

## GENERACIÓ D'EINES BIOLÒGIQUES PER LA PRODUCCIÓ I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE *PLASMODIUM VIVAX*

**Marina Ruiz Vidal**

**TREBALL DE FINAL DE GRAU EN BIOTECNOLOGIA**

Tutor acadèmic: Maria Montserrat Poblet Icart, [montserrat.poblet@urv.cat](mailto:montserrat.poblet@urv.cat)

En cooperació amb: Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal)

Supervisor: Carmen Fernández Becerra, [carmen.fernandez@isglobal.org](mailto:carmen.fernandez@isglobal.org)

Juny 2021

Jo, Marina Ruiz Vidal, amb DNI 48277504K, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 5 de juny de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Ruiz Vidal', written in a cursive style.

## Agraïments

Voldria mencionar en primer lloc a la persona que em va proporcionar la seva confiança i l'oportunitat de poder portar aquest projecte, la Doctora Carmen Fernández, com a tutora de pràctiques. Gràcies per obrir-me les portes al teu grup de recerca i haver conegut la teva vocació des de ben a prop. Seguit de tots el components fonamentals del grup en qüestió, PVREX – ISGlobal, en especial al Marc i l'Alberto per la quantitat i qualitat de temps que han dedicat en ajudar-me, tot l'aprenentatge dins del laboratori que m'han aportat i la facilitat a l'hora de treballar-hi en grup.

Un altra figura important, ha estat la Doctora Montserrat Poblet, tutora acadèmica, agrair-li la seva disposició sempre que ho he necessitat a solucionar qualsevol dubte que m'ha sorgit, orientar-me i corregir aquest treball.

Finalment, però no menys important, fer referència als meus companys de grau pels 4 anys que hem passat junts, i en l'àmbit més personal a la meva família i amics pel seu suport incondicional.

Dades del centre.....	pàg. 6
Resum del treball – Abstract.....	pàg. 8
<b>1. Introducció.....</b>	<b>pàg. 10</b>
Malària.....	pàg. 10
<i>Plasmodium vivax</i> .....	pàg. 11
Cicle biològic.....	pàg. 11
Característiques de <i>P. vivax</i> .....	pàg. 12
Situació dels tractaments actuals.....	pàg. 14
Proteïnes antigèniques d'interès a <i>P. vivax</i> .....	pàg. 15
<b>2. Hipòtesi del treball.....</b>	<b>pàg. 16</b>
<b>3. Objectius.....</b>	<b>pàg. 16</b>
<b>4. Materials.....</b>	<b>pàg. 17</b>
Soques.....	pàg. 17
Medis de cultiu comercials.....	pàg. 17
Reactius.....	pàg. 17
Kits comercials.....	pàg. 18
Solucions no comercials.....	pàg. 18
Enzims de restricció.....	pàg. 18
Recursos en xarxa i programes bioinformàtics.....	pàg. 18
<b>5. Metodologia i fonaments.....</b>	<b>pàg. 19</b>
Proteïnes i plasmidis seleccionats.....	pàg. 19
Transformació d' <i>E. coli</i> .....	pàg. 19
Creixement de les colònies transformades.....	pàg. 20
Tècniques per a la purificació dels plasmidis.....	pàg. 20
Digestió dels plasmidis.....	pàg. 22
Quantificació de l'ADN.....	pàg. 22
Producció i purificació de proteïnes.....	pàg. 23
Quantificació de proteïnes.....	pàg. 27
Anàlisi computacional – <i>in silico</i> .....	pàg. 29
<b>6. Resultats.....</b>	<b>pàg. 30</b>
<b>7. Discussió i conclusions.....</b>	<b>pàg. 39</b>
<b>8. Autoavaluació.....</b>	<b>pàg. 41</b>
<b>9. Bibliografia.....</b>	<b>pàg. 42</b>

## Abreviacions – Vocabulari

**BSA:** *Bovine Serum Albumine*

**Exosomes:** són vesícules extracel·lulars que es produeixen als endosomes de la majoria de les cèl·lules eucariotes.

**GST (*glutathione S-transferase*):** compren una família d'isoenzims metabòlics de fase II en eucariotes i procarïotes. Més conegudes per la seva habilitat de catalitzar la conjugació de la forma reduïda del glutatió en substrats xenobiòtics per tal de detoxificar.

**GTE:** Glucosa/Tris/EDTA

**K&T:** *Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity*

**Micro-vasculatura o micro-vasos:** aquells vasos sanguinis amb un diàmetre igual o menor a 100 micròmetres i les seves estructures associades.

**Parasitèmia:** és la presència de paràsits al torrent circulatori.

**Reticulòcits:** són glòbuls vermells que encara no han arribat a la seva total diferenciació.

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**Stabilate:** una població d'organismes similars a una soca però més estable i mantinguda en condicions viables per a un propòsit particular.

**Vt:** volum total

**WGE:** *Wheat Germ Expression System*

## Dades del centre

### Informació sobre la institució – ISGlobal

L'Institut de Salut Global de Barcelona (**ISGlobal**) neix de forma oficial l'any 2010 sota l'impuls de la Fundació la Caixa, més el suport d'una agrupació d'institucions acadèmiques i governamentals que busquen proporcionar a Barcelona d'un centre de referència d'investigació que dongui resposta als reptes de la salut global del segle XXI.

Aquesta institució és consolidada com un nexa d'excel·lència basat en la recerca, que té el seu origen en l'àmbit hospitalari (Hospital Clínic i Parc de la Salut MAR) i acadèmic (Universitat de Barcelona i Universitat Pompeu Fabra), acumulant en el camp de la salut global, més de 30 anys d'experiència. El seu model de treball aposta per la translació del coneixement generat per la ciència a través de les àrees de formació, anàlisi i desenvolupament global.

La meta principal dels projectes que constitueixen l'agenda d'ISGlobal és corregir les desigualtats en l'estat de salut de les diferents poblacions del món.

ISGlobal, centre de la xarxa CERCA, es configura d'aquesta manera com un dels centres pioners en conjugar la investigació sobre malalties transmissibles amb la investigació sobre malalties cròniques i les seves causes mediambientals i climàtiques, situant-se entre els centres de referència en salut global a nivell internacional. <sup>[1]</sup>

### Informació sobre les instal·lacions de recerca – IGTP

L'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (**IGTP**) és un centre de recerca públic situat a Badalona (Barcelonès) que té com a objectiu principal incrementar el coneixement científic per transformar-lo, a continuació, en una millor salut i atenció mèdica dels pacients i de la comunitat.

L'Institut està associat a un dels grans hospitals docents de l'àrea de Barcelona: l'Hospital Germans Trias i Pujol (HUGTP) i forma part del campus biomèdic Can Ruti. El centre té la missió de crear un entorn multi-disciplinari i multi-institucional que permeti fer investigació amb la màxima eficiència per millorar la salut i la qualitat de vida de les persones, sent un centre de recerca biomèdica de prestigi, referent a Catalunya i al món. <sup>[2]</sup>

## Grup de recerca en malalties infeccioses – *Plasmodium vivax* i exosomes (PVREX)

El grup de recerca **PVREX**, de l'Institut de Salut Global de Barcelona, està co-dirigit per dos investigadors principals: Hernando A. del Portillo, professor de recerca ICREA, i Carmen Fernández-Becerra, professora associada de recerca. Es van adherir a l'IGTP al novembre del 2015 mitjançant un acord de col·laboració entre ambdues institucions.

PVREX aporta la seva experiència en investigació sobre malària i exosomes amb una motivació molt forta per produir un impacte global. El grup utilitza una sèrie de tecnologies basades en la biologia molecular i cel·lular, combinades amb estudis immuno-epidemiològics en regions endèmiques de malària *vivax* per estudiar la biologia del paràsit, revelar els mecanismes que actuen sobre l'anèmia i l'esplenomegàlia i descobrir nous antígens per a la producció de noves vacunes. A més, són pioners en l'ús d'exosomes derivats de reticulòcits com a vacuna i plataforma contra la malària. Amb aquesta finalitat, el Dr. del Portillo ha co-fundat INNOVEX THERAPEUTICS.SL, la primera *spin-off* espanyola dedicada a l'ús d'exosomes com a nous agents terapèutics i eines diagnòstiques.

A més, el grup ha implementat la producció de proteïnes solubles a petita escala en el sistema de germen de blat lliure de cèl·lules per a assaigs immunològics múltiple, imatges *in vivo* de paràsits de la malària en models de ratolí i la tecnologia d'òrgans en un xip per avançar en el coneixement del paper de la melsa en la malària i altres anèmies hemolítiques.

Finalment, a causa de la manca d'un sistema de cultiu *in vitro* per a la malària *vivax*, que té un tropisme únic per als reticulòcits, el grup treballa en la immortalització del CD34<sup>+</sup> humana capaç d'expandir-se i diferenciar-se en aquests glòbuls vermells joves. Per tant, aquestes àrees i tecnologies d'investigació són susceptibles de col·laborar amb grups que treballen en vesícules extracel·lulars, vacunes i trastorns hematològics a l'IGTP. [3]

## Resum

La malària és una de les malalties parasitàries més extenses al món, d'on s'ha de tenir en compte a *Plasmodium vivax*, una de les principals espècies que infecten als humans, si es vol aconseguir l'eliminació de la malària. Degut a la seva complexitat biològica intrínseca, les tasques d'investigació en la cursa d'una solució per eradicar-lo, com són el disseny de fàrmacs i vacunes, no són fàcils d'aconseguir. Per tant, a hores d'ara és necessari invertir en el coneixement d'aquest paràsit, per tal d'entendre els mecanismes que el regulen i les proteïnes que estan involucrades amb la patologia.

En aquest treball, es proposa estudiar dues proteïnes prèviament identificades pel nostre grup. Per una part, Phist (codificada per PVX\_093680), que s'associa a vesícules extracel·lulars i sembla que té un paper important com a comunicador intercel·lular dins la malària causada per *P. vivax*. I per l'altra, una proteïna hipotètica, Hypol (codificada per PVX\_114580), l'expressió de la qual depèn de la melsa i s'associa amb la protecció clínica. Aquest projecte pretén expressar-les com a **proteïnes recombinants** mitjançant el sistema alternatiu lliure de cèl·lules, anomenat **Wheat Germ Expression system**.

La proteïna Phist es va produir amb èxit mitjançant aquest sistema, tot i que en menys quantitat de la necessària per a **assajos d'immunització** en ratolins BALB/c. A més, tampoc s'ha pogut expressar la proteïna Hypol. Per tant, es va realitzar una **anàlisi computacional – in silico** per identificar epítops immunògens que ens permetin dissenyar i produir pèptids sintètics per a futurs assaigs de immunització i producció d'anticossos.

Tot i tractar-se de petits estudis experimentals i amb un marge de millora important, aquest tipus de metodologies emprades poden ser alternatives interessants a tenir en compte quan es tracta amb organismes de la complexitat de *Plasmodium vivax*.

**Paraules clau:** *Plasmodium vivax*, proteïnes recombinants, *Wheat Germ Expression system*, assaig d'immunització, anàlisi computacional – *in silico*.

## Abstract

Malaria is one of the most widespread parasitic diseases in the world and where *Plasmodium vivax*, one of the main species that infect humans, has to be taken in consideration if malaria elimination wants to be achieved. Due to its intrinsic biological complexity, research tasks in the race for a solution to eradicate it, such as the design of drugs and vaccines, are not easy to achieve. Therefore, it is now necessary to invest in the knowledge of this parasite, in order to understand the mechanisms that regulate it and the proteins involved in pathology.

In this work, it is proposed to study two proteins previously identified by our group. The first one, Phist (encoded by *PVX\_093680*) is associated with extracellular vesicles and seems to play an important role as intercellular communicator in *vivax* malària. The second one, is an hypothetical protein Hypol (encoded by *PVX\_114580*), whose expression is dependent of the spleen and it is associated with clinical protection. This project aimed to express them as **recombinant proteins** using the cell-free alternative system, called **Wheat Germ Expression system**.

The Phist protein was successfully produced using this system, although in less amount than necessary for **immunization assays** in BALB/c mice. Furthermore, we were unable to express the Hypol protein. Therefore, we carry out a **in silico – computational analysis** to identify immunogenic epitopes that allow us to design and produce synthetic peptides for future immunization and antibody production assays.

Although these are small experimental studies with a significant room for improvement, these types of methodologies used can be interesting alternatives to consider when dealing with organisms of the complexity of *Plasmodium vivax*.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, recombinant proteins, Wheat Germ Expression system, immunization assay, *in silico* – computational analysis.

