

Trabajo de Fin de Grado

La proteína recombinante
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
reductoisomerasa apicoplastídica de
Plasmodium falciparum y su interacción
con aptámeros

Sara Manresa Guille

Grado en Biotecnología

Tutores: Xavi Fernàndez Busquets y Carlota Roca Martínez

Avalador: Jordi Viver Fabregó

Vic, Setiembre 2020

Agradecimientos

Ante todo, quiero agradecer a mi tutor Xavi Fernàndez Busquets, la oportunidad de haber podido realizar mi trabajo fin de grado en su grupo de Nanomalaria, estoy más que agradecida. Desde mi primer día, fui aceptada e integrada por todo el grupo como una más; me sentí como en casa, mi segunda casa durante todo este tiempo. También agradecerle a Carlota Roca Martínez el haberme dado la oportunidad de entrar en el grupo, gracias a su decisión por ser mi tutora y supervisora durante todo mi trabajo de fin de grado. También agradezco todos los conceptos que he aprendido con ellos, gracias también por su gran empatía, amabilidad, paciencia, comprensión, simpatía, y por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos, gracias de verdad por haberme querido enseñar, ha sido muy importante para mí, me siento muy agradecida.

Quiero dar las gracias también a mi familia, amigos, y a todo el grupo de Nanomalaria, por su comprensión y apoyo en mí, ya que, en el transcurso de este trabajo, he pasado por diversas emociones. Debido a la pandemia del coronavirus, las cosas se complicaron y pasamos a teletrabajar todo el grupo. Al mismo tiempo, tuve un aumento extraordinario de horas en mi trabajo como técnica de laboratorio de análisis clínico. También, perdí a un ser querido de mi familia, mi abuelo, a quien dedico también este trabajo.

Agradezco también a Xavi Fernàndez Busquets y a la Uvic-UCC, su ayuda por darme la oportunidad de reemprender mis prácticas experimentales del trabajo fin de grado, una vez terminado el estado de alarma, para así, poder terminar mi trabajo experimental. También quiero dar las gracias a mi tutor de la Uvic, Jordi Viver, por haber seguido como mi tutor y haberme ayudado, aún después del estado de alarma.

Finalmente agradecer a todas las personas que me han animado, ayudado, y motivado en el transcurso de toda mi carrera, en especial a Albert Coloma, Carolina Perez, Maria Carme Barrera, Anna Vilajeliu y Cristina Xaubet. También a mi familia, especialmente a mi madre Isabelle, mi hermana Laia, mi mamie Evelyne, mi media hermana Sara, y a mi padre Jordi y su pareja Conchi Luque.

Gracias a todos vosotros y a todo mi esfuerzo, ya veo la luz al final del túnel; ya veo el final de este largo camino; ya veo el fruto de todo mi esfuerzo invertido. Gracias.

Resumen

Título: *La proteína recombinante 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa apicoplastídica de Plasmodium falciparum y su interacción con aptámeros*

Palabras clave: *apicoplasto, vía del metileritritol fosfato (MEP), 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR), aptámero*

Autora: Sara Manresa Guille

Tutores: Xavi Fernàndez Busquets, Carlota Roca Martínez, y Jordi Viver Fabregó.

Fecha: Setiembre 2020

La especie humana se ve gravemente afectada por la enfermedad de la malaria, que es una infección parasitaria causada por cinco especies distintas de *Plasmodium*, de las cuales, *Plasmodium falciparum*, causa la enfermedad más grave y mortal, siendo la mayor representante de los casos en la región de África (99.7%), la región de Asia Sudoriental (50%), la región del Mediterráneo Oriental (71%), y la región del Pacífico Occidental (65%). La Organización Mundial de la Salud estimó que en 2018 murieron aproximadamente 405.000 personas por malaria en todo el mundo.

Por ahora, todas las intervenciones, insecticidas, vacunas, y fármacos desarrollados para prevenir, controlar, y eliminar la malaria causada por *Plasmodium falciparum*, han sido abatidos por la rápida y eficiente resistencia que *P. falciparum* desarrolla para alcanzar su supervivencia. Actualmente, *P. falciparum* ha mostrado resistencia frente a tratamientos actuales tales como las terapias combinadas basadas en artemisinina y fosmidomicina. Por ello, se necesitan con urgencia, nuevas terapias innovadoras dirigidas a bloquear o inhibir las funciones para la supervivencia del parásito.

Una de las vías indispensables del parásito, es la vía del metileritritol fosfato (MEP) ubicada en el apicoplasto. Es la única vía del parásito para proporcionar las principales unidades de isopreno necesarias como precursor metabólico para diversas actividades vitales de *Plasmodium*. Esta vía no está presente en los humanos, por tanto, es única del parásito. Los precursores requeridos para la biosíntesis de isoprenoides son el isopentenilpirofosfato (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Que son producidas por *Plasmodium falciparum* en la vía del MEP, iniciada con piruvato y D-gliceraldehid 3-fosfato (G3P). Esta vía del MEP y sus componentes, son considerados un gran objetivo potencial para el diseño de nuevos tratamientos antipalúdicos.

La proteína DXR, la segunda enzima de la vía MEP, juega un papel importante en la síntesis de los componentes básicos de los isoprenoides, por este motivo, la enzima DXR se ha convertido en un objetivo de interés especial y prometedor para la malaria, también por su esencialidad y su ausencia en la especie humana.

Los aptámeros son un potente tratamiento innovador que puede combatir la malaria. Son una cadena corta de oligonucleótidos diseñados para inhibir proteínas de interés.

Abstract

Title: *Recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase apicoplast protein from Plasmodium falciparum and its interaction with aptamers*

Keywords: *apicoplast, methylerythritol pathway (MEP), 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), aptamer*

Author: Sara Manresa Guille

Tutors: Xavi Fernàndez Busquets, Carlota Roca Martínez, and Jordi Viver Fabregó.

Date: September 2020

The human species is severely affected by the malaria disease, which is a parasitic infection caused by five different species of *Plasmodium*, of which *Plasmodium falciparum* causes the most serious and deadly disease, being the largest representative of cases in the Africa region (99.7%), the South-East Asia region (50%), the Eastern Mediterranean region (71%), and the Western Pacific region (65%). The World Health Organization estimated that in 2018 approximately 405.000 people died from malaria worldwide.

For now, all interventions, insecticides, vaccines, and drugs developed to prevent, control, and eliminate malaria caused by *Plasmodium falciparum*, have been killed by the rapid and efficient resistance that *P. falciparum* develops to achieve its survival. Currently, *P. falciparum* has shown resistance to current treatments such as artemisinin and fosmidomycin based combination therapies. Therefore, new innovative therapies are urgently needed to block or inhibit the survival functions of the parasite.

One of the essential pathways of the parasite is the methylerythritol phosphate (MEP) pathway located in the apicoplast. It is the only pathway for the parasite to provide the major isoprene units required as a metabolic precursor for various vital activities of *Plasmodium*. This pathway is not present in humans; therefore, so it is unique to the parasite. The precursors required for isoprenoid biosynthesis are isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Which are produced by *Plasmodium falciparum* in the MEP pathway, initiated with pyruvate and D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P). This MEP pathway and its components are considered a great potential target for the design of new antimalarial treatments.

The DXR protein, the second enzyme of the MEP pathway, plays an important role in the synthesis of the basic components of isoprenoids, for this reason, the DXR enzyme has become a target of special interest and promising for malaria, as well for its essentiality and its absence in the human species.

Aptamers are a powerful innovative treatment that can fight malaria. They are a short chain of oligonucleotides designed to inhibit proteins of interest.

Listado de abreviaturas

En la redacción de este trabajo, el significado de las abreviaturas expuestas, son de expresión y origen inglés.

ATP: Adenosine Triphosphate

BCA: Bicinchoninic acid assay

BSA: Bovine Serum Albumin

DNA: Deoxyribonucleic acid

DMAPP: Dimethylallyl Pyrophosphate

DOXP: 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate

DXR: 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase

DXS: Deoxy-xylulose 5-phosphate synthase

G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate

GST: Glutathione S-transferase

HIS: Histidine

HRP: Horseradish peroxidase

IBEC: Institute for Bioengineering of Catalonia

IMAC: Immobilized metal affinity chromatography

IPP: Isopentenyl Pyrophosphate

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ITC: Isothermal Titration Calorimetry

LB: Luria Bertani

MCS: Multiple cloning site

MEP: Methylerythritol phosphate

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form

PBS: Phosphate Buffered Saline

RNA: Ribonucleic acid

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Malaria	1
1.1.2 El vector de la malaria, los mosquitos <i>Anopheles</i>	1
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.2.1 Evolución de <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.2.2 <i>P. falciparum</i> : ciclo de vida.....	3
1.2.3 Diagnóstico y síntomas de la malaria producida por <i>P. falciparum</i>	6
1.2.4 Tratamientos contra <i>P. falciparum</i>	6
1.2.4.1 Aptámeros.....	7
1.3 La ruta metabólica del metil eritritol fosfato	9
1.3.1 La proteína DXR de <i>P. falciparum</i>	10
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1 Expresión de la proteína DXR	11
3.1.1 Transformación	13
3.1.2 Ensayo de inducción.....	14
3.1.3 Obtención del extracto insoluble de DXR	14
3.2 Extracción de la proteína DXR a partir de la fracción insoluble	15
3.3 Diálisis.....	16
3.4 Purificación DXR mediante cromatografía IMAC	18
3.5 Electroforesis SDS – PAGE	21
3.6 NanoDrop	21
3.7 Desalación y concentración.....	21
3.8 Cuantificación proteica	22
3.9 Western Blot	22
3.10 Calorimetría (ITC)	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Análisis de la expresión de proteína DXR de <i>P. falciparum</i> en la extracción de la fracción insoluble	25
4.2 Análisis de la pureza de la proteína DXR <i>P. falciparum</i>	26
4.2.1 Primera purificación	26
4.2.2 Segunda purificación.....	28
4.3 Análisis de la diálisis	30
4.4 Análisis del proceso de obtención de DXR <i>P. falciparum</i>	31
4.5 Cuantificación proteica mediante BCA.....	32

4.6 Western Blot	33
4.7 Calorimetría.....	33
5. DISCUSIÓN.....	36
6. VISIÓN PERSONAL Y FUTURA	38
7. CONCLUSIONES	38
8. REFERENCIAS.....	39
9. ANEXO PROTOCOLOS.....	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Malaria

La malaria o paludismo es una importante enfermedad parasitaria a escala mundial, vinculada a la pobreza, que mayoritariamente afecta de manera específica en zonas tropicales y subtropicales, siendo éstas geográficamente zonas de intenso riesgo debido a su pobreza ¹. La malaria es la responsable de más de 200 millones de nuevos casos anualmente, de los cuales aproximadamente 400.000 personas mueren a causa de la malaria ².

La enfermedad está causada por parásitos unicelulares pertenecientes al phylum Apicomplexa, del reino protista y género *Plasmodium*. Este género comprende cinco especies que causan malaria en humanos: *P. falciparum* y *P. vivax* causan el 95% de las infecciones, siendo *P. falciparum* la especie que causa un mayor número de muertes, mientras que *P. malariae* y *P. ovale* son menos comunes, ya que están geográficamente confinadas. El quinto parásito, *P. knowlesi*, habitualmente infecta grandes simios en ciertas áreas de bosques de Asia Sudoriental, aunque se haya confirmado en varios casos humanos ³.

Plasmodium presenta una serie de características que se corresponden con la presencia de un conjunto de microtúbulos especializados en el extremo apical de la célula, un orgánulo denominado apicoplasto ⁴. La amplia variedad de morfologías y ciclos complejos dentro de este grupo de protistas son consistentes con su capacidad de infectar a muchos tipos de animales desde moluscos hasta mamíferos. Entre las razones que obstaculizan la caracterización de algunas de las vías bioquímicas específicas en estos organismos, está la transición a un estilo de vida parasitario obligado, incluyendo la pérdida masiva de genes implicados en varios procesos metabólicos y la capacidad de obtener precursores a partir de los metabolitos de sus huéspedes ⁵.

1.1.2 El vector de la malaria, los mosquitos *Anopheles*

La malaria se transmite a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*.

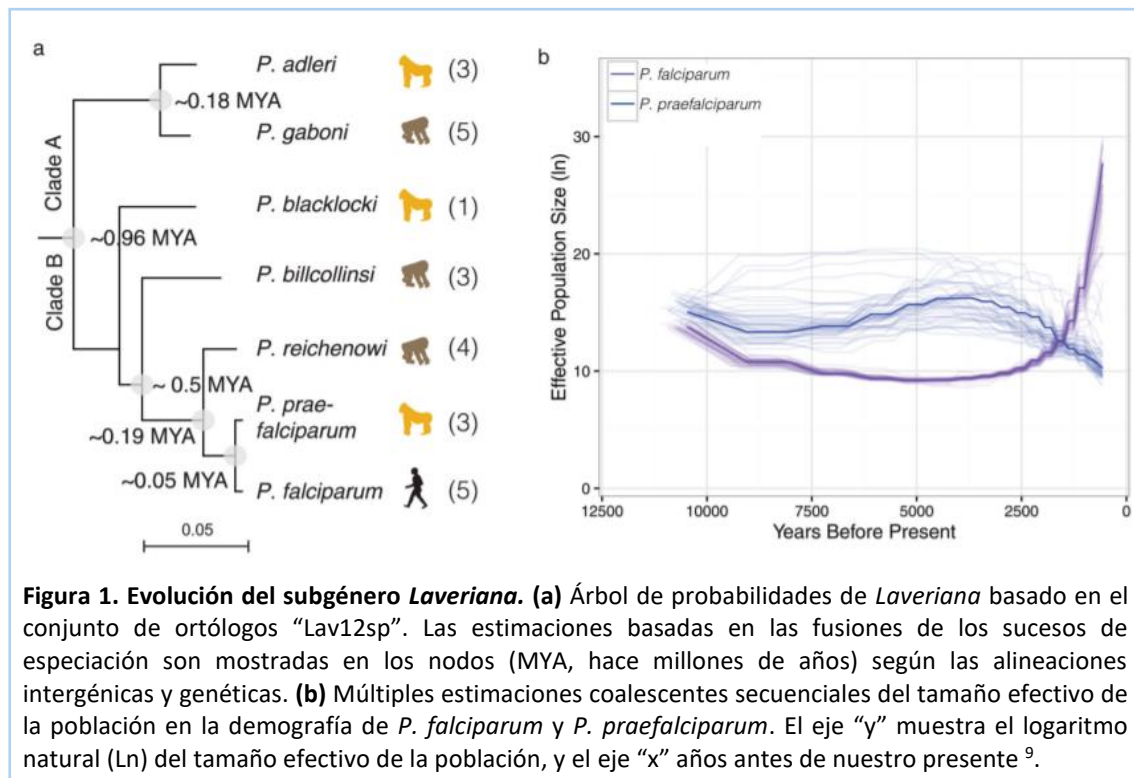
Pero no todos los mosquitos son capaces de transmitir el parásito de la malaria; de todas las especies de mosquito solo un grupo del género *Anopheles* puede servir como vector del parásito, y solo las hembras de esta especie pican y se alimentan de sangre debido a su alto contenido nutritivo, necesario para la producción y desarrollo de sus huevos (ovogénesis). Los machos en cambio se alimentan de néctar y otras fuentes de azúcar. En la actuación como vector para la malaria, el mosquito *Anopheles* depende de un ambiente idóneo para la adecuada evolución del parásito, así como también de los hábitos humanos que promueven el contacto huésped-vector ⁶.

De las 515 especies de *Anopheles* que se conocen, solo 70 pueden transmitir los parásitos del género *Plasmodium* que causa malaria en humanos ^{7,8}.

1.2 *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Evolución de *Plasmodium falciparum*

Durante su historia evolutiva, el parásito de la malaria humana más mortal, *P. falciparum*, se sospecha que podría haber evolucionado a partir del subgénero *Laveriana* que infecta a los grandes simios africanos. De todas las especies de parásitos de este subgénero *Laveriana*, *P. falciparum* habría sido el único que pudo adaptarse a los humanos. Por el momento se encuentran 7 especies dentro del subgénero *Laveriana* (Figura 1a), que infectan a chimpancés (*P. gaboni*, *P. billcollinsi* y *P. reichenowi*), gorilas (*P. praefalciparum*, *P. blacklocki* y *P. adleri*) y humanos (*P. falciparum*) ⁹.



En 2018 el grupo de investigación del doctor Otto, informó de los genomas completos de todas las especies conocidas del subgénero *Laverania*, proporcionando información de *P. falciparum* como un importante patógeno humano. Calcularon que el ancestro de todos los parásitos actuales del subgénero *Laveriana* existió hace 0.7–1.2 millones de años, dónde estiman que *P. falciparum* empezó a infectar humanos a partir de la especie *P. praefalciparum* hace 40,000–60,000 años atrás (Fig. 1.a) y que no surgió de una sola

transmisión como otros propusieron anteriormente. Hace años, este subgénero se dividió en dos clados, A (*P. adleri* y *P. gaboni*) y B que incluye las especies restantes (Fig. 1a). Después de esta subdivisión ocurrieron sucesos de especiación que generaron nuevos parásitos ¹⁰.

Se plantea que la población parasitaria podría haber atravesado un cuello de botella hace aproximadamente 5.000 años (Fig. 1b). Dado que la expansión de la población humana con la aparición de la agricultura posiblemente conllevó a una fuerte presión evolutiva para las especies de mosquitos, especialmente en la especie *Anopheles gambiae* para alimentarse principalmente de humanos. Este suceso posibilitó a *P. falciparum* poder extenderse a gran escala rápidamente, seguido de una acumulación de mutaciones que favorecieron el crecimiento de la especie en humanos y en los vectores antropofílicos como *Anopheles gambiae*. Las nuevas características adquiridas por *P. falciparum*, lo convirtieron en el único miembro del subgénero *Laveriana* capaz de infectar y propagarse en humanos ¹⁰.

1.2.2 *P. falciparum*: ciclo de vida

P. falciparum tiene un ciclo de vida complejo que involucra como huéspedes a los humanos (reproducción asexual del parásito en vertebrados mamíferos) y a los mosquitos *Anopheles* como vector y huésped invertebrado (donde se establecen las formas de reproducción sexual de los parásitos) ^{11, 12}.

