

TESI DOCTORAL

PRODUCCIÓ D'ANTÍGENS RECOMBINANTS DE
TOXOPLASMA GONDII EN SOQUES
ESCHERICHIA COLI EDITADES GENÈTICAMENT

Adrià Redondo Jimenez

Director de tesi: Dr. Joan Bertran Comulada (UVic – UCC)

Supervisor extern: Dr. Daniel Goti Gisbert (Spinreact – Toyobo Group)

Programa de doctorat: Ciències Experimentals i Tecnologies

2020

*"We get to choose who we let into our
weird little worlds." Sean Maguire
(Robin Williams a Good Will Hunting)*

*"If, somehow, the lord gave me another chance
at that moment... I would do it all over again."
Joel Miller (Troy Baker a The Last of Us Part II)*

RESUM

El present treball correspon a un doctorat industrial entre l'empresa Spinreact S.A.U., dedicada al desenvolupament i producció de reactius pel diagnòstic *in vitro*, i la Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya. L'objectiu de l'estudi va ser l'establiment d'un procés de producció d'antígens recombinants de *Toxoplasma gondii* que fossin útils pel desenvolupament d'un reactiu de serodiagnòstic de la toxoplasmosi.

La toxoplasmosi és una zoonosi estesa amb un impacte important en pacients immunosuprimits i crítica en dones embarassades degut a la seva transmissió als fetus. La diagnosi per mètodes serològics depèn principalment del lisat heterogeni del paràsit *Toxoplasma gondii*, que és difícil d'estandarditzar i amb un alt cost de producció. En canvi, els antígens recombinants de *Toxoplasma gondii* son molt útils per la detecció d'anticossos en mostres de sèrum i poden ser produïts de manera assequible en *Escherichia coli*. A més, els avenços en el sistema CRISPR-Cas9 faciliten l'edició del genoma de molts organismes, incloent *Escherichia coli*. Això permet generar soques de bacteris que produeixen antígens recombinants útils pel diagnòstic de malalties i amb avantatges potencials en termes de producció d'antígens quan es compara amb l'expressió de soques transformades amb plasmidi.

En aquesta tesi es presenten soques recombinants d'*Escherichia coli* que han estat generades, via transformació amb plasmidi o via edició genètica, per produir els antígens de *Toxoplasma gondii* SAG2, GRA2, tots dos, o la nova proteïna quimèrica SAG2-GRA2. També es demostra que aquests antígens son útils pel desenvolupament d'immunoassaigs, sent la proteïna quimèrica la que obté els millors resultats.

RESUMEN

El presente trabajo corresponde a un doctorado industrial entre la empresa Spinreact S.A.U., dedicada al desarrollo y producción de reactivos para el diagnóstico *in vitro*, y la Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya. El objetivo del estudio fue el establecimiento de un proceso de producción de antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii* que fueran útiles para el desarrollo de un reactivo de serodiagnóstico de la toxoplasmosis.

La toxoplasmosis es una zoonosis extendida con un impacto importante en pacientes inmunosuprimidos y crítica en mujeres embarazadas debido a su transmisión a los fetos. La diagnosis por métodos serológicos depende principalmente del lisado heterogéneo del parásito *Toxoplasma gondii*, que es difícil de estandarizar y con un alto coste de producción. En cambio, los antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii* son muy útiles para la detección de anticuerpos en muestras de suero y pueden ser producidos de manera asequible en *Escherichia coli*. Además, los avances en el sistema CRISPR-Cas9 facilitan la edición del genoma de muchos organismos, incluyendo *Escherichia coli*. Esto permite conseguir cepas de bacterias que producen antígenos recombinantes útiles para el diagnóstico de enfermedades y con ventajas potenciales en términos de producción de antígenos cuando se compara con la expresión de cepas transformadas con plásmido.

En esta tesis se presentan cepas de *Escherichia coli* que se han generado, vía transformación con plásmido o vía edición genética, para producir los antígenos de *Toxoplasma gondii* SAG2, GRA2, ambos, o la nueva proteína quimérica SAG2- GRA2. También se demuestra que estos antígenos son útiles para el desarrollo de inmunoensayos, siendo la proteína quimérica la que obtiene mejores resultados.

SUMMARY

This work corresponds to an industrial doctorate between the company Spinreact S.A.U., devoted to the development and production of reagents for *in vitro* diagnosis, and the University of Vic - Central University of Catalonia. The aim of the study was the establishment of a production process of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens that would be useful for the development of a serodiagnosis reagent.

Toxoplasmosis is a widespread zoonosis with an important impact on immunocompromised people and critical in pregnant women because of its transmission to the fetuses. Diagnosis by serological methods mainly relies on heterogeneous *Toxoplasma gondii* lysates, which is hard to standardize and with high cost. Recombinant *Toxoplasma gondii* antigens are very useful for antibody detection in serum samples and they can be produced affordably in *Escherichia coli*. Besides, the breakthrough of the CRISPR-Cas9 system facilitates genome editing in many organisms, including *Escherichia coli*. This has allowed establishing bacteria strains that produce recombinant antigens useful for disease diagnosis and with potential advantages in terms of antigen production when compared with expression from plasmid-transformed strains.

Here in this dissertation, it is presented strains of *Escherichia coli* that have been generated, by plasmid transformation or by genome editing, to produce the *Toxoplasma gondii* antigens SAG2, GRA2, both or the novel chimeric protein SAG2-GRA2. Also, it is shown that such antigens are useful in immunoassay development, being the chimeric protein the one with better results.

