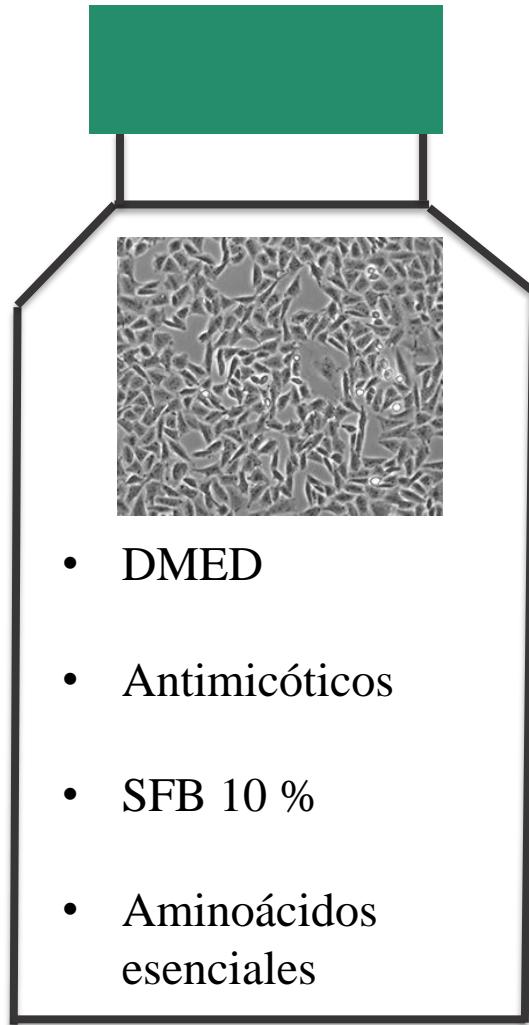
Objetivo General

- Evaluar la interacción de la proteína similar a TRAP (TLP) de *Plasmodium vivax* en células hepáticas y epiteliales como mediadora del atravesamiento celular.

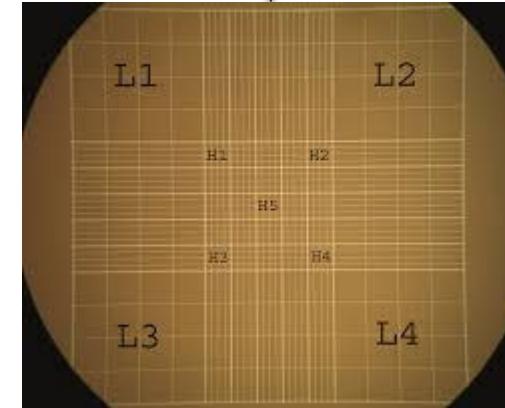
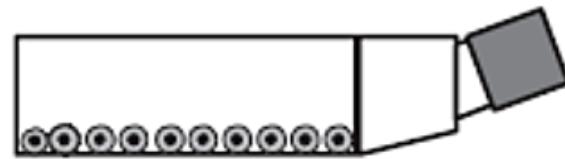
Objetivos Específicos

- Obtener la proteína TLP de *Plasmodium vivax* de forma recombinante en un sistema procariota.
- Evaluar la interacción de la proteína recombinante PvTLP a la línea celular hepática HepG2 y epitelial HeLa
- Determinar la región crítica de interacción entre la proteína recombinante PvTLP y la célula hospedera.

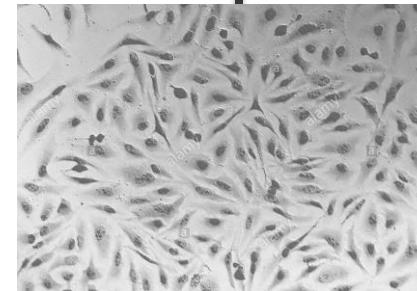
CULTIVO CELULAR



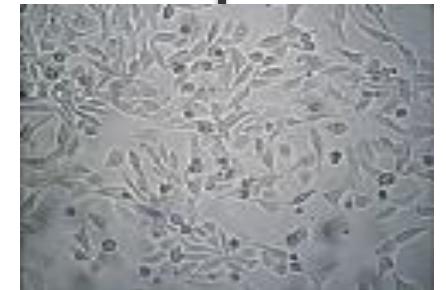
HeLa-HepG2



Azul de Tripan



HeLa



HepG2

Viabilidad celular :
90%

CITOMETRIA DE FLUJO

2 millones
de células
200 µl



HeLa o HepG2



HeLa o
HepG2+PI



HeLa o
HepG2 + APC



HeLa o HepG2
TLP



Centrifugar



se incubó



Centrifugar



PBS-BSA



APC

Anti-His acoplado a APC.