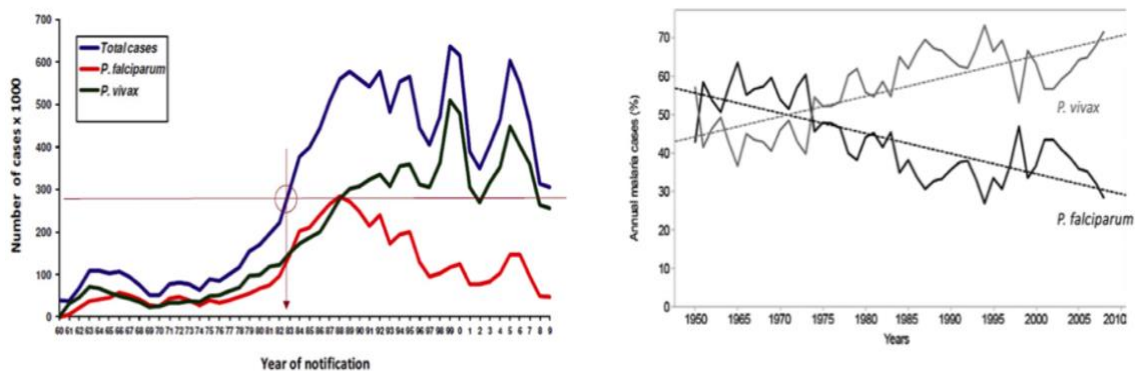
# 1. Introducció

## Malària

La **malària** (de l'italià *mal aria* – mal aire) o paludisme (provinent del llatí *palus* – pantà) és una malaltia tropical parasitària produïda per l'espècie del gènere **Plasmodium**.

És una patologia que principalment afecta a les cèl·lules sanguínies i és transmesa per vectors, normalment el mosquit femella del gènere *Anopheles*, que es troba a 91 països de tot el món. De les més de 120 espècies de *Plasmodium* que infecten mamífers, aus i rèptils, només se sap que cinc infecten als éssers humans regularment: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* i *Plasmodium knowlesi*. [4]

La malària és una de les poques malalties on la mortalitat és encara mesurada en centenars de milions de casos cada any. Segons l'evolució en el transcurs dels anys i la longevitat del problema, comença a ser evident que la seva eradicació avindrà una tasca complicada i *P. vivax* serà una de les espècies més complicades d'eliminar, tot i que rep menys atenció que la malària produïda per *P. falciparum*. A més, en els països que l'èxit en el decreixement de la malaltia comença a ser evident, la majoria de casos que encara queden són causats per *P. vivax*. [5]



**Figura 1.** Nombre de casos de malària de *P. vivax* i *P. falciparum* a Tailàndia (esquerra) i Brasil (dreta) en els darrers anys. [5]

## Plasmodium vivax

*P. vivax* és el paràsit humà de la malària més dispers, trobat en moltes parts de les regions tropicals i sub-tropicals del planeta. Avui en dia, s'estima que 7,5 milions de persones a tot el món estan infectats per *P. vivax* i al voltant de 2,5 bilions viu en zones on hi ha risc d'infecció, fent de l'espècie causant de la malària humana més àmpliament distribuïda. [6]



Figura 2. La incidència de malària causada per *Plasmodium vivax* al món durant el 2017. [5]

Les infeccions del paràsit han estat sempre considerades per ser benignes, però en els últims anys, aquestes han demostrat causar patologies severes que posen en risc la vida dels afectats, incloent el síndrome de trastorn respiratori agut, la malària cerebral, la insuficiència de diversos òrgans, esplenomegàlia, l'anèmia o altres complicacions hematològiques. [7]

## Cicle biològic

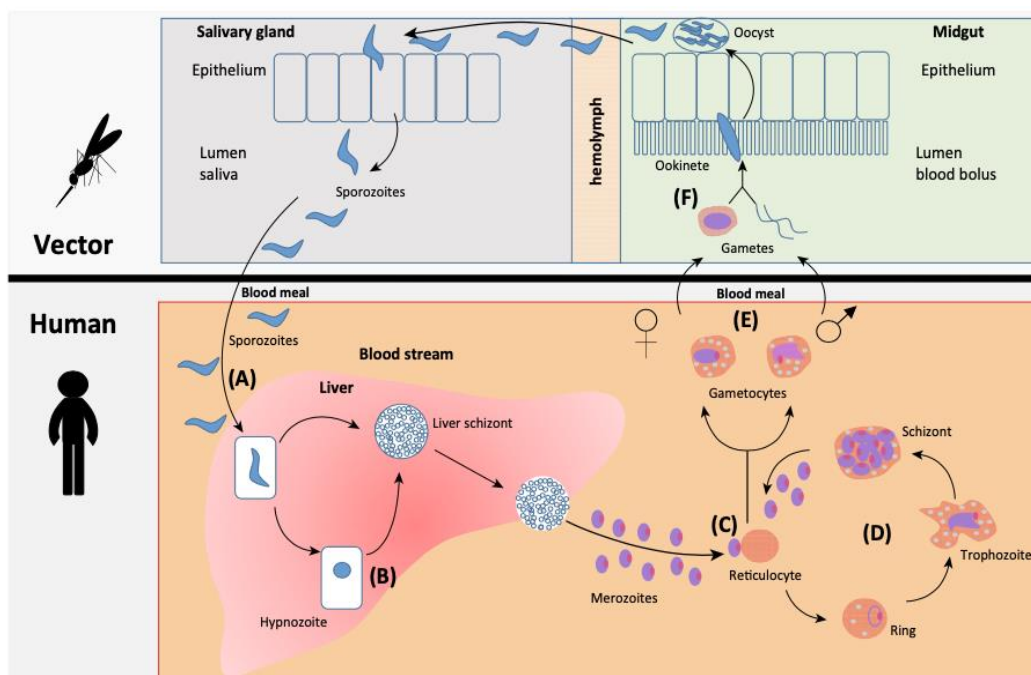


Figura 3. Representació esquemàtica del cicle biològic de *P. vivax*. [8]

(A) Durant la succió per part del mosquit *Anopheles*, els **esporozoïts** (*sporozoites*) són alliberats de les glàndules salivals i ràpidament migren, pel torrent sanguini, cap al fetge de l'hoste, on envaeixen els hepatòcits. Després de la infecció, una parts dels esporozoïts es multiplicaran a les cèl·lules del fetge, generant els **esquizont hepàtic** (*liver schizont*), els quals tindran dues possibilitats: (B) es generaran un tipus de formes latents al fetge anomenades **hipnozoïts** (*hypnozoite*); o (C) lisaran l'hepatòcit i passaran a anomenar-se **merozoïts** (*merozoites*). Aquí hi ha un primer **cicle asexual**, en què els merozoïts poden o bé re-infectar hepatòcits o bé tornar a el torrent sanguini, on penetren als **reticulòcits**. Seguint aquest segon camí, (D) el paràsit inicia el **cicle eritrocític** on els merozoïts comencen a alimentar-se de la parc proteica de l'hemoglobina i apareixent llavors el **trofozoït** (*trophozoite*). Novament, el paràsit es multiplicarà a l'interior d'aquestes cèl·lules, formant-se l'**esquizont hemàtic**, on també es lisarà el reticulòcit per alliberar nous merozoïts. La majoria de merozoïts continuaran aquest cicle replicatiu infectant noves cèl·lules, però (E) una fracció dels paràsits no hi entra, per a poder diferenciar-se en les formes sexuals de **gametòcits femení i masculí** que es transmetran al mosquit. A l'insecte es diferenciaran en gàmetes i al fusionar-se, es produeix la fecundació. (F) El zigot ràpidament es diferencia en un **oocinets** (*ookinete*), el qual creua la barrera epitelial de l'intestí del mosquit, assentant-se a la membrana basal i multiplicant-se en estructures anomenades **oocists** (*oocyst*). Els nous esporozoïts son alliberats dels oocists i migren de la hemolimfa a les glàndules salivals, on creuaran un altre epiteli per arribar a la saliva, podent infectar a un altre humà durant la següent picada del mosquit en qüestió. [8]

### Característiques de *P. vivax*

*P. vivax* ha desenvolupat una sèrie de **mecanismes** extraordinaris que li han permès la seva expansió per la majoria de territoris i una resiliència a les mesures de control estàndard fins avui en dia desenvolupades, en comparació amb la resta de paràsits de la malària humans, entre d'ells:

#### - Forma latent del paràsit al fetge – Hipnozoït

L'hipnozoït, una estructura aparentment insignificant formada durant el cicle vital de *P. vivax*, complica greument l'epidemiologia al permetre l'adaptació del paràsit a climes temperats on altres *Plasmodium* humans no poden sobreviure. Aquesta habilitat el permet mantenir-se en una forma latent durant mesos o inclús anys. [8]

Per exemple, al voltant del 80% dels casos de malària per *P. vivax* a l'Àsia de la regió pacífica, son deguts a els estadis de latència al fetge i les conseqüents recaigudes. Per

tant, el reservori d'hipnozoïts suposa un focus predominant de la infecció on enfocar-se per aconseguir eliminar el paràsit. [5]

#### - Infecció als reticulòcits

*P. vivax* té preferència pels **reticulòcits**, una fracció minoritària de les cèl·lules vermelles sanguínies circulants a la sang perifèrica i provinents de la medul·la. S'ha comprovat que el seu tropisme cel·lular és més estret del que es pensava, restringint-se a reticulòcits joves que expressin alts nivells del receptor de la transferrina (CD71). A més, durant el seu procés continu de maduració cap a normòcits, presenten una sèrie de canvis bioquímics i biofísics, incloent la pèrdua mediada per vesícules extracel·lulars (**exosomes**) del contingut reticular i de les proteïnes de membrana, com el receptor CD71. [8]

Per tant, com el nivell de reticulòcits amb CD71 és escàs, en individus infectats, la infecció per *P. vivax* sol presentar un **índex de parasitemia baix** a causa de la seva preferència per envair els reticulòcits en lloc dels eritròcits, com és el cas de *P. falciparum*. En conseqüència, es requereix una eina de diagnòstic més sensible ja que és difícil detectar el paràsit en individus asimptomàtics infectats i en infeccions d'espècies mixtes mitjançant microscòpia de llum convencional.

Els mètodes de detecció basats en PCR són dels més sensibles, però no són practicables en procediments de diagnòstic rutinari, especialment en entorns rurals. Per tant, cal un assaig diagnòstic específic més sensible i senzill que pugui arribar a tots els indrets. Els **assaigs immunològics** poden ser alternatives atractives, ja que es poden utilitzar per diagnosticar portadors asimptomàtics i individus exposats recentment a *P. vivax*. [7]

Aquesta preferència pels reticulòcits també impedeix el desenvolupament de tècniques de cultiu *in vitro* contínues, causant un baix coneixement sobre els mecanismes d'immunitat del paràsit. Com a resultat, la majoria dels coneixements sobre mecanismes immunitaris es prenen a partir d'informes sobre *P. falciparum* o altres *Plasmodium sp.* en models animals. [9]

Tot i així, els cultius a curt termini establerts amb paràsits *ex vivo* i preparacions riques en reticulòcits de la sang de cordó umbilical, poden ser utilitzats per avaluar l'eficàcia de les vacunes dels paràsits a l'estadi de merozoït a la sang. I pel que fa a l'estadi hipnozoït

al fetge, els models basats en ratolins humanitzats i cultius d'hepatòcits *in vitro* estan pavimentant el camí pel descobriment de fàrmacs i vacunes en aquest àmbit. [8]

#### - Duffy-binding protein (PvDBP)

Donada la invasió dels reticulòcits per part dels merozoïts, aquesta es regulada normalment per les interaccions proteiques entre la proteïna de *P. vivax*, **Duffy-binding protein (PvDBP)** i el receptor de l'antigen Duffy per quimiocines (**DARC**) a la membrana del reticulòcit.

A l'Àfrica sub-Sahariana, on el focus de malària es aclaparadorament atribuït a *P. falciparum*, la baixa prevalença de *P. vivax* és atribuïda a la alta proporció de població amb el grup sanguini Duffy-negatiu (falta del receptor DARC per a la glicoproteïna als glòbuls vermells) reduint el risc d'infecció. Tanmateix, recentment s'ha demostrat una prevalença d'infeccions sub-microscòpiques per *P. vivax* en algunes parts d'Àfrica suggerint que el paràsit evoluciona a l'utilitzar receptors alternatius per la invasió dels eritròcits. [5]

### Situació dels tractaments actuals

En general, els **programes de control** de la malària s'han centrat en ampliar la cobertura d'intervencions clau com les xarxes de llit tractades amb insecticides i diagnòstics ràpids. [10] En aquest cas, ens centrarem en resumir els fàrmacs antipalúdics fins ara més efectius i els avenços en la recerca d'una vacuna amb possibilitats:

#### - Fàrmacs

Actualment els tractaments per la **fase sanguínia** es centren en les teràpies combinades amb **artemisinina** o **cloroquina**. Per una altra part, el tractament pels **hipnozoïts** es limita a un fàrmac (**primaquina**), el qual no és recomanable per la deficiència de la glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (**G6DP**), un fenotip comú a la majoria de les regions endèmiques de malària, el qual és perjudicial en dones embarassades i lactants ja que pot haver risc d'hemòlisi tant per al fetus com pel futur nadó. Tot i així, ja han començat a sorgir casos de resistència a la cloroquina (*chloroquine-resistant*, **CQR**) en diverses zones. Per tant, s'ha demostrat que una altra possible solució eficaç és combinar la cloroquina amb la primaquina, el qual redueix la parasitemia de *P. vivax* al 90%. [5]

## - Vacunes

La recerca de la vacuna contra la malària té una història extensa i és basada en estudis sobre la immunitat adaptativa. Identificar els millors antígens com a possibles candidats, ha sigut el camp més estudiat fins ara, especialment des de que es coneix el potencial de les dianes descobertes amb la primera publicació del genoma de *falciparum* (2002) i seguidament el de *vivax* al 2008.