TAULA DE CONTINGUTS

Resum	3
Resumen	4
Summary.....	5
1. Introducció.....	12
1.1 Toxoplasmosi	12
1.1.1 Organisme i cicle de vida	13
1.1.2 Epidemiologia i patologia	16
1.1.3 Diagnosi	18
1.1.4 Antígens recombinants en immunoassaigs	21
1.2 Edició genètica.....	24
1.2.1 Edició genètica a través del tall DSB en el DNA.....	24
1.2.2 CRISPR-Cas9	26
1.2.3 Sistema de dos plasmidis en <i>Escherichia coli</i>	29
2. Objectius.....	34
3. Materials i Mètodes.....	36
3.1 Materials.....	36
3.1.1 Equips i aparells	36
3.1.2 Software.....	38
3.1.3 Reactius químics	38
3.1.4 Medis, solucions i tampons	39
3.1.5 Kits i enzims	41
3.1.6 Plasmidis	42
3.1.7 Línies cel·lulars.....	42
3.1.8 DNA genòmic	42
3.1.9 Anticossos i sèrums.....	43
3.2 Mètodes.....	44

3.2.1 Preparació del DNA genòmic de <i>Toxoplasma gondii</i> i dels plasmidis pCas – pTargetF	44
3.2.2 Amplificació per PCR.....	44
3.2.3 Electroforesi en gel d'agarosa	45
3.2.4 Reaccions enzimàtiques.....	46
3.2.5 Protocol de cèl·lules competents	47
3.2.6 Transformació bacteriana.....	48
3.2.7 Cultiu bacterià.....	49
3.2.8 Electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
3.2.9 Solubilització de proteïnes recombinants	50
3.2.10 Purificació de proteïnes recombinants amb Ni-NTA	51
3.2.11 Precipitació de proteïnes amb TCA.....	52
3.2.12 Western blot	52
3.2.13 Quantificació de proteïnes	53
3.2.14 Càlcul de productivitat.....	53
3.2.15 Extracció de DNA genòmic.....	53
3.2.16 Precipitació de DNA	54
3.2.17 Edició genètica.....	54
3.2.18 Cribratge blau – blanc.....	55
3.2.19 Pes humit i pes sec cel·lular	55
3.2.20 Emmagatzematge a llarg termini amb glicerol.....	56
3.2.21 Sensibilització del làtex i immunoturbidimetria	56
3.2.22 Immunoassaig enzimàtic (ELISA)	57
4. Resultats	59
4.1 Generació de soques transformades amb plasmidi	59
4.1.1 Selecció dels antígens de <i>Toxoplasma gondii</i>	59
4.1.2 Generació dels <i>cassettes</i> d'expressió	61
4.2 Producció de proteïna recombinant en soques transformades amb plasmidi	67
4.2.1 Determinació d'un protocol de purificació adient	67
4.2.2 Optimització de les condicions de <i>upstream</i>	74
4.2.3 <i>Scale-up</i> i quantificació de proteïna	80

4.3 Generació de soques editades genèticament	84
4.3.1 Establiment del sistema CRISPR-Cas9.....	84
4.3.1.1 Generació dels pTarget.....	84
4.3.1.2 Generació dels DNA donadors.....	87
4.3.2 Edició genètica	95
4.3.2.1 Edicions dirigides als loci <i>cadA</i> , <i>fecA</i> , <i>lacZ</i> , <i>ompA</i> i <i>ybbD</i>	95
4.3.2.2 Establiment d'un nou protocol de cèl·lules competents.....	107
4.3.2.3 Modificacions a les edicions i nou locus <i>panD</i>	109
4.3.2.4 Transformació amb pTarget- \emptyset	113
4.3.3 <i>Curing</i> dels plasmidis pTarget – pCas i estabilitat de l'edició	114
4.4 Producció de proteïna recombinant en soques editades genèticament	116
4.4.1 Diferències en la producció de biomassa i de proteïna recombinant entre soques.....	116
4.4.2 Purificació proteica i quantificació	118
4.5 Funcionalitat dels antígens recombinants.....	122
4.5.1 Test d'aglutinació en làtex per turbidimetria	122
4.5.2 Test ELISA.....	127
5. Discussió	130
5.1 Generació de soques transformades amb plasmidi	130
5.2 Producció de proteïna recombinant en soques transformades amb plasmidi	131
5.3 Generació de soques editades genèticament	134
5.4 Producció de proteïna recombinant en soques editades genèticament	138
5.5 Funcionalitat dels antígens recombinants.....	139
6. Conclusions i propostes de futur	142
Referències bibliogràfiques	144
Índex d'abreviatures.....	160
Índex de figures	163
Índex de taules	169
Annex.....	172

<i>Primers</i>	172
Resultats de seqüenciació	177
Publicació indexada vinculada a la tesi (en premsa)	191
Agraïments	219

1. INTRODUCCIÓ

Els doctorats industrials tenen l'objectiu de contribuir a la competitivitat i a la internacionalització de les empreses mitjançant la captació de talent i la formació de doctors dins de projectes d'R+D+I. Un dels elements essencials per les empreses és el fet de poder col·laborar amb grups o centres de recerca capdavanters i poder accedir als seus equipaments i infraestructures per desenvolupar projectes de recerca estratègics. A més, els doctorats industrials permeten generar sinergies i actuen com a pont perquè l'entorn universitari pugui transferir el seu coneixement a l'entorn productiu.