Incubación

CITOMETRIA DE FLUJO



Centrifugar



PBS-BSA



Hela o Hep2



Hela o HepG2+PI



HeLa o HepG2 +
APC



HeLa o HepG2 +
TLP



PI: Yoduro de propidio

APC: Anti- histidinas
acopladas a
aloficocianina

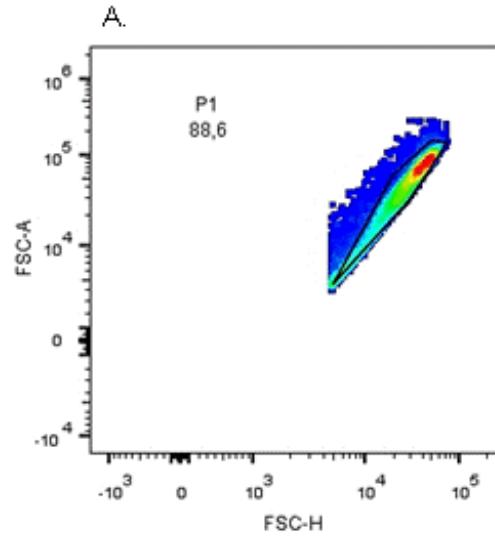
Se
leyeron
30.000
eventos



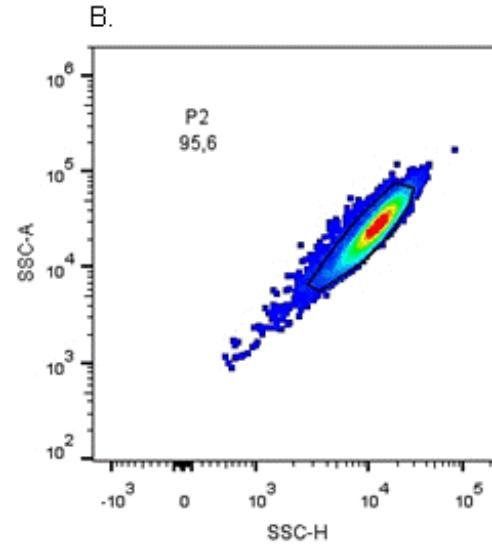
PI

SELECCIÓN DE LA POBLACION OBJETO DE ESTUDIO

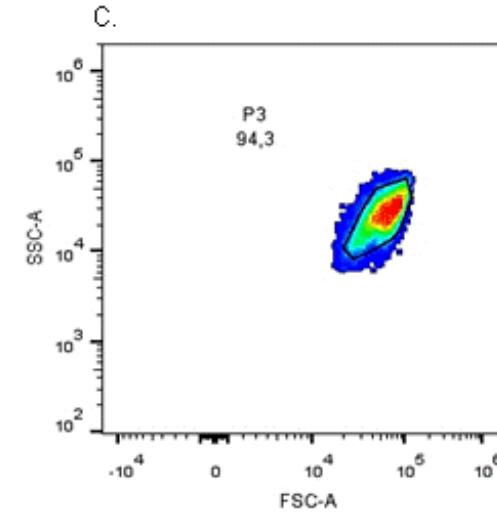
Tamaño Área vs Altura



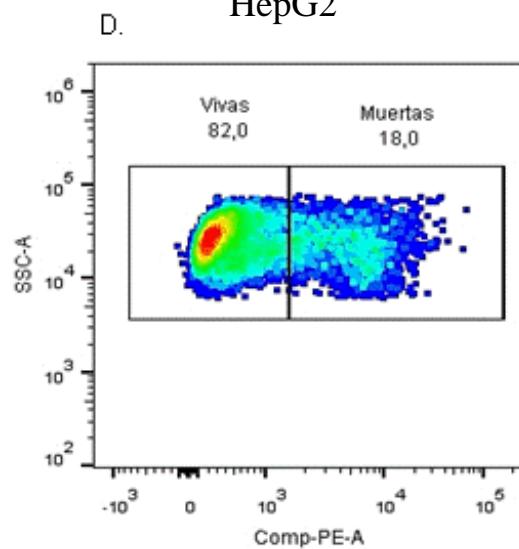
Complejidad Área vs Altura



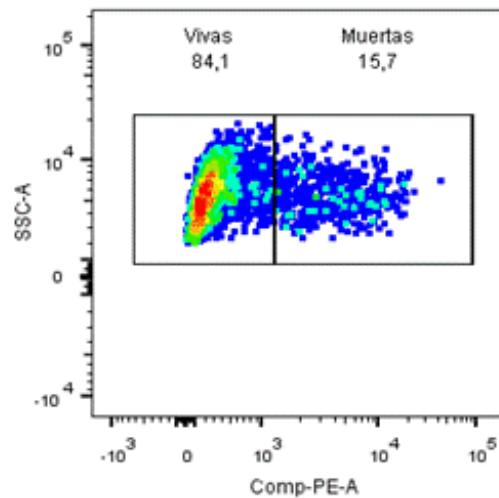
Tamaño vs Complejidad



HepG2



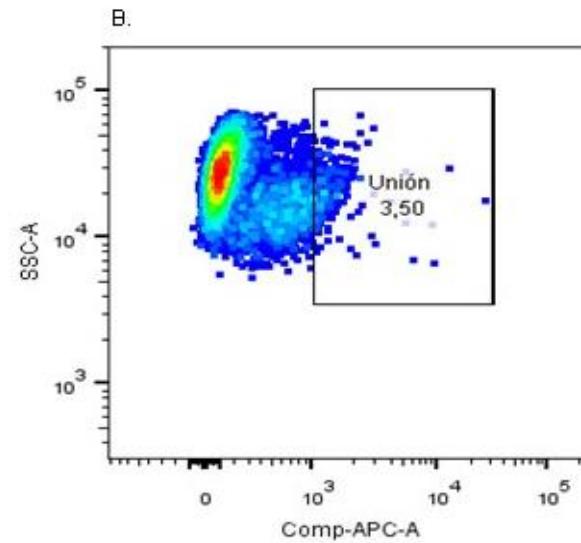
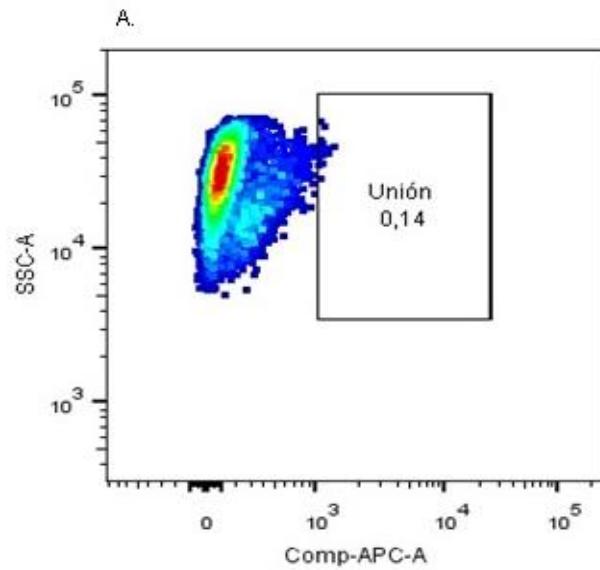
HeLa



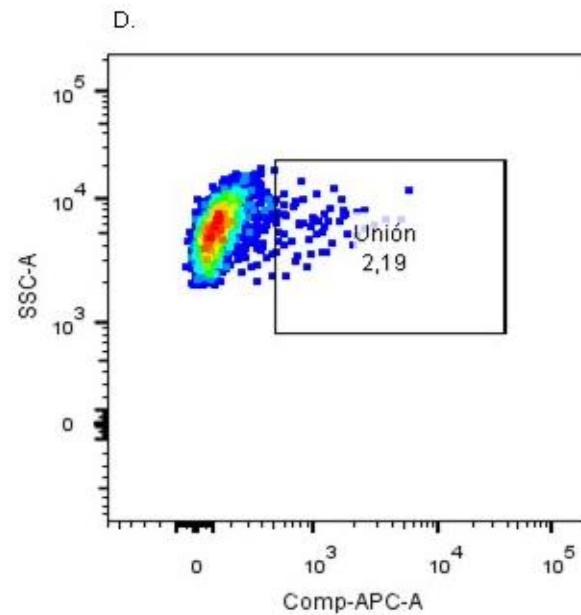
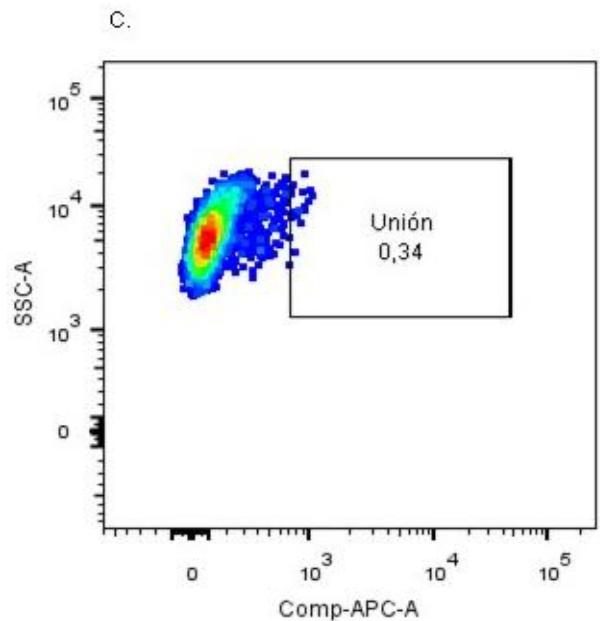
FSC: Tamaño
SSC: Complejidad