Avui en dia, la majoria de vacunes contra *P. vivax* desenvolupades segueixen en estadis preclínics. La principal candidata és la relacionada amb la proteïna DBP, on la inducció d'anticossos anti-DBP que bloquegin aquestes interaccions i la invasió dels reticulòcits a *P. vivax* és la base d'aquesta vacuna. [11]

Una justificació coherent a aquest retràs pot ser atribuïda al fet que qualsevol recerca per a trobar un candidat a vacuna requereix l'expressió d'antígens recombinants i les proteïnes de *Plasmodium* han estat consistentment de les més difícils d'expressar. Això és degut a que el percentatge de nucleòtids d'Adenines (A) i Timines (T) en alguns genomes de *Plasmodium* pot excedir el 80%, el que fa que manipular el material genètic (ADN) en construccions d'expressió sigui difícil i resulti en estructures d'aminoàcids que no són sempre ben tolerades pels sistemes d'expressió de proteïnes estàndards eucariòtics o procariòtics.

A més, les diferències significatives entre *falciparum* i *vivax* en la funció i l'estructura de les proteïnes específiques del merozoït, incloent les proteïnes que no tenen un ortòleg evident 1:1 entre les dues espècies, indiquen que el coneixement en les dianes immunològiques de *falciparum* com a candidates a vacuna, sols tenen una producció parcial en *vivax*.

Per tant, tot i l'extens nombre d'antígens de *P. vivax* que han estat identificats amb potencial com a vacuna, hi ha una necessitat clara d'estudis més detallats dels antigens amb una alta prioritat. [9]

## **Proteïnes antigèniques d'interès a *P. vivax***

El grup d'investigació PVREX ve treballant en els últims anys en la identificació de nous antigens com a candidats a vacunes. En aquest sentit, han centrat la seva atenció en:

- La importància que té la melsa durant la infecció per *P. vivax*. Recentment, han identificat una sèrie de proteïnes les quals la seva expressió depèn de la presència d'aquest òrgan. <sup>[12]</sup>
- Identificar el paper de les vesícules extracel·lulars (exosomes) dins de la infecció per *P. vivax*. Un treball recent del grup ha analitzat la composició proteòmica dels exosomes procedents del plasma de pacients amb *P. vivax* <sup>[13]</sup> identificant una sèrie de proteïnes del paràsit de gran interès pel possible desenvolupament de nous candidats a vacunes.

## 2. Hipòtesis

Per a determinar la localització cel·lular i la funció de les proteïnes dependents de la melsa, així com de les relacionades amb els exosomes, necessitem generar anticossos policlonals en ratolins en front a algunes d'aquestes proteïnes que ens permeti localitzar-les mitjançant microscòpia confocal. Inicialment, en línies transgèniques de *P. falciparum* expressant aquestes proteïnes i posteriorment en reticulòcits infectats amb *P. vivax* procedents d'aïllats de camp.

## 3. Objectius

L'objectiu principal d'aquest projecte és la generació d'anticossos policlonals enfront a proteïnes de *P. vivax* dependents de la melsa i relacionades amb els exosomes, produïdes *in vitro* pels sistemes lliure de cèl·lules del germen de blat (WGE). Per tant, proposem els següents **objectius específics**:

- Aprenentatge i entrenament en les tècniques bàsiques de biologia molecular i anàlisi computacional.
- Producció de proteïnes recombinants de *P. vivax* en el sistema lliure de cèl·lules del germen de blat (WGE).
- Preparació de les proteïnes per a la immunització i producció d'anticossos.

## 4. Materials

### Soques

Nom	Casa Comercial	Referència
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	ThermoFisher™	ECO112
<i>E. coli</i> JM109	Promega™	L2005

Taula 1. Soques

### Medis de cultiu comercials

Nom	Casa Comercial	Referència
S.O.C Medium	Invitrogen™	15544-034
LB Broth	Sigma™	L3022-250G
LB Agar	Sigma™	L2897-250G

Taula 2. Medis de cultiu comercials

### Reactius

Nom	Casa Comercial	Referència
Ampicil·lina	AppliChem™	A0839.0010
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen™	10977035
FastDigest Buffer (10X)	Thermo Scientific™	B64
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen™	10488085
Agarosa - RNase free	Invitrogen™	15510-019
TBE 1X	Invitrogen™	15581-044
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Thermo Scientific™	S33102
SDS	Sigma™	L3771-500G
Bis-acrilamida 30%	Sigma™	A3574
TEMED	Sigma™	T9281-100ML
APS 10%	Honeywell Fluka™	9914
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher™	26616
PBS	Sigma™	P4417
L-Glutathione reduïda 98%	Sigma™	G6013-5G
Stain Comassie; Brilliant blue R 250	Honeywell Fluka™	27816
Metanol	Thermo Scientific™	10010280
Àcid acètic glacial	PanReac™	211008.1211
2-Propanol RNase-Free	Sigma™	I-9516
Bovine Serum Albumin Lyophilised pH ~ 7 (BSA)	Biowest™	P6154-100GR
Dulbecco A (Phosphate Buffered Saline Tablets)	Oxoid™	BR0014G
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad™	#5000006

Taula 3. Reactius

## Kits comercials

Nom	Casa Comercial	Referència
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega™	A2492
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega™	A1223
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN™	12362
RTS 100 Wheat Germ CECF Kit	biotechrabbit™	BR1401001
GST Spintrap™	cytvia™	GE28-9523-59

Taula 4. Kits comercials

## Solucions no comercials

Aquestes són les solucions que es van utilitzar durant la purificació de plasmidis per mitjà d'una lisi alcalina no comercial.

Nom	Composició
Solució I	Glucosa 50 mM Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM (pH 8,0)
Solució II	NaOH 0,2 N SDS 1%
Solució III	Acetat potàssic 5M Àcid acètic glacial H <sub>2</sub> O destil·lada

Taula 5. Solucions no comercials

## Enzims de restricció

Nom	Casa Comercial	Referència
FastDigest BamHI	Thermo Scientific™	FD0054
FastDigest NotI	Thermo Scientific™	FD0593
FastDigest PstI	Thermo Scientific™	FD0614

Taula 6. Enzims de restricció

## Recursos en xarxa i programes bioinformàtics

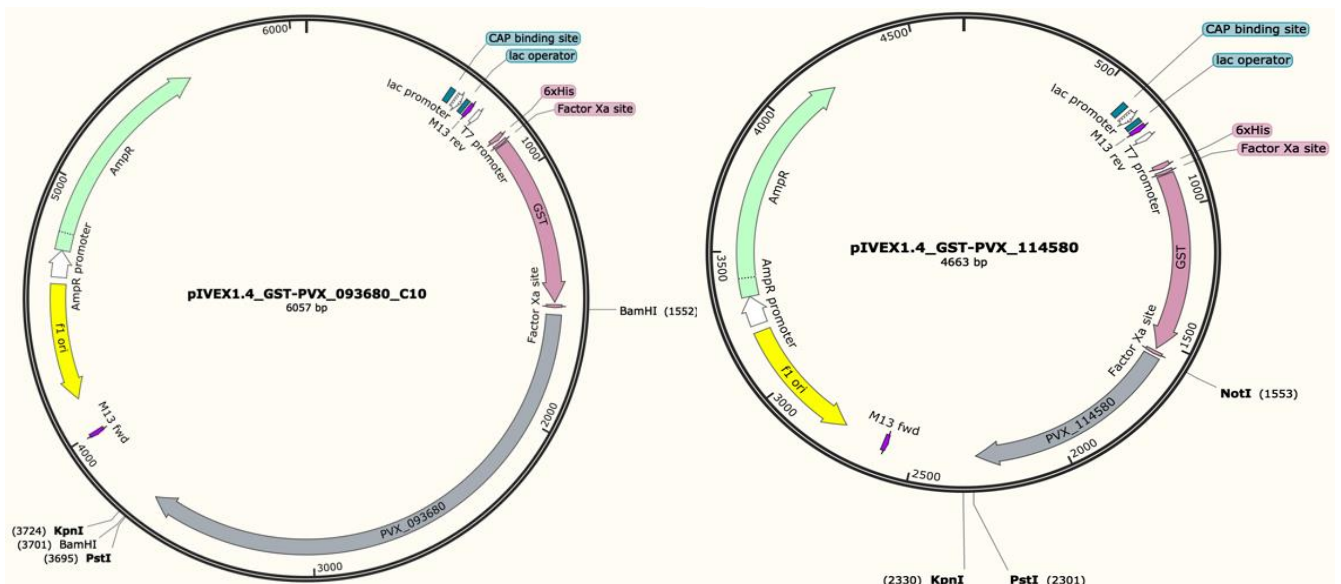
Nom	Aplicació	Referència
SnapGene® 5.2.5	Software que proporciona les eines necessàries per treballar en el camp de la biologia molecular.	<a href="https://www.snapgene.com/release-notes/?version=5.2.5">https://www.snapgene.com/release-notes/?version=5.2.5</a>
PlasmDB	Base de dades sobre tots els tipus de <i>Plasmodium</i>	<a href="https://plasmodb.org/plasmo/app">https://plasmodb.org/plasmo/app</a>
BioRender©	Pàgina web per al disseny i creació de figures científiques.	<a href="https://biorender.com">https://biorender.com</a>

Taula 7. Recursos en xarxa i programes bioinformàtics.

## 5. Metodologia i fonaments

### Proteïnes i plasmidis seleccionats

La proteïna relacionada amb els exosomes, **Pf-fam-b**, pertany a la família de les PHIST i codifica pel gen *PVX\_093680*, així com la proteïna hipotètica **Hypol** relacionada amb la melsa i codificada pel gen *PVX\_114580*, van ser seleccionades per aquest treball. Ambdues havien sigut clonades prèviament pel grup en el vector d'expressió pel sistema de germen de blat "Wheat Germ System" (WGE) denominat **pIVEX-GST1.4d** [14] generant respectivament els plasmidis **pIVEX-GST1.4d\_PVX\_093680** i **pIVEX-GST1.4d\_PVX\_114580** (veure mapes Figura 4).



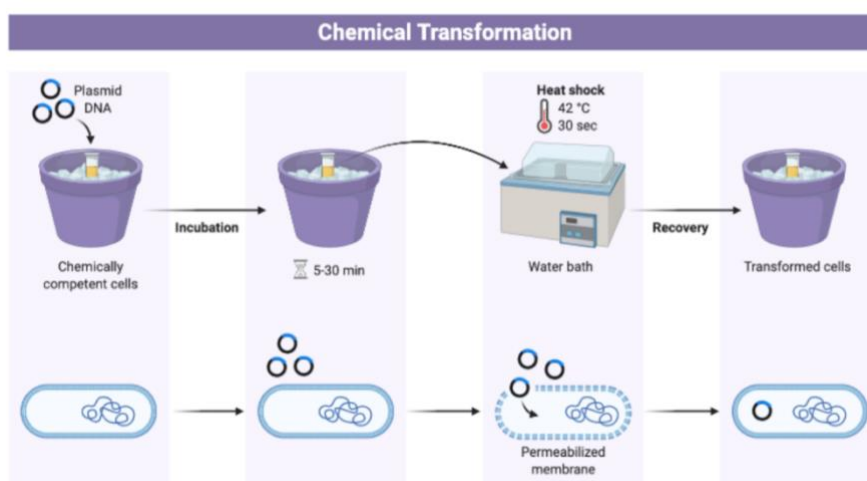
**Figura 4.** Representació esquemàtica dels plasmidis **pIVEX1.4\_GST-PVX\_093680\_C10** i **pIVEX1.4\_GST-PVX\_114580** generats amb el programa SnapGene.

### Transformació d'*E. coli*

La transformació bacteriana és un procés natural on les cèl·lules capten l'ADN forani del medi en una baixa freqüència. Després de la transformació, les cèl·lules poden expressar la informació genètica adquirida, la qual podrà ser utilitzada com a font de diversitat gènica i proporcionar beneficis per a l'hoste (per exemple, resistència als antibiòtics).

En aquest cas, s'utilitza la soca **DH5 $\alpha$**  per a Phist i la soca **JM109** per a Hypol, i es realitza la transformació del tipus **Heat Shock**. Es descongelen 50 $\mu$ L de les cèl·lules de la soca bacteriana d'***E. coli*** en qüestió, durant 15 minuts en gel. A més, es prepara un

banc de dilucions del plàsmid (1 µg/µL) amb les següents concentracions: 10 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL. A continuació s'afegeix 30 µL de la mostra amb 1 µL del plàsmid a les diverses concentracions, es barreja (vòrtex) i es deixa en gel durant 30 minuts. Seguidament s'escalfen a 42°C durant 45 segons en un bany d'aigua i després 2 minuts en gel. S'afegeix 300 µL de **medi S.O.C** i s'incuba a 37°C durant una hora i a 500 rpm al ThermoMixer®. Per acabar, agafem tota la mostra i la sembrem en placa de Petri amb medi LB Agar i ampicil·lina durat tota la nit a 37°C. Es conten les colònies i es calcula l'eficiència. Una eficiència esperada està entre 10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> colònies/µg.