Aquest projecte de doctorat industrial va ser una iniciativa de l'empresa Spinreact S.A.U., dedicada al desenvolupament i producció de reactius pel diagnòstic *in vitro*, amb la col·laboració de la Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya. Actualment, Spinreact S.A.U. té entre els seus productes el kit Toxo-Latex, que és un assaig d'aglutinació que permet discriminar visualment pacients positius i negatius de la toxoplasmosi. La intenció d'aquest projecte de recerca era estudiar la producció de matèries primeres alternatives que possibilitessin el desenvolupament de nous reactius de diagnòstic de la toxoplasmosi sense dependre d'empreses externes, i així substituir el reactiu de la toxoplasmosi actual la producció del qual és externa.

1.1 TOXOPLASMOSI

La toxoplasmosi és una malaltia zoonòtica de distribució mundial causada per *Toxoplasma gondii*, un protozou que es desenvolupa com a paràsit intracel·lular obligat o holoparàsit. Els paràsits obligats depenen totalment de l'hoste, sovint vivint en estat simbiòtic, per tant, no poden completar el seu cicle de vida i no

poden sobreviure sense l'hoste. El *T. gondii* afecta gairebé a tots els animals de sang calenta, sent capaç d'envair i multiplicar-se en qualsevol cèl·lula (Tenter et al., 2000; Dubey, 2016).

Malgrat aquesta malaltia parasitària sol ser asimptomàtica o amb símptomes lleus inespecífics en adults immunocompetents, és necessari diagnosticar a temps les infeccions recents ja que la transmissió d'aquest organisme des de les dones embarassades als fetus suposa un risc important pel nounat (Mombro et al., 2003).

S'han descrit tres soques principals i diverses formes recombinants de *T. gondii* amb virulència i distribució geogràfica variables. El tipus I, juntament amb les formes recombinants, es consideren els més virulents, és a dir, amb els nivells més alts de parasitemia, mentre que els tipus II i III han mostrat menys agressivitat en estudis amb ratolins (Howe i Sibley, 1995; Saeij et al., 2005).

1.1.1 ORGANISME I CICLE DE VIDA

El paràsit protozou *T. gondii*, que pertany al fílum Apicomplexa (família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatidae), va ser descrit per primer cop al 1908 per Nicolle i Manceaux present en un rosegador nord-africà anomenat *Ctenodactylus gondii* (Mombro et al., 1995). Té un cicle biològic complex amb tres formes parasitàries; els trofozoïts o taquizoïts, que són mòbils i de forma arquejada gràcies a la qual rep el seu nom ja que "toxó" significa "arc" en grec, els oòcits o esporozoïts, i els cists o bradizoïts (Dubey et al., 1998).

El trofozoït o taquizoït, que és la seva forma replicativa, té entre 5 i 8 µm de longitud i entre 2 i 3 µm d'amplada, i normalment envaeix macròfags o cèl·lules epitelials. Les immunoglobulines específiques del sèrum IgM i IgG indueixen l'opsonització i fagocitosi del taquizoït per la qual cosa no és fàcil trobar-los després de 7 – 10 dies des de la primera infecció quan són a la fase aguda. L'oòcit,

que generalment es troba a les fems de gat i presenta un diàmetre d'entre 10 i 15 μm , és la forma de resistència a l'ambient extern i conté un parell d'esoroblasts que alhora contenen quatre esporozoïts cadascun. Per últim, els cists parasiten diferents cèl·lules del cos, principalment en els sistemes musculars del cervell i de l'ull. Tenen un diàmetre d'entre 50 i 200 μm i contenen centenars de bradizoïts. Aquests cists constitueixen la forma de resistència a l'ambient intern gràcies a l'embolcall que permet l'intercanvi de nutrients (Montoya i Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux i Dardé, 2012).

El *T. gondii* pot dur a terme un cicle vital en un únic hoste o bé en diversos hostes. En el primer cas, l'hoste són els gats o altres fèlids, mentre que en el segon cas hi ha un hoste definitiu, que són els fèlids, i un hoste intermediari que poden ser diverses espècies de mamífers, com ara els humans, els rosegadors o els ocells (Montoya i Liesenfeld, 2004).

Els humans es poden infectar mitjançant diversos mecanismes de transmissió, com ara la ingesta de menjar cru o poc cuit, la ingesta d'aigua contaminada, a través de la ruta oro-fecal després d'una contaminació amb fems de fèlids, o, tot i que menys habitual, a través de la placenta i els transplantaments d'òrgans o les transfusions de sang de pacients infectats (Bowie et al., 1997; Tenter et al., 2000). Totes aquestes vies de transmissió tenen com a conseqüència l'arribada dels paràsits a l'intestí humà. Un vegada a la mucosa intestinal, i a través de la circulació sanguínia, els paràsits poden arribar a qualsevol òrgan o teixit sent els més freqüents el múscul ocular i el sistema nerviós central, però mai infectant l'intestí o les cèl·lules sanguínies.