UNIÓN TOTAL DE $P_{\nu}TLP$ CON CÉLULAS HepG2 Y HeLa

HepG2



HeLa



CSP

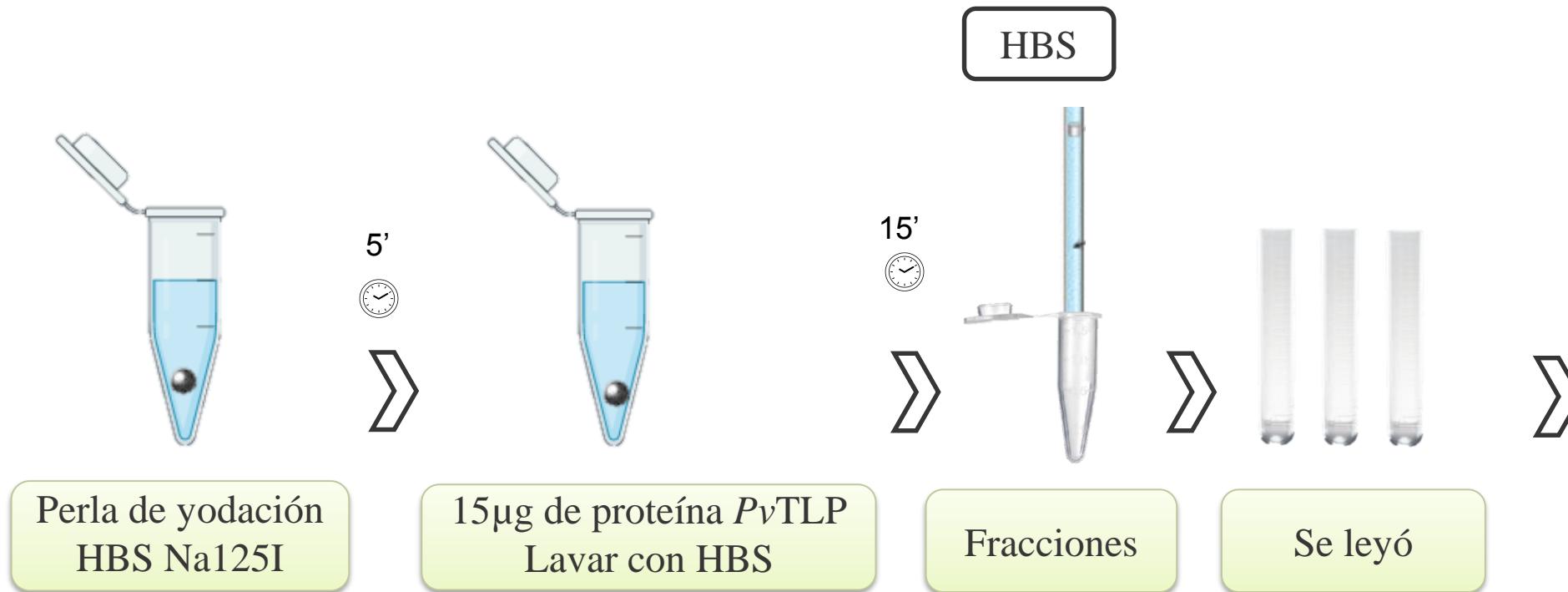
SIAP 1 Y 2

HepG2
HeLa

Suarez JE et al, 2001-Curtidor H et al, 2011

RADIOMARCAJE CON YODO 125 A *Pv*TLP

PROTEINA



ENSAYOS DE UNIÓN CON LA PROTEÍNA

HBS proteína	Proteína sin radiomarcador	Proteína radiomarcado	Células (1.2 millones)	Concentración proteína sin radiomarcador	Concentración de proteína radiomarcado
100 µl	0 µl	10 µl	30 µl	33 µg/ml	1.05 µg/ml
30 µl	70 µl	10 µl	30 µl		
90 µl	0 µl	20 µl	30 µl	33 µg/ml	2.11 µg/ml
20 µl	70 µl	20 µl	30 µl		
80 µl	0 µl	30 µl	30 µl	33 µg/ml	3.17 µg/ml
10 µl	70 µl	30 µl	30 µl		
70 µl	0 µl	40 µl	30 µl	33 µg/ml	4.23 µg/ml
0 µl	70 µl	40 µl	30 µl		

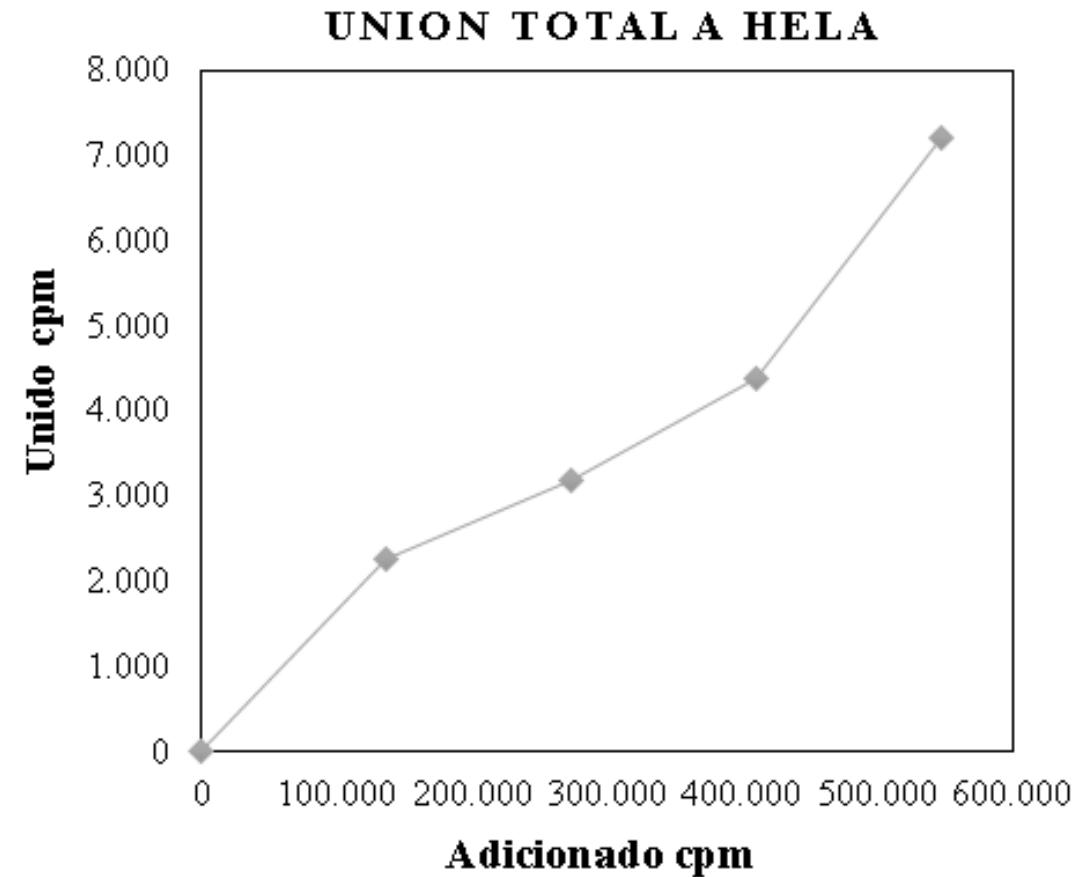
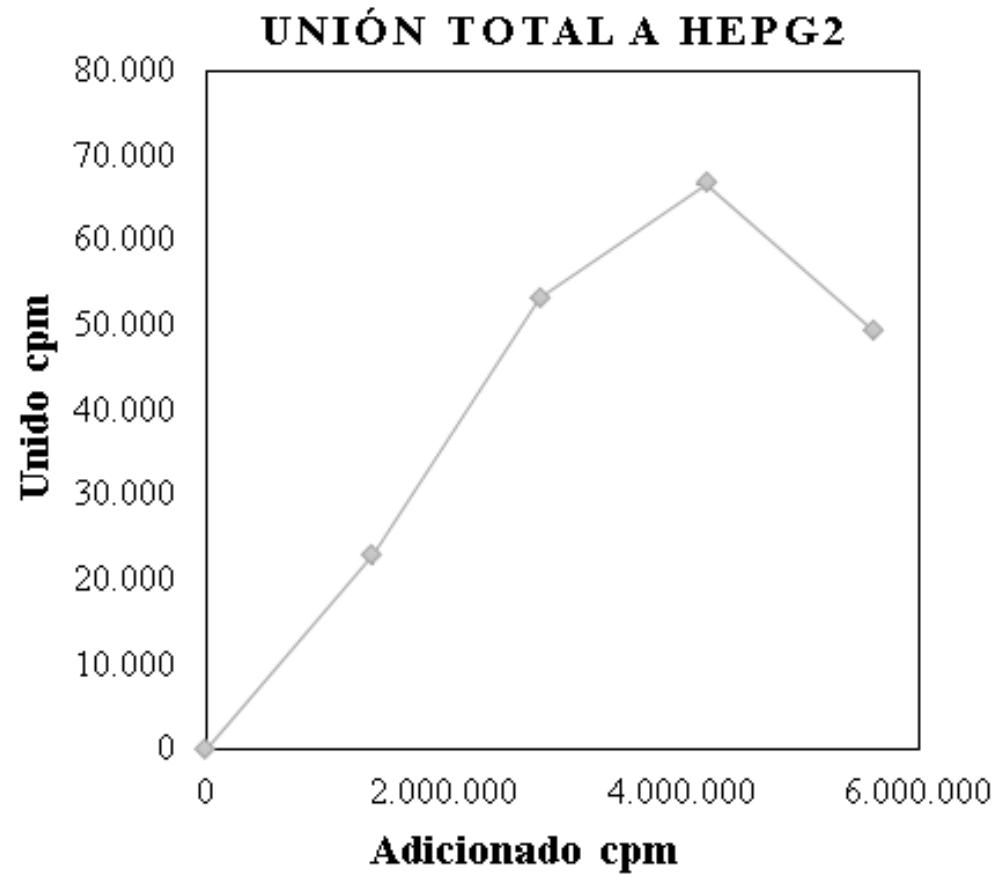
UNIÓN TOTAL DE P_v TLP