En cada etapa del desarrollo del parásito, hay una morfología y fisiología característica determinada por su perfil de expresión génica, observada a través de análisis transcriptómicos y proteómicos específicos de cada etapa del ciclo. *P. falciparum*, a diferencia de las demás especies, confiere la capacidad de citoadherencia a los eritrocitos infectados, lo cual permite al parásito evadir su eliminación en el bazo y completar así todo su ciclo sin ser atacado por el sistema inmunitario. Este mecanismo contribuye de manera importante a la patogénesis de la malaria grave por *P. falciparum* ¹².

El ciclo empieza en el huésped humano con la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* para alimentarse de sangre, cuando el mosquito penetra la dermis hasta alcanzar la sangre periférica para alimentarse. Al mismo tiempo se transmite la infección al contaminar la herida el mosquito con su saliva cargada de esporozoítos maduros, que son la forma infectiva de *Plasmodium* ¹³. Los esporozoítos penetran en las células del parénquima hepático (hepatocitos), donde tiene lugar la fase de esquizogonia exoeritrocitaria primaria o también llamada esquizogonia pre-eritrocítica ^{14, 15}. En esta fase el parásito se desarrolla a partir de los esporozoítos, dentro de las células parenquimatosas invadidas, multiplicándose asexualmente y produciendo numerosos merozoítos hepáticos (~20.000-40.000), cuando se encuentra en estado maduro. Cuando el esporozoíto madura y forma merozoítos en su interior, pasa a denominarse esquizonte ^{12, 11}.

Los esporozoítos se convierten en esquizontes exoeritrocíticos a la vez que su núcleo se divide repetidamente. Estos esquizontes maduran y se fragmentan, provocando la lisis celular del hepatocito y concluyendo la esquizogonia exoeritrocítica primaria. Seguidamente se liberan a la circulación sanguínea grandes cantidades de merozoítos que invadirán eritrocitos, donde se replicarán asexualmente iniciando una segunda fase, la esquizogonia eritrocítica ^{12,16}. Cuando los merozoítos invaden los hematíes, adquieren en el interior del eritrocito la forma de vacuola ameboide uninucleada denominada trofozoíto. Los trofozoítos crecen hasta transformarse en esquizontes maduros; aquí se inicia la esquizogonia eritrocitaria. Esta etapa es una segunda fase de multiplicación asexual de los merozoítos, donde el esquizonte produce aproximadamente 8-16 merozoítos eritrocitarios que son liberados en el torrente sanguíneo mediante la lisis celular del esquizonte maduro para re-invasión de nuevos eritrocitos. Este proceso se repite de manera cíclica ^{17,18}.

Después de 2 o 3 esquizogonias eritrocíticas, en vez de transformarse en trofozoíto algunos merozoítos evolucionan a microgametocitos (gametocitos masculinos) y macrogametocitos (gametocitos femeninos) ¹⁶. Estas formas sexuales del parásito abandonan la circulación periférica y entran en el espacio extravascular de la médula ósea, donde maduran y evolucionan mediante etapas (de I a V) en un transcurso de 8-10 días (proceso llamado Gametocitogénesis) ¹⁹. Llegados a este punto de la enfermedad, cuando un mosquito *Anopheles* se alimenta de sangre de una persona infectada con malaria, absorbe los gametocitos del parásito, que continuarán su ciclo biológico en el mosquito ¹⁶.

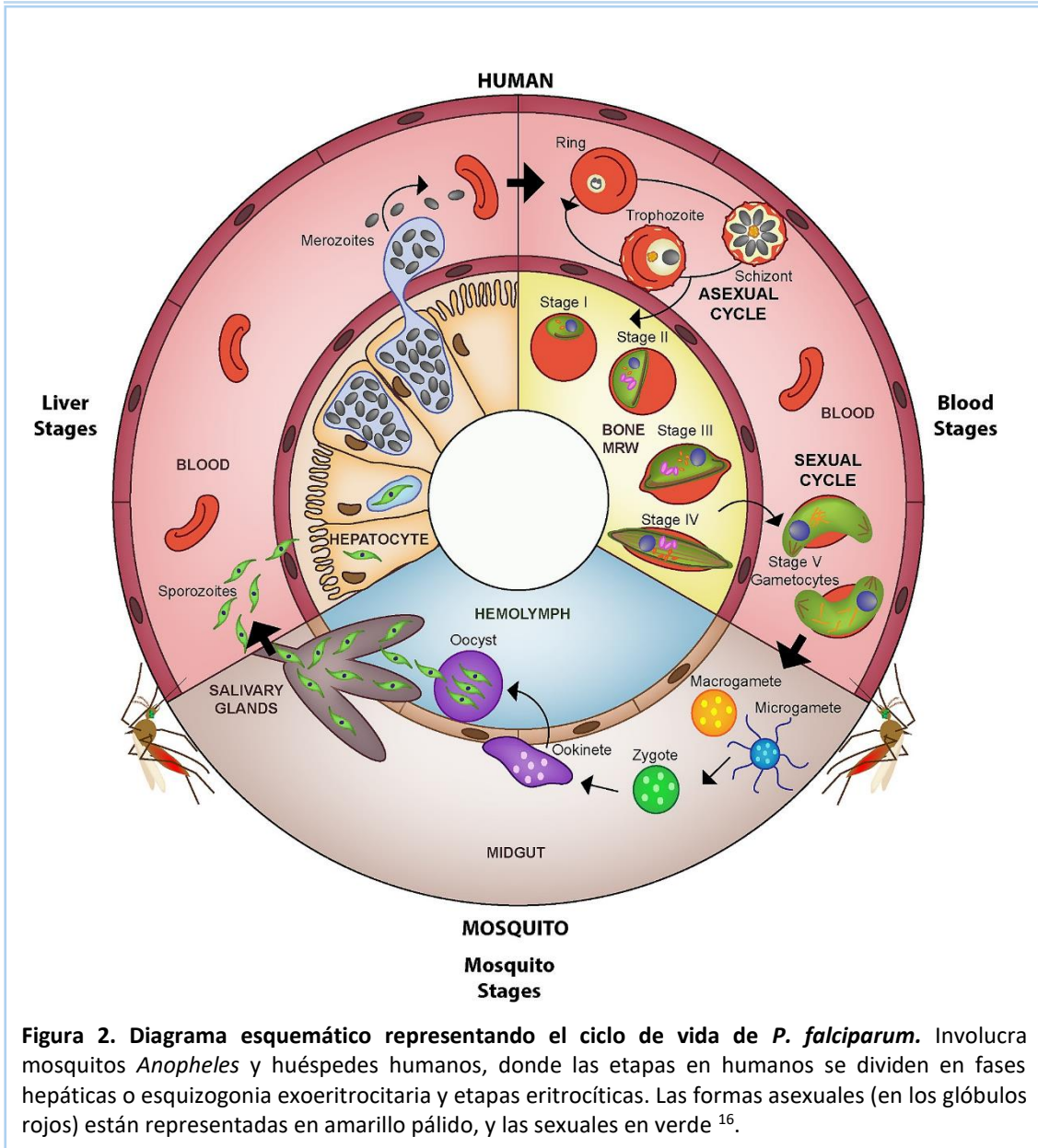


Figura 2. Diagrama esquemático representando el ciclo de vida de *P. falciparum*. Involucra mosquitos *Anopheles* y huéspedes humanos, donde las etapas en humanos se dividen en fases hepáticas o esquizogonia exoeritrocitaria y etapas eritrocíticas. Las formas asexuales (en los glóbulos rojos) están representadas en amarillo pálido, y las sexuales en verde ¹⁶.

Cuando los gametocitos entran en el estómago del mosquito, realizan la gametogénesis para transformarse en gametos masculinos y femeninos, y se produce la fecundación entre microgametos y macrogametos para formar el cigoto (Figura 2) ¹⁹, que se diferencia en una forma móvil llamada ooquineto. Este proceso de esporogonia fue descrito por primera vez por T. A. Freyvogel en el año 1966 (Acta Trop., 23: 201-22). Con el tiempo, el ooquineto crece, sus núcleos (femenino y masculino) se fusionan y atraviesa la pared intestinal del mosquito donde evoluciona a ooquiste ¹⁸. El ooquiste migra hacia la cavidad celómica del mosquito, donde divide su núcleo formando miles de esporozoítos que se liberan y migran a las glándulas salivales del mosquito (Figura 2). Estos esporozoítos se inyectan en el torrente sanguíneo del huésped humano cuando el mosquito se alimenta de la sangre de un humano, transmitiendo así la malaria al contaminar la herida de la picadura con saliva llena de esporozoítos ¹⁸.

1.2.3 Diagnóstico y síntomas de la malaria producida por *P. falciparum*

El diagnóstico tradicional de la malaria sigue siendo a través de la microscopía óptica, con la observación de frotis sanguíneos teñidos mediante la tinción de Giemsa. Sin embargo, para el diagnóstico de *P. falciparum* también es muy frecuente utilizar pruebas de diagnóstico rápido, habitualmente pruebas basadas en la detección de la proteína 2 rica en histidina de *P. falciparum* (PfHRP2) o de la lactato deshidrogenasa del parásito²⁰.

Los síntomas que se presentan en la malaria, generalmente se manifiestan con fiebres intermitentes, dolores de cabeza y musculares, diarrea y decaimiento. Tales síntomas pueden llegar a agravarse y provocar la muerte por anemia grave, daño cerebral o insuficiencia renal²¹.

1.2.4 Tratamientos contra *P. falciparum*

Los mecanismos de resistencia de *P. falciparum* frente a los fármacos antipalúdicos son inevitables, ya que el parásito posee una expresión variable de muchas de las proteínas que son potenciales dianas terapéuticas, lo cual le permite evadir la acción de los fármacos. Es por ese motivo que en todo momento se están investigando nuevos tratamientos para combatir la malaria.

A diferencia del mosquito *Anopheles* que combate la malaria solo con mecanismos inmunes innatos, los humanos la combaten con mecanismos innatos y adaptativos^{22, 23}.

Algunos de los tratamientos actuales para evitar la resistencia de *P. falciparum* ante los medicamentos antipalúdicos, son terapias combinadas que se aplican de manera dispar según el estado de la enfermedad. En base el documento de la Organización Mundial de la Salud (OMS): *Guidelines for the treatment of Malaria (2015)*²⁴, que contiene las recomendaciones terapéuticas para el control global de la enfermedad. La artemisinina es un metabolito secundario isoprenoide que combate la etapa sanguínea de *P. falciparum*, eliminando los parásitos sexuales y reduciendo los gametocitos responsables de la transmisión^{25, 24, 20}.

Existen otros fármacos antimaláricos como la cloroquina, sulfadoxina y pirimetamina, atovacuona-proguanil, y fosmidomicina, pero el parásito desarrolló resistencia ante estos. Por lo expuesto, el 2001 se aconsejó usar las terapias combinadas en artemisinina (TCA) como tratamiento de primera línea para *P. falciparum*²⁶.

Actualmente, la OMS recomienda el uso de cinco TCA (artesunato-mefloquina, artemether-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-pirimetamina, y dihidroartemisinina-piperaquina) que ofrecen una tasa de fracaso inferior al 10% para malaria no complicada producida por *P. falciparum*. Aun así, se ha confirmado la resistencia de *P. falciparum* a la artemisinina. Para afrontar esta situación se está

considerando la TCA más reciente (artesanato-pironaridina), y la posibilidad de una triple combinación de fármacos basados en artemisinina ²⁴.

Como consecuencia de los fracasos de algunos tratamientos, en 2019 la OMS informó en su documento: *World Malaria Report 2019*, que la mayoría de las regiones afectadas por malaria (Asia Sudoriental, América, Mediterráneo Oriental, y Pacífico Occidental) tenían ahora como política de tratamiento de primera línea arteméter-lumefantrina (AL) y artesunato-mefloquina (AS-MQ) ^{20, 27}.

Con respecto a la prevención de la enfermedad, se están investigando vacunas para las diferentes etapas del ciclo de *P. falciparum*, para prevenir la malaria. En la etapa preeritrocítica las vacunas se dirigen hacia los antígenos de esporozoítos y esquizontes. En las etapas eritrocíticas se centran contra los merozoítos. Las vacunas para las etapas de mosquito se centran en los gametos impidiendo su desarrollo a ooquinetos. Actualmente la vacuna RTS,S es la única registrada contra la malaria ^{28, 29}.

1.2.4.1 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios de cadena corta sencilla de ARN o ADN, con una elevada capacidad de unión específica a moléculas contra las que se seleccionan ³⁰. Su estructura tridimensional les permite interactuar casi con cualquier tipo de diana ³¹. Los aptámeros son biomarcadores que se pueden desarrollar mediante el método de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). La técnica SELEX es un enfoque de selección combinatoria *in vitro* de oligonucleótidos partiendo de una amplia biblioteca de secuencias oligonucleotídicas candidatas, de la cual se seleccionan moléculas con alta afinidad y especificidad de unión a estructuras moleculares elegidas ³¹.

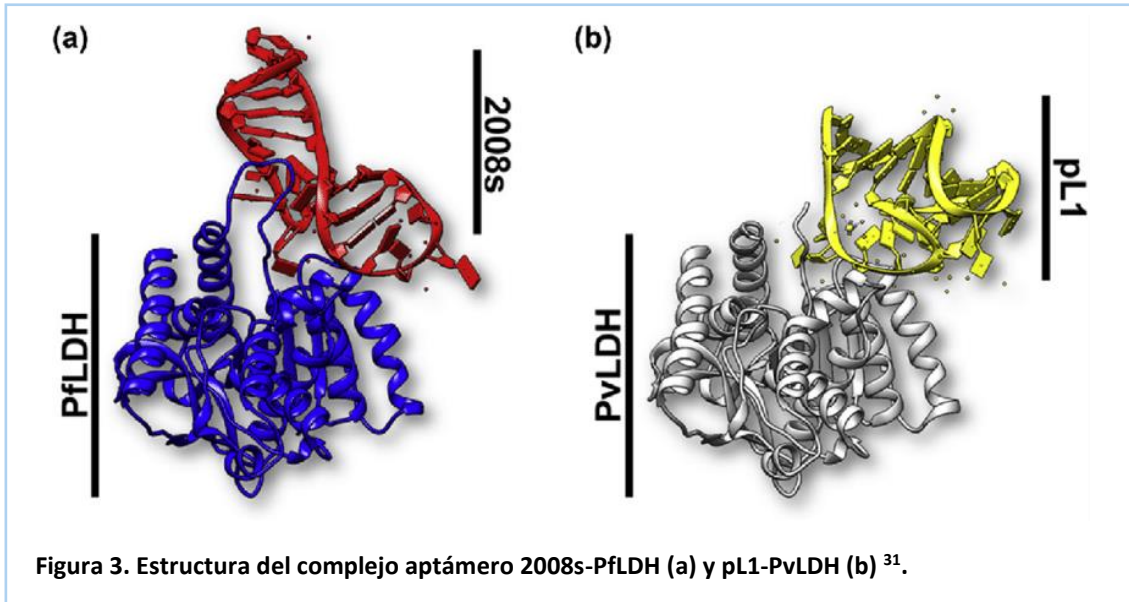
Los aptámeros están aprobados para uso terapéutico y diagnóstico contra varias enfermedades, y su eficacia puede ser aumentada con la introducción de modificaciones químicas, que pueden evitar la degradación enzimática por fluidos corporales ^{32, 33}.

Los aptámeros son una alternativa frente a los anticuerpos, siendo más estables, simples de producir y modificar, menos sensibles a la humedad y al calor; tienen una baja inmunogenicidad y pueden generarse contra una gran variedad de dianas, desde moléculas pequeñas hasta proteínas y organismos completos ^{34, 35, 36}. También son menos susceptibles a la contaminación, no requieren de modelos animales y se producen de manera más rápida ³¹.

La susceptibilidad de los aptámeros ante la degradación por nucleasas puede evitarse mediante modificaciones químicas o la conjugación a moléculas como polietilenglicol o biotina ³¹.

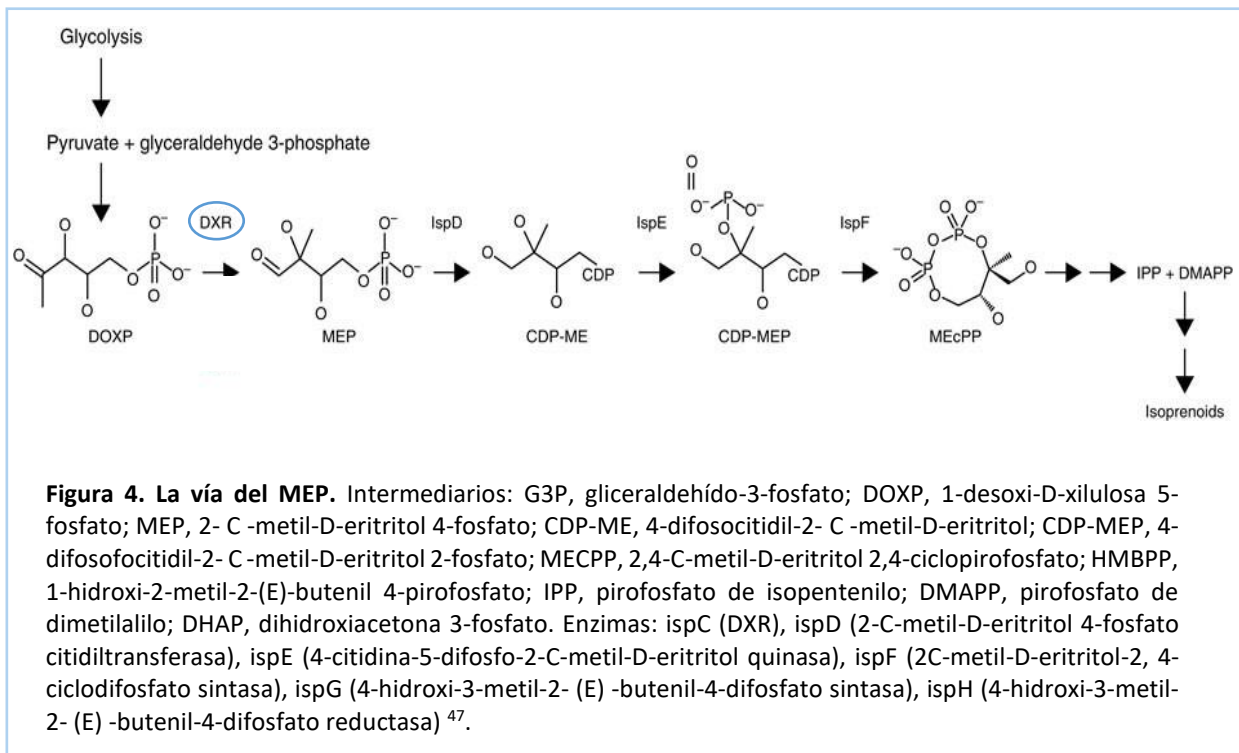
La técnica SELEX puede ser empleada para generar aptámeros contra diversas proteínas de *P. falciparum* que pueden ser utilizadas en nuevas estrategias diagnósticas o terapéuticas. Se han seleccionado aptámeros de DNA, como pL1 o 2008s, con alta

afinidad contra la proteína lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfLDH), que funciona como marcador de diagnóstico. Aunque los aptámeros pL1 y 2008s interaccionen con la misma enzima, sus secuencias y estructuras son completamente diferentes (Figura 3) ^{37, 38}. Además, el aptámero pL1 también interactúa con la proteína LDH de *P. vivax* (Figura 3) ³⁷.