Quan els paràsits envaeixen diferents cèl·lules comencen una fase coneguda com a fase proliferativa, en la qual es divideixen ràpidament i reben el nom de taquizoïts. Un cop la cèl·lula hoste envaïda no pot contenir més taquizoïts, es trenca la membrana i allibera taquizoïts començant la parasitació de noves

cèl·lules i òrgans on continuen dividint-se ràpidament. El paràsit prolifera fins que el sistema immunitari presenta una resposta destinada a reduir la velocitat d'aquesta fase. Després de la resposta immunitària, els paràsits es divideixen més lentament i desenvolupen una coberta cística protectora formant els cists de *T. gondii*. A l'interior d'aquests cists hi ha els paràsits dividint-se lentament, anomenats bradizoïts, els quals es caracteritzen en aquesta nova fase cística per mantenir-se actius durant un llarg període de temps o, fins i tot, per tota la vida de l'hoste deixant una senyal immunitària basal a l'individu infectat (Figura 1; Montoya i Liesenfeld, 2004).

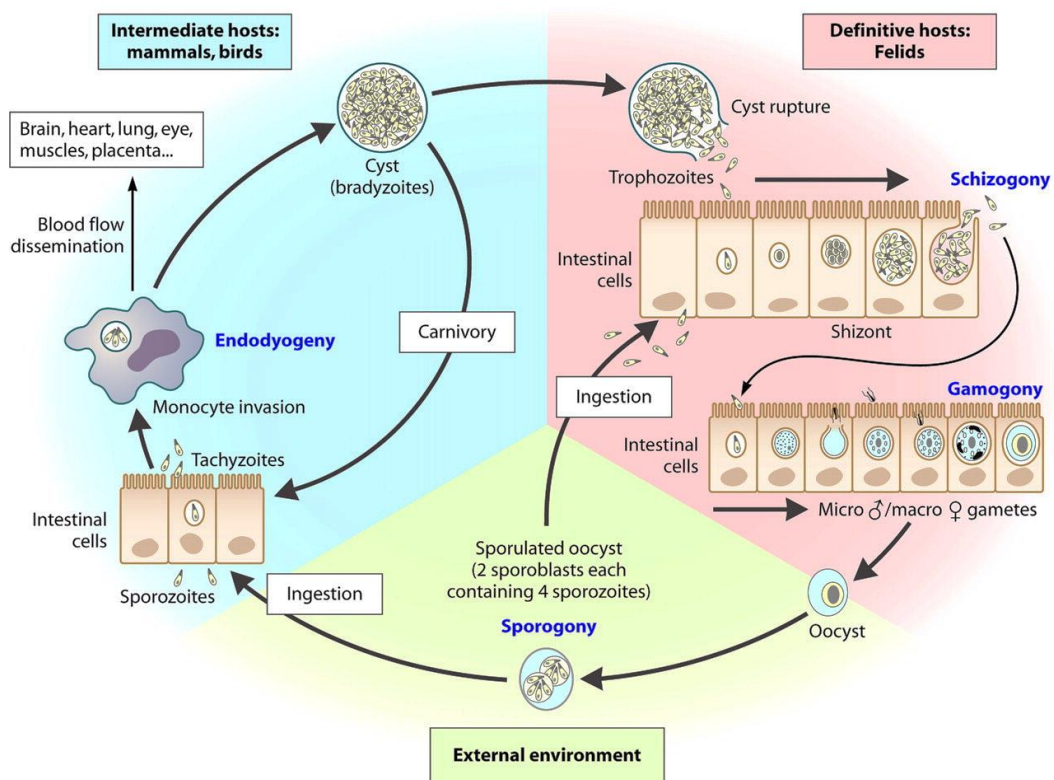


Figura 1. El cicle vital de *T. gondii*. Les tres formes resultants de les tres vies de reproducció, trofozoïts, oocists i cists, poden envair una cèl·lula hoste i continuar el cicle vital. La fase sexual es desenvolupa exclusivament en les cèl·lules epitelials dels fèlids que són l'hoste definitiu, i la fase asexual es desenvolupa en els teixits dels mateixos fèlids i d'altres hosts considerats intermediaris, com ara els ocells i els humans (Robert-Gangneux i Dardé, 2012).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA I PATOLOGIA

La toxoplasmosi és la zoonosi endèmica amb més prevalença del món ja que aproximadament el 30 % de la població mundial està infectada amb *Toxoplasma* (Dubey, 2016). Els estudis epidemiològics mostren que existeix una ampla variació en la prevalença de la infecció segons la distribució geogràfica i, per tant, que està relacionada amb factors ambientals, hàbits culturals i estatus socioeconòmic. Per exemple, en climes càlids i secs hi ha una baixa incidència de la toxoplasmosi, mentre que en climes temperats i humits la incidència s'incrementa. Les temperatures per sobre dels 60 °C o per sota dels 20 °C poden destruir els cists de bradizoïts, que són la forma més habitual d'infecció en humans. En països desenvolupats com els Estats Units, la seroprevalença és de l'11,14 %, mentre que a l'Iran pot arribar al 40 % i al Brasil a més del 50 % (Dubey et al., 2012; Jones et al., 2018; Malary et al., 2018). La seroprevalença a Espanya no està ben determinada, variant entre l'11 i el 28 % segons diferents estudis (Ory Manchón, 2009; Baquero-Artigao et al., 2013), i a Catalunya es troba al 28,6 % (Muñoz Batet et al., 2004).