U.Total: 1%

U.Total: 1,2%

A.

B.



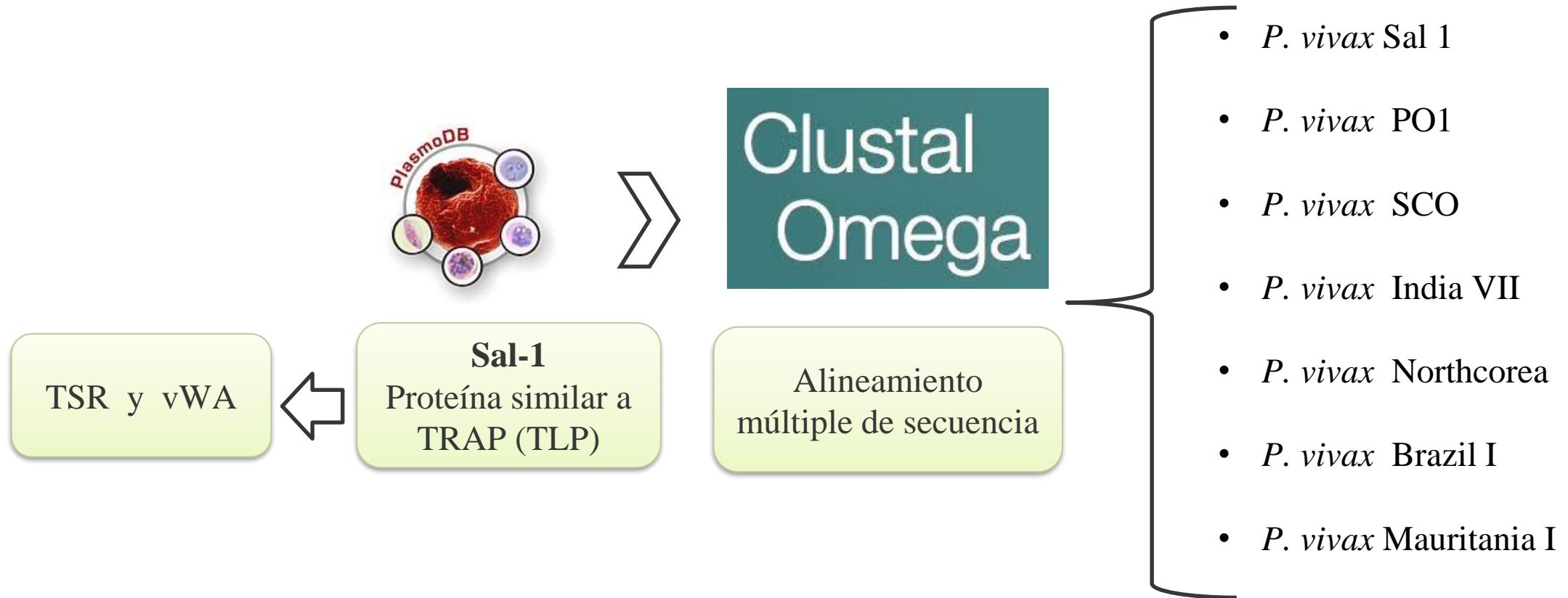
Objetivo General

- Evaluar la interacción de la proteína similar a TRAP (TLP) de *Plasmodium vivax* en células hepáticas y epiteliales como mediadora del atravesamiento celular.

Objetivos Específicos

- Obtener la proteína TLP de *Plasmodium vivax* de forma recombinante en un sistema procariota.
- Evaluar la interacción de la proteína recombinante PvTLP a la línea celular hepática HepG2 y epitelial HeLa
- Determinar la región crítica en la interacción entre la proteína recombinante PvTLP y la célula hospedera.

OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS



ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS.

PO1	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300
SCO	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300
India	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300
North	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300
Brazil	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300
Sal	-----SEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	37
Mauritania	YHRLILTYSLKIFYEDIATNATCSEWSDWSDCSVSCNMGYHFSKRNTLHNVGNAIGGKYK	300

PO1	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	360
SCO	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMTQAFWLKYILKPIRN	360
India	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	360
North	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	360
Brazil	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	360
Sal	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	97
Mauritania	RTGKNCIDQRSLLIQECFETSCDHSLDVCDIEVDLSLLVDDTSSMSQAFWLKYILKPIRN	360

PO1	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420
SCO	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420
India	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420
North	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420
Brazil	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420
Sal	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	157
Mauritania	LI AHLNLSSKLVNISIITYSQETYTWVNFSSNLARNRDQLLLFLEYWRFNFGGPANNLKS	420

 41284

 42428

 42429

 42431

 42432

 42433

 **Dominio TSR**

 **Dominio vWA**

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS.

PO1	ALNYVHRHVLNANERRPNAHKVLVI FNVGDVSNNVARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
SCO	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
India	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
North	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
Brazil	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
Sal	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	217
Mauritania	ALNYVHRHVLNANEGRPNAHKVLVI FNVGDVSNNAARGVKEVVRNIKLTAAADVYAI CLN	480
<u>***** *****.***** *****</u>		
PO1	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
SCO	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
India	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
North	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
Brazil	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
Sal	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE -----	245
Mauritania	NTREGNCQAI SGASAVTHDAYEEE VYGE GAANQGE AT ANPPDEDAPY FYSYSNVSAFREQ	540
<u>*****</u>		