1.3 La ruta metabólica del metil eritritol fosfato

La ruta metabólica del metileritritol fosfato (MEP) consta de siete pasos enzimáticos iniciados con la formación de DXP (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) a partir de la condensación de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (G3P), realizada por la enzima DXS (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa). A continuación, la enzima DXR (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa) cataliza la transformación de DXP en MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato), que requiere una isomerización, seguida de una reducción dependiente de NADPH³⁹. Las actividades de DXS y DXR son pasos limitantes en la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía del MEP, que además de estar en el parásito de la malaria, también está presente en eubacterias, plantas superiores, algas, cianobacterias y diatomeas⁴⁰. Esta ruta es actualmente un objetivo para la producción de herbicidas y medicamentos antibacterianos, ya que es indispensable para las plantas y la mayoría de las eubacterias. La vía del MEP también es una diana terapéutica para la malaria, debido a que esta ruta está ausente en los humanos a diferencia de *Plasmodium*, donde tiene un papel indispensable^{41, 42, 43, 44, 45, 46}.



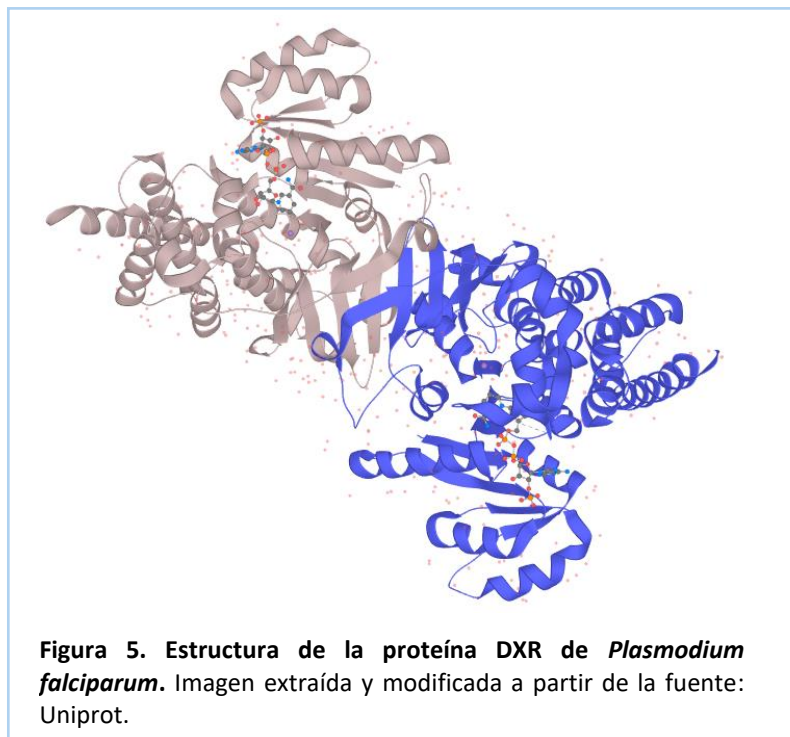
Plasmodium depende de la vía MEP para sintetizar isoprenoides *de novo*. Cuando se descubrió esta dependencia, la vía de MEP se convirtió en una diana terapéutica para la elaboración de medicamentos antipalúdicos^{47, 48, 49}.

En *Plasmodium*, el MEP es un intermediario esencial de la biosíntesis de isoprenoides, que son compuestos indispensables para la estructura de la membrana, la química redox, los ciclos reproductivos, la regulación del crecimiento, la transducción de señales, la respiración celular, la localización de proteínas en la membrana y los mecanismos de

defensa del parásito. Debido a que *Plasmodium* depende para su desarrollo de esta vía metabólica, se ha convertido en una de las principales dianas para la producción de fármacos antimaláricos ^{43, 50}.

1.3.1 La proteína DXR de *P. falciparum*

La 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) es una enzima deshidrogenasa de clase B, que está compuesta por tres dominios: un dominio N-terminal para la unión del cofactor, un dominio central con residuos del centro activo, y un dominio helicoidal C-terminal. El dominio N-terminal es uno de los componentes que realizan el pliegue de unión a dinucleótidos, y que interviene en la unión del NADPH. El dominio catalítico central está unido al dominio C-terminal, y abarca los sitios de unión para cationes divalentes como Mn^{2+} , fosfato del sustrato y el bucle catalítico ⁵¹. El centro activo consta de la conformación abierta, que permite que DXP entre y se una al sitio activo, y de la conformación cerrada, que cubre el sitio activo promoviendo la activación de la función catalítica ⁵². En la DXR de *P. falciparum*, NADPH se une a la cavidad formada por residuos presentes en el dominio C-terminal, conservados en todos los parásitos de la malaria ⁵³.



DXR es una diana para el desarrollo de anticuerpos y aptámeros contra *P. falciparum*, porque al ser la primera enzima de la ruta del MEP indispensable para el parásito, su inhibición impediría el crecimiento del parásito. En la vía del MEP, DXR es la segunda enzima, que cataliza la transformación dependiente de NADPH y la reducción de DXP a MEP; tiene como cofactores el DTT y el cloruro de manganeso ($MnCl_2$); y tiene un peso molecular de 55,75 kDa. El antibiótico fosmidomicina, era una potente inhibidor de esta enzima pero ahora, con la resistencia del parásito presentada, es ineficaz ^{45, 54, 50}.

2. OBJETIVOS

La DXR es una diana particularmente atractiva para el desarrollo de nuevos inhibidores, por ser la primera enzima de la ruta del MEP y por su ausencia en humanos. Al inhibirla se lograría bloquear una vía esencial para la supervivencia del parásito y por otro lado, el hecho de estar ausente en los humanos la convierte en una diana específica y, por lo tanto, el tratamiento no conllevaría efectos secundarios relevantes para el uso humano.

Para poder evaluar si es posible la interacción entre aptámero y proteína, se llevó a cabo:

1. La obtención y purificación de la proteína 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa de *Plasmodium falciparum*.
2. Análisis de la interacción entre la proteína DXR y un aptámero desarrollado previamente en los laboratorios de IBEC.

3. METODOLOGÍA

3.1 Expresión de la proteína DXR

La proteína diana fue la proteína DXR de *Plasmodium falciparum* (UniProtQ8IKG4) sin los 72 aminoácidos correspondientes al péptido señal que la dirige al apicoplasto. La proteína fue clonada en el vector de expresión pGS21a (Genscript).

El vector recombinante se diseñó con las etiquetas His x6 (~ 9-10 kDa) para poder realizar un sistema de purificación por afinidad, y poder obtener elevada concentración de proteína. La etiqueta GST es una proteína de fusión larga (26kDa) que ayuda a obtener una mayor concentración de la proteína DXR, con el fin de poder adquirir una suficiente cantidad de proteína para poder realizar al final una calorimetría, para analizar la interacción de la proteína DXR de *P. falciparum* con los aptámeros desarrollados anteriormente en IBEC, mediante el método SELEX.

El pGS-21a también contiene un promotor T7 que permite a nuestro gen transcribirse de manera frecuente, un terminador de transcripción T7, el origen de replicación del bacteriófago (f1 ori) en sentido negativo (-), un gen de resistencia a la ampicilina (marcador de selección), un origen de replicación (Ori) que permite replicar el plásmido de ADN, un operador lac I que codifica mRNA para transcribir la proteína represora lac permitiendo su unión e interrumpiendo la acción del ARN polimerasa, y un sitio de clonado múltiple (MCS). El inductor IPTG es el activador que libera el represor lac tetramérico del operador lac de forma aloestérica, promoviendo la actividad del ARN polimerasa para la transcripción del gen DXR.

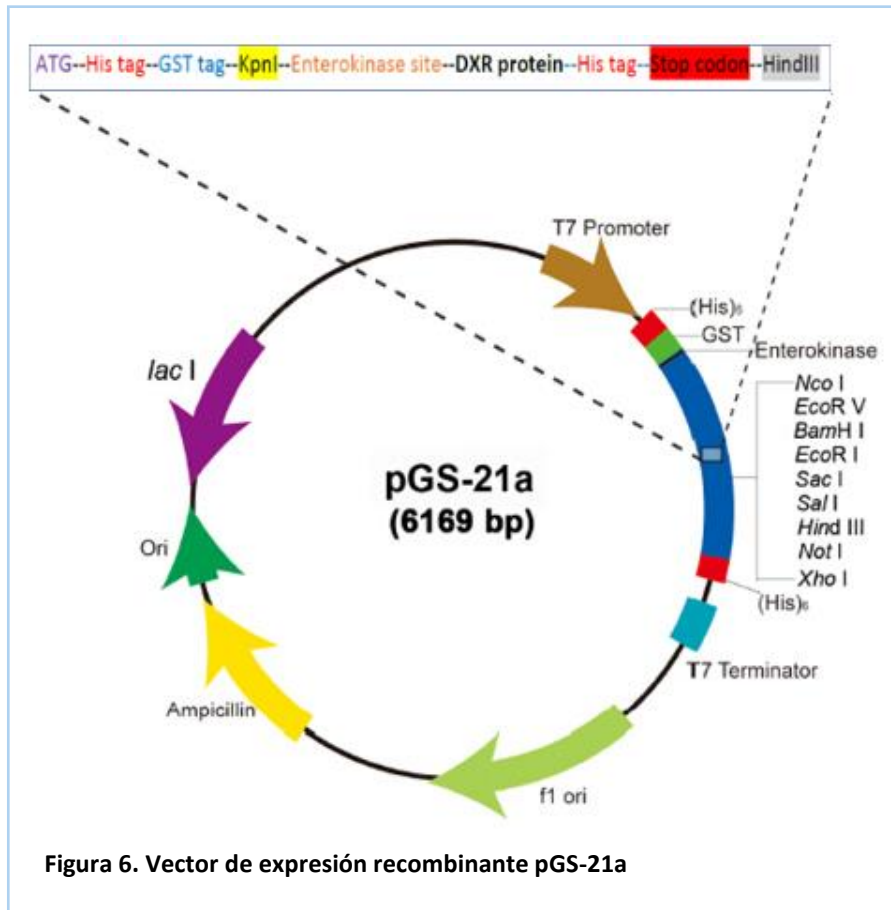
La elección de la expresión de DXR de *P. falciparum* en *E. coli*, se debe a que *E. coli* es una bacteria ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para expresar y producir proteínas recombinantes, en bajo coste. Tienen una fácil manipulación genética, y una alta densidad y rapidez de cultivo y crecimiento.

En *E. coli*, las cepas BL21 (DE3) de expresión seleccionadas, son lisógenos del bacteriófago DE3, que contienen una copia cromosómica del gen ARN polimerasa de T7, bajo control del promotor lac I, inducible por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido).

Para expresar y obtener la proteína DXR de *P. falciparum*, se debe realizar una transformación por choque térmico de las cepas BL21 con nuestro plásmido recombinante. Luego se inducen las colonias positivas que contienen nuestro plásmido para que transcriban la proteína DXR de *P. falciparum*, y posteriormente se lisan las células por sonicación en hielo y mediante centrifugaciones, se separarán las fracciones solubles e insolubles.

La extracción de la proteína se realizó desde la fracción insoluble, ya que, la mayoría de la proteína de interés se encuentra en los cuerpos de inclusión, asimismo, en la fracción insoluble es donde se encuentra el 99% de proteína a diferencia de la fracción soluble, donde se encuentra el 1% de proteína. Se continúa verificando la expresión de la proteína DXR en la lisis total y fracción insoluble mediante electroforesis SDS-PAGE. Realizamos una primera purificación para eliminar parte de las proteínas de fondo, luego, hacemos una diálisis para replegar la proteína DXR y recuperar así su estructura.

Finalmente, realizamos la segunda purificación, dónde nuestra proteína DXR, será purificada mediante un sistema de afinidad de la etiqueta His tag. Donde en cada fracción, obtendremos nuestra proteína de manera limpia hasta alcanzar casi un 95% de pureza. Una vez obtengamos la proteína DXR purificada y visualizada en una electroforesis SDS-PAGE, se realizará un Western Blot para comprobar e identificar que la presencia de la banda correspondiente a nuestra proteína DXR, es realmente la proteína DXR de *P. falciparum*, mediante controles positivos y negativos. Después de tener la confirmación de que nuestra proteína corresponde a la DXR de *P. falciparum*, procedemos a concentrar y cuantificar la concentración de DXR, y a analizar si la proteína DXR obtenida interactúa con los aptámeros de DXR desarrollados anteriormente en los laboratorios de IBEC, mediante el método de calorimetría isotérmica.



3.1.1 Transformación

Realizamos una transformación de las células BL21 (DE3) de *E. coli* para poder insertar el plásmido recombinante y transformarlo en una cepa de expresión de bacterias especializadas en la producción de la proteína DXR de *P. falciparum*. Para transformar las células, se cultivó una colonia fresca de células competentes BL21 de *E. coli* (200 μ l) con el plásmido pGS-21a recombinado (2 μ l), se realizó un choque térmico a 42 ° C durante 90 segundos y se añadió medio de cultivo Luria Bertani (medio LB) preparado, autoclavado y precalentado a 37 ° C, que contenía cloruro de sodio (NaCl), triptona, agua milli-Q, y extracto de levadura.

El cultivo se incubó en agitación a 300 rpm durante 1 hora a 37 ° C, luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se sembraron 100 μ l del pellet en varias placas hechas con medio Agar, LB y Ampicilina. Las placas se dejaron durante una noche a 37 ° C, y el día siguiente se examinaron las placas para observar si había colonias de *E. coli*; esto indica que son colonias positivas resistentes a la ampicilina porque han insertado el plásmido pGS-21a.

3.1.2 Ensayo de inducción

Las colonias *E. coli* positivas, se inocularon en tubos con Ampicilina y 5 ml de medio LB, y se dejan incubar a 37 ° C en agitación de 180 rpm durante 4 horas, hasta que el cultivo presente una buena turbidez y una absorción situada en un rango de 0.4 – 0.6. Después de confirmar una absorbancia no mayor de 0.502, se procede a inocular el cultivo con 25 µl de IPTG 0.5 mM por litro de cultivo en condiciones de 15 ° C y 180 rpm durante una noche. Finalizamos el proceso centrifugando el cultivo a 10.000 rpm 1 hora a 4 ° C, descartando el sobrenadante y guardando el pellet a – 80 ° C.

Para poder continuar el proceso y realizar la extracción de la fracción insoluble de la proteína DXR, se coge una porción del pellet obtenido, y se usa para realizar una electroforesis SDS-PAGE para determinar si se ha inducido bien la muestra, observando una banda en el mismo nivel que el control positivo.

3.1.3 Obtención del extracto insoluble de DXR

El objetivo de obtener la fracción insoluble de la proteína DXR de *P. falciparum* en vez de la fracción soluble, se debe a que en la fracción soluble solo está presente el 1% de la proteína, siendo esta más inestable. En cambio, en la fracción insoluble, se presenta aproximadamente el 95 % de proteína y es más estable.

A partir de 4 litros de cultivo inducido, se obtiene un pellet el cual luego es resuspendido en tampón de lisis (Tabla 1) y se incuba 30 minutos.

TAMPÓN LISIS POR LITRO DE CULTIVO INICIAL	SUPLEMENTOS
Tris – Cloruro 20 mM pH = 7.4	Lisozima
Cloruro de sodio 0.5 M (NaCl)	Cóctel inhibidor de proteasas con EDTA
Imidazol 20 mM	Cloruro de Manganeso (MgCl ₂)

Tabla 1. Componentes del tampón lisis y del suplemento agregado.

Seguidamente se lisa el pellet mediante el método de sonicación en hielo (Tabla 2). Después, el lisado se centrifuga a 17.000 rpm durante 1 hora, se agrega 1 mililitro de sulfato de protamina que retendrá el DNA, y se vuelve a centrifugar 1 hora a 17.000 rpm para obtener la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (pellet).

	Ajuste de amplitud	de Tiempo	Pulso ON	Pulso OFF
Sonicación:	80 %	30 minutos	10 segundos	20 segundos

Tabla 2. Sonicación. Parámetros de la sonicación realizada.

3.2 Extracción de la proteína DXR a partir de la fracción insoluble

Para conseguir la proteína DXR de *P. falciparum* desde la fracción insoluble, se realizan varios procesos para alcanzar finalmente la proteína plegada y purificada, ya que, en esta fracción están presentes muchas otras proteínas de fondo que interfieren en la expresión de la proteína diana. Las proteínas obtenidas a partir de fracciones insolubles, se encuentran agregadas formando cuerpos de inclusión. Por lo tanto, para obtener la proteína DXR pura se debe desnaturalizar y desplegar, a través de tampones con altos contenidos en urea.

TAMPÓN AISLAMIENTO	TAMPÓN SOLUBILIZACIÓN
Urea 2 M	Urea 6 M
Tris – Cloro 20 mM	Tris – Cloro 20 mM
NaCl 0.5 M	NaCl 0.5 M
Imidazol 20 mM	Imidazol 20 mM
MnCl ₂ 1 mM	MnCl ₂ 1 mM
DTT 2 mM	DTT 2 mM

Tabla 3. Concentraciones de los componentes usados para preparar el tampón de aislamiento y de solubilización.