La toxoplasmosi és una infecció parasitària amb un ampli espectre de símptomes clínics, des de asimptomàtics fins a condicions severes i potencialment mortals. Tot i que, com el 90 % dels casos presenten infecció asimptomàtica o símptomes lleus, la majoria de pacients no es diagnostiquen. S'han descrit dos tipus de malaltia en funció de la seva transmissibilitat, la toxoplasmosi congènita i la toxoplasmosi adquirida. I dos tipus més en funció de la fase de la malaltia, la toxoplasmosi aguda i la toxoplasmosi crònica.

La toxoplasmosi congènita és la forma més habitual de la malaltia i, per aquesta raó, un diagnòstic precoç és extremadament necessari per evitar el risc de transmissió al fetus. La transmissió transplacentària pot donar-se durant els nou mesos de gestació. El dany és més sever quan la transmissió es dona durant el

primer trimestre comportant un part prematur, ceguera, malformacions neonatals o avortament, però la transmissió sol ser més freqüent durant el tercer trimestre quan la malaltia és menys perillosa (Gilbert et al., 2013; Jones et al., 2003). A més, la infecció crònica materna no està associada a la malaltia congènita. La incidència de la toxoplasmosi congènita s'ha estimat en 0,1 ‰ als Estats Units (Guerina, 1994) i en 1,9 ‰ a Espanya (Baquero-Artigao et al., 2013).

Per altra banda, en el cas de la toxoplasmosi adquirida, el sistema immunològic del pacient juga un paper clau. Com s'ha explicat prèviament, en pacients immunocompetents la malaltia sol cursar asimptomàtica. Però la toxoplasmosi adquirida en pacients immunocompromesos, com els de SIDA, els d'un trasplantament o els de quimioteràpia, pot ser causa de mort. Quan la immunitat d'aquests pacients cau, la parasitació es reactiva com a conseqüència de la ruptura dels cists, alliberant els bradizoïts i envaint noves cèl·lules on tornen a adquirir el caràcter de taquizoïts multiplicant-se ràpidament. Aquest procés explica perquè la malaltia es manté en fase aguda en les persones immunocompromeses causant contínuament la destrucció cel·lular. Els òrgans principals de disseminació són el sistema nerviós central, el cor, el fetge i els pulmons, on la resposta immunològica és limitada, causant lesions cel·lulars extenses que comporten miocarditis, pneumònia intersticial, encefalitis severa o, fins i tot, malalties neuropsiquiàtriques com el trastorn bipolar o la depressió (Henriquez et al., 2009; Pereira-Chiocola et al., 2009).

En la toxoplasmosi aguda, que és la primera fase de la malaltia, es produeix una ràpida proliferació dels taquizoïts en un gran número de cèl·lules hoste destruint-les i, conseqüentment, causant un procés inflamatori. El paràsit continua multiplicant-se ràpidament fins que hi ha una resposta immunològica a l'organisme hoste durant un període d'incubació de 10 – 14 dies. La malaltia normalment remet autolimitant-se després de 3 o 4 setmanes, però existeixen

casos crònics amb conseqüències significatives (Montoya i Liesenfeld, 2004). En la toxoplasmosi crònica, els bradizoïts es divideixen lentament i formen els cists del paràsit als òrgans i teixits del hoste durant l'anomenada fase cística. Aquesta fase sovint és asimptomàtica, al contrari de la fase aguda, i pot durar mesos o anys.

1.1.3 DIAGNOSI

La diagnosi de la toxoplasmosi pot arribar a ser un repte ja que és difícil distingir entre la infecció aguda i la infecció crònica. La toxoplasmosi es pot detectar per mètodes directes o indirectes. Els mètodes directes consisteixen en la visualització del paràsit a la mostra del pacient, que només s'utilitza com a mètode de confirmació ja que compta amb un baix rendiment, o bé en la diagnosi molecular per PCR, que detecta el DNA del paràsit *T. gondii* però que encara no és una tècnica estandarditzada i comporta un cost massa alt. Per aquesta raó, la toxoplasmosi es detecta rutinàriament mitjançant mètodes indirectes, també anomenats serològics, que en molts casos es combinen per obtenir un diagnòstic complet (Montoya, 2002; Remington et al., 2004; Bourdin et al., 2014).

La diagnosi serològica es basa en la detecció d'anticossos específics contra *T. gondii*. Entre els mètodes serològics més importants es troba el test de Sabin i Feldman (test SF), també conegut com a *dye test* (DT), que va ser el primer test fet servir per diagnosticar la toxoplasmosi (Sabin i Feldman, 1948). A més, és un test amb alta sensibilitat i especificitat, tot i que actualment només s'utilitza com a mètode de referència. Altres mètodes indirectes en els que es basen productes que es troben al mercat són l'hemaglutinació indirecta (IHA), la immunofluorescència indirecta (IIF), l'immunoassaig enzimàtic (ELISA) o l'aglutinació en làtex (LAT), que s'utilitzen habitualment per cribratges serològics de la toxoplasmosi (Taula 1; Ybañez et al., 2020).

Taula 1. Comparació d'assaigs de diagnòstic de la toxoplasmosi.

Assaig diagnòstic	Avantatges	Desavantatges
Microscòpia òptica	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilitat i especificitat - Mètodes de referència - Repetibilitat de resultats 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessitat d'un microscopi - Díficil obtenció de mostres - Lents i no-automatitzables - Alt cost
Sabin-Feldman		
Immunofluorescència indirecta		
Hemaglutinació indirecta	<ul style="list-style-type: none"> - Més mostres/hora que la microscòpia 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestabilitat d'eritròcits - Díficil obtenció d'antígens - Baixa especificitat
Aglutinació en làtex	<ul style="list-style-type: none"> - Més mostres/hora que la microscòpia - Automatitzable 	<ul style="list-style-type: none"> - Díficil obtenció d'antígens - Qualitat variable depenent dels antígens
ELISA		

La majoria dels tests de diagnòstic que es troben al mercat utilitzen dues estratègies: l'aglutinació indirecta o l'immunoassaig enzimàtic indirecte.