 42434

 42435

 42436

 **Dominio vWA**

 **Dominio TSR**

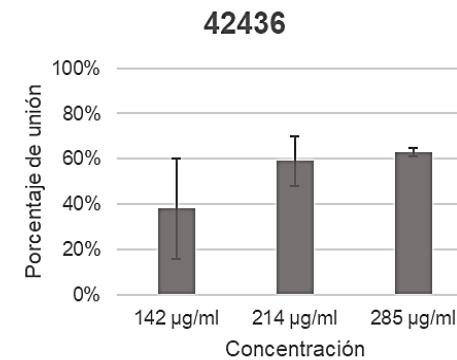
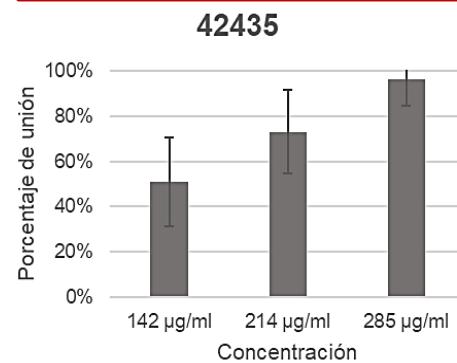
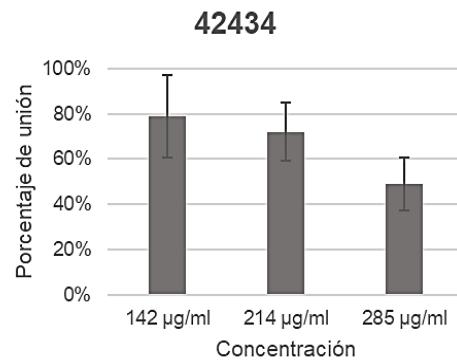
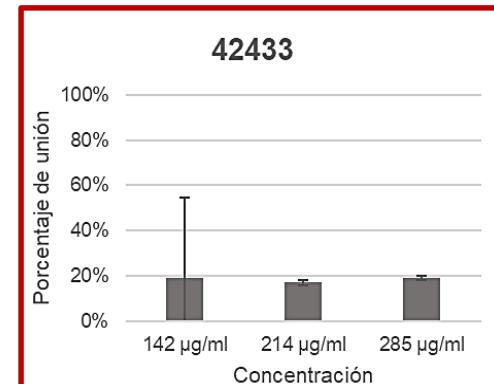
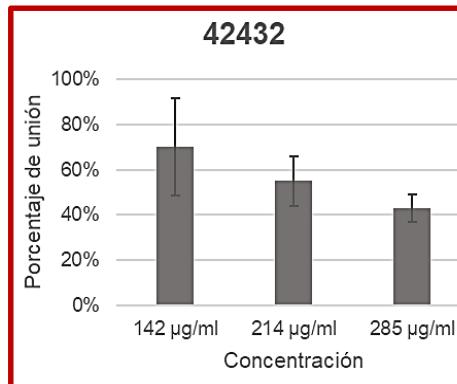
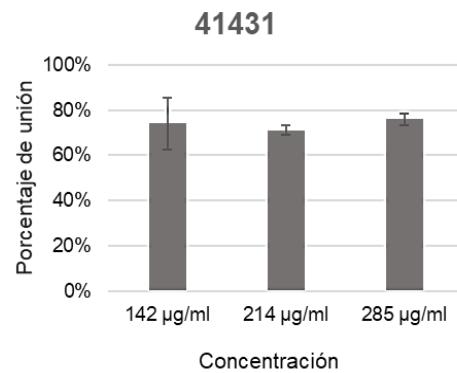
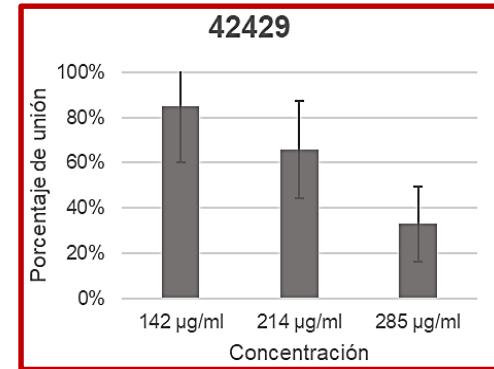
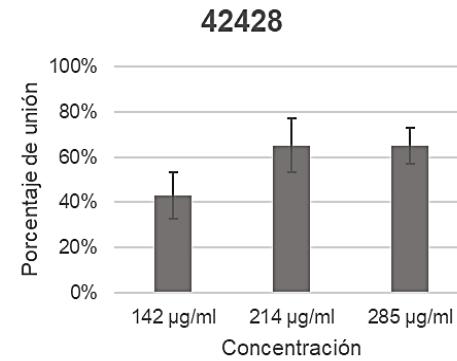
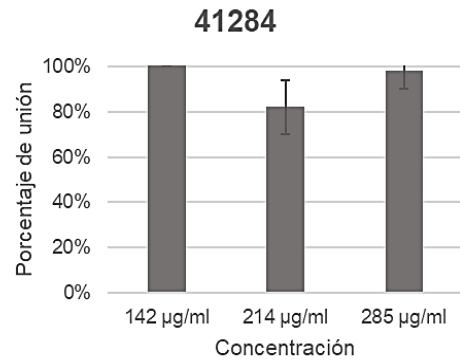
OBTENCIÓN DE PEPTIDOS SINTETICOS

ID	Secuencias
41284	SEWSDWSDSSVSSNMGYHFS
42428	KRNTLHNVGNNAIGGKYKRTG
42429	KNSIDQRSLIIQESTFETSSDY
42431	HLNISSKLVNISITTYSQET
42432	YTWVNFSSNLARNRDQLLLF
42433	LEYWRFNFGGPANNLKSALN
42434	RNIKLTYAADVYAISLNNTR
42435	EGNSQAISGASAVTHDAYEE
42436	AISGASAVTHDAYEEEVYGE