La obtención de la DXR pura se inicia con la solubilización de la fracción insoluble (pellet resultado del anterior método) mediante la agregación de dos tampones. En primer lugar, se adiciona un tampón de aislamiento para disolver y solubilizar el pellet; seguidamente se incuba 30 minutos a 4 ° C y se sónica en las mismas condiciones que la anterior sonicación hecha (Tabla 2). Una vez sonicado, se centrifuga a 14.000 rpm durante 40 minutos a 4 ° C. Luego, se guarda el sobrenadante obtenido (sobrenadante

aislamiento), y en el pellet resultante se añade un tampón de solubilización, que contiene una cantidad más elevada de urea. Posteriormente se centrifuga otra vez en las mismas condiciones (14.000 rpm, 40 minutos, 4 ° C), y se adquiere un segundo sobrenadante (sobrenadante de solubilización), el cual contiene menos cantidad de proteína.

Con los dos sobrenadantes obtenidos (sobrenadante de aislamiento y sobrenadante de solubilización), se procede a realizar una primera purificación (método expuesto en el punto 3.4) para descartar gran parte de las proteínas contenidas de fondo en la fracción insoluble, que interfieren en el próximo proceso de la diálisis, para recuperar la proteína plegada y renaturalizada.

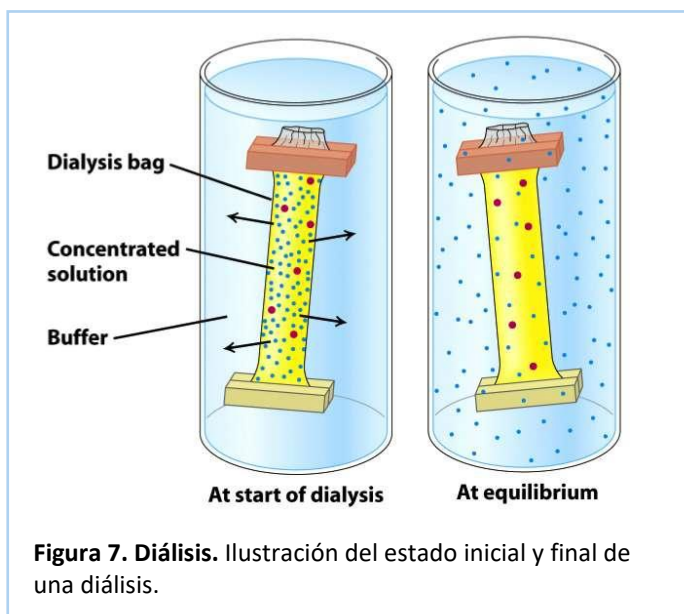
3.3 Diálisis

El objetivo de la diálisis es recuperar la estructura de la proteína DXR, es decir, renaturalizarla, ya que, se desnaturalizó a causa de la acción de la urea contenida en los tampones de solubilización y aislamiento para extraer la proteína. La urea estimuló el despliegue de la proteína DXR, entonces, para recuperar su forma estructural, es necesario realizar una diálisis para poder eliminar toda la urea contenida en la proteína.

En el proceso de la diálisis se coloca la solución proteica dentro de una bolsa hecha de una membrana semipermeable al agua y a los iones, pero no a la proteína DXR de interés. La bolsa de diálisis contiene unos poros de tamaño que permite el intercambio de sales y tampones hasta establecerse un equilibrio entre el interior y el exterior de la membrana, maximizando el gradiente de concentración de solutos, que estimula la eliminación de la urea.

La bolsa de diálisis con el extracto proteico, es cerrada con nudos y pinzas, y colocada dentro de un vaso de precipitado de 2 L, a 4 ° C y en agitación, donde se deposita el tampón de intercambio bajo en urea. Cada 3 horas, se cambió el tampón de diálisis. Entonces, para el extracto proteico que contenía 6 M urea, se cambió el tampón de diálisis a uno de 5 M, después a uno de 4 M, y luego de 4 M a 3 M, y así hasta llegar a un tampón sin urea.

Para el extracto proteico que contenía 2 M de urea, se cambió primero a un dializado de 1.5 M de urea, luego a 1 M de urea, después 0.5 M urea y finalmente a 0 M de urea.



DIÁLISIS FLUJO SOLUBILIZACIÓN (urea 6M)	DIÁLISIS FLUJO AISLAMIENTO (urea 2M)
1. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 5 M 	1. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 1.5 M
2. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 4 M 	2. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 1 M
3. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 3 M 	3. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 0.5 M
4. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 2 M 	4. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 0 M
5. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 1 M 	
6. Tampón: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – Cl 20 mM pH= 8.3 ▪ NaCl 0.5 M ▪ Urea 0 M 	

Tabla 4. Tampones de la diálisis realizada. El pH de los tampones está determinado por el punto isoeléctrico de la proteína DXR ($pI = 6 - 10$).

3.4 Purificación DXR mediante cromatografía IMAC

La purificación es una de las técnicas más importantes e indispensables para alcanzar el objetivo de obtener la proteína de interés DXR de *P. falciparum* purificada.

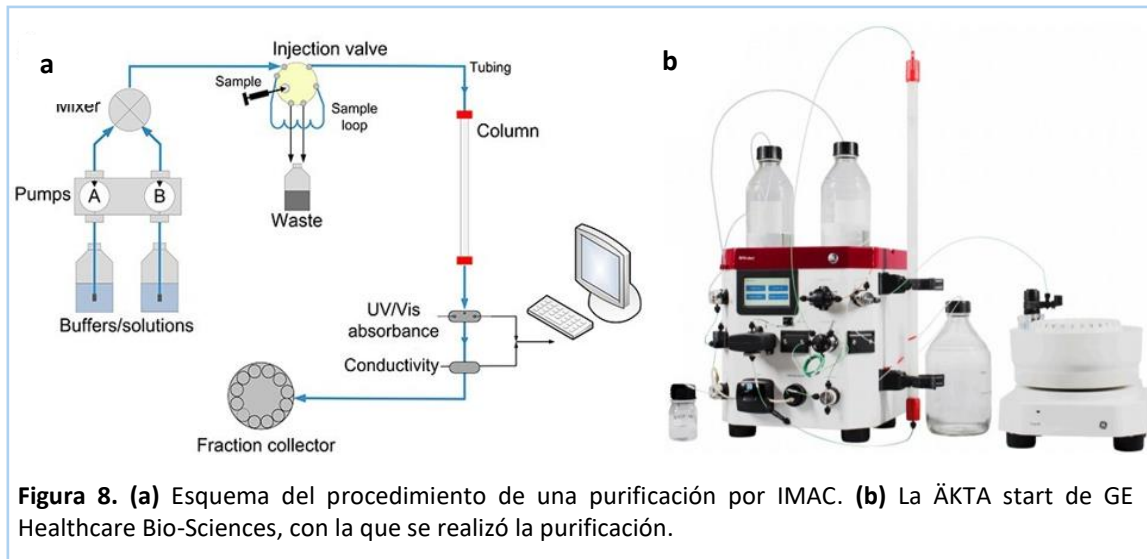
Previo a la purificación de las muestras (flujo dializado de aislamiento y solubilización), se añade 100 mM de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) como complemento para la proteína. Después se filtran las muestras con filtros 0,45 μm y se centrifugan a 2500 G durante 10 minutos a 4 ° C. El $MnCl_2$ es un cofactor de la proteína DXR de *P. falciparum*. Antes de realizar la purificación, se prepararon tampones de Imidazol necesarios para realizar los lavados, equilibrios, y eluciones de la purificación (Tabla 5). El tampón A corresponde al tampón de carga y el tampón B corresponde al tampón de elución.

TAMPÓN A PURIFICACIÓN	TAMPÓN B PURIFICACIÓN
Imidazol 20 Mm	Imidazol 400 mM
Tris – Cl 0.5 M pH = 8.10	Tris – Cl 0.5 M pH = 8.10
NaCl 0.5 M	NaCl 0.5 M
H ₂ O milli-Q	H ₂ O milli-Q

Tabla 5. Componentes de los tampones de purificación. La diferencia entre el tampón A y B es la concentración de Imidazol (tampón A, imidazol 20 mM; tampón B, imidazol 400 mM).

La purificación con cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) se realizó con una columna HisTrap HP de 1 ml (Amersham Biosciences AB), la cual estaba cargada previamente con iones níquel (Ni^{2+}). La purificación se hizo mediante la máquina ÄKTA start (GE Healthcare Bio-Sciences AB) (Figura 8). Primero se preparó el equipo para limpiar los restos de anteriores purificaciones, se realizaron lavados y se equilibró todo el sistema. El sistema se equilibró con el mismo tampón de imidazol 20 mM. Posteriormente se hicieron 20 ml de lavados a la columna, observando como la señal de U.V. desciende y se mantiene constante. A continuación se aspiraron 16 ml de muestra, cargándose 1 ml/min. La muestra de proteína que traspasaba la columna, era debido a que no se había pegado a las resinas de níquel. Seguidamente, se vuelven a realizar lavados con volumen 20 ml. Posteriormente se realizan las eluciones en un gradiente lineal de 20 ml de volumen, usando una mezcla de solución amortiguadora de elución, con el tampón A y el tampón B; en este momento, se inicia el fraccionamiento de la

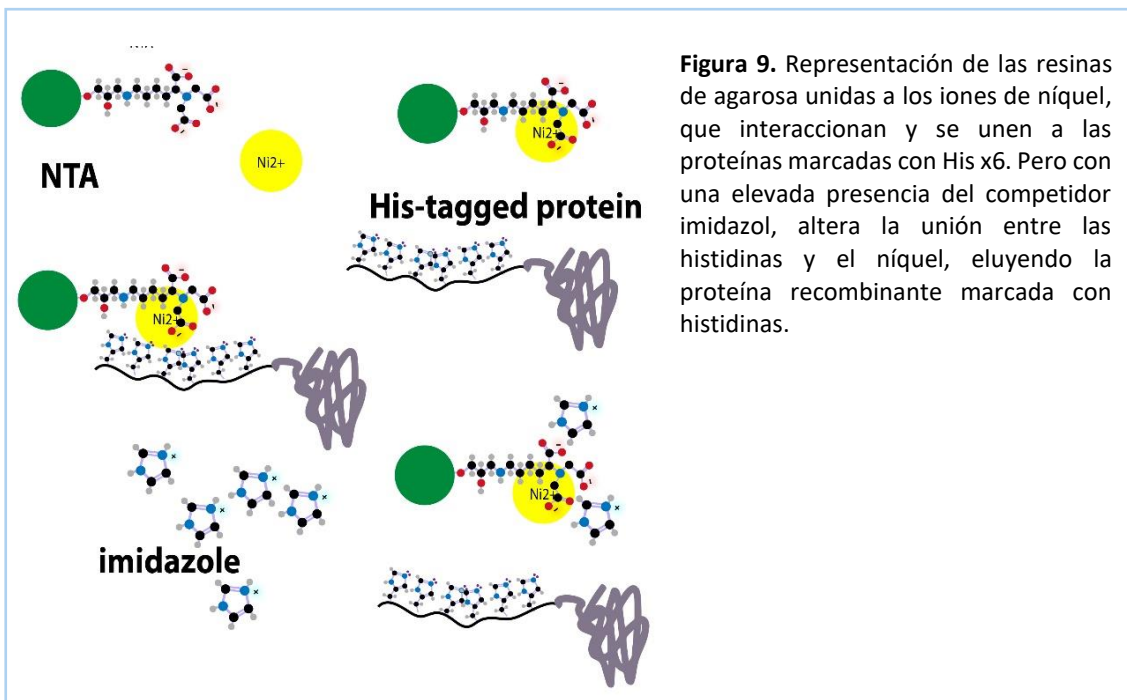
muestra pegada a la columna, con fracciones de 0.5 ml, las cuales se analizan mediante SDS-PAGE para identificar en qué fracción ha caído la proteína recombinante purificada.



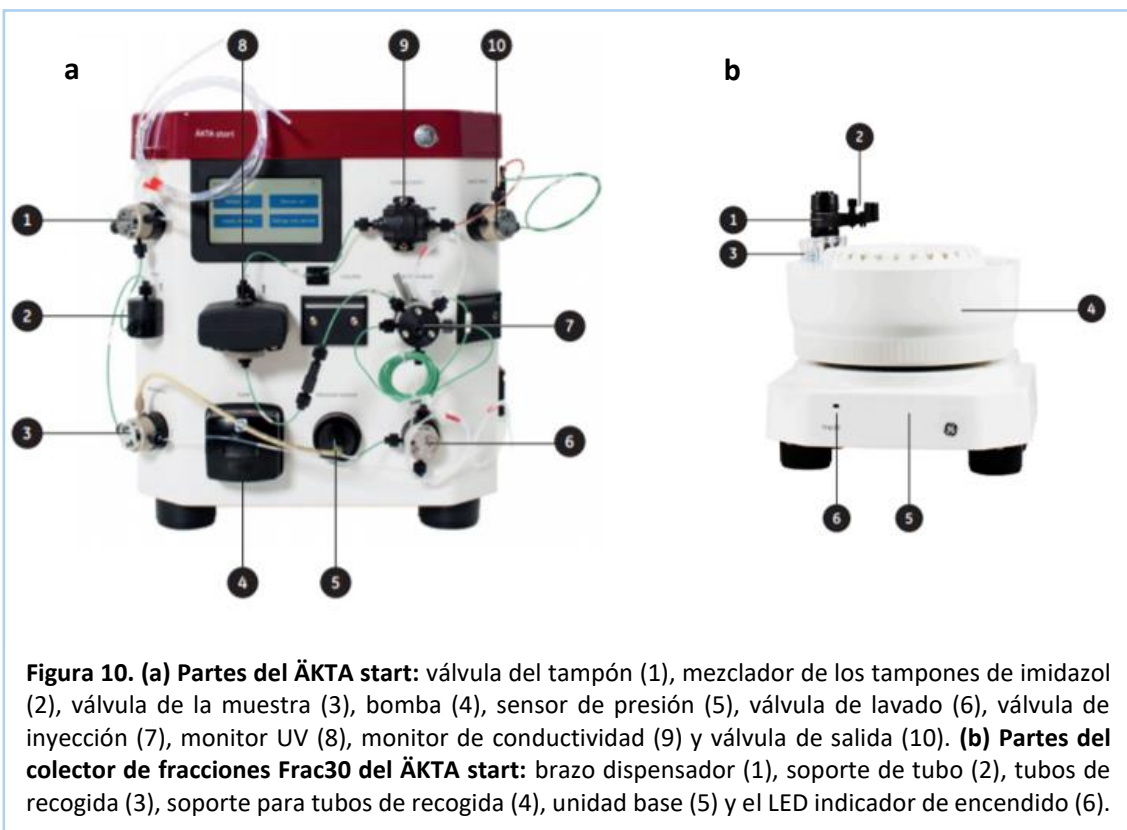
Cuando se aspira la muestra y pasa por la columna, las colas de histidina que contiene la proteína recombinante, se unen a las resinas de níquel que contiene la columna, quedando así, la proteína retenida a la columna. Una vez insertada la muestra, se inician 20 volúmenes de gradiente imidazol, en los cuales, en cada volumen se aumenta la concentración mediante el tampón de 20 mM y de 400 mM de imidazol. El gradiente se inicia con el tampón 20 mM como punto de partida, y a continuación, se acciona el tampón 400 mM de imidazol junto al 20 mM; elevando así en cada volumen de gradiente, la concentración de imidazol.

El imidazol es un buen competidor contra las histidinas, para la unión de la columna de níquel. En un momento dado, durante el gradiente de 20 volúmenes, la concentración de imidazol es tan elevada, que la fuerza de unión entre la cola de histidinas y los iones metálicos de níquel se ve alterada por una concentración elevada de imidazol, que evita la unión de las proteínas marcadas con His a la columna de níquel. Es decir, que provoca la elución de la proteína marcada con His, que será observada en absorbancia U.V, fraccionada, y analizada con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

En la cromatografía de afinidad con columnas HisTrap HP, las columnas estaban hechas de polipropileno biocompatible y estaban rellenas de Níquel sefarosa de alto rendimiento, que son unas resinas de agarosa altamente reticuladas a las que se le ha inmovilizado un grupo quelante. A esta matriz quelante se le agregó el ion metálico níquel (Ni^{2+}). El níquel generalmente es el ion metálico de primera elección para purificaciones de proteínas recombinantes marcadas con etiqueta His.



Estas columnas precargadas con iones metálicos Ni²⁺ generalmente son las elegidas para las purificaciones de proteínas etiquetadas con His recombinantes, juntamente con el imidazol como solución para hacer las eluciones, ya que, aumenta la selectividad de His en IMAC. El imidazol también es usado para el tampón de la muestra y como tampón de lavado en la purificación, para aumentar la selectividad de las proteínas marcadas con His en IMAC.



3.5 Electroforesis SDS – PAGE

El método de la electroforesis SDS-PAGE con gel de poliacrilamida de 12.5 %, es una técnica para separar moléculas basándose en sus propiedades, tamaño, forma y punto isoeléctrico (ver punto 9.1 del anexo protocolos). Se llevó a cabo en varias ocasiones a fin de poder comprobar y confirmar la buena práctica de la extracción de la proteína DXR de *P. falciparum*, en su expresión, en la diálisis y en la purificación de la proteína. También se realizó una electroforesis SDS-PAGE para llevar a cabo la técnica del Western Blot.

3.6 NanoDrop

El NanoDrop es un espectrofotómetro de UV visible de espectro completo, utilizado generalmente para cuantificar y evaluar la pureza de ADN, ARN, y proteínas. Solo se cuantificaron aquellas fracciones seleccionadas en la purificación, por su elevada pureza.

Las cuantificaciones se obtuvieron mediante la absorbancia A260/280 de la muestra con un espectrofotómetro de micro volumen. Se pipetearon 2 µl de imidazol para realizar el blanco, y seguidamente se midieron las muestras dispensando 2 µl de cada una.