Els tests d'aglutinació indirecta, i més concretament els d'aglutinació en làtex com el Toxo-Latex que actualment ven Spinreact S.A.U., requereixen de partícules de làtex revestides amb antígens del paràsit que s'uneixen específicament als anticossos anti-*Toxoplasma*. En presència d'anticossos, les partícules amb antígens en suspensió formen agregats amb els anticossos multivalents o aglutinines. Això permet tant la seva visualització a ull nu com la determinació de

la concentració dels anticossos específics per tècniques de dispersió de llum, com la turbidimetria o la nefelometria (Figura 2). La turbidimetria mesura l'atenuació de la llum causada per la dispersió, és a dir, la reducció de la intensitat de la llum transmesa, mentre que la nefelometria mesura la intensitat de la llum dispersada directament o a un angle concret.

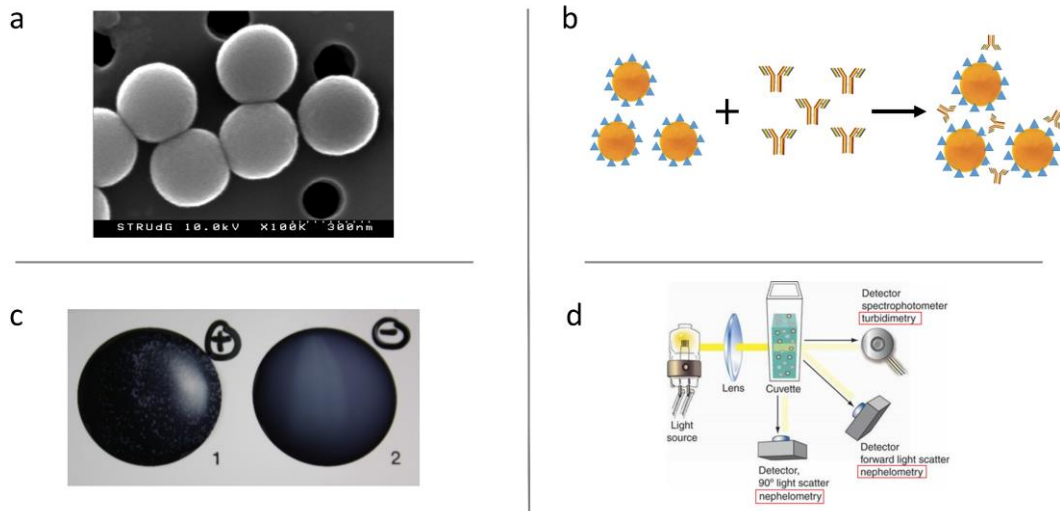


Figura 2. Elements de l'aglutinació en làtex. a) Partícules de làtex de 300 nm de la casa comercial Ikerlat utilitzades habitualment per Spinreact S.A.U. b) Esquema de l'aglutinació en làtex indirecta on els antigens s'uneixen a les partícules de làtex per detectar anticossos específics. c) Resultat d'una mostra positiva i una mostra negativa per toxoplasmosi utilitzant el test Toxo-Latex. d) Esquema amb els principis bàsics de les tècniques de dispersió de llum (turbidimetria i nefelometria).

Per altra banda, els ELISA indirectes es basen en la unió dels antigens a una fase sòlida on son capaços de detectar anticossos específics formant complexos antigen – anticòs. Els rentats i la posterior addició d'un anticòs secundari conjugat a un enzim permet quantificar la reacció colorimètrica (Figura 3).

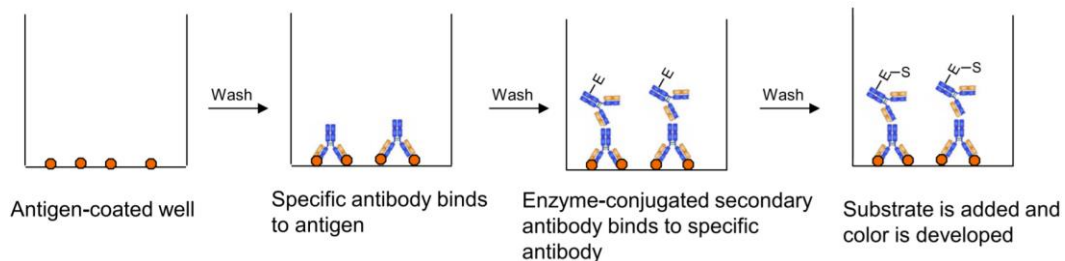


Figura 3. Esquema dels passos de l'ELISA indirecte. (Liu et al., 2015).