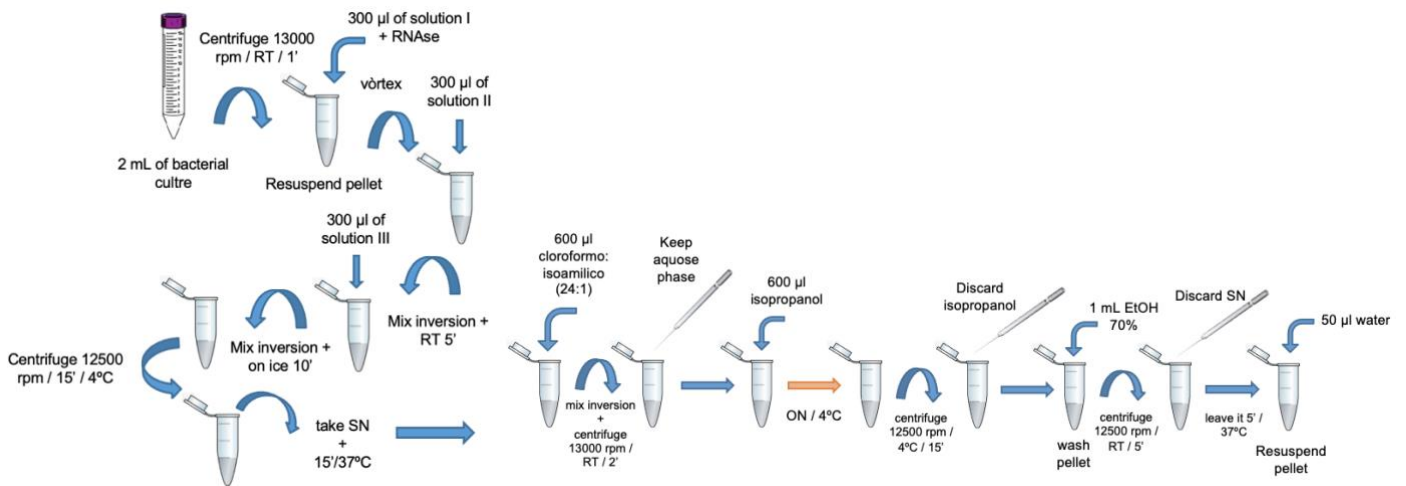
**Figura 5.** Representació esquemàtica de la transformació per Heat Shock.  
**Font:** BioRender

### Creixement de les colònies transformades

Un cop tenim les colònies d'interès (**transformades**) i volem obtenir molta més quantitat per començar a produir proteïna, fem créixer aquestes colònies. Partim d'un cultiu en sembra o líquid congelat d'*E. coli* **Stabilate**, ho passem a un volum més gran de medi LB amb ampicil·lina (proporció 1:1000) i deixem incubar durant 16 hores en agitació, a 37°C i el recipient una mica obert per a que hi hagi intercanvi de gasos amb l'exterior.

### Tècniques per la purificació de plasmidis

La majoria de tècniques utilitzades per a la purificació de plasmidis o extracció d'ADN, en general es basen en la reacció de **lisi alcalina**. En aquest estudi vam utilitzar 2 kits comercials: **PureYield™ Plasmid Midiprep System** de Promega, i **EndoFree® Plasmid Maxi Kit** de QIAGEN, a més d'un protocol no comercial (**Figura 6**).



**Figura 6.** Representació esquemàtica de la purificació no comercial de l'ADN plasmídic a petita escala.

El **primer buffer de lisi alcalí**, normalment conté **SDS**, que farà lisar les cèl·lules bacterianes, alliberant tots els seus components cel·lulars. L'increment del pH també causarà el desparellament de bases de la hebra circular d'ADN, tot i estar físicament unides; a més de provocar la desnaturalització i desplegament de les proteïnes.

Seguidament, es **neutralitza el pH** amb un àcid feble, el que tornarà a provocar l'aparellament de bases del nostre ADN. En el cas dels plasmidis, com són relativament petits, succeirà de manera eficient en un període curt de temps. Al contrari, l'ADN genòmic bacterià no serà capaç d'aparellar-se eficientment. Com a resultat, l'ADN genòmic, les proteïnes i els lípids s'agregaran en un precipitat blanc esponjós, que es pot veure amb facilitat. Aquest agregat és insoluble, el que ens permetrà separar-ho de l'ADN del plasmidi (soluble).

Un cop tenim l'ADN del plasmidi aïllat, encara poden quedar alguns contaminants, com una varietat d'ions provinents dels diferents tampons utilitzats, i han de ser eliminats. En aquest punt, depenent de la casa comercial, es fa servir una estratègia o una altra:

- Als kits de **Promega™**, per eliminar els contaminants, s'utilitza una matriu de sílice. Sota una força iònica elevada, el sílice s'unirà selectivament a l'ADN i llavors es pot netejar la columna fins a eliminar tots els residus. Seguidament, es canvia a un tampó que té una força iònica baixa on, sota aquestes condicions, l'ADN s'allibera de la matriu de sílice i s'acaba obtenint el nostre ADN purificat.

- Respecte als kits de **QIAGEN™**, s'utilitza un tipus de resina per unir l'ADN plasmídic. Les restes d'ARN, proteïnes, colorants i impureses de baix pes molecular s'eliminen mitjançant un rentat de salinitat mitjana. A continuació, l'ADN plasmídic s'elueix en un tampó amb salinitat elevada, després es concentra i dessala per precipitació d'isopropanol.

### Digestió dels plasmidis

Les endonucleases de restricció son enzims que hidrolitzen l'ADN bicatenari en llocs específics en funció de la seva seqüència, deixant uns extrems característics que permeten la seva posterior unió a altres molècules d'ADN amb extrems compatibles. A més, és possible identificar un fragment concret d'ADN mitjançant digestions amb aquestes endonucleases si el seu mapa de restricció és conegut. <sup>[15]</sup> En aquest cas, per comprovar que l'insert genòmic d'interès estava dins dels plàsmid purificats, es va realitzar una digestió doble per a *PVX\_093680* i *PVX\_114580*, i una digestió simple per al control del gen de GST, linealitzant els vectors.

Hem utilitzat **reaccions de digestió** d'entre 15 – 20 µl com a volum total. Segons la concentració d'ADN mesurada al NanoDrop® i la quantitat d'ADN desitjada, decidíem quin volum de mostra agafar.

A més de la mostra purificada d'ADN, s'afegeix aigua UltraPure™ DNase/RNase-Free, el tampó FastDigest Buffer (10X) i per últim els enzims de restricció, que en cada cas:

Gen	Enzim(s) de restricció	Volum (µl)
<b><i>PVX_093680</i></b>	BamHI i PstI	0,5 cadascun
<b><i>PVX_114580</i></b>	NotI i PstI	0,5 cadascun
<b><i>Gen GST</i></b>	PstI	1

**Taula 8.** Enzims de restricció utilitzats en cada cas per fer la digestió.

Un cop es va tenir la reacció preparada, es deixa durant 1 hora i 30 minuts a l'incubador Eppendorf® Thermomixer Comfort.

### Quantificació de l'ADN

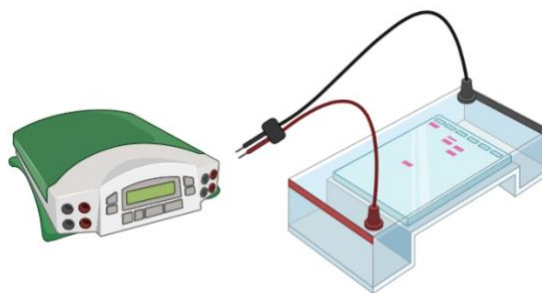
#### NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer

Per saber la puresa i la concentració d'ADN obtinguda, un dels mètodes emprats, va ser utilitzar l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 UV-Vis. Aquest presenta els avantatges de que sols es necessita una petita quantitat del volum de la mostra (≈ 1-2 µl), utilitza una tecnologia de retenció on s'utilitza sols la tensió superficial per mantenir

la mostra al lloc, eliminant la necessitat d'utilitzar cubetes o d'altres aparells per contenir la mostra, i permeten la neteja en segons.

### Electroforesi en gel d'agarosa 0.8 – 1%

L'altre mètode per avaluar la quantitat d'ADN obtinguda, tant de les mostres digerides com no digerides, va ser l'electroforesi en gel d'agarosa al 0.8 – 1%.



**Figura 7.** Esquema del muntatge de la cubeta de l'electroforesi i el gel d'agarosa. **Font:** BioRender

En una balança de precisió, es pesa els 40-50 grams d'agarosa en pols, segons el percentatge que ens interressi, i es dipositen dins d'un Erlenmeyer. Afegim els 50 mL TBE 1X, mesurats amb una proveta, barregem i ho escalfem dins d'una font d'escalfor com pot ser un microones. Un cop l'agarosa s'ha dissolt completament, afegim 5µl SYBR Safe i tornem a barrejar. Dipositem la solució a la cubeta (50mL) d'electroforesi, col·loquem la pinta de 16 pous i deixem solidificar durant uns 30 minuts. Un cop tenim el gel d'agarosa solidificat, retirem la cinta protectora, afegim TBE 1X fins a cobrir completament la cubeta i carreguem les mostres d'interès. Posem la tapa amb els elèctrodes ben posicionats i ho connectem amb la font d'alimentació a 100V durant 1 hora per a que les mostres puguin córrer bé i es puguin distingir un cop analitzem el gel. Per últim, retirem el gel d'agarosa ja corregut de la cubeta, el col·loquem al transil·luminador d'UV i ja podrem analitzar la imatge resultant.

## Producció i purificació de proteïnes

### Wheat Germ Expression System

Els mecanismes per la producció d'ADN recombinant a *Escherichia coli* són una eina important en la síntesi de proteïnes. No obstant a això, l'expressió restringida a causa de la presència d'una membrana i una paret cel·lular, comporten l'obtenció d'un rendiment menor en comparació amb altres sistemes alternatius, com pot ser el proposat **Wheat Germ Expression System Cell-Free (WGE)**.

Aquesta eina facilita un entorn òptim per a la síntesi de proteïnes, ja que es proporcionen tots els recursos metabòlics i la maquinària cel·lular necessària. A la reacció s'afegeix un extracte de germen de blat que conté tots els requisits necessaris per a la transcripció i la traducció. Les proteïnes acabades de sintetitzar es transfereixen a **liposomes**, cosa que permet mantenir les formes de proteïna natives durant les etapes de rentat. Com a

possibles inconvenients, no es pot realitzar les modificacions post-traduccionals de les proteïnes expressades com la glicosilació o la formació de ponts disulfur. [16]

Depenent de la proteïna, l'expressió de fins a 10-100 µg de proteïna per reacció poden ser obtinguts en 24 hores en una reacció inicial de síntesi de 50 µl.

L'objectiu en aquest pas és expressar proteïnes codificades en cDNAs clonats dels plasmidis en qüestió amb el kit **Wheat Germ - Biotechrabit BR1401001 – RTS 100 Wheat Germ CECF Kit**.

El sistema es basa en una microplaca on es produeix la reacció. Consta de 8 mòduls els quals contenen dos tipus de compartiment. Tal com es pot veure a la **Figura 8**, el **pou de reacció (reaction compartment)** conté uns anells de color vermell que el distingeixen del **pou d'alimentació (feeding compartment)**, els quals són transparents.



**Figura 8.** Imatge de la microplaca del kit *Wheat Germ - Biotechrabit BR1401001 – RTS 100 Wheat Germ CECF Kit*.

Per començar, s'han de preparar dos tipus de solucions:

<i>Feeding Solution</i>	<i>Reaction Solution</i>
900 µl de <i>Feeding Mix</i> 80 µl d' <i>Amino Acids</i> 20 µl de <i>Methionine</i>	15 µl de <i>Reaction Mix</i> 4 µl d' <i>Amino Acids</i> 1 µl de <i>Methionine</i> 15 µl de <i>Wheat Germ Lyaste</i> (mostra) 15 µl d'aigua estèril

**Taula 9.** Solucions a preparar pel kit *Wheat Germ - Biotechrabit BR1401001 - RTS 100 Wheat Germ CECF Kit*. Els volums són equivalents per a una reacció = un pou de la microplaca = 1 mostra.

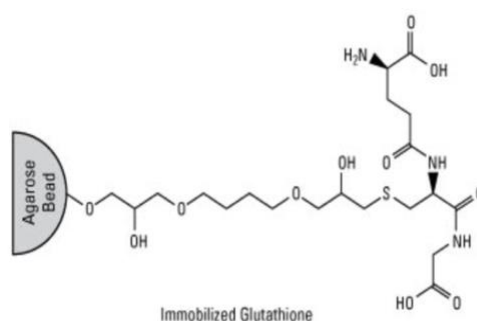
Es pipeteja 1 mL de la *Feeding Solution* a cadascun dels pous d'alimentació necessaris (1 reacció per compartiment) i el mateix amb 50 µl de la *Reaction Solution* al pou de reacció. Amb compte, es tanquen els mòduls utilitzats de la microplaca amb film adhesiu i deixem incubar-la al *Eppendorf® Thermomixer Comfort* durant 24 hores a 900 rpm i 24°C.

## SpinTrap-GST Purification

Les proteïnes de per sí, no s'utilitzen naturalment en anàlisis d'alt rendiment a causa de les seves diverses propietats fisicoquímiques. En conseqüència, les **etiquetes d'afinitat** (*Affinity tags*) s'han convertit en eines de recerca àmpliament utilitzades per determinar la funció biològica de les proteïnes no caracteritzades.