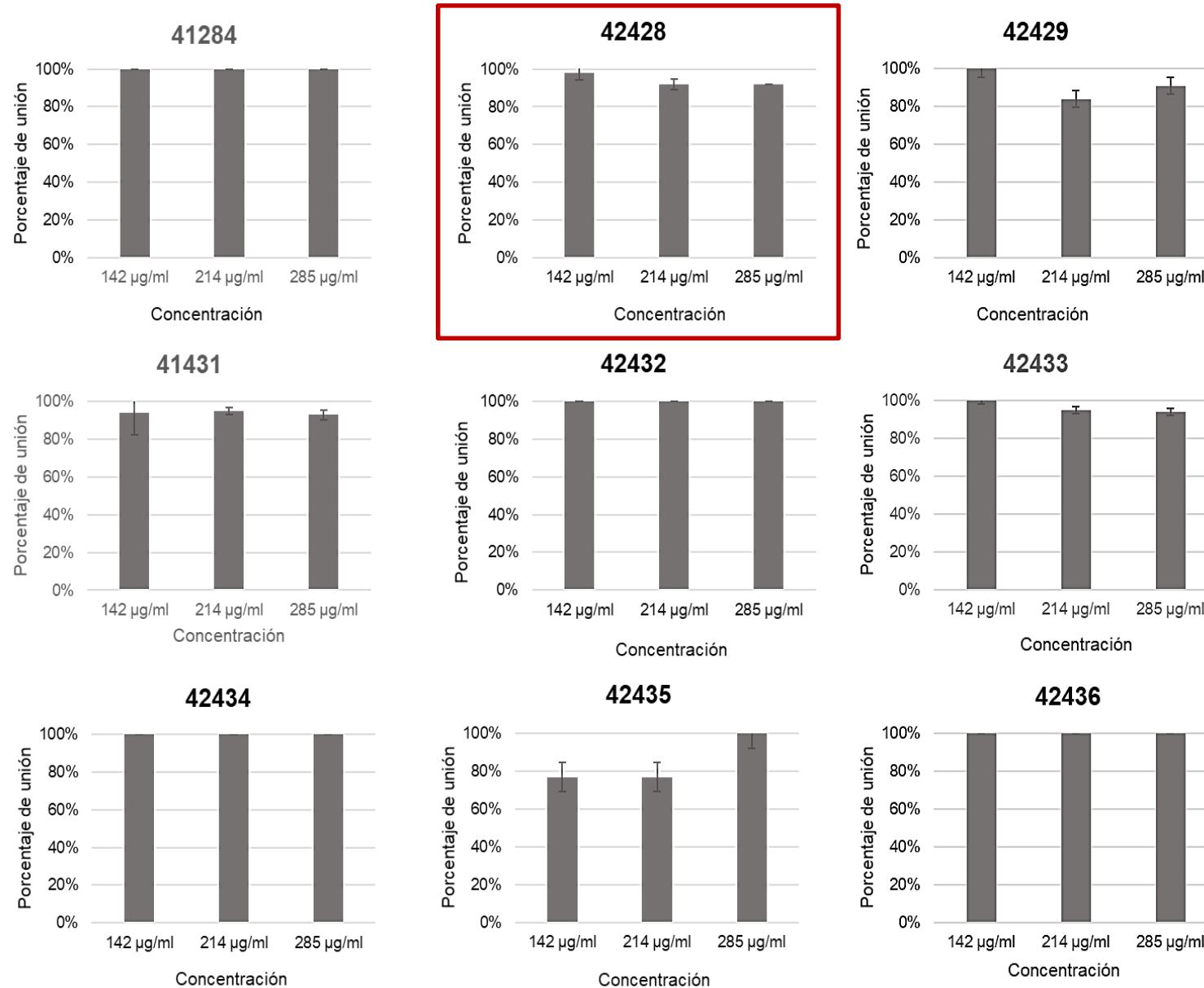
ENSAYO DE COMPETICIÓN

HBS	Péptido sin radiomarcador	Proteína radiomarcada	Células	Concentración de péptido sin radiomarcador	Concentración de proteína radiomarcada
85 μ l	0	25 μ l	30 μ l		2.67 μ g/ml
65 μ l	20 μ l	25 μ l	30 μ l	142 μ g/ml	2.67 μ g/ml
55 μ l	30 μ l	25 μ l	30 μ l	214 μ g/ml	2.67 μ g/ml
45 μ l	40 μ l	25 μ l	30 μ l	285 μ g/ml	2.67 μ g/ml

Unión de *Pv*TLP a células HepG2 en presencia de péptidos sintéticos



Unión de la proteína PvTLP a células HeLa en presencia de péptidos sintéticos

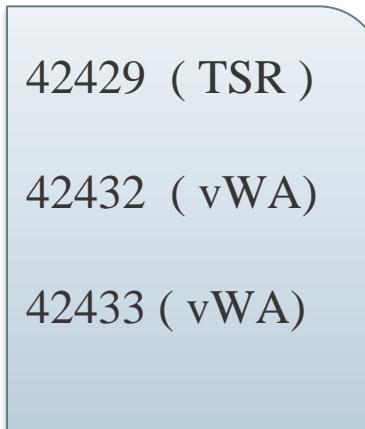
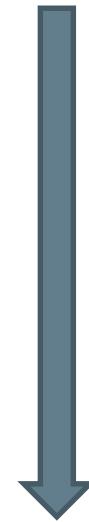


COMPETICIÓN

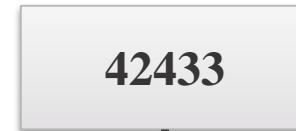


HeLa: El péptido **42428** al 10%

50 % U. Total **HepG2**



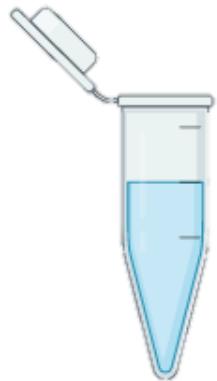
CelTos ha mostrado resultados similares con **HepG2**



Mayor U.total **HepG2**

RADIOMARCAJE CON YODO 125 DE LOS PÉPTIDOS

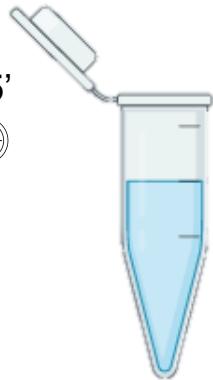
PÉPTIDOS



Cloramina T
péptido
Na125I



15'

metabisulfito
de sodio



HBS



Fracciones del péptido
radiomarcado

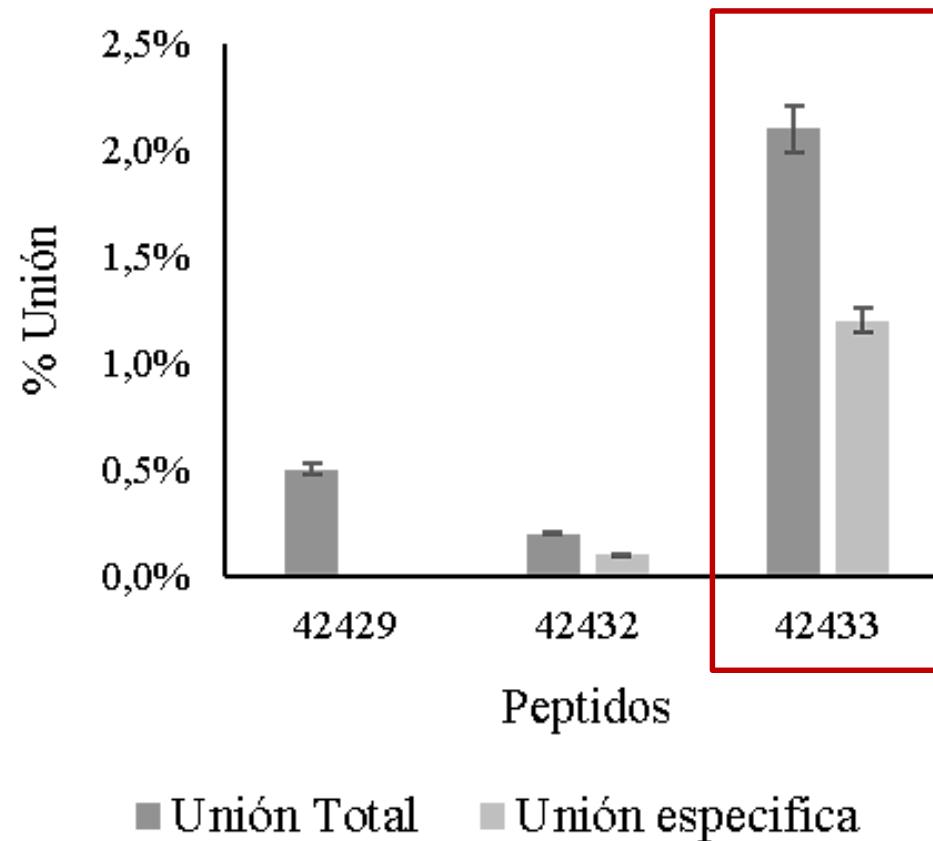


ENSAYOS DE UNIÓN CON PÉPTIDOS RADIOMARCADOS

HBS péptido	Péptido sin radiomarcador	Péptido radiomarcado	Células (1.2 millones)	Concentración de péptido sin radiomarcador	Concentración de péptido radiomarcado
80 µl	0 µl	10 µl	30 µl	83.3 µg/ml	1.16 µg/ml
70 µl	10 µl	10 µl	30 µl		
70 µl	0 µl /	20 µl	30 µl	83.3 µg/ml	2.33 µg/ml
60 µl	10 µl	20 µl	30 µl		
60 µl	0 µl	30 µl	30 µl	83.3 µg/ml	3.5 µg/ml
50 µl	10 µl	30 µl	30 µl		
50 µl	0 µl	40 µl	30 µl	83.3 µg/ml	4.6 µg/ml
40 µl	10 µl	40 µl	30 µl		

UNIÓN TOTAL Y ESPECÍFICA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Unión total y específica de peptidos en HepG2



TSRP
SIAP-1 RII

CONCLUSIONES

- *PvTLP* se pudo expresar de manera recombinante en sistemas procariotas y su obtención se logró a través de tratamiento soluble, siendo esta una proteína presente en diferentes especies de *Plasmodium*, lo que sugiere una relevancia funcional.
- La proteína *PvTLP* fue capaz de unirse a las células HepG2 y HeLa sugiriendo una participación en la interacción parasito- hospedero en procesos como el atravesamiento celular.
- Se destaca la relevancia de unión del péptido 42433 a células HepG2 lo que indica que la región del factor vWA de la proteína *PvTLP* participa en el proceso.
- Los péptidos 42429, 42432 y 42433 son posibles candidatos a vacuna ya que inhibieron en más de un 50% la unión de la proteína a las células HepG2.