La sensibilitat i l'especificitat d'aquests tests varien en funció de diversos factors, sent el més important la qualitat de la preparació dels antígens que s'utilitzen com a matèria primera. El lisat d'antígens natiu, anomenat *Toxoplasma lysate antigen* (TLA), és el més freqüent i consisteix en un extracte soluble de totes les proteïnes de les cèl·lules del taquizoït cultivades en ratolins o en cultius de teixits i posteriorment lisades. Els TLA comporten una producció laboriosa, amb un alt cost, difícil d'estandarditzar, associada a infeccions no-desitjades i amb una gran variabilitat entre lots. Per aquestes raons, algunes empreses i grups de recerca han desenvolupat en els últims anys un sistema de producció d'antígens recombinants mitjançant, majoritàriament, bacteris com *Escherichia coli* (Holec-Gasior, 2013).

1.1.4 ANTÍGENS RECOMBINANTS EN IMMUNOASSAIGS

Durant dècades, diversos grups de recerca han estudiat el conjunt d'antígens de *T. gondii* que s'alliberen en el procés de parasitació d'una cèl·lula hoste. Existeixen quatre grans grups d'antígens coneguts fins al moment. Els antígens dels grànuls densos (GRA), que es secreten durant la primera fase d'infecció de la parasitació i tenen un paper clau en la formació de la membrana del vacúol on es desenvolupen els paràsits abans d'envair la cèl·lula hoste. Els antígens del micronema (MIC), que tenen la funció d'adhesió i penetració en les cèl·lules hoste. Els antígens de la roptria (ROP), que faciliten la formació dels vacúols de parasitació. I els antígens de superfície (SAG), que es troben a la membrana externa dels taquizoïts i duen a terme el reconeixement dels receptors superficials de les cèl·lules hoste (Lekutis et al., 2001; Joiner i Roos, 2002; Mercier et al., 2002).

L'avenç en el coneixement de l'estructura antigènica de *T. gondii* ha donat lloc al desenvolupament de nous reactius de diagnòstic mitjançant la tecnologia del DNA recombinant. Aquesta tecnologia permet obtenir les proteïnes amb una alta puresa i d'una forma més eficient i segura, a més de permetre el

desenvolupament de kits amb alta repetibilitat de resultats i una fàcil estandardització. Diverses proteïnes antigèniques de *Toxoplasma* són adequades per aquest propòsit (Aubert et al., 2000; Li et al., 2000; Beghetto et al., 2003; Remington et al., 2004; Buffolano et al., 2005; Golkar et al., 2008; Holec-Gasior, 2013). Dues de les proteïnes que ja s'han estudiat en sistemes d'expressió recombinant amb *E. coli* son SAG2, que té un rol central com a lligand interactuant amb les molècules de superfície de la cèl·lula hoste (Parmley et al., 1992; Huang et al., 2002), i GRA2, que és l'antigen central en la connexió entre el paràsit i l'hoste influint en la virulència i supervivència del paràsit (Holec-Gasior et al., 2009). A més, existeixen els primers estudis de SAG2 i GRA2 com a candidats per la serodiagnosi de la toxoplasmosi amb resultats satisfactoris (Ching et al., 2013; Costa et al., 2017).

En els últims anys també s'ha descrit que la combinació de dos o més antígens de *T. gondii* pot millorar el rendiment dels tests de diagnòstic augmentant la seva sensibilitat (Pietkiewicz et al., 2004; Holec-Gasior et al., 2009; Costa et al., 2017). Més recentment, s'ha desenvolupat l'ús de proteïnes quimèriques amb fragments immunodominants de diferents antígens, la qual cosa facilita l'estandardització del test de diagnòstic i la reducció dels costos de producció (Beghetto et al., 2006; Lau et al., 2011; Dai et al., 2012; Holec-Gasior et al., 2012a, 2012b; Dai et al., 2013; Ferra et al., 2015; Ferra et al., 2019).

A més, el coneixement dels antígens específics de la toxoplasmosi aguda i de la toxoplasmosi crònica serveix com a eina per desenvolupar tests de diagnòstic que discriminen entre les dues fases, reconeixent preferentment immunoglobulines IgM i IgG per separat o determinant l'aviditat de les IgG (Flori et al., 2008; Remington et al., 2011; Ching et al., 2014; Villard et al., 2013).

A Ybañez et al. (2020) es fa una revisió exhaustiva i actualitzada de tots els antígens recombinants de *T. gondii* produïts fins ara, tant individualment, en combinacions o en forma de quimera, i dels seus resultats en diversos tests de diagnòstic.

1.2 EDICIÓ GENÈTICA

El gran interès per ampliar el coneixement sobre el genoma i els diversos gens codificats va impulsar el progrés en la seqüenciació del DNA. Però, a partir de la seqüenciació completa del genoma humà i d'altres espècies, els interessos van virar cap a una nova incògnita, la comprensió de la funció dels gens i l'avenç d'eines precises d'edició genètica que milloraven la tecnologia del DNA recombinant dels anys 70 (Venter et al., 2001).

Durant els últims anys s'han desenvolupat quatre tecnologies d'edició genètica basades en enzims de restricció naturals o bé enzims artificials: les meganucleases (MNs), les *zinc-finger* nucleases (ZFNs), les *transcription activator-like effector* nucleases (TALENs) i el sistema *clustered regularly interspaced short palindromic repeat – CRISPR associated protein 9* (CRISPR-Cas9).