La **GST** és una proteïna, on la seva seqüència d'ADN sovint s'integra en vectors d'expressió per a la producció de proteïnes recombinants. El resultat de l'expressió d'aquest vector és una proteïna de fusió etiquetada amb GST on, la proteïna GST funcional (26 kDa) es fusiona amb el N-terminal de la proteïna recombinant.

Com que la GST es plega ràpidament en una proteïna estable i altament soluble després de la traducció, la inclusió de l'etiqueta GST sovint afavoreix una major expressió i solubilitat de proteïnes recombinants que l'expressió sense l'etiqueta. A més, les proteïnes de fusió etiquetades amb GST es poden purificar o detectar en funció de la capacitat de GST (enzim) per unir-se al seu substrat específic, el **glutatió**, un tripèptid (Glu-Cys-Gly) en la seva forma reduïda.



**Figura 9.** Esquema d'un suport sòlid d'agarosa amb el glutatió reduït. **Font:** ThermoFisher.

Com veiem a la **Figura 9**, aquest s'immobilitza a través del seu grup sulfidril (provinent de la Cys) a un suport sòlid, que es pot utilitzar per capturar proteïnes GST pures o etiquetades amb GST mitjançant la reacció d'unió enzim-substrat.

Després de rentar qualsevol columna d'afinitat per eliminar components de la mostra no units, la proteïna de fusió de GST purificada es pot dissociar i recuperar (eluir) d'una columna de glutatió per addició d'un excés de glutatió reduït. El glutatió lliure desplaça de manera competitiva la interacció d'unió al glutatió immobilitzat amb la GST, permetent que la proteïna de fusió surti de la columna d'afinitat.

Les columnes de **GST SpinTrap™** estan dissenyades per a purificacions ràpides a petita escala de proteïnes de fusió a GST. Primer de tot, es preparen les següents solucions:

<i>Binding Buffer (PBS 1X, pH 7.4)</i>	<i>Elution Buffer</i>
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 140 mM NaCl 2.7 mM KCl 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM Tris-HCl 20 mM de glutatió reduït

**Taula 10.** Solucions a preparar pel kit GST SpinTrap™

- Es re-suspèn la resina de cada columna a utilitzar per inversió i sacseig continuat. Es desenrosca un quart de la tapa superior i s'extreu el tap inferior. A continuació es posa la columna en un tub de 2 mL de microcentrífuga i es centrifuga durant 30 segons a 100 x *g* per extreure el líquid d'emmagatzematge (*storage liquid*).
- Es descarta el *storage liquid* i s'equilibra la columna afegint 600 µl de *Binding Buffer* i es torna a centrifugar a 100 x *g* durant 30 segons.
- Es torna a posar el tap inferior i s'afegeix la mostra (50 µl que teníem al pou d'alimentació de la microplaca + 50 µl de PBS utilitzat per rentar a continuació el pou). Es barreja a 900 rpm a 18°C durant 30 minuts per assegurar-nos de que hi ha una unió òptima de les proteïnes de fusió a GST amb el glutatió.
- Es treu el tap inferior i es centrifuga durant 30 segons a 100 x *g*, descartant el filtrat.
- Seguidament, es renta la columna amb 600 µl de *Binding Buffer* i es torna a centrifuga durant 30 segons a 100 x *g*. Es repeteix aquest pas de neteja i es descarta el filtrat.
- Es posa el tap inferior i s'afegeix 150 µl de *Elution Buffer* i s'incuba a 18°C, a 900 rpm i durant 15 minuts. S'extreu el tap inferior, col·locant la columna en un tub Eppendorf i centrifugant durant 30 segons a 100 x *g*.
- El filtrat recol·lectat serà la mostra purificada o Elució 1, per obtenir una segona mostra (Elució 2) tornar a repetir el pas anterior.

## Quantificació de proteïnes

### Electroforesi tipus SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 10%)

#### Preparació dels hidrogels

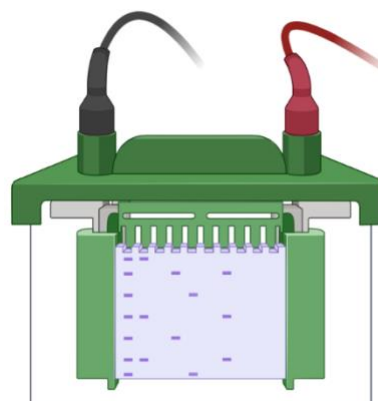
Aquest tipus d'electroforesi consta de dos hidrogels diferents. Per una banda el **separating gel**, on correran les mostres un cop s'inicia el camp elèctric i el **stacking gel**, que ens permetrà carregar-les.

La base més característica la proporciona el component del polímer acrilamida, en aquest cas s'utilitza en un 10%. A més, el gruix dels cristalls serà d'1 mm. A l'hora de fer el gel, l'ordre dels reactius no és important excepte pel TEMED i l'APS, al ser components que indueixen la polimerització, i han de ser afegits al final.

Reactius per a cada gel	
(1) <i>Separating gel</i> (vt ≈ 8 mL)	(2) <i>Stacking gel</i> (vt ≈ 2 mL)
2 mL 1,5 M Tris-Cl (pH 8.8)	120 µl Tris-Cl 0,5 M (pH 6.8)
60 µl SDS 20%	20 µl SDS 20%
2,7 mL Bis-acrilamida 30%	200 µl Bis-acrilamida 30%
3,2 mL d'aigua	1,6 mL d'aigua
11 µl TEMED	5 µl TEMED
40 µl APS 10%	15 µl APS 10%

**Taula 11.** Reactius i quantitats a utilitzar per a cada tipus de gel.

Es comença preparant el *separating gel* (1), s'afegeix entre els cristalls del muntatge de la cubeta i seguidament s'afegeix una mica d'aigua miliQ per crear una superfície uniforme i homogènia al gel, facilitant l'entrada de les proteïnes posteriorment. Un cop el gel ha polimeritzat, s'extreu l'aigua amb paper de filtre. A continuació es prepara el *stacking gel* (2), s'afegeix la solució acuradament sobre el *separating gel* i immediatament s'afegeix la pinta que modelarà els pous.



**Figura 10.** Esquema del muntatge de la cubeta de l'electroforesi i el gel SDS-PAGE. **Font:** BioRender

#### Preparació i càrrega de les mostres

Les mostres en qüestió produïdes (15µl) a quantificar, es barregen amb el tampó de carrega **Reducing loading buffer 4X amb DTT** (5µl) i s'escalfen a 95°C durant 5 minuts, just abans de carregar-les al SDS-PAGE gel. A continuació, es carreguen les mostres i el marcador als pous del gel preparat, es cobreix la cubeta amb tampó de càrrega (*Running Buffer*) i es connecta la cubeta a la font d'alimentació (100V).

### Tinció de les mostres

Un cop ha corregut el gel (aproximadament durant 1 hora i 30 minuts), es procedeix a tenyir-lo per a fixar les mostres. Es col·loca el gel en un recipient de vidre, sempre intentat que estigui humit (amb aigua destil·lada). S'afegeix al voltant de 20 mL de **Staining solution** i s'escalfa al microones durant 40 segons. Seguidament, s'incuba el recipient en una placa de rotació durant 15-20 minuts.

Un cop s'ha tenyit el gel, es descarta la *Staining solution* i s'afegeix 20 mL de **Distaining solution**, s'escalfa al microones durant 40 segons i es torna a incubar en una placa de rotació durant 15-20 minuts. Es repeteix aquest últim pas fins que veiem que el gel s'ha destenyit lo suficient per veure amb facilitat les bandes de les mostres carregades i el marcador.

Solució de tinció ( <i>Staining solution</i> ), vt ≈ 100 mL	Solució de destenyir ( <i>Distaining solution</i> ) vt ≈ 1000 mL
50 mL d'aigua miliQ 40 mL de metanol 10 mL d'àcid acètic 0,1 mL de <i>Comassie Blue Stain</i>	500 mL d'aigua miliQ 400 mL de metanol 100 mL d'àcid acètic

**Taula 12.** Reactius i quantitats a utilitzar per a cada tipus de solució.

### Mètode de Bradford

Per una altra banda, també valorem la producció de proteïnes pel mètode de Wheat-Germ, analitzant les mostres pel **mètode de Bradford**:

#### Preparació de la recta de calibratge (control amb BSA)

Primer de tot, es realitza una **recta de calibratge** amb diferents concentracions de BSA (pH 7). A partir d'una solució 2 mg/mL de BSA, es realitza una dilució seriada amb PBS 1X o el tampó on s'hagin eluït les mostres problema, per obtenir les següents concentracions: 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL i 0.03125 mg/mL.

#### Preparació del Assaig Proteic – Bradford

Primer de tot, es dilueix el reactiu de tinció (**Bio-Rad**) 4x fins a 1x utilitzant aigua mili Q. A continuació, es passa a carregar 10 µl tant de les mostres control de la recta, com les problema a la placa de 96 pous transparent i de fons pla. Seguidament, s'afegeix 200 µL del reactiu de tinció diluït a cada pou i es deixa incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. **Notes:** al menys els control i el blanc s'han d'afegir per duplicat o triplicat. Per

a uns resultats més reproduïbles, és millor afegir el reactiu de tinció amb una pipeta multicanal. Per últim, es mesura l'absorbància al **Varioskan (ThermoFisher)** o un altre tipus d'espectròmetre que pugui llegir les plaques de 96 pous a 595 nm.

### **Anàlisi computacional – *in silico***

A més de tota la part experimental de laboratori, vam voler enfocar aquesta recerca al camp de la bioinformàtica, utilitzant diferents tipus de servidors de predicció. Es va realitzar un **anàlisi *in silico*** per trobar possibles seqüències d'aminoàcids dintre de les seqüències d'aminoàcids de les dues proteïnes d'interès, candidates per sintetitzar pèptids antigènics que poguessin donar una bona resposta immunogènica.

La identificació i la predicció en l'estudi de les característiques de les proteïnes relacionades incrementen el coneixement sobre elles i porten a desenvolupar més estudis sobre vacunes i diagnòstics.

En aquest cas algunes eines bioinformàtiques validades han estat utilitzades per analitzar les característiques de les dues proteïnes en qüestió, com les propietats físico-químiques, les estructures secundàries i terciàries, la predicció de cèl·lules B i T, a banda d'altres factor importants per tal d'introduir epítops potencials en el disseny d'una vacuna altament eficient.

#### **BebiPred-2.0 Linear Epitope Predictor**

Aquest servidor prediu els **epítops de les cèl·lules B** d'una seqüència proteica, utilitzant un algoritme Random Forest entrenat en aminoàcids que formen o no part d'epítops determinats per estructures cristal·lines. Es tenen en compte sols els residus amb puntuacions superiors al llindar (el valor per defecte és 0,5), que formaran part d'un epítop i es pintaran de color groc al gràfic (veure a **Resultats**). <sup>[17]</sup>

#### **Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale**

Un mètode semi-empíric que fa ús de propietats físico-químiques dels residus dels aminoàcids i la seva freqüència d'aparició en segments d'epítops experimentalment coneguts, es va desenvolupar per predir determinants antigènics a les proteïnes. L'aplicació d'aquest mètode en un gran nombre de proteïnes ha demostrat pels autors que aquest mètode pot predir candidats antigènics amb un 75% de precisió, el qual és millor que la majoria dels mètodes coneguts. <sup>[18]</sup>

## 6. Resultats

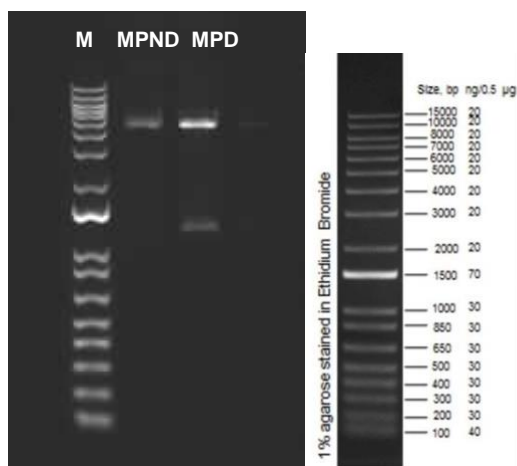
### Phist (*PVX\_093680*)

El gen *PVX\_093680*, codifica per la proteïna relacionada amb els exosomes, Pf-fam-b, que pertany a la família de les PHIST. Es localitza al cromosoma 1, amb una llargada de 4254 pb i 3 exons. Aquesta proteïna te una posició transmembrana (47-70 pb) en forma helical, composta per 710 aminoàcids, un punt isoelèctric de 6.54 i una massa de 80,73 kDa. Un fragment d'aquest gen, corresponent a 1140 pb, ha estat amplificat prèviament a partir d'ADN genòmic i clonat al vector pIVEXGST1.4d utilitzant els llocs de restricció BamHI-PstI, generant el vector final **pIVEX-GST1.4\_PVX\_093680**.

Vam començar aquest treball amb la preparació de suficient ADN plasmídic, a ser utilitzat posteriorment en la producció de proteïna mitjançant el sistema de WGE. De totes les tècniques de producció de ADN plasmídic, les que millor ens van funcionar foren: PureYield™ Plasmid Midiprep System i EndoFree® Plasmid Maxi Kit.