3.7 Desalación y concentración

La desalación, intercambiando el tampón de las muestras, se llevó a cabo con el objetivo de sacar las sales, el imidazol y adherir un mejor tampón que otorgase más estabilidad a la muestra, frente a métodos como la concentración.

Para desalar y concentrar las muestras, se usaron los dispositivos Amicon® Ultra-4 10K. Los dispositivos Amicon Ultra-4 10K contienen una estructura con un dispositivo de filtro dentro de un tubo de centrifuga de 15 ml, que le proporciona una ultrafiltración rápida con una alta capacidad para una concentración estimada de casi 80 veces superior.

La desalación, concentración e intercambio de tampón, se llevó a cabo agregando la muestra en el tubo Amicon® Ultra-4. Seguidamente se centrifugó a 4.000 G durante 15 minutos, luego se descartó la solución contenida dentro del tubo de centrifuga y se agregó PBS 1X como nuevo tampón sin sales contenidas. Después se volvió a centrifugar a 4.000 G durante 15 minutos y se volvió a descartar la solución contenida en el tubo, filtrada por la membrana contenida. A continuación, la muestra concentrada en el dispositivo de filtro, se recolectó mediante una micropipeta. Finalmente, se cuantificó la muestra con micro BCA para verificar el aumento de concentración y comprobar si había funcionado la técnica. A las muestras de proteína DXR, se les agregó glicerol y cloruro de manganeso, para mantenerlas más estables y evitar que precipitasen.

3.8 Cuantificación proteica

Mediante el método *Pierce BCA Protein Assay Kit de Thermofisher Scientific*, se cuantificaron las concentraciones de las muestras mediante una recta patrón con PBS 1X.

El micro BCA se realizó en una placa de 96 pozos transparentes, dónde se insertaron los siguientes volúmenes:

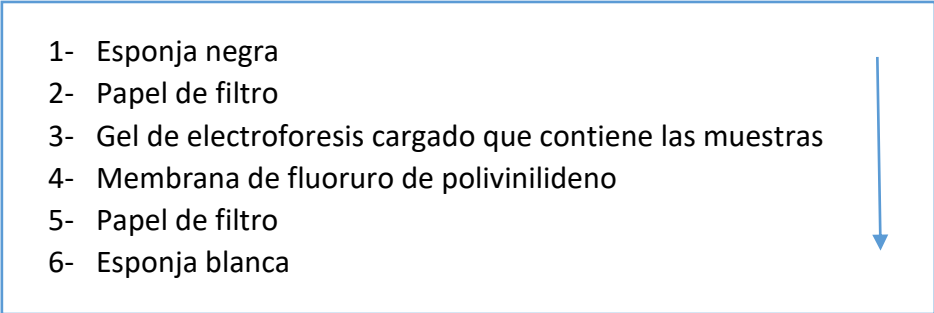
- i. Blanco 1: 5 μ L de BSA + 20 μ L de PBS 1X
- ii. Blanco 2: 5 μ L de imidazol + 20 μ L de PBS 1X
- iii. Muestras: 5 μ L de muestra proteína + 20 μ L de PBS 1X

Seguidamente en cada pozo llenado, se adicionaron 200 μ L de la solución de trabajo BCA (resultado de mezclar un reactivo A 50x junto a un diluyente B), y se llevó a incubar a 60 ° C durante 30 minutos, para después medir la absorbancia. El resultado se obtuvo con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Posteriormente se analizó y cuantificó mediante la recta patrón.

3.9 Western Blot

El Western Blot es una técnica crucial en la biotecnología, biología molecular y celular, para la identificación de proteínas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas extraídas de células como control.

Para realizar el western blot primero se hizo una electroforesis SDS-PAGE de gel de poliacrilamida de 12.5%, dónde se cargaron como muestras, los controles positivos y negativos, la fracción insoluble, los flujos de solubilización y aislamiento, y sus purificaciones. La electroforesis se hizo a 80 V durante 20 minutos, y seguidamente a 120 V durante hora y media. Una vez cargado el gel, se preparó el western blot colocando los componentes en forma de sándwich para la transferencia, estructurado de la siguiente manera:

- 1- Esponja negra
 - 2- Papel de filtro
 - 3- Gel de electroforesis cargado que contiene las muestras
 - 4- Membrana de fluoruro de polivinilideno
 - 5- Papel de filtro
 - 6- Esponja blanca
- 

En el momento de crear el sándwich, se procuró no dejar burbujas entre el gel y la membrana. El sándwich se realizó dentro de un tampón de transferencia que contenía 250 mM de Tris y 1.92 M de glicina, para que todo se humidificara. Una vez montado el sándwich para western blot, se carga en el aparato de transferencia a 4 ° C con agitación, con un tampón de transferencia 1X preparado, que contiene una solución de transferencia 1X (Tris y glicina), metanol, SDS (dodecilsulfato sódico) y H₂O milli-Q. El sándwich se cargó a 100 mA durante 10 minutos y se dejó cargando a 400 mA toda la noche.

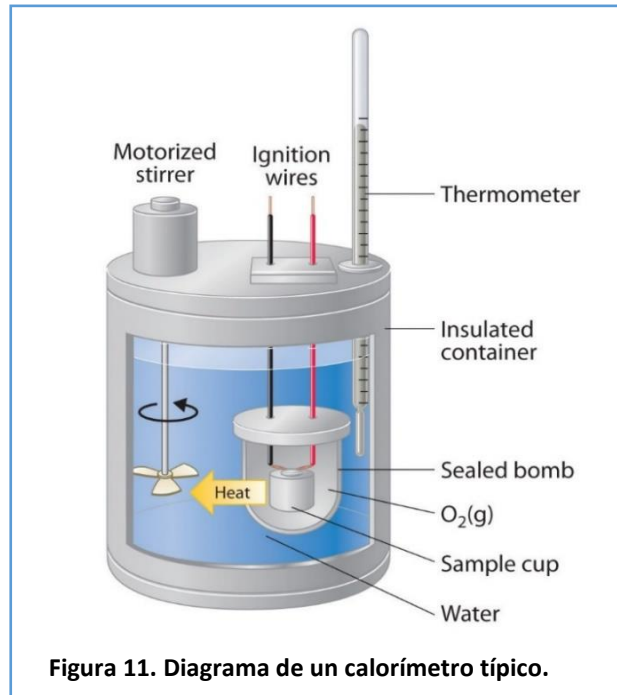
A continuación, al día siguiente se procedió a extraer la membrana del sándwich, comprobando si la transferencia fue exitosa, para pasar a realizar el bloqueo de la membrana con una solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% p/v en PBS – Tritón 1% v/v) durante toda la noche a 4 ° C con agitación. Al siguiente día se lavó la membrana 3 veces con PBS 1x – Tritón 1%, y se incubó con un anticuerpo primario monoclonal anti his-tag durante 2 horas a 4 ° C. Una vez desbloqueados los sitios de unión inespecíficos de las proteínas, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x – Tritón 1% y agitación, para retirar los anticuerpos no unidos y el exceso de proteína de bloqueo. Luego se prosiguió incubando la membrana con un anticuerpo secundario anti Rabbit (HRP) contenido en un medio de leche en polvo 5% p/v en PBS 1x – Tritón 1% v/v, durante 1 hora en agitación. Seguidamente, se realizaron tres lavados más de 5 minutos para descartar los anticuerpos que no se hubieran unido y el exceso de anticuerpo presente, y se procedió a revelar con ECL 1:1 (proporción de A y B proporcionada) a oscuras antes de realizar la fotografía con ImageQuant LAS 4000.

Estos anticuerpos secundarios están conjugados con la enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP). La HRP produce una quimioluminiscencia en contacto con el reactivo Immobilon Classico Western HRP Substrate, que queda reflejada en la membrana de manera fluorescente en la oscuridad, y queda impresa en las fotografías realizadas por ImageQuant de GE Healthcare Life Sciences.

3.10 Calorimetría (ITC)

La calorimetría es una técnica que analiza las reacciones químicas de las interacciones de proteínas a través de la medición del calor que se libera en los cambios de energía. La capacidad térmica o calorífica específica (J·K⁻¹) es la cantidad de energía térmica (J) necesaria para el aumento de la temperatura de 1 gramo de un elemento a 1 Kelvin (1 grado Celsius).

El agua es el elemento que la calorimetría utiliza absorbiendo el calor que el agua absorbe, para medir los cambios de energía de las reacciones químicas, gracias a la capacidad que tiene el agua para absorber el calor, ya que, tiene una capacidad calorífica específica inusualmente alta.



El calorímetro, mediante el uso de una masa conocida de agua, calcula automáticamente todo el calor liberado en la reacción. Este cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$\Delta H = -mC \cdot \Delta T$$



ΔH = calor liberado (J)

m = masa de agua en calorímetro (kg)

C = capacidad calorífica específica del agua ($4,18 \times 10^3 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

ΔT = aumento de la temperatura del agua en calorímetro (K)

La técnica de la calorimetría se llevó a cabo con el objetivo de analizar si la proteína DXR de *P. falciparum* obtenida purificada, podía interactuar con aptámeros contra la DXR de *P. falciparum* desarrollados anticipadamente por el grupo de nanomalaria en los laboratorios de IBEC. También mediante la calorimetría, se puede caracterizar la interacción, ya sea exotérmica o endotérmica.

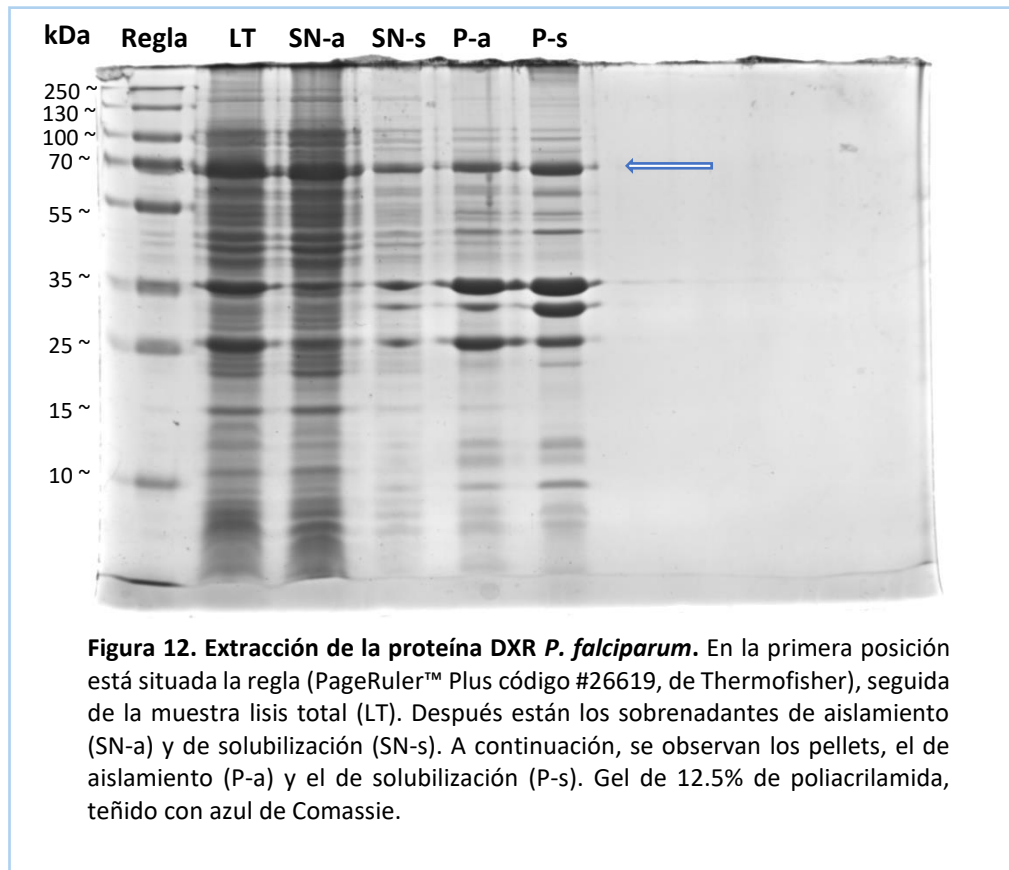
Para realizar una calorimetría (ITC), primero se lava el calorímetro y a continuación, se adiciona la muestra que contiene la proteína DXR con medio PBS 1X, con una jeringa. Paralelamente se adiciona de manera escalonada la solución de aptámeros en una celda calorimétrica de reacción. Entonces se desencadena la posibilidad de la reacción de unión, que llega al sistema a través de una secuencia de estados de equilibrio. Después

se realiza otra calorimetría con la proteína y su medio PBS 1X, para asegurar que el PBS 1X no interacciona con la proteína DXR de *Plasmodium falciparum*.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de la expresión de proteína DXR de *P. falciparum* en la extracción de la fracción insoluble

En la extracción de la proteína DXR de *P. falciparum* a partir de la fracción insoluble, era necesario comprobar si en los cultivos resultado de la extracción, cultivo de aislamiento y cultivo de solubilización, teníamos expresión de proteína DXR de *P. falciparum*. Para confirmar la expresión de la proteína se realizó una electroforesis SDS-PAGE de gel de poliacrilamida de 12.5 %, dónde se insertaron 20 μ L de cada muestra.



En la Figura 12, observamos que si tenemos banda de expresión de la proteína recombinante DXR de *P. falciparum* (~76.8 kDa) en todas las muestras, y que tenemos más intensidad en la banda de la muestra del sobrenadante de aislamiento. Es coherente encontrar más concentración de proteína en el sobrenadante de aislamiento que en el de solubilización. Porque la muestra de solubilización se obtuvo a partir del

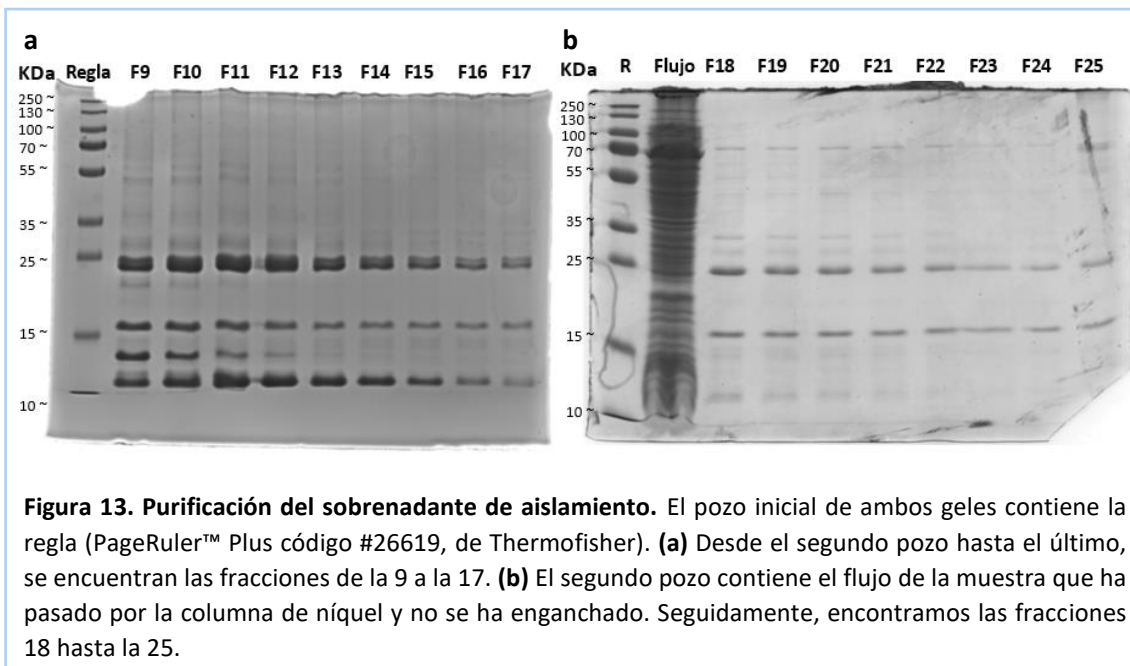
pellet de aislamiento, por tanto, tiene una centrifugación y un tampón más, y entonces, contiene menos concentración de proteínas en el sobrenadante.

4.2 Análisis de la pureza de la proteína DXR *P. falciparum*

Para poder obtener la proteína DXR de *P. falciparum* purificada, se realizó una cromatografía de afinidad de columna con las muestras de solubilización (urea 6 M) y aislamiento (urea 2 M). Para que la purificación fuese eficiente en la elución de la proteína DXR marcada con histidinas, era imprescindible realizar una diálisis previamente, ya que, para que la cola de histidinas se enganchara a la columna de níquel en la purificación, la proteína debía estar replegada. Y para poder replegar la proteína, se eliminó a través de una diálisis (ver punto 3.3) toda la urea posible contenida en la proteína. Pero, en vista de la elevada cantidad de proteínas inespecíficas en nuestras muestras (sobrenadante de aislamiento y solubilización), se procesó una purificación previa para limpiar la muestra de las proteínas de fondo.

4.2.1 Primera purificación

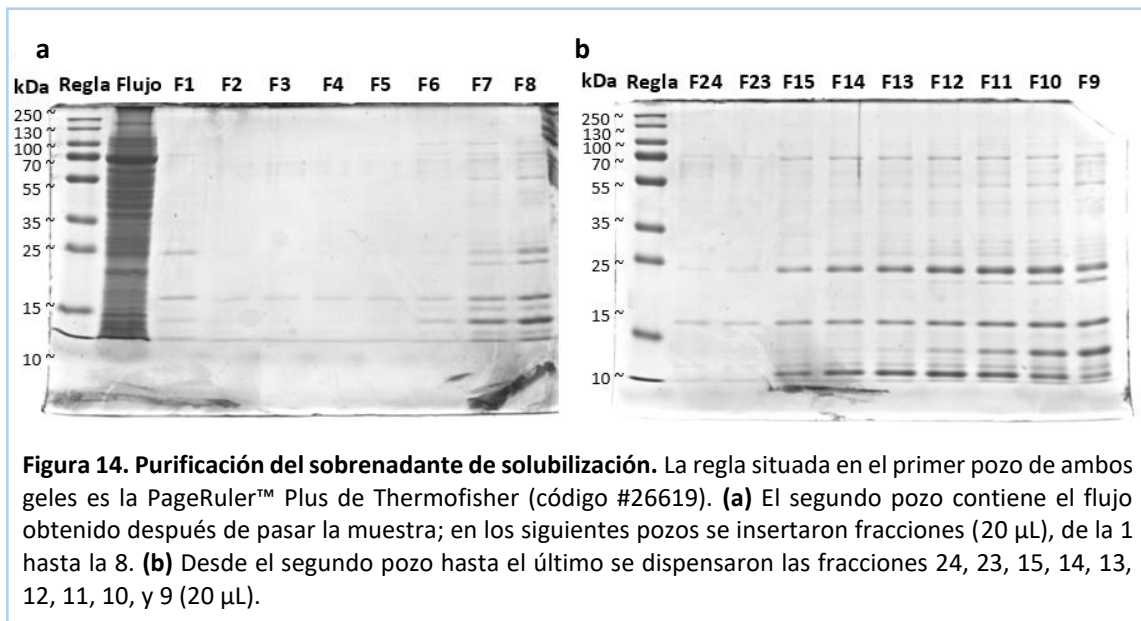
Para determinar si en la primera purificación realizada sin diálisis, se habían limpiado las proteínas que interferían, se realizaron 2 geles de electroforesis SDS-PAGE de 12.5 % que contenían 30 fracciones con las proteínas eluidas de la columna de níquel. En cada pozo del gel de poliacrilamida, se insertaron 20 μ L de muestra.