PERSPECTIVAS

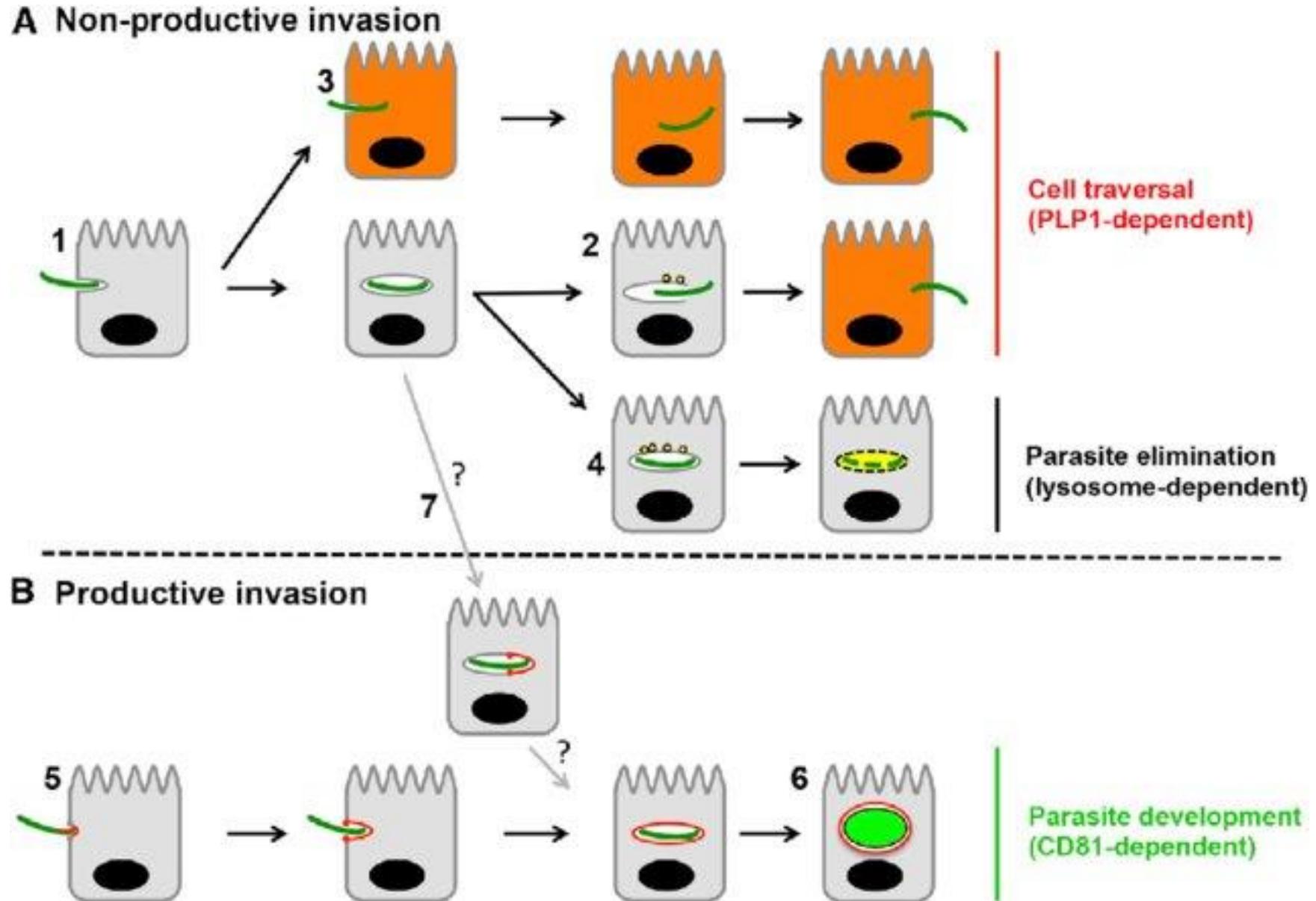
- Realizar ensayos enzimáticos para determinar la naturaleza del tipo de receptores que tiene la proteína de cada una de las líneas celulares.
- Completar los procesos de caracterización y funcionalidad de los dominios que están involucrados en los procesos de atravesamiento e invasión celular.
- Evaluar la antigenicidad que tienen los dominios de *PvTLP* en ensayos in vitro con muestras infectadas de *Plasmodium vivax*.

AGRADECIMIENTOS

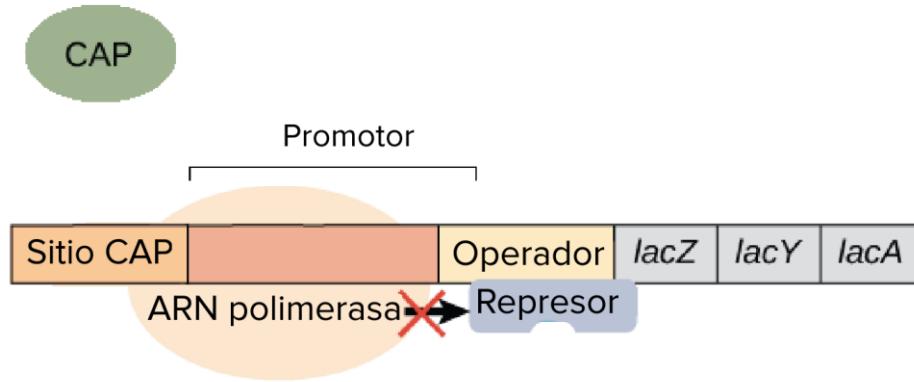
- Principalmente agradezco a **Dios, a mis padres y hermano** por darme la oportunidad y apoyo de estudiar y seguir escalando cada peldaño en mí vida profesional
- Agradezco a la **Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca** por la academia de formación que nos brinda a cada uno de nosotros generando grandes herramientas del conocimiento y valores en la salud y la sociedad.
- Agradezco a mi profesora y asesora **Gabriela Arévalo** por abrirme una puerta al inicio de la investigación y darme un excelente seguimiento, apoyo y dedicación para lograr un buen trabajo.
- A la **Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)**, especialmente al grupo Receptor- Ligando por el apoyo incondicional de todos y cada uno de los que hacen parte de este grupo.
- **A mi asesora externa** Jeimmy Castañeda por su apoyo, paciencia, dedicación, tiempo y consejos que sin su ayuda y conocimiento no hubiese sido posible lograr este proyecto.
- A los investigadores y amigos **Adriana y Fredy** por sus enseñanzas y acompañamiento en este proceso, su paciencia y apoyo también fue fundamental para culminar este gran proceso, muchas gracias.
- A mis **compañeros y amigos** que estuvieron allí con palabras y vibras positivas que prometían un logro más en mi vida personal y profesional