### PureYield™ Plasmid Midiprep System

Utilitzant el kit MidiPrep de Promega, vam aconseguir purificar l'ADN plasmídic però en una concentració molt baixa, com s'observa a la **Taula 15**.



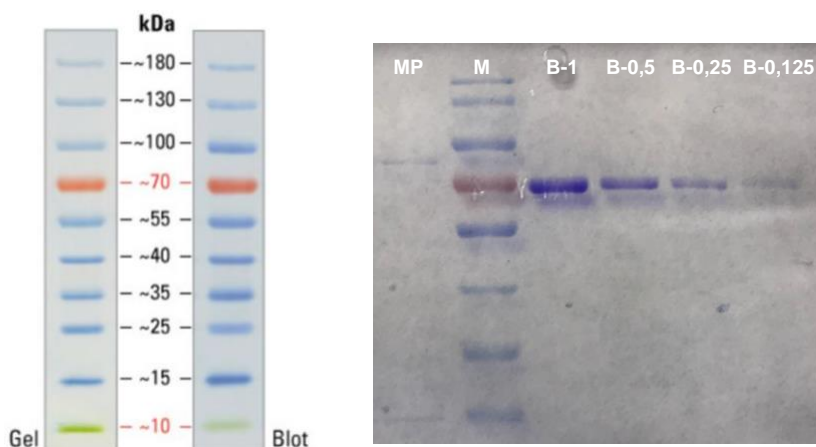
**Figura 11.** Resultats obtinguts a l'electroforesi per gel d'agarosa i a la digestió en la purificació del plasmidi pIVEX-GST1.4\_PVX\_093680 mitjançant la MidiPrep de Promega. M (marcador), MPND (mostra no digerida) i MPD (mostra digerida).

Nom de la mostra	Concentració (ng/µl)
MP – Elució 1	70,69
MP – Elució 2	33,38

**Taula 15.** Resultats obtinguts amb el Nanodrop a la purificació del plasmidi pIVEX-GST1.4\_PVX\_093680 mitjançant la MidiPrep de Promega.

Per comprovar què realment teníem les quantitats mesurades, i que els kits de Promega estaven funcionant, es va realitzar una digestió del plasmidi **pIVEX-GST1.4\_PVX\_093680**, amb els enzims de restricció BamHI i PstI, a més d'una electroforesi en gel d'agarosa. Com es pot observar en la **Figura 11**, la digestió es va produir correctament, alliberant una banda de 1140 pb, corresponent al fragment del gen *PVX\_093680*.

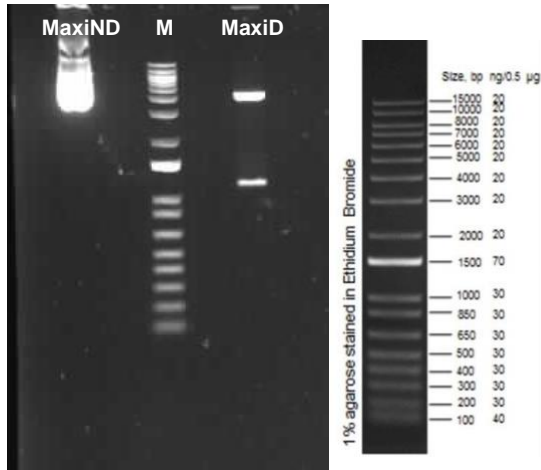
Aquest plasmidi va ser utilitzat per produir pel sistema de Wheat Germ, la proteïna amb l'alíquota obtinguda de la MidiPrep (MP), un cop comprovat amb l'electroforesi amb gel d'agarosa. Els resultats es poden veure a la **Figura 12**, en el gel del tipus SDS-PAGE i utilitzant de control el BSA en diferents concentracions ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).



**Figura 12.** Resultats obtinguts en el sistema de producció de proteïnes solubles Wheat Germ, quantificades per electroforesi en gel del tipus SDS-PAGE al 10%, utilitzant com a control diferents concentracions de BSA ( $\mu\text{g}$ ). La mida esperada de la proteïna Phist és d'aproximadament 80 kDa, que correspon a la proteïna de fusió amb GST, considerant GST a 26 kDa. MP (MidiPrep), M (marcador) i B (BSA).

### EndoFree® Plasmid Maxi Kit

Finalment, per obtenir més quantitat i amb una elevada puresa, es va decidir provar amb el EndoFree® Plasmid Maxi Kit de QIAGEN. Com s'observa a la **Taula 16**, la concentració de DNA obtingut va ser molt major que al utilitzar el kit de Promega. El DNA presentava una excel·lent qualitat com s'observa a la **Figura 13**, i després de ser digerit amb els enzims, BamHI i PstI, va alliberar la banda corresponent al insert clonat del gen *PVX\_093680*.

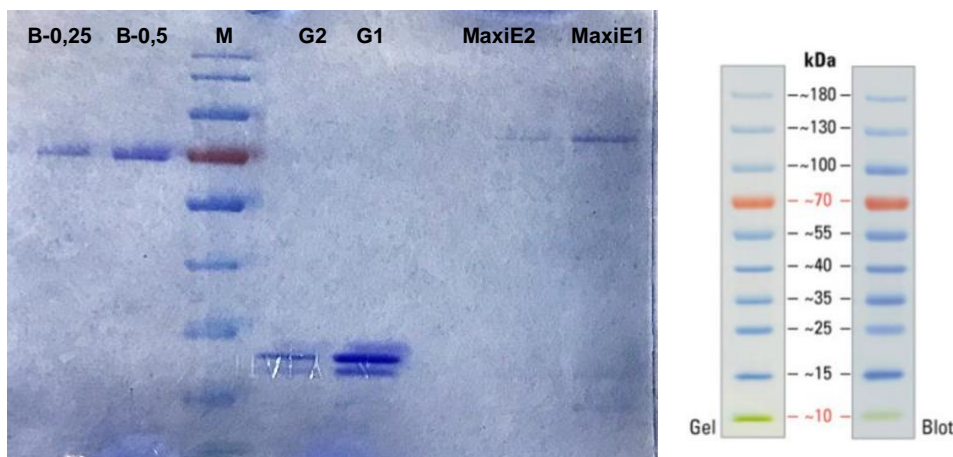


Nom de la mostra	Concentració (ng/µl)
Maxi – Elució 1	720,02
Maxi – Elució 2	82,64

**Taula 16.** Resultats obtinguts amb el Nanodrop a la purificació del plasmidi pVEX-GST1.4\_PVX\_093680 mitjançant la Maxi Endofree de QIAGEN.

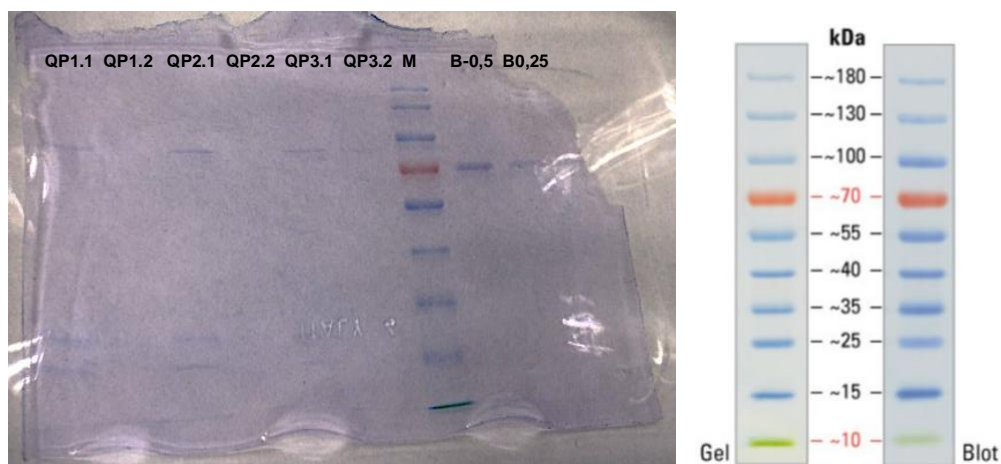
**Figura 13.** Resultats obtinguts a l'electroforesi per gel d'agarosa i a la digestió en la purificació del plasmidi pVEX-GST1.4\_PVX\_093680. MaxiND (mostra no digerida), M (marcador) i MaxiD (mostra digerida).

Un cop confirmada la concentració de l'ADN plasmídic, així com la seva qualitat mitjançant el gel d'electroforesi, vam procedir a la producció de la proteïna mitjançant el sistema de WGE. Com s'observa a la **Figura 14**, la proteïna va ser produïda amb èxit tant en l'Elució 1 (**MaxiE1**) com a l'Elució 2 (**MaxiE2**). Com a control de sistema de WGE, fem servir el plasmidi que codifica per a la GST. Per determinar la quantitat de proteïna produïda en cadascuna de les elucions, fem servir com a control diferents concentracions de BSA (µg/µl).



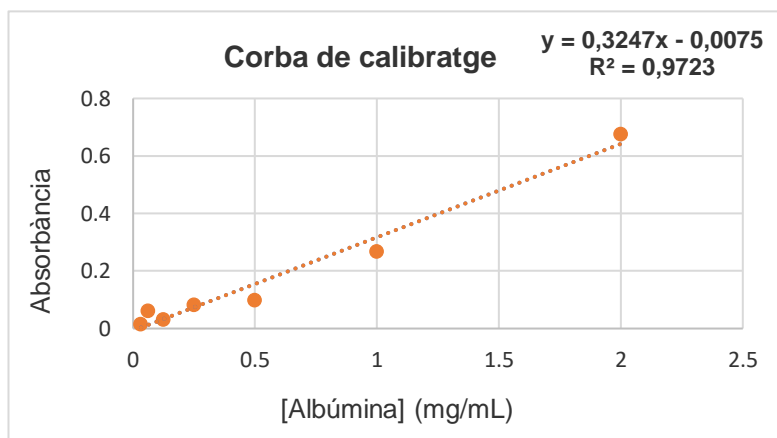
**Figura 14.** Resultats obtinguts en el sistema de producció de proteïnes solubles Wheat Germ, quantificades per electroforesi en gel del tipus SDS-PAGE al 10%, utilitzant com a control diferents concentracions de BSA (µg). La mida esperada de la proteïna Phist és d'aproximadament 80 kDa, que correspon a la proteïna de fusió amb GST, considerant GST a 26 kDa. B (BSA), M (marcador), G2 (GST – Elució 2), G1 (GST – Elució 1), MaxiE2 (mostra Maxi – Elució 2) i MaxiE1 (mostra Maxi – Elució 1).

Per comprovar si el sistema de producció proteic Wheat Germ estava funcionant correctament, es va tornar a produir la mateixa mostra anterior per triplicat.



**Figura 15.** Resultats obtinguts en el sistema de producció de proteïnes solubles Wheat Germ, quantificades per electroforesi en gel del tipus SDS-PAGE al 10%, utilitzant com a control diferents concentracions de BSA ( $\mu\text{g}$ ). La mida esperada de la proteïna Phist és d'aproximadament 80 kDa, que correspon a la proteïna de fusió amb GST, considerant GST a 26 kDa. QP1.1 (mostra 1 – Elució 1), QP1.2 (mostra 1 – Elució 2), QP2.1 (mostra 2 – Elució 1), QP2.2 (mostra 2 – Elució 2), QP3.1 (mostra 3 – Elució 1), QP3.2 (mostra 3 – Elució 2), M (marcador) i B (BSA).

En relació als resultats obtinguts, es va voler quantificar les mostres pel **mètode de Bradford**:



**Figura 16.** Corba de calibratge amb Albúmina i PBS utilitzada com a control en el mètode de Bradford.

[Albúmina] (mg/mL)	Absorbància			
	Control 1	Control 2	Mitjana C1 – C2	Mitjana Controls - Blanc
<b>Blanc (0)</b>	0,402015	0,337957	0,369986	-
<b>0,032</b>	0,384216	0,385865	0,3850405	<b>0,0150545</b>
<b>0,061</b>	0,429936	0,432926	0,431431	<b>0,061445</b>
<b>0,125</b>	0,389506	0,414082	0,401794	<b>0,031808</b>

<b>0,25</b>	0,47341	0,430894	0,452152	<b>0,082166</b>
<b>0,5</b>	0,436866	0,501762	0,469314	<b>0,099328</b>
<b>1</b>	0,626386	0,652195	0,6392905	<b>0,2693045</b>
<b>2</b>	0,869789	1,22465	1,0472195	<b>0,6772335</b>

**Taula 17.** Dades de les absorbàncies mesurades d'Albúmina i PBS com a control en el mètode de Bradford.

Es van mesurar les mostres obtingudes de la primera purificació feta amb el sistema Maxi Endofree QIAGEN (06/05) i la posterior per triplicat (11/05). A més de després fer el càlcul, per la quantitat de volum que teníem de cada mostra (125µl).