Mediante la observación de la absorbancia con UV de las fracciones con las proteínas eluidas, se decidió coger muestra de fracción a partir de la 9 hasta la fracción 25, ya que, en las siguientes fracciones, no se contempló ningún aumento de absorbancia.

Cómo podemos observar en la Figura 13, la muestra de aislamiento sí se pudo limpiar, se descartaron proteínas de diferentes pesos moleculares que interferían en la expresión de nuestra proteína DXR de *P. falciparum*. También confirmamos que no se identificaba la banda de nuestra proteína recombinante DXR (~76.8 kDa) en las primeras fracciones, pero sí que en las siguientes fracciones se presentaba la banda de nuestra proteína DXR en baja intensidad, junto con otras bandas de proteínas. La poca y baja concentración de la banda de proteína recombinante DXR, es debido a que la proteína no está del todo plegada y, por tanto, gran parte no pudo engancharse en la columna de níquel, y entonces, atravesó la columna junto el resto de muestra. Por este motivo, vemos gran cantidad de la proteína en el flujo de la muestra.

En la purificación realizada del sobrenadante de solubilización, también fueron descartadas parte de las proteínas de fondo que interferían en la purificación de nuestra proteína de interés DXR (Figura 14). Y del mismo modo que en la purificación anterior (Figura 13), la mayor parte de la proteína se presentaba en el flujo obtenido del pase de la muestra, porque no se había pegado a la columna de níquel debido a que no estaba plegada.



En la Figura 14, se observa en comparación a la purificación del sobrenadante de aislamiento (Figura 13), cómo la cantidad de proteínas presentes en cada fracción es menor. Esto se debe al motivo comentado anteriormente, que el sobrenadante de solubilización contiene menor cantidad de proteína porque se obtuvo después de centrifugar el pellet de aislamiento.

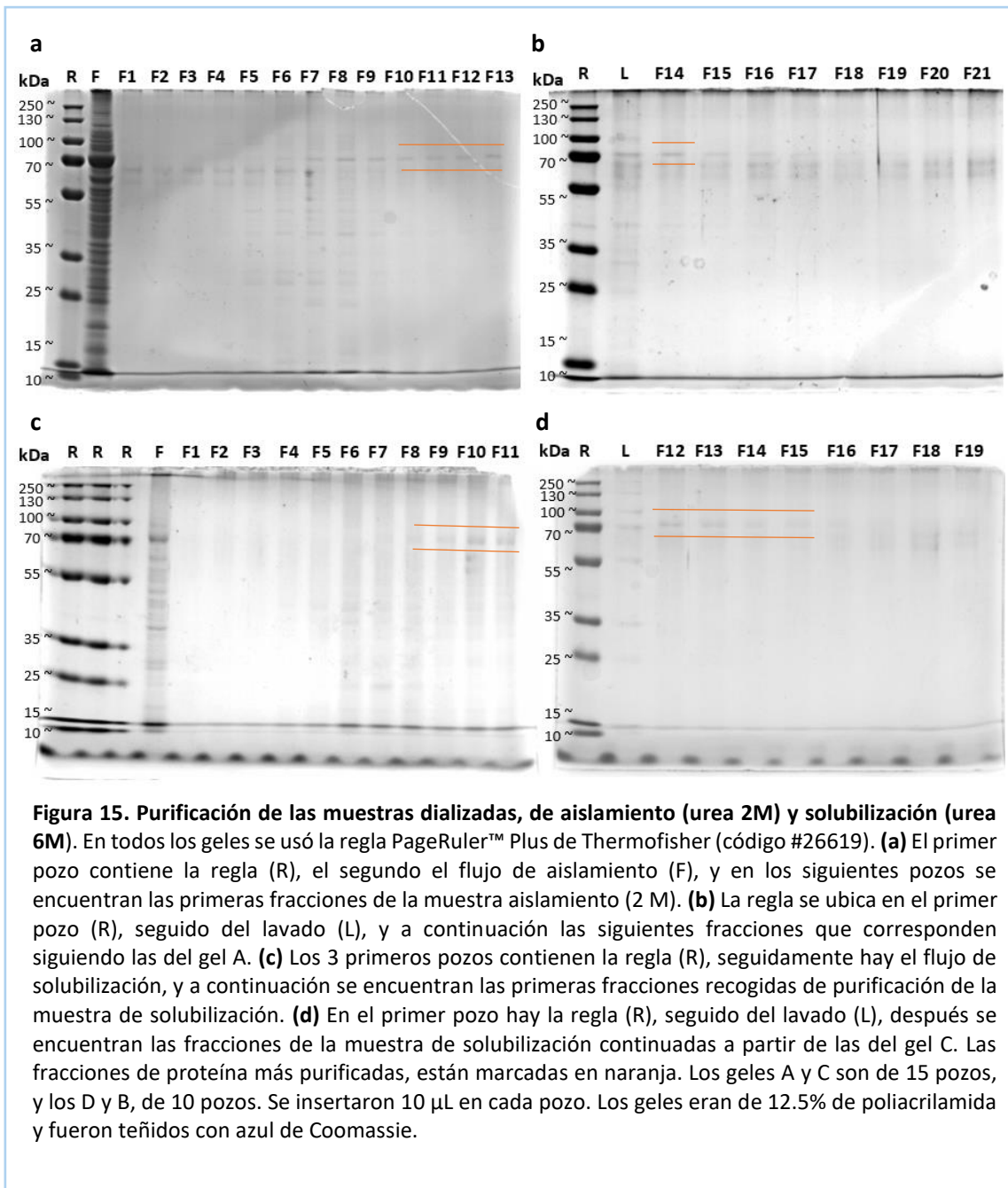
4.2.2 Segunda purificación

En la segunda purificación realizada, después de hacer una diálisis de las muestras (Figura 16), se observó en algunas fracciones, que se consiguió la proteína DXR de *P. falciparum* purificada en aproximadamente casi un 95 % (Figura 15).

Condiciones purificación:

- i. Absorción final: 255.2 mAU
- ii. Conductividad: 38.5 ms/m
- iii. Tasa de flujo: 1.0 mL/min

De la purificación, a partir de una electroforesis SDS-PAGE de gel de poliacrilamida 12.5 %, se seleccionaron las fracciones de proteína más purificadas, sin otras bandas de proteína, para desalarlas y concentrarlas, para poder realizar una calorimetría.



Las fracciones seleccionadas en la muestra de aislamiento (urea 2 M) fueron la 10, 11, 12, 13, y 14. Y las fracciones elegidas como más purificadas en la muestra de solubilización (urea 6 M) fueron la 9, 10, 11, 12, 13, 14, y 15. Estas fracciones que contenían la proteína expresada se combinaron para concentrar la proteína para cuantificarla y analizar su posible interacción con aptámeros mediante la calorimetría.

4.3 Análisis de la diálisis

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de gel de poliacrilamida 12.5%, para comprobar la eficacia de la diálisis, observando la cantidad de proteína DXR expresada, ya que, la diálisis es una técnica delicada, donde toda nuestra proteína puede precipitar fácilmente, al reducir la cantidad de urea en el medio. Para ver si las muestras dializadas habían precipitado, se centrifugaron, y se obtuvo el pellet y sobrenadante de cada muestra para hacer una electroforesis SDS-PAGE (Figura 16) y ver si aún teníamos proteína solubilizada en el sobrenadante.

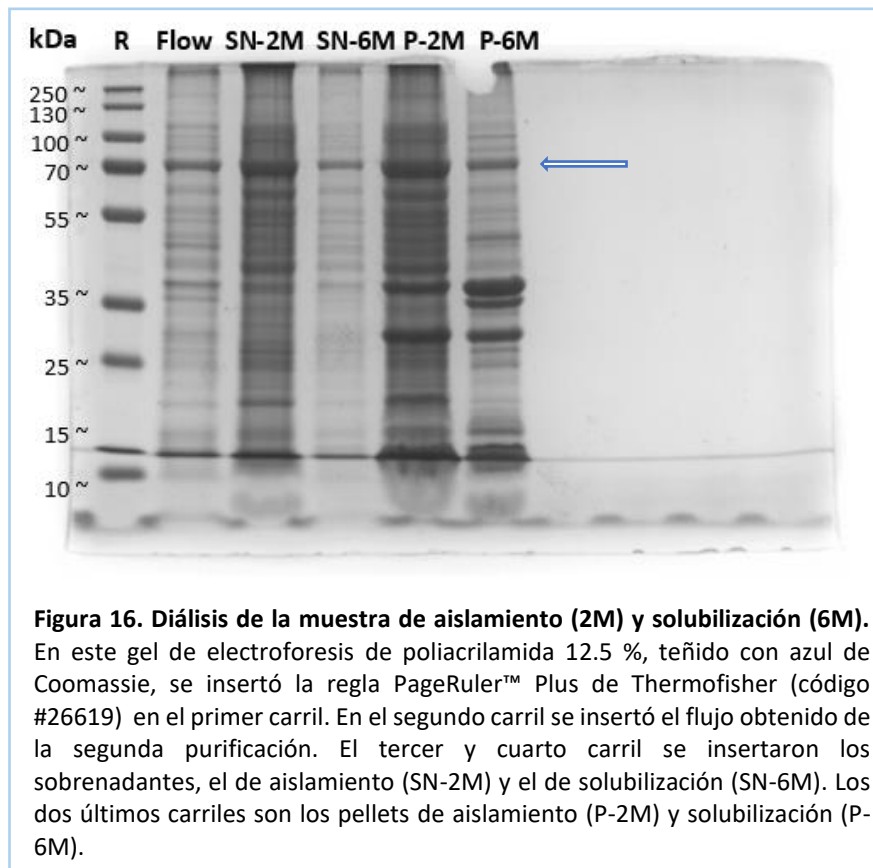


Figura 16. Diálisis de la muestra de aislamiento (2M) y solubilización (6M). En este gel de electroforesis de poliacrilamida 12.5 %, teñido con azul de Coomassie, se insertó la regla PageRuler™ Plus de Thermofisher (código #26619) en el primer carril. En el segundo carril se insertó el flujo obtenido de la segunda purificación. El tercer y cuarto carril se insertaron los sobrenadantes, el de aislamiento (SN-2M) y el de solubilización (SN-6M). Los dos últimos carriles son los pellets de aislamiento (P-2M) y solubilización (P-6M).

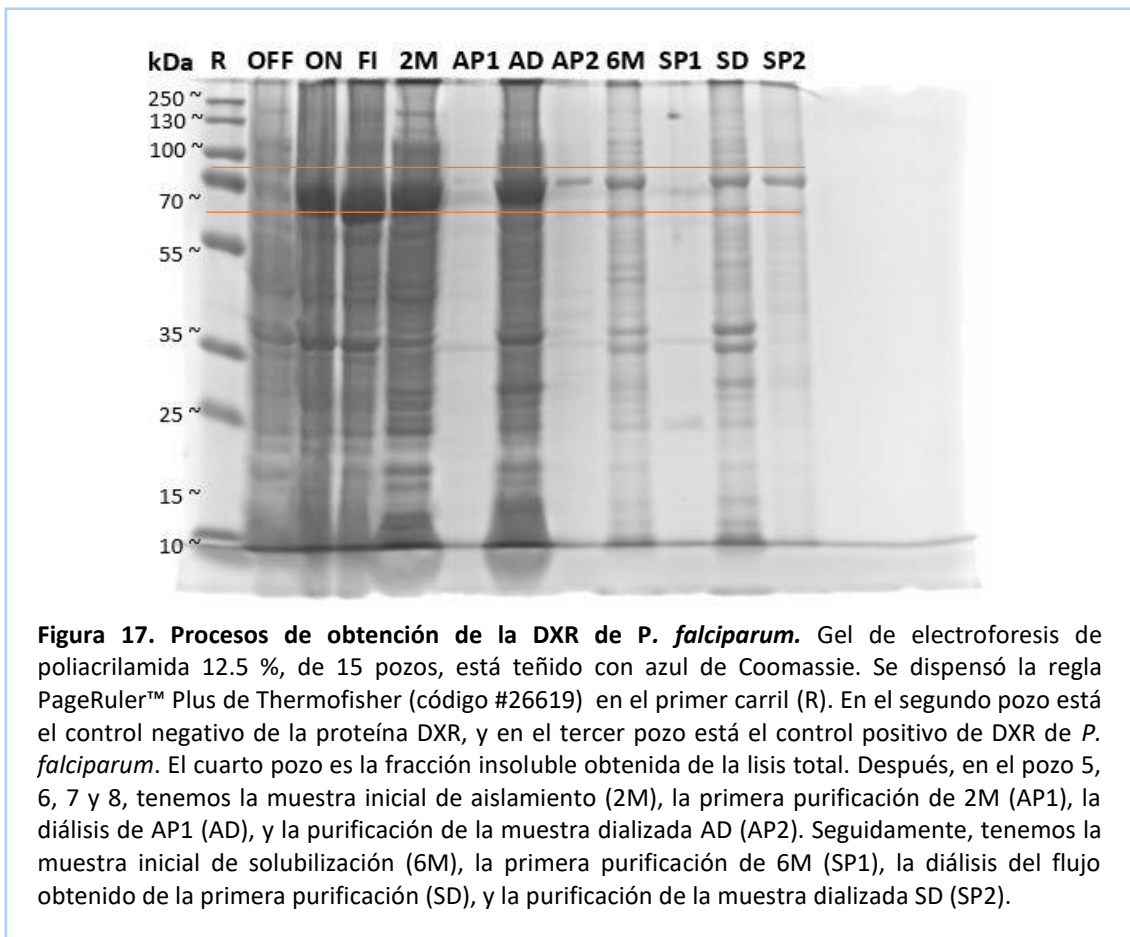
La diálisis se realizó después de la primera purificación, para quitar toda la urea contenida en su medio y volver a tener la proteína plegada, para que así la proteína se una a la columna de níquel en la segunda purificación.

Cómo podemos observar en la Figura 16, seguimos teniendo expresión de la banda DXR de *P. falciparum* (~76.8 kDa) en el sobrenadante, no se ha precipitado toda la proteína, pero un poco sí, por ese motivo vemos presente la banda de la proteína en los pellets.

En la figura 16, también se sigue viendo más intensa la banda de la proteína recombinante DXR en el sobrenadante de aislamiento (SN-2M), que en el sobrenadante de solubilización (SN-6M), porque la cantidad de proteína en SN-2M es mayor.

4.4 Análisis del proceso de obtención de DXR *P. falciparum*

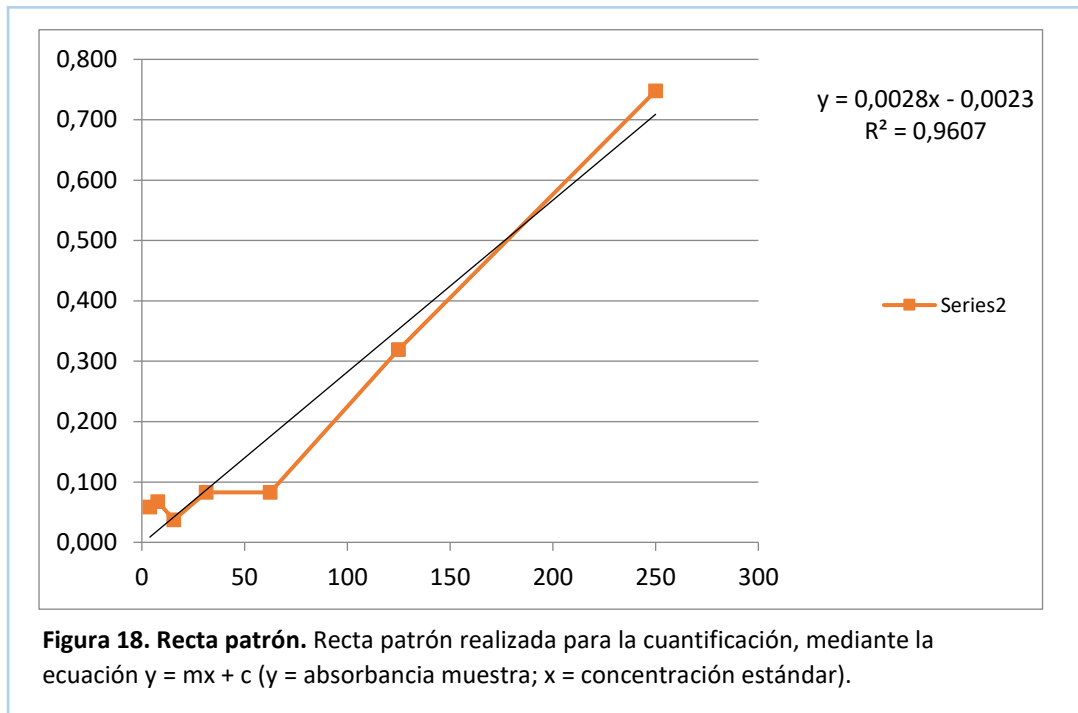
Una vez realizado todo el proceso de obtención de proteína, se realizó una electroforesis de gel de poliacrilamida 12.5 % para contemplar y comprobar la expresión continuada de la proteína DXR de *P. falciparum* durante todos los procesos.