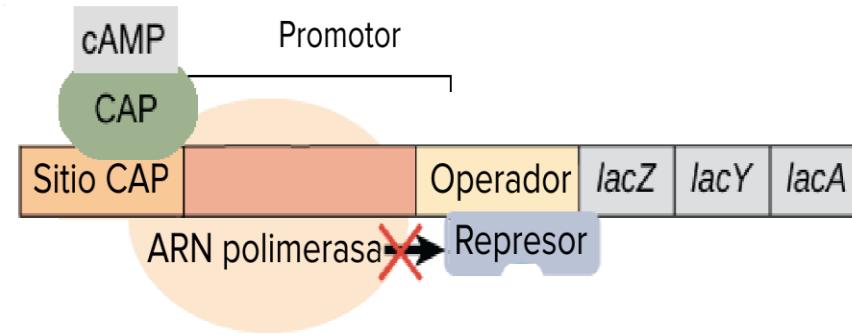
PROCESO DE ATRAVESAMIENTO CELULAR



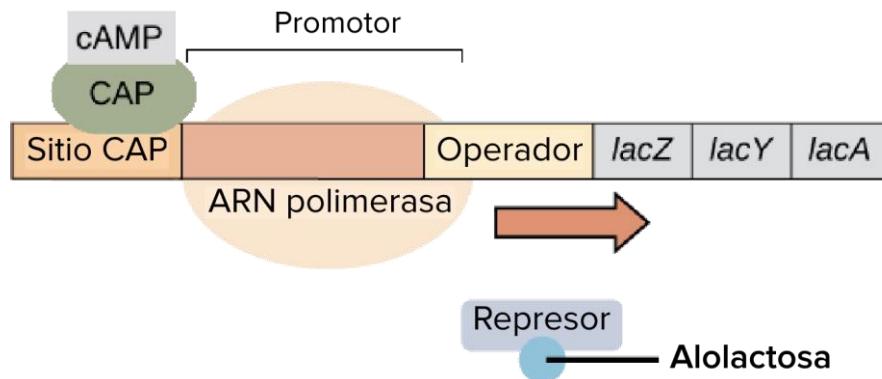
Glucosa presente, lactosa ausente:



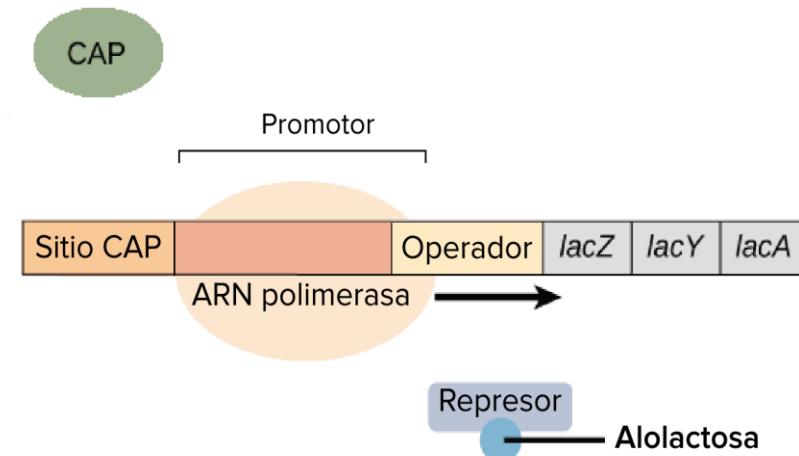
Glucosa ausente, lactosa ausente:



Glucosa ausente, lactosa presente:



Glucosa presente, lactosa presente:

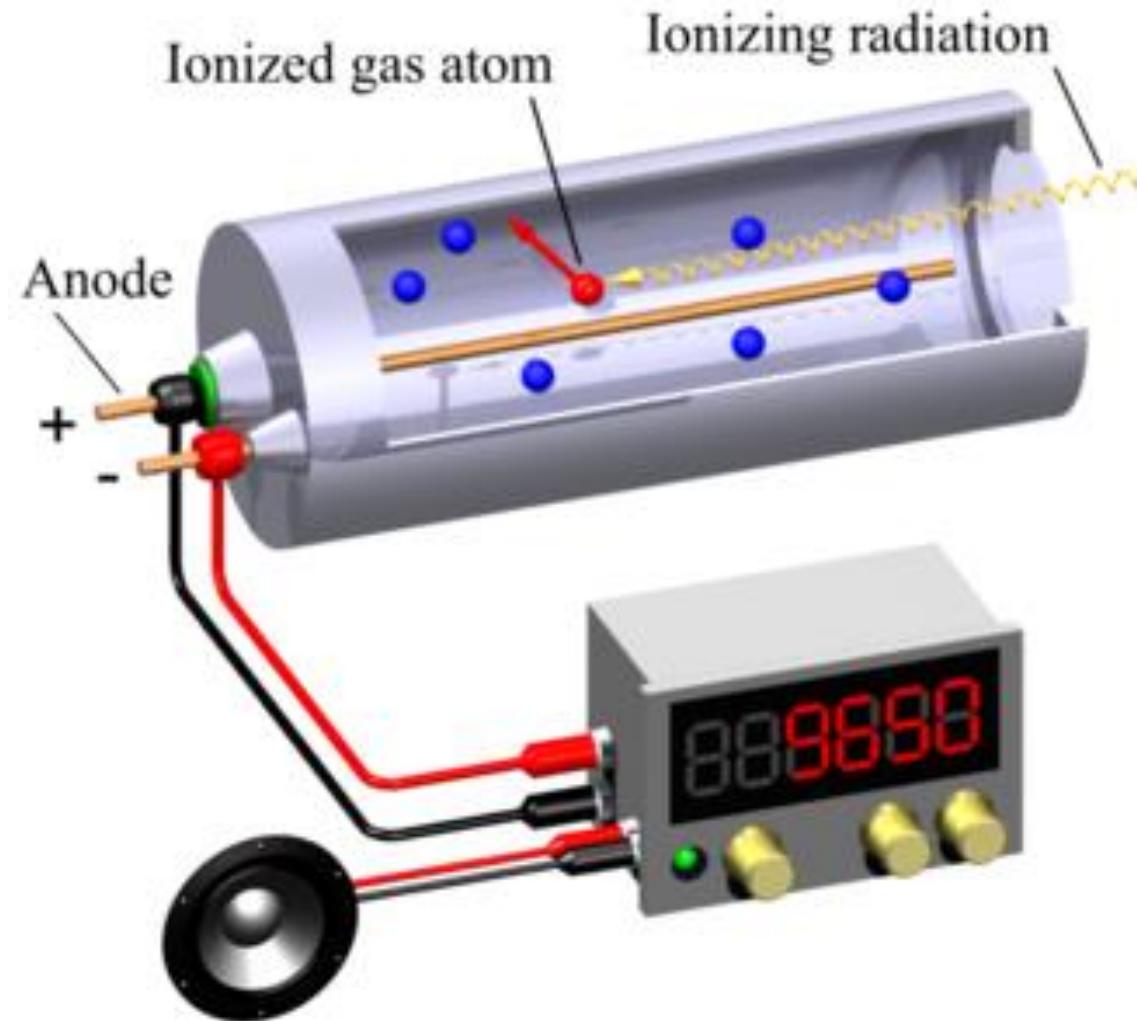


Citometria de Flujo	Radiomarcaje
% células que tiene la proteína unida	% Proteína que se unió a las células
Determina la viabilidad celular	No determina la viabilidad celular
< Sensibilidad	> Sensibilidad
< Especificidad	> Especificidad

Sensibilidad: Capacidad de la prueba de detectar los **verdaderos positivos**

Especificidad: Capacidad de la prueba de detectar los **verdaderos negativos**

CONTADOR GAMMA



PORCENTAJE DE UNION TOTAL

1.

Marcacion	13705	
Adicionado	U. total	U.inhibida
0	0,0	0
137050	2254,0	1960
274100	3180,0	3492
411150	4380,0	3392
548200	7204,0	5200
=PENDIENTE(B31:B35		
PENDIENTE(conocido_y; conocido_x)		

2.

Marcacion	13705	
Adicionado	U. total	U.inhibida
0	0,0	0
137050	2254,0	1960
274100	3180,0	3492
411150	4380,0	3392
548200	7204,0	5200
=PENDIENTE(B31:B35;A31:A35)		

3.

Marcacion	13705	
Adicionado	U. total	U.inhibida
0	0,0	0
137050	2254,0	1960
274100	3180,0	3492
411150	4380,0	3392
548200	7204,0	5200
0,01206421	=A38*100	

HepG2

U Total	42429	42432	42433	42434
142 µg/ml	85%	70%	19%	79%
214 µg/ml	66%	55%	17%	72%
285 µg/ml	33%	43%	19%	50%