Mostra	Absorbància	[proteïna] (µg/µl)	en 125 µl
<b>GST – Elució 1</b>	0,499873	1,562590083	195,3237604
<b>GST – Elució 2</b>	0,411313	1,289846012	161,2307515
<b>QP1 – Elució 1 (06/05)</b>	0,408573	1,281407453	160,1759316
<b>QP1 – Elució 2 (06/05)</b>	0,34613	1,089097629	136,1372036
<b>QP1 – Elució 1 (11/05)</b>	0,417931	1,310227903	163,7784878
<b>QP1 – Elució 2 (11/05)</b>	0,355542	1,118084386	139,7605482
<b>QP2 - Elució 1 (11/05)</b>	0,421888	1,322414536	165,3018171
<b>QP2 – Elució 2 (11/05)</b>	0,322611	1,016664613	127,0830767
<b>QP3 – Elució 1 (11/05)</b>	0,400486	1,256501386	157,0626732
<b>QP3 – Elució 2 (11/05)</b>	0,33888	1,066769326	133,3461657

**Taula 18.** Dades obtingudes de les absorbàncies mesurades amb el mètode de Bradford i la conseqüent concentració de proteïna calculada a partir de la corba de calibratge.

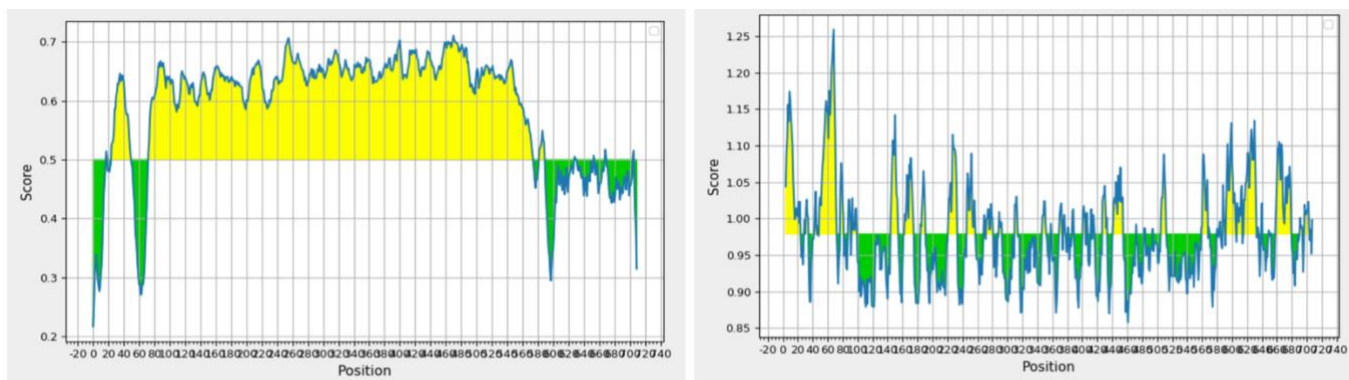
Com es pot observar, les concentracions obtingudes al mètode de Bradford (**Taula 18**) no corresponen amb els valors de les electroforesis amb gel SDS-PAGE (**Figura 14 i 15**), ja que en el primer cas s'indiquen valors de al voltant d'1 µg/µl i en el cas dels gels, no arriba a 0,020 µg/µl. A més, la concentració obtinguda en les elucions 2 no es correspon amb les observades al gel, on pràcticament no són perceptibles després de la tinció. Per tant, les concentracions en el mètode de Bradford estan sobrevalorades possiblement per la interacció del tampó d'elució amb el reactiu de Bradford.

Degut a la baixa concentració de proteïna obtinguda del sistema WGE, insuficient pels assajos d'immunització en ratolins BALB/c, vam procedir a realitzar anàlisis computacionals per predir els epítops immunogènics, i el conseqüent disseny de pèptids sintètics.

Finalment, passant ja a la part **bioinformàtica**, aquests són els resultats obtinguts per a cadascun dels servidors de predicció utilitzats:

### Bebipred Linear Epitope Prediction 2.0 i Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity

Com podem veure als gràfics, les regions proteiques marcades en color groc ens indiquen una propensió elevada de presentar antigenicitat i tenir epítops, respectivament. En canvi, les regions en color verd, mostren una propensió molt baixa.



**Figura 17.** Resultat de Phist (PVX\_093680) amb el servidor Bebipred Linear Epitope Prediction 2.0 (esquerra) i Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity (dreta). L'eix vertical correspon al valor establert pel programa i l'eix horitzontal a la posició dels aminoàcids dins de la seqüència.

En base a les dades obtingudes, es va realitzar un estudi de quines serien les regions antigèniques més propenses a utilitzar-se com a pèptids antigènics de la proteïna Phist. Es van seleccionar les regions de la seqüència d'aminoàcids amb un score superior a 0.5 per al servidor Bebipred i 1.0 per a K&T. A més d'escollir sols les seqüències amb una llargària superior a 5 aminoàcids.

	Bebipred Linear Epitope Prediction 2.0	Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity
Peptid	Antigen Score	Epítop Score
<b>SLEVS (76-80)</b>	0.604	1.040
<b>HNVHPIPAY (144-152)</b>	0.624	1.073
<b>VIRODQOAOVKP (162-173)</b>	0.645	1.034
<b>SVTPS (185-189)</b>	0.628	1.034
<b>IRPAGKHVVKP (221-231)</b>	0.600	1.063
<b>KPNVPSEH (245-252)</b>	0.660	1.043
<b>PFNVP (426-430)</b>	0.650	1.030
<b>FHSATPHRSVDDV (441-453)</b>	0.652	1.031
<b>RPPVPGP (504-510)</b>	0.643	1.042
<b>FGCTRA (561-566)</b>	0.570	1.049

**Taula 19.** Possibles pèptids candidats a sintetitzar-se. Entre parèntesi s'informa de les posicions que ocupen dins de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna.

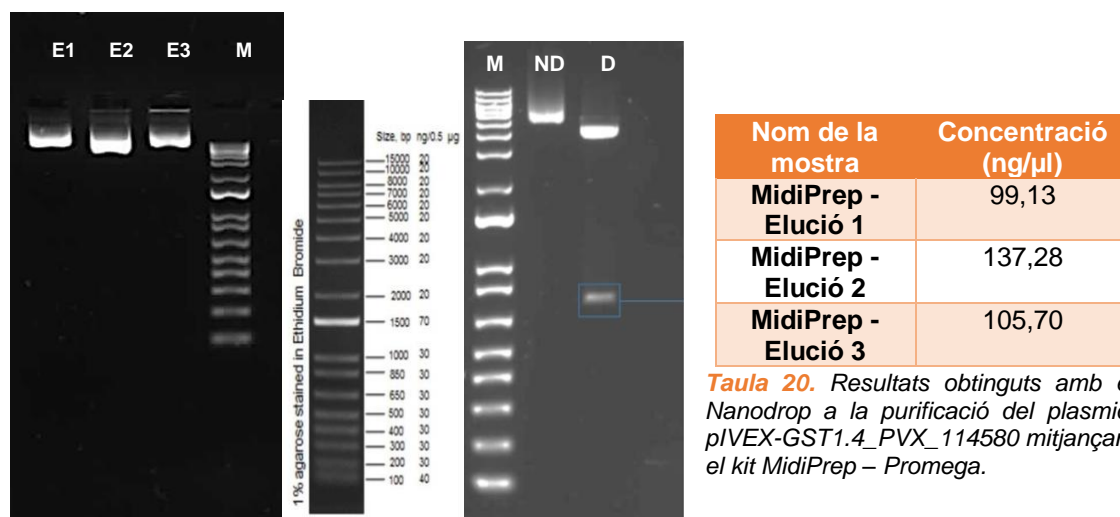
## Hypol (PVX\_114580)

El gen *PVX\_114580* codifica per la proteïna hipotètica conservada i relacionada amb la melsa, Hypol. Es localitza al cromosoma 11, el qual conté 2 exons i te una llargada de 2128 pb. Aquesta proteïna te una funció molecular i d'unió pels àcids nucleics, te una llargada de 243 aminoàcids, un punt isoelèctric de 9.73 i un pes molecular de 28,5 kDa. El fragment corresponent a la seqüència codificant de 732 pb, havia estat prèviament amplificat a partir del cDNA i clonat al vector pIVEX-GST1.4d utilitzant els llocs de restricció NotI i PstI, generant així el vector final **pIVEX-GST1.4\_PVX\_114580**.

Al igual que amb el gen anterior, es va començar amb la preparació de suficient ADN plasmídic a ser utilitzat posteriorment a la producció de proteïna mitjançant el sistema WGE. De totes les tècniques de producció d'ADN plasmídic, les que millor van funcionar en aquest cas també van ser: PureYield™ Plasmid Midiprep System i EndoFree® Plasmid Maxi Kit.

## PureYield™ Plasmid Midiprep System

Utilitzant el kit MidiPrep de Promega, vam aconseguir purificar l'ADN plasmídic amb unes concentracions significants com s'observa a la **Taula 20**:



**Figura 18.** Resultats obtinguts a l'electroforesi per gel d'agarosa i a la digestió en la purificació del plasmidi pIVEX-GST1.4\_PVX\_114580 mitjançant el kit MidiPrep – Promega. E1 (Elució 1), E2 (Elució 2), E3 (Elució 3), ND (no digerit), D (digerit), M (marcador).

**Taula 20.** Resultats obtinguts amb el Nanodrop a la purificació del plasmidi pIVEX-GST1.4\_PVX\_114580 mitjançant el kit MidiPrep – Promega.

Per comprovar que realment teníem les quantitats mesurades, i que els kits de Promega estaven funcionant, es va realitzar una digestió del plasmidi **pIVEX-GST1.4\_PVX\_114580**, amb els enzims de restricció NotI i PstI, a més d'una electroforesi en gel

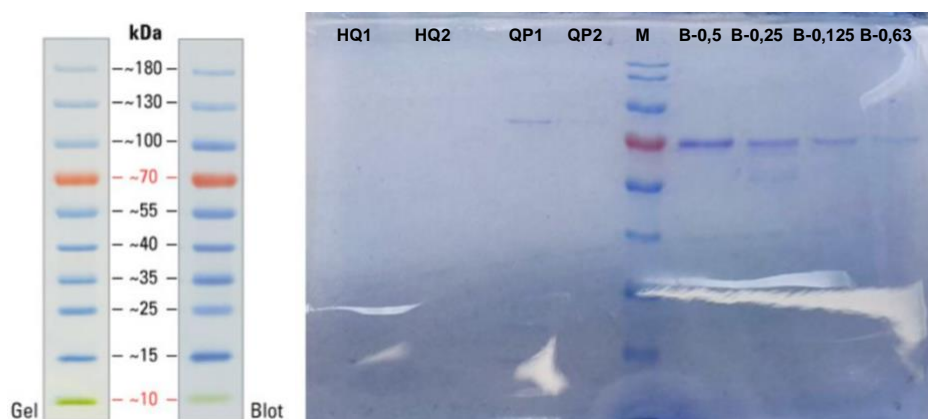
d'agarosa. Com es pot observar en la **Figura 18**, la digestió es va produir correctament, alliberant una banda de 732 pb, corresponent al fragment del gen *PVX\_114580*.

Al igual que amb *PVX\_093680*, es va utilitzar el kit Maxi Endofree de QIAGEN per obtenir més quantitat de plàsmid i lo més pur possible.

Nom de la mostra	Concentració (ng/μl)
Maxi - Elució 1	220
Maxi - Elució 2	84

**Taula 21.** Resultats obtinguts amb el Nanodrop a la purificació del plasmidi pVEX-GST1.4\_PVX\_114580 mitjançant el kit Maxi Endofree – QIAGEN.

Un cop confirmada la concentració de l'ADN plasmídic, principalment amb l'**Elució 1** del kit Maxi Endofree de QIAGEN (220 ng/ μl), vam procedir a la producció de la proteïna mitjançant el sistema de WGE. Com s'observa a la **Figura 19**, la proteïna no va ser produïda amb èxit tant en l'Elució 1 (**HQ1**) com a l'Elució 2 (**HQ2**). Com a control de sistema de WGE, vam fem servir una alíquota de la Phist. Per determinar la quantitat de proteïna produïda en cadascuna de les elucions, fem servir com a control diferents concentracions de BSA (μg/μl).

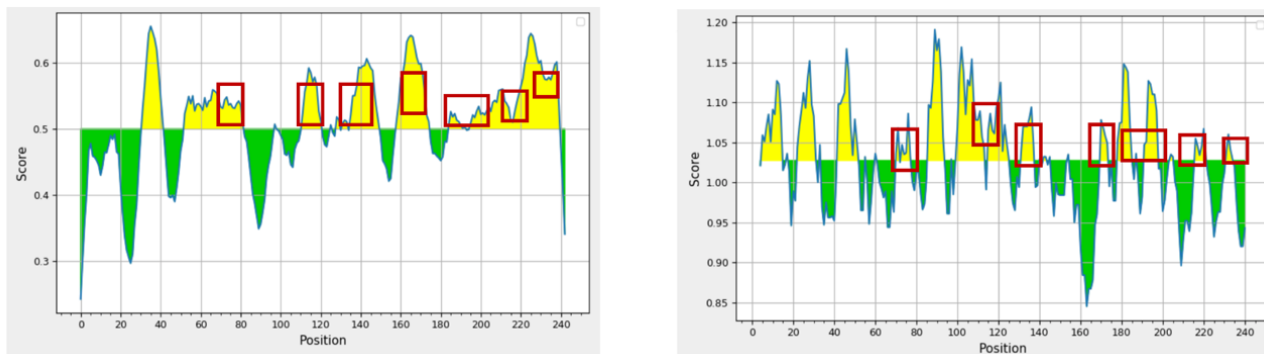


**Figura 19.** Resultats obtinguts en el sistema de producció de proteïnes solubles *Wheat Germ*, quantificades per electroforesi en gel del tipus SDS-PAGE 10%, utilitzant com a control diferents concentracions de BSA (μg). La mida esperada de les proteïnes és: Phist (80 kDa), Hyp1 (54 kDa), que corresponen a les proteïnes de fusió amb GST, considerant GST a 26 kDa. HQ1 (mostra Hypol – Elució 1), HQ2 (mostra Hypol – Elució 2), QP1 (mostra Phist – Elució 1), QP2 (mostra Phist – Elució 2), M (marcador) i B (BSA).