En la Figura 17 se observa la banda de expresión de nuestra proteína de interés DXR de *P. falciparum*. Aun así, contemplamos que la banda de control positivo de DXR (ON) es muy ancha e intensa. Esto es debido a la gran cantidad de proteína que contiene, y a que en el momento de la electroforesis se dispuso demasiada cantidad, se debió poner menor cantidad que el resto de las muestras.

4.5 Cuantificación proteica mediante BCA

En la Tabla 6, podemos observar las concentraciones finales obtenidas, de las fracciones de proteína de la muestra de aislamiento (2M) y la muestra de solubilización (6M), purificadas y concentradas. Se consiguió tener suficiente cantidad de proteína para realizar la calorimetría.



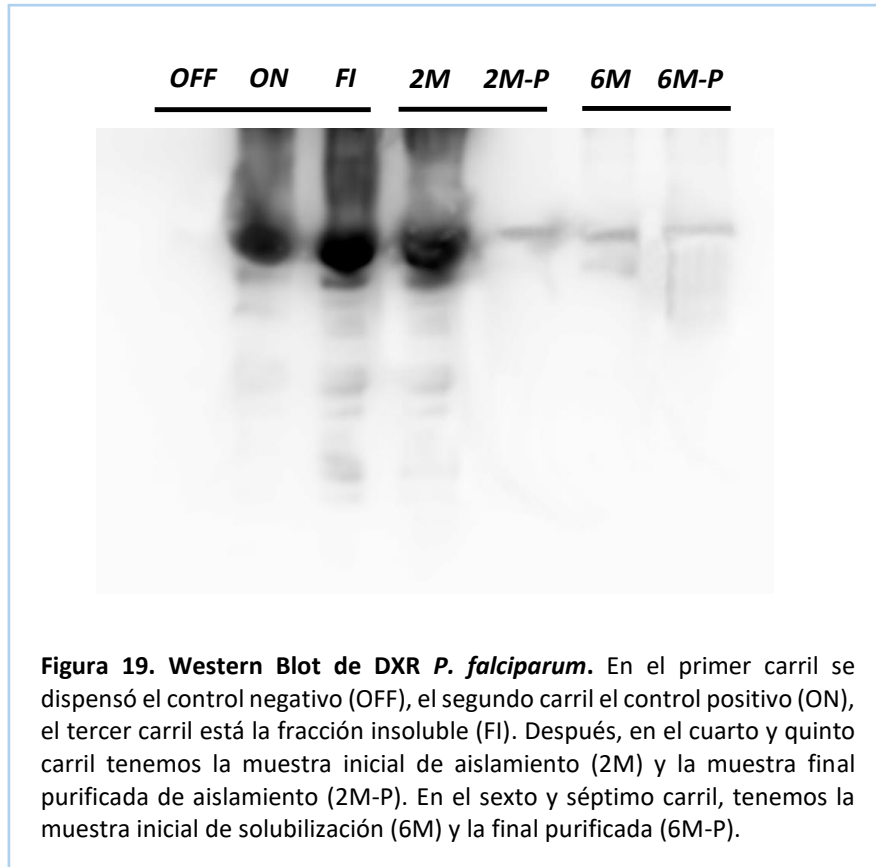
Cuantificación proteína DXR	
BCA	
Fracciones 6M: 12, 13, 14, 15	0.115 mg/mL
Fracciones 6M: 9, 10, 11	0.265 mg/mL
Fracciones 2M: 13, 14	1.260 mg/mL
Fracciones 2M: 10, 11, 12	0.048 mg/mL

Tabla 6. (a) Medida de las concentraciones de proteína. Se cuantifica la concentración de proteína después de concentrarla, mediante el método BCA.

En la Figura 18, podemos ver la recta patrón realizada para poder calcular la concentración proteica de las muestras. Se hizo la curva patrón con la ecuación de regresión lineal $y = 0.0028x + 0.0023$, obteniendo una $R^2 = 0.9607$.

4.6 Western Blot

Para confirmar que la proteína obtenida y purificada, es realmente la DXR de *P. falciparum*, era necesario identificarla. Se realizó un Western Blot para lograr identificar nuestra proteína mediante la identificación de his-tag.



En la Figura 19 se puede observar la presencia de señal específica a la his-tag de la proteína DXR de *P. falciparum*.

4.7 Calorimetría

La calorimetría fue realizada con el fin de determinar si la proteína DXR de *Plasmodium falciparum* podía interaccionar con los aptámeros desarrollados previamente contra esta proteína.

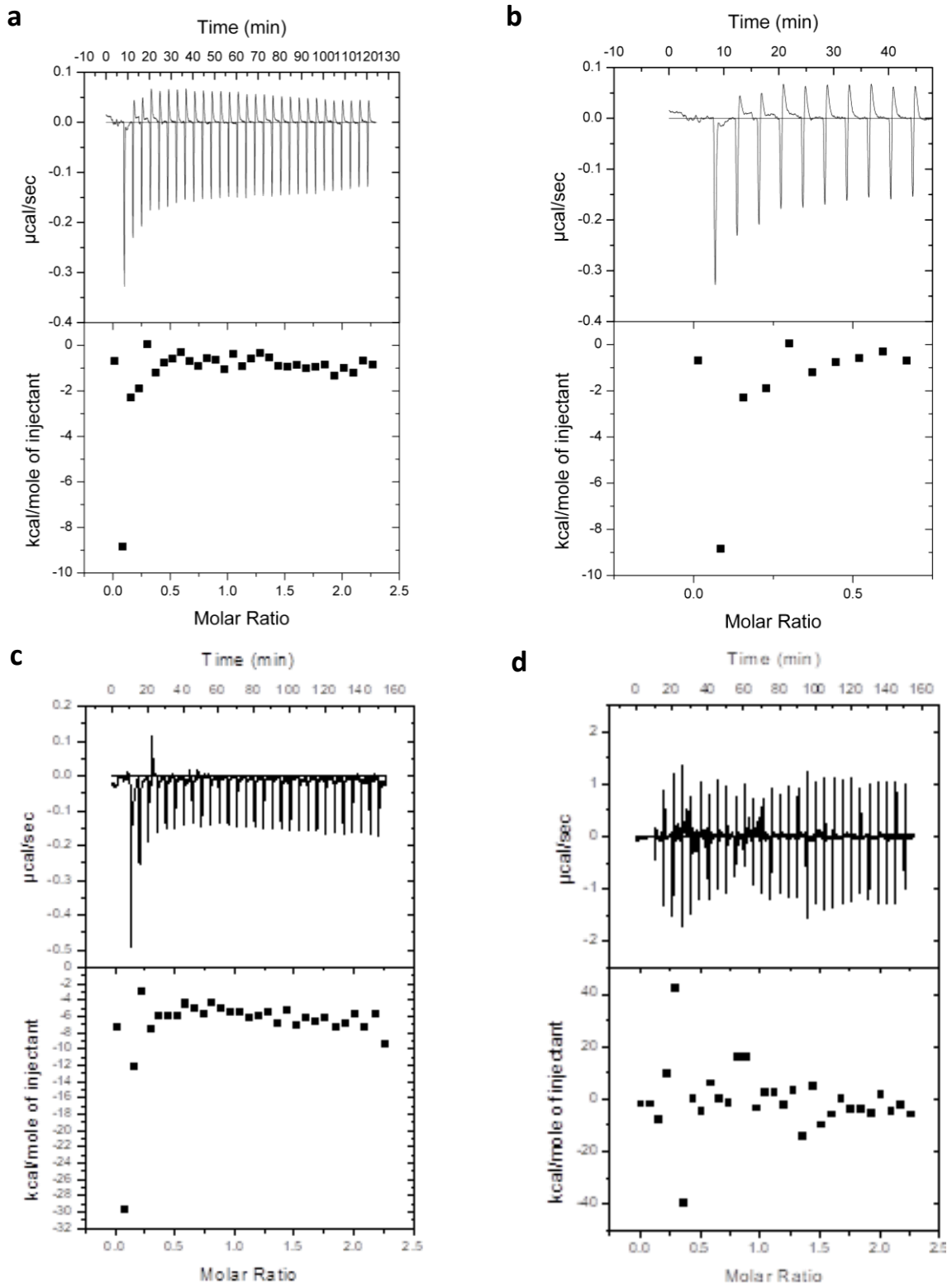


Figura 20. Calorimetría (ITC) con la proteína y aptámeros contra la DXR de *P. falciparum*. (a) Primer ensayo de calorimetría: 0.005 mM de DXR (celda) y 0.05 mM aptámeros (jeringa). (b) Primeras 10 inyecciones del ensayo (a). (c) Segundo ensayo calorimetría: 0.01 mM de DXR (celda) y 0.1 mM aptámeros (jeringa). (d) Primer ensayo control con la proteína DXR y el tampón PBS.

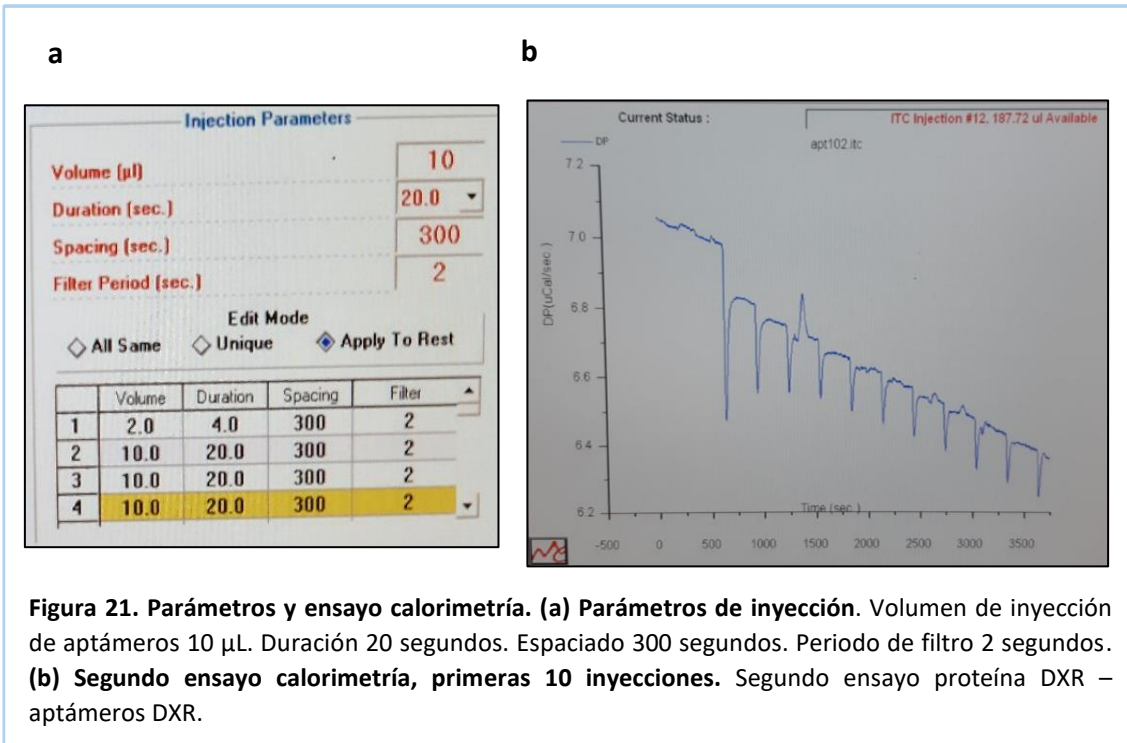


Figura 21. Parámetros y ensayo calorimetría. (a) Parámetros de inyección. Volumen de inyección de aptámeros 10 µL. Duración 20 segundos. Espaciado 300 segundos. Periodo de filtro 2 segundos. **(b) Segundo ensayo calorimetría, primeras 10 inyecciones.** Segundo ensayo proteína DXR – aptámeros DXR.

Parámetros experimentales	
Inyecciones totales	10 µL
Temperatura celular	25 ° C
Referencia línea de base	10 µCal/seg
Retraso inicial	300 seg
Concentración jeringa	0.1 mM
Concentración celular	0.01 mM
Velocidad de agitación	300

Tabla 7. Parámetros experimentales de la calorimetría.

Observando la Figura 20, vemos que a diferencia del primer ensayo que muestra interacción dudosa debido a una segunda señal en la gráfica, posiblemente a una desnaturalización de la proteína, por ello, se hicieron ensayos de estabilidad de la proteína y se escogió como tampón, PBS 1X, para el segundo ensayo. Por otro lado, el segundo ensayo sí se evidenció la señal de interacción del aptámero con la proteína DXR, logrando un aumento de intensidad de señal. Aun así, no se obtuvieron suficientes puntos para obtener la constante de disociación (Kd).

En el segundo ensayo (Figura 21) no se recuperó la línea de base programada como 10 µCal/sec, solo se alcanzó 6.8 µCal/sec, esto puede ser debido a un fallo técnico del equipo o mantenimiento. Con los ensayos de calorimetría realizados, se puede determinar que la reacción entre aptámero y proteína DXR de *Plasmodium falciparum*,

es de tipo exotérmica, ya que, las señales de interacción evidenciadas corresponden a una interacción exotérmica, aunque no es muy intensa, por ese motivo, no se pudo obtener la constante Kd.

El siguiente paso correspondería a realizar un segundo control blanco, evaluando si hay interacción entre el aptámero DXR de *P. falciparum* y el tampón PBS. Seguidamente se debería realizar otro ensayo con la enzima GST y la proteína DXR de *P. falciparum*, para verificar si la interacción del segundo ensayo realizado era realmente una interacción por parte de la proteína DXR, y no de la enzima GST.

5. DISCUSIÓN

Durante el procedimiento de la expresión y obtención de la proteína DXR de *Plasmodium falciparum* a partir de la extracción de la fracción insoluble del cultivo *E. coli*, se presenciaron diversas dificultades. Al estar la mayor parte de la proteína DXR en la fracción insoluble, agregada a cuerpos de inclusión; se decidió obtener la proteína a partir de esta fracción, aunque fuese difícil su obtención y purificación. Porque en esta fracción hay una elevada cantidad de proteínas en gran concentración, comparado con la fracción soluble que solo contiene una concentración del 1% de proteína.

El problema de la fracción soluble, además de tener poca concentración de proteína, era la inestabilidad de la proteína, propensa fácilmente a la lisis. Alternamente, el tampón usado para solubilizar la proteína insoluble DXR, contenía factores como el DTT, que también desnaturalizaban la proteína. Otra dificultad añadida era la ubicación de la enzima DXR, porque es una proteína de la vía del MEP que se encuentra en el lumen del apicoplasto, por tanto, es difícil expresar la enzima DXR de *Plasmodium* en *E. coli*⁵⁵.

Pese a las dificultades encontradas para expresar la proteína en la bacteria *E. coli*, la decisión de expresar la proteína DXR de *Plasmodium* en la bacteria *E. coli* era correcta, ya que, esta bacteria era de elevada recomendación, descrita por varios artículos como *Veladi y col.*, que concluyeron que *E. coli* era, en efecto, un sistema de expresión adecuado para proteínas Apicomplexa, incluidas las de *Plasmodium*⁵⁶.

En la primera purificación, debido a que la proteína se encontraba en presencia de la urea, no se habría enganchado en la resina de la columna de níquel, por tanto, habría traspasado la columna y estaría en el flujo de la muestra. Afortunadamente, se verificó la presencia de la proteína expresada en el flujo de la primera purificación. Entonces, en la primera purificación, nuestra proteína DXR, no se enganchó en la columna porque no estaba plegada. Aun así, fue útil la purificación previa a la diálisis para poder eliminar gran parte de proteínas que interferían a la expresión de nuestra proteína DXR. Asimismo, en la diálisis, y en la purificación procesada después de la diálisis, también se filtró y se limpió la muestra de proteínas que interferían en la purificación de DXR.

La proteína recombinante marcada con histidina se purificó en un solo paso usando la cromatografía de columna de afinidad. Esta purificación es diferencialmente mejor que otros métodos de purificación de proteínas recombinantes sin la etiqueta de la histidina, que suelen durar días ⁵⁷.

De las fracciones obtenidas en la segunda purificación, pocas se seleccionaron, las que mostraban presencia de la proteína DXR más limpia en las electroforesis SDS-PAGE realizadas.

Todos los procesos realizados a la proteína (diálisis, purificación, sonicación, solubilización) podían provocar en cierta manera, que una cantidad de la proteína se precipitara; provocando una disminución en su concentración. En general cada paso de la extracción y purificación de las proteínas son críticos, por lo que hay que tener en cuenta puntos como el cambio de temperatura al manipular la muestra, los cambios de tampón, pH, etc. Por ejemplo: en la sonicación, si la muestra no está suficientemente fría y si la aguja no está exactamente centrada en la muestra contenida dentro del tubo falcon, entonces se genera una espuma en la muestra que indica que la proteína se está desnaturalizando ⁵⁸.

Para evitar que la proteína precipitara en gran cantidad, se insertaron complementos como glicerol y cloruro de manganeso (MnCl₂), para estabilizar y mejorar la buena funcionalidad de los procesos a realizar para solubilizar, lisar, plegar, purificar y obtener la proteína ⁵⁹. A conocimiento de la dificultad que suponía obtener esta proteína, se añadió la etiqueta GST como complemento para ayudar a lograr una mayor concentración de la proteína ⁶⁰.

La proteína DXR de *Plasmodium falciparum* purificada, en la calorimetría, mostró una interacción posible con los aptámeros desarrollados previamente en el centro IBEC. Las bajas, pero significativas señales de interacción del segundo ensayo de calorimetría indicaron que la posible reacción de interacción entre aptámero y proteína era exotérmica. Es necesario realizar más ensayos de calorimetría e incluir más controles, tales como el de GST y aptámero, GST y tampón, DXR y tampón, y aptámero y tampón; para poder confirmar que la interacción es realmente entre el aptámero y la proteína.

En el progreso de este proyecto, no se dispuso del tiempo suficiente para poder repetir varios ensayos y métodos, como la repetición del gel de poliacrilamida de electroforesis SDS-PAGE que se realizó para el análisis de todo el proceso de obtención de la proteína, dónde se contemplan las bandas de control y fracción insoluble, un poco distanciadas del peso de 70 kDa, donde se encuentra nuestra proteína. En este proyecto también estaba previsto poder realizar otras técnicas de análisis, como la realización de un ensayo enzimático para verificar si la proteína obtenida era activa.