Degut a la dificultat de produir la proteïna Hypol mitjançant el sistema de WGE, al igual que amb la proteïna Phist, vam optar per realitzar un anàlisi computacional per determinar els epítops més immunogènics i poder sintetitzar pèptids sintètics per a futurs assajos d'immunització a ratolins BALB/c.

Finalment, passant ja a la part **bioinformàtica**, aquests són els resultats obtinguts per a cadascun dels servidors de predicció utilitzats:

### Bebipred Linear Epitope Prediction 2.0 i Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity



**Figura 20.** Resultat d'HypoI (PVX\_114580) amb el servidor *Bebipred Linear Epitope Prediction 2.0* (esquerra) i *Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity* (dreta). L'eix vertical correspon al valor establert pel programa i l'eix horitzontal a la posició dels aminoàcids dins de la seqüència.

En base a les dades obtingudes, es va realitzar un estudi de quines serien les regions antigèniques més propenses a utilitzar-se com a pèptids antigènics de la proteïna HypoI (marcats en els requadres vermells). Es van seleccionar les regions de la seqüència d'aminoàcids amb un score superior a 0.5 per al servidor *Bebipred* i 1.0 per a *K&T*. A més d'escollir sols les seqüències amb una llargària superior a 5 aminoàcids.

#### Bebipred Linear Epitope Predicition 2.0 Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity

Pèptid	Antigen Score	Epitop Score
SFTVIEKKHLSK (69-80)	0.537	1.032
DYFKSSVQSP (111-120)	0.558	1.069
KKFAYIYIKKYENYYDL (128-144)	0.549	1.037
KLGLVDE (168-174)	0.568	1.040
ADKPEFINSVFPANDRFSYLK (184-205)	0.517	1.034
ENFYLFQK (214-221)	0.539	1.038
SELLAK (229-234)	0.585	1.033

**Taula 22.** Possibles pèptids candidats a sintetitzar-se. Entre parèntesi s'informa de les posicions que ocupen dins de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna.

## 7. Discussió i conclusions

Com hem pogut veure, hi ha una necessitat creixent de trobar una cura per eradicar la malària. En el cas de *P. vivax*, la situació és més preocupant ja que les dades epidemiològiques no experimenten millores, inclús en països on l'èxit en el decreixement de la malaltia ha començat a ser evident, i que malauradament és l'espècie que menys importància capta de totes elles. A més d'afegir les característiques que fan de l'espècie més difícil d'estudiar i d'eradicar, on la majoria d'estratègies de control i tractaments utilitzats per *Plasmodium falciparum*, no són extrapolables per a *vivax*.

Fent un balanç general de tots els kits utilitzats per tal de purificar els plasmidis, l'EndoFree® Plasmid Maxi Kit de QIAGEN és el que ens ha donat uns millors resultats en quan a concentració d'ADN, en els dos plasmidis escollits. Cal dir, que al ser l'únic kit emprat amb filtres especials que eliminen quasi per complert els contaminants (endotoxines), era d'esperar.

Pel que fa ja a la producció i purificació de les proteïnes recombinants, com s'ha vist en estudis anteriors, les proteïnes expressades amb *E. coli*, tendeixen a degradar-se i mostrar baixos nivells de proteïnes intactes. Pel contrari, les proteïnes solubles expressades amb el sistema lliure de cèl·lules Wheat Germ acostumen a ser de les mides predites i presenten molt menys nivells de degradació.<sup>[14]</sup> L'evidència s'ha incrementat pel que fa aquest sistema en el sentit de que també reté l'activitat enzimàtica de la proteïna.<sup>[16]</sup> Anteriorment, el sistema Wheat Germ ja s'ha utilitzat per la producció d'antígens en *P. vivax*, on 89 proteïnes solubles diferents van ser expressades, a més d'haver-se aconseguit la síntesi de vacunes basades en aquesta plataforma que indueixen respostes immunes funcionals.<sup>[9]</sup>

En el nostre cas, el sistema ha funcionat a l'hora de produir la proteïna Phist, tot i no haver obtingut concentracions gaire elevades. Pel que fa a la Hypol, no s'ha aconseguit produir en cap dels casos, inclusivament l'EndoFree® Plasmid Maxi Kit de QIAGEN per a la purificació de l'ADN plasmídic. Aquest problema s'havia observat per altres companys del grup d'investigació que ho havien intentat sense obtenir bons resultats de producció. Per tant, creiem que, aquest fet està relacionat amb la conformació i l'estabilitat de la proteïna, i no amb la font d'ADN utilitzada per a la producció de la mateixa amb el sistema WGE.

Seguidament, en la quantificació pel mètode de Bradford de Phist, no s'han obtingut les concentracions esperades en relació a les de l'electroforesi amb gel SDS-PAGE. Creiem que aquesta incongruència podria ser deguda a que es va utilitzar com a blanc PBS en comptes del mateix reactiu que s'havia utilitzat per eluir la mostra original.

En base a uns dels objectius principals del treball, com era el d'obtenir suficients quantitats de proteïna, cal dir que no s'ha aconseguit. El qual es planteja com una oportunitat de qüestionar el mètode utilitzat i intentar-lo millorar en estudis posteriors.

Per últim, afegir que l'anàlisi *in silico* realitzat per a la producció de pèptids sintètics, és una alternativa a tenir en compte. Cada cop aquest tipus de metodologies basades en prediccions per mitjà d'algoritmes bioinformàtics es tenen més en compte en l'àmbit de la investigació; a més, sintetitzar de manera artificial proteïnes ja és una realitat bastant assequible. <sup>[19]</sup>

En aquest treball s'ha intentat reproduir els passos necessaris des de que es selecciona un gen candidat (*PVX\_093680* i *PVX\_114580*) fins a la producció de proteïnes antigèniques recombinants (Phist i Hypol) que en un futur seran immunitzades en ratolins experimentals per a la creació d'anticossos policlonals.

D'aquesta manera, també es podran arribar a localitzar en línies transgèniques de *P. falciparum*, que siguin capaces d'expressar-les, i més endavant en reticulòcits infectats per *P. vivax*.

Finalment, penso que aquesta metodologia pot ser una estratègia molt útil per seguir estudiant les característiques i la funcionalitat de les proteïnes relacionades amb *P. vivax* que encara es desconeixen i a la llarga pot ser d'utilitat per al disseny i generació de vacunes, entre d'altres usos.

## 8. Autoavaluació

Començar dient que degut a la situació extraordinària que estem vivint en relació a la pandèmia del COVID-19, mai m'hagués imaginat poder arribar a fer les pràctiques externes i el treball final de grau, de forma presencial, en un grup com PVREX – ISGlobal, en el que he estat durant aquests mesos.

Sincerament, quan estava en la cerca de trobar algun lloc on realitzar les pràctiques, tampoc tenia una prioritat clara. A la llarga, això va fer que em decantés pel camp de la recerca biomèdica en malalties infeccioses, i en especial per la malària.

Aquest fet em porta al primer punt d'autoavaluació, on crec que l'afany i la curiositat per aprendre sobre una malaltia de la qual no tenia experiència prèvia ha estat tot un repte de superació a l'hora d'aprendre tots els aspectes involucrats des dels seus fonaments.

Respecte a la feina dins del laboratori, com bé he dit, és una sort haver tingut el privilegi de treballar de primera mà en un grup d'investigació realitzant el meu propi projecte. L'haver-me rodejat de persones amb tanta vocació, m'ha aportat grans fonts d'aprenentatge i suport des del primer moment de la meva estància.

Crec que aquest és el moment de la carrera on correlaciones la majoria de les competències adquirides amb la seva aplicació al món real. En aquest cas, he pogut aprendre de primera mà alguns dels procediments i metodologies més comuns a l'hora de produir proteïnes recombinants, des del disseny dels vectors amb l'insert d'interès fins a la producció, purificació i quantificació de les respectives proteïnes; a més d'agafar alguns fonaments de bioinformàtica en la predicció i disseny de pèptids sintètics. Penso que són vessants bastants útils en l'aplicació dins del camp de la biotecnologia i m'han sorprès positivament.

No és cap descobriment que, el dia a dia de la investigació, no sempre és un camí fàcil i directe, sinó que es vasa en l'assaig i l'error (molts per a ser el cas), la qual cosa pot semblar molt frustrant quan no aconseguixes els resultats esperats, però a la llarga t'aporta formació i pensament crític per buscar-hi noves alternatives.

Per acabar, com a valoració general penso que la realització d'aquest treball ha estat una vivència molt enriquidora i la tornaria a repetir sense cap dubte.

## 9. Bibliografia

1. Qui som? - Institut de Salut Global de Barcelona [Internet]. Barcelona; 2018 [actualització 2018, consultat març 2021]. Disponible a: <https://www.isglobal.org/quienes-somos>
2. Sobre l'IGTP – Institut d'Investigació en Ciències de Salut Germans Tries i Pujol [Internet] [consultat març 2021]. Disponible a: <http://www.germanstrias.org/about-us/ca-index>
3. *Plasmodium vivax* i exosomes (PVREX) – Malalties Infeccioses (IGTP) [Internet] [consultat març 2021]. Disponible a: <http://www.germanstrias.org/research/malalties-infeccioses/7/plasmodium-vivax-i-exosomes-pvrex>
4. Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *Lancet* (London, England), 391(10130), 1608–1621.
5. Price, R. N., Commons, R. J., Battle, K. E., Thriemer, K., & Mendis, K. (2020). *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. *Trends in parasitology*, 36(6), 560–570.
6. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Dayananda, K. K., Achur, R. N., & Gowda D. C. (2018). Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis*. 55, 1-8.
8. Popovici, J., & Ménard, D. (2015). Challenges in Antimalarial Drug Treatment for *Vivax* Malaria Control. *Trends in molecular medicine*, 21(12), 776–788.
9. Tham, W. H., Beeson, J. G., & Rayner, J. C. (2017). *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. *International journal for parasitology*, 47(2-3), 111–118.
10. Twohig, K. A., Pfeffer, D. A., Baird, J. K., Price, R. N., Zimmerman, P. A., Hay, S. I., Gething, P. W., Battle, K. E., & Howes, R. E. (2019). Growing evidence of

*Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa. PLoS neglected tropical diseases, 13(1), e0007140.

11. Reyes-Sandoval, A., & Bachmann, M. F. (2013). *Plasmodium vivax* malaria vaccines: why are we where we are? Human vaccines & immunotherapeutics, 9(12), 2558–2565.
12. Fernandez-Becerra, C., Bernabeu, M., Castellanos, A., Correa, B. R., Obadia, T., Ramirez, M., Rui, E., Hentzschel, F., López-Montañés, M., Ayllon-Hermida, A., Martin-Jaular, L., Elizalde-Torrent, A., Siba, P., Vêncio, R. Z., Arevalo-Herrera, M., Herrera, S., Alonso, P. L., Mueller, I., & Del Portillo, H. A. (2020). *Plasmodium vivax* spleen-dependent genes encode antigens associated with cytoadhesion and clinical protection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(23), 13056–13065.
13. Toda, H., Diaz-Varela, M., Segui-Barber, J., Roobsoong, W., Baro, B., Garcia-Silva, S., Galiano, A., Gualdrón-López, M., Almeida, A., Brito, M., de Melo, G. C., Aparici-Herraiz, I., Castro-Cavadía, C., Monteiro, W. M., Borràs, E., Sabidó, E., Almeida, I. C., Chojnacki, J., Martinez-Picado, J., Calvo, M., ... Del Portillo, H. A. (2020). Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-κB facilitating parasite cytoadherence. *Nature communications*, 11(1), 2761.
14. Rui, E., Fernandez-Becerra, C., Takeo, S., Sanz, S., Lacerda, M. V., Tsuboi, T., & del Portillo, H. A. (2011). *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. *Malaria journal*, 10, 192.
15. Medrano Muñoz, A. (2003). *Expresión recombinante en E. coli de antígenos de Actinobacillus pleuropneumoniae para vacunación y diagnóstico*. [Tesi de doctorat, Universitat Autònoma de Barcelona]. Repositori Institucional – Universitat Autònoma de Barcelona.
16. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 2005 Jun;23(6):316-20.

17. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(W1):W24-W29.
18. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4.
19. Chandrudu, Saranya & Skwarczynski, Mariusz & Pattinson, David & Apte, Simon & Doolan, Denise & Toth, Istvan. (2016). Synthesis and immunological evaluation of peptide-based vaccine candidates against malaria. *Biochemical Compounds.* 4.1.