Para mejorar el protocolo de purificación de la proteína, se podrían probar métodos distintos a la diálisis para conseguir replegar la proteína, ya que, con la diálisis puede precipitar la proteína, y no se suele conseguir que gran parte de la proteína vuelva a plegarse ⁶¹. También para futuros ensayos de calorimetría, se debería asegurar obtener una elevada concentración de la proteína purificada y del aptámero, para poder ir

umentando la concentración de aptámero y proteína, y ver si hay más señal de interacción. También sería sugerente modificar el volumen de inyección de 10 µl de la calorimetría.

6. VISIÓN PERSONAL Y FUTURA

La oportunidad de haber podido realizar este proyecto junto a grandes profesionales del sector de la nanotecnología, bioingeniería, biotecnología y bioquímica, en el grupo de Nanomalaria del IBEC, me ha brindado la oportunidad de aprender nuevos conocimientos en este sector.

En el trabajo realizado junto con Carlota Roca, bajo su supervisión y la de Xavi Fernández Busquets, he comprendido como la nanotecnología es la mejor innovación para poder combatir enfermedades como la malaria provocada por el parásito *P. falciparum* resistente a la mayoría de los fármacos actuales. Los aptámeros son una de las últimas innovaciones dentro de la nanotecnología, que son capaces de reconocer e inhibir proteínas específicas. Pero, para que un aptámero pueda llegar hasta al apicoplasto, el cual es difícil acceder debido a las 4 membranas que rodean el orgánulo, necesita la ayuda de liposomas como la lipofectamina. En el apicoplasto, es donde se encuentra su vía metabólica MEP, imprescindible para su supervivencia. Pero en un futuro, con la generación de nuevos aptámeros eficaces para enzimas de la vía del MEP, podrían inhibir proteínas esenciales para la supervivencia del parásito, y detener así, el desarrollo de la malaria causada por *P. falciparum*. Aun así, considero que es complicado, debido a que el aptámero por sí solo no puede entrar en el apicoplasto e inhibir la proteína.

7. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado la obtención y purificación de la proteína recombinante DXR de *Plasmodium falciparum*, objetivo principal del trabajo.
2. La diálisis resultó ser un método inadecuado para plegar la proteína DXR de *Plasmodium falciparum*, debido a ello, una parte considerable de la muestra de proteína, precipitó durante el proceso de la diálisis.
3. Las purificaciones de His tag efectuadas después de la diálisis, fueron satisfactorias, ya que, se consiguió eluir y fraccionar la proteína DXR de *P. falciparum* marcada con histidinas.

4. La calorimetría evidenció una interacción, que podría corresponderse entre el aptámero desarrollado en los laboratorios de IBEC y la proteína DXR de *Plasmodium falciparum* obtenida
5. El volumen de inyección de aptámero insertado en la calorimetría realizada (10 μ L) y la concentración de proteína DXR de *Plasmodium falciparum* y el aptámero, fueron insuficientes para generar una señal elevada de interacción.
6. Para poder verificar la señal de interacción entre la proteína DXR de *P. falciparum* y el aptámero en la calorimetría, es necesario repetir las calorimetrías e incluir más controles negativos como el control GST y el PBS 1X.

8. REFERENCIAS

1. Gallup, J. L. & Sachs, J. D. The Economic Burden of Malaria. (2001).
2. Lee, H., Halverson, S. & Ezinwa, N. Mosquito-Borne Diseases. *Primary Care - Clinics in Office Practice* vol. 45 393–407 (2018).
3. Van Der Meer, J. Y. & Hirsch, A. K. H. The isoprenoid-precursor dependence of *Plasmodium* spp. *Nat. Prod. Rep.* 29, 721–728 (2012).
4. Foth, B. J. & McFadden, G. I. The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int. Rev. Cytol.* 224, 57–110 (2003).
5. Cova, M. *et al.* The Apicomplexa-specific glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase gene family encodes a key enzyme for glycoconjugate synthesis with potential as therapeutic target. *Sci. Rep.* 8, 1–12 (2018).
6. Oaks SC Jr., Mitchell VS, Pearson GW, Carpenter CCJ, eds. Malaria: Obstacles and Opportunities - PubMed. *Washington (DC): National Academies Press (US);* (1991).
7. Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors* 5, 69 (2012).
8. Spencer, L. M., Mendoza, E. & Louro, A. *Mecanismos de invasión del esporozoíto de Plasmodium en el mosquito vector Anopheles Mechanisms of invasion from sporozoite of Plasmodium into the mosquito vector Anopheles* (2016).
9. York, A. On the origin of *Plasmodium falciparum*. *Nature Reviews Microbiology* vol. 16 393 (2018).
10. Otto, T. D. *et al.* Genomes of all known members of a *Plasmodium* subgenus reveal paths to virulent human malaria. doi:10.1038/s41564-018-0162-2 (2018).
11. Schuster, F. L. Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 355–364

- (2002).
12. Lee, W. C., Russell, B. & Rénia, L. Sticking for a cause: The falciparum malaria parasites cytoadherence paradigm. *Front. Immunol.* 10, 1444 (2019).
 13. Shortt, H. E., Fairley, N. H., Covell, G., Shute, P. G. & Garnham, P. C. C. The pre-erythrocytic stage of plasmodium falciparum: A preliminary note. *Br. Med. J.* 2, 1006–1008 (1949).
 14. Shortt, H. E. & Garnham, P. C. C. Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. *Nature* vol. 161 126 (1948).
 15. Shortt, H. E., Fairley, N. H., Covell, G., Shute, P. G. & Garnham, P. C. C. The pre-erythrocytic stage of plasmodium falciparum. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 44, 405–419 (1951).
 16. Kengne-Ouafo, J. A. *et al.* Immune responses to the sexual stages of Plasmodium falciparum parasites. *Front. Immunol.* 10, (2019).
 17. Bozdech, Z. *et al.* The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* 1, (2003).
 18. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors* vol. 3 5 (2010).
 19. Nilsson, S. K., Childs, L. M., Buckee, C. & Marti, M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathogens* vol. 11 (2015).
 20. Ashley, E. A., Pyae Phyo, A. & Woodrow, C. J. Malaria. *The Lancet* vol. 391 1608–1621 (2018).
 21. Nájera, J. a., González Bueno, A. & Baratas Díaz, A. Malaria Guía didáctica. *Bibl. Nac. España* 006, 42 (2009).
 22. Crompton, P. D. *et al.* Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 157–187 (2014).
 23. Doolan, D. L., Dobaño, C. & Baird, J. K. Acquired immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 22 13–36 (2009).
 24. WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. *World Health Organization* (2015).
 25. Raphemot, R., Posfai, D. & Derbyshire, E. R. Current therapies and future possibilities for drug development against liver-stage malaria. *Journal of Clinical Investigation* vol. 126 2013–2020 (2016).
 26. Lin, J. T., Juliano, J. J. & Wongsrichanalai, C. Drug-resistant malaria: The era of ACT. *Current Infectious Disease Reports* vol. 12 165–173 (2010).
 27. WHO. *World Malaria Report 2019.* (2019).
 28. Gosling, R. & von Seidlein, L. The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. *PLoS Medicine* vol. 13 (2016).

29. Jones, S. *et al.* Naturally acquired antibody responses to recombinant Pfs230 and Pfs48/45 transmission blocking vaccine candidates. *J. Infect.* 71, 117–127 (2015).
30. Oteng, E. K., Gu, W. & McKeague, M. High-efficiency enrichment enables identification of aptamers to circulating *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Sci. Rep.* 10, 1–11 (2020).
31. Ospina-Villa, J. D. *et al.* Advances on aptamers against protozoan parasites. *Genes* vol. 9 (2018).
32. Ulrich, H. *et al.* DNA and RNA Aptamers: From Tools for Basic Research Towards Therapeutic Applications. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9, 619–632 (2006).
33. Frith, K. A. *et al.* Towards development of aptamers that specifically bind to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* through epitopic targeting. *Malar. J.* 17, (2018).
34. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (80-)*. 249, 505–510 (1990).
35. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A. & Feigon, J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3745–3749 (1993).
36. Han, K., Liang, Z. & Zhou, N. Design strategies for aptamer-based biosensors. *Sensors* vol. 10 4541–4557 (2010).
37. Cheung, Y. W. *et al.* Aptamer-mediated *Plasmodium*-specific diagnosis of malaria. *Biochimie* 145, 131–136 (2018).
38. Gulab Singh Yadav, Vikas Kumar, N. K. A. *Aptamers Biotechnological applications of a Next Generation Tool.* (Springer Nature, 2019). doi:10.1007/978-981-13-8836-1.
39. Proteau, P. J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview. *Bioorganic Chemistry* vol. 32 483–493 (2004).
40. Lichtenthaler, H. K. Non-mevalonate Isoprenoid Biosynthesis: Enzymes, Genes and Inhibitors - PubMed. *Biochem Soc Trans* (2001).
41. Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J. & Müller, C. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 55, 305–313 (2000).
42. Chaudhary, K. K. & Prasad, C. V. S. S. Virtual Screening of compounds to 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from *Plasmodium falciparum*. *Bioinformation* 10, 358–364 (2014).
43. Goble, J., Adendorff, M., de Beer, T., Stephens, L. & Blatch, G. The Malarial Drug Target *Plasmodium falciparum* 1-Deoxy-D-Xylulose-5- Phosphate Reductoisomerase (PfDXR): Development of a 3-D Model for Identification of

- Novel, Structural and Functional Features and for Inhibitor Screening (Supplementary Information). *Protein Pept. Lett.* 17, 109–120 (2009).
44. Wiesner, J. & Jomaa, H. Isoprenoid Biosynthesis of the Apicoplast as Drug Target. *Curr. Drug Targets* 8, 3–13 (2006).
 45. Umeda, T. *et al.* Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* 1, (2011).
 46. Umeda, T. *et al.* Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* 1, (2011).
 47. Guggisberg, A. M. *et al.* A sugar phosphatase regulates the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in malaria parasites. *Nat. Commun.* 5, 1–10 (2014).
 48. Yeh, E. & DeRisi, J. L. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 9, (2011).
 49. Odom, A. R. & Van Voorhis, W. C. Functional genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 108–111 (2010).
 50. Guggisberg, A. M. *et al.* A sugar phosphatase regulates the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in malaria parasites. *Nat. Commun.* 5, 1–10 (2014).
 51. Saggi, G. S., Pala, Z. R., Garg, S. & Saxena, V. New insight into isoprenoids biosynthesis process and future prospects for drug designing in *Plasmodium*. *Frontiers in Microbiology* vol. 7 (2016).
 52. Mac Sweeney, A. *et al.* The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. *J. Mol. Biol.* 345, 115–127 (2005).
 53. Kunfermann, A. *et al.* IspC as target for anti-infective drug discovery: Synthesis, enantiomeric separation, and structural biology of fosmidomycin thia isosters. *J. Med. Chem.* 56, 8151–8162 (2013).
 54. Armstrong, C. M., Meyers, D. J., Imlay, L. S., Meyers, C. F. & Odom, A. R. Resistance to the antimicrobial agent fosmidomycin and an FR900098 prodrug through mutations in the deoxyxylulose phosphate reductoisomerase gene (*dxr*). *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5511–5519 (2015).
 55. Handa, S. *et al.* Production of recombinant 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase from *Plasmodium vivax* in *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio* 3, 124–129 (2013).
 56. Vedadi, M. *et al.* Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151, 100–110 (2007).
 57. Trigoso, Y. D., Evans, R. C., Karsten, W. E. & Chooback, L. Cloning, expression, and purification of histidine-tagged *Escherichia coli* dihydrodipicolinate reductase.

PLoS One 11, (2016).

58. Stathopoulos, P. B. *et al.* Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.* 13, 3017–3027 (2008).
59. Wingfield, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2015, 6.1.1-6.1.35 (2015).
60. Kachel, W. B. *Applications of the GST- Affinity Tag in the Purification and Characterization of Proteins.* (2016).
61. Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* vol. 4 235–251 (2014).

9. ANEXO PROTOCOLOS

9.1 Electroforesis SDS-PAGE de gel de poliacrilamida

Para la realización de la electroforesis se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Preparar el soporte Bio-rad que sostiene las tapas junto las bases de vidrio de 1.5 mm. Agregar H₂O a la parte superior, para verificar que el agua no escapa, porque están bien sostenidos los vidrios. Liberar el agua y secar con papel de celulosa.
2. Preparación de la solución Running para 2 geles de 12.5%:

Para 2 geles de 1.5 mm	
Porcentaje del gel (%)	12.5
Acrilamida (30%) Bis – Acril (0.8%)	7.5 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	4.52 ml
Agua Bidestilada	5.72 ml
SDS 10%	200 µl
APS 10%	100 µl
TEMED	30 µl
Volumen total	9 ml

Tabla 8. Componentes para elaborar la solución running.

El TEMED y APS, se dispensan justo en el momento previo a agregar la solución en los soportes de vidrio.

3. Una vez preparada la solución Running, se dispensa dentro de la placa de vidrio hasta llegar al nivel de la barra verde que sostiene las placas de vidrio, con la ayuda de una micropipeta de 1 ml. Seguido, se dispensa un poco de alcohol para empujar la solución running puesta y eliminar las posibles burbujas originadas. Luego esperar de 10 a 20 minutos hasta que solidifique el gel, y quitar el alcohol añadido. La solución running restante, se deja en el mismo tubo falcon en el cual se preparó, para tener un control.
4. Preparación de la solución Stacking para 2 geles de 12.5%:

Para 2 geles de 1.5 mm	
Porcentaje del gel (%)	3.3
Acrilamida (30%) Bis – Acril (0.8%)	0.792 ml
Tris 0.5 M pH 6.8	1.8 ml
Agua Bidestilada	4.46 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	20 µl
Volumen total	7.22 ml

Tabla 9. Componentes para preparar la solución stacking.

El TEMED y APS, se dispensan justo en el momento previo a agregar la solución en los soportes de vidrio.

5. Después de preparar la solución stacking, se dispensa dentro de la placa de vidrio hasta llenar toda la cobertura. Seguidamente se colocan los peines de 1.5 mm, asegurando de que no hay burbujas. Luego esperar de 10 a 20 minutos hasta que solidifique el gel. La solución de stacking restante, se deja en el mismo tubo falcon en el cual se preparó, como control.
6. Colocar el gel dentro del electroforador, verter el tampón de electroforesis en el electroforizador (el tampón de electroforesis debe cubrir el gel por completo), y conectarlo a una fuente de alimentación.
7. Retirar los peines de 1.5 mm, y agregar la regla y las muestras (preparadas previamente) en los pozos del gel. Las muestras se preparan previamente colocando 10 µl de cada muestra en un eppendorf, y a cada eppendorf de muestra, se le añade 10 µl de loading buffer 1X preparado. Seguidamente, las muestras se calientan en un termoblot a 95 ° C durante 5 minutos, y luego, se centrifugan 2 minutos a 11.000G.

8. Cargar la electroforesis con la fuente de alimentación, a 80 V durante 30 minutos, y luego a 130 V durante 1 hora y 30 minutos.
9. Una vez cargador el gel, se retira del soporte de vidrio, y se coloca en un soporte con solución fijadora 10% durante 20 minutos en leve agitación.

Solución fijadora 1X	
Etanol	40 ml
Ácido Acético Glacial	10 ml
H₂O mili-Q	50 ml

Tabla 10. Componentes solución fijadora al 10%.

10. Teñir el gel fijado, con Azul de Coomassie, durante 30 minutos en leve agitación.
11. Lavar el gel durante varias horas en leve agitación, hasta que se vea suficientemente limpio.
12. Sacar foto del gel con ImageQuant LAS 40000.

9.2 Transformación (pGS-21a)

1. Insertar 2 μ l de plásmido recombinante pGS-21a sobre 200 μ l de células competentes BL21 (DE3).
2. Dejar 15 minutos en hielo.
3. Realizar choque térmico 42 ° C durante 90 segundos.
4. Dejar 5 minutos en hielo.
5. Añadir 1 ml de medio LB precalentado a 37 ° C.
6. Incubar 1 hora a 37 ° C con agitación a 300 rpm.
7. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos, extraer el sobrenadante.
8. Plaquear (placas LB + Ampicilina) y sembrar 100 μ l de muestra sobrenadante.

9. Dejar toda la noche en estufa a 37 ° C.

9.3 Ensayo inducción

1. Tomar una colonia e introducirla en un falcon estéril con 5 ml de LB + Antibiótico, y dejar toda la noche a 37 ° C.
2. Inocular 0.5 – 2% del pre-cultivo en Erlenmeyer de cultivo.
3. Incubar a 37 ° C en agitación 180 rpm hasta que el cultivo tenga una OD 600 = 0.4 – 0.5.
4. Tomar 1 ml del cultivo, centrifugarlo, y guardar a -20 ° C (control) antes de la inducción.
5. Añadir 0.5 M IPTG por litro de cultivo y dejar a 15 ° C a 180 rpm toda la noche (de 16 a 20 horas).
6. Centrifugar 10.000 rpm durante 1 hora a 4 ° C.
7. Descartar el sobrenadante y guardar pellet a -80 ° C.
8. Para comprobar inducción, separar una muesca de pellet y resuspenderlo en buffer de electroforesis SDS-PAGE. Luego, correr el gel de la inducción y del control. Si salen las bandas correspondientes, continuar con la obtención del extracto proteico.

9.4 Obtención del extracto proteico

1. Agregar al pellet, el buffer de lisis.
2. Resuspender bien hasta que quede acuoso
3. Agregar lysosyma, MgCl₂, Pefabloc y DNAsa (después del lisado).

4. Incubar a RT 30 minutos en agitación.
5. Sonicar (80 %, 10 a 12 minutos, ON 10 segundos, OFF 20 segundos). Durante sonicación la muestra debe estar en hielo. Para sonicar, separar el lisado en falcon del 50 ml.
6. Centrifugar 17.000 rpm durante 1 hora.
7. Guardar el pellet a -80 ° C (fracción insoluble) y el sobrenadante (fracción soluble).