1.2.1 EDICIÓ GENÈTICA A TRAVÉS DEL TALL DSB EN EL DNA

L'edició del genoma amb les nucleases modificades abans mencionades pot incloure insercions o delecions, també coneguts com a *indels*, o bé modificacions precises, conegudes com a *knock-in*, provocant una ruptura de la doble cadena (*double-strand break*, DSB) en un locus específic del DNA. Aquest tall DSB activa els mecanismes de reparació *non-homologous end-joining* (NHEJ) i *homology-directed repair* (HDR) en gairebé totes les cèl·lules i organismes. A través del procés propens a errors de NHEJ, els talls DSB es relliguen produint *indels* que resulten en mutacions, com ara un desplaçament en la pauta de lectura. En el cas del HDR, el trencament es repara precisament amb l'ajut de l'altra cadena homòloga utilitzant recombinació homòloga (Figura 4; Sander i Joung, 2014; Li et al., 2020).

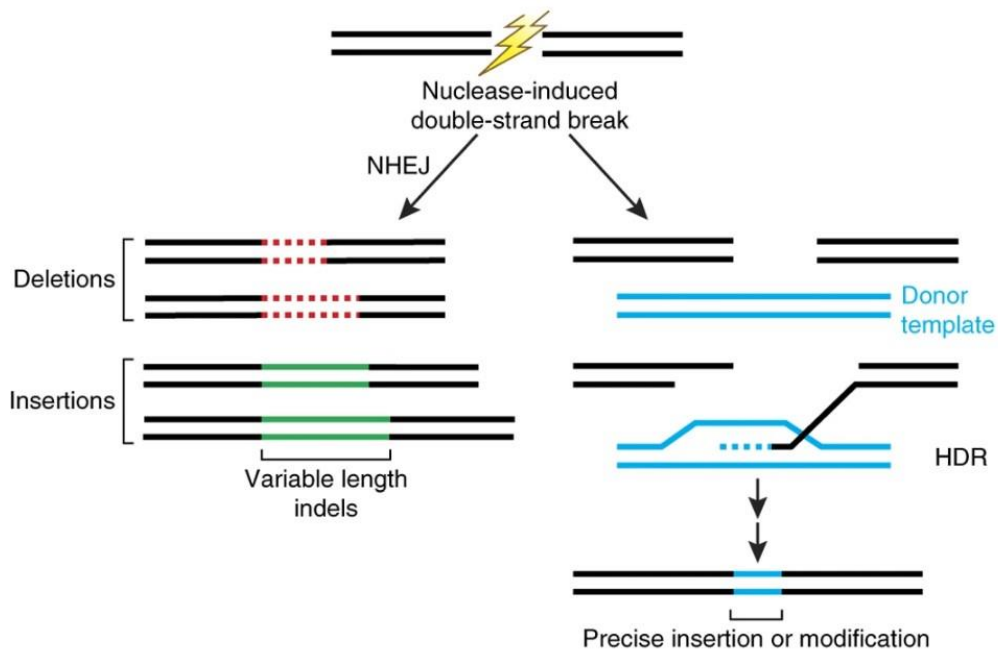


Figura 4. Processos de reparació del DSB *non-homologous end-joining* i *homology directed repair*. El procés de NHEJ és susceptible a errors i pot resultar en insercions o delecions causant canvis en la pauta de lectura. L'HDR, per altra banda, és un mecanisme molt precís on les cadenes germanes o un motlle donador introduït indueixen a la reparació precisa, a alteracions o bé a insercions (Sander i Joung, 2014).

Tots dos mecanismes es poden utilitzar per dur a terme modificacions genètiques dirigides a seqüències de DNA específiques. En cèl·lules eucariotes, el procés de NHEJ és un esdeveniment més freqüent que l'HDR. Quan s'indueix un DSB en un exó codificant d'un gen específic la reparació via NHEJ pot resultar en la disrupció mitjançant codons stop prematurs, és a dir, provocant el *knock-out* del gen (Ran et al., 2013). En canvi, la reparació via HDR es pot fer servir per introduir un DNA exògen flanquejat per seqüències d'homologia, com ara gens que confereixen resistència a antibiòtics o altres oligonucleòtids de doble cadena o de cadena simple. Aquesta recombinació homòloga es dona amb una eficiència més alta que la dels mètodes utilitzats anteriorment (Chen et al., 2011; Tan et al., 2013).

Les meganucleases són enzims de restricció que tenen llargues seqüències de reconeixement de DNA que sovint es troben al genoma. El disseny de les

meganucleases és difícil ja que l'assemblatge del DNA i les funcions de ruptura es troben unides en un sol domini (Khan, 2019). Les segones nucleases dissenyades per induir DSB van ser les *zinc-finger* nucleases, que consisteixen en 3 – 6 dominis *zinc-finger* d'unió a DNA, dels quals cada un pot reconèixer 3 – 4 bases de DNA o RNA. Els *zinc-finger* es troben fusionats a un domini de la nucleasa FokI no-específic de la seqüència. Aquest domini FokI només pot tallar el DNA quan es dimeritza, per tant, es dissenyen dues ZFNs per unir-se *upstream* i *downstream* del lloc de tall desitjat. Quan s'uneixen les dues ZFNs els dominis FokI poden dimeritzar i produir cadascun una ruptura d'una sola cadena (*single-strand break*, SSB), resultant en un DSB. Malauradament, el disseny de les ZFNs és molt laboriós i lent, i produeixen una quantitat alta de *off-targets* (Font i Mackay, 2010; Khan, 2019). Per altra banda, les TALENs, que van sorgir conjuntament amb les ZFNs, també són proteïnes dissenyades que consisteixen en un domini d'unió al DNA fusionat al domini FokI. Són lleugerament millors en especificitat i eficiència que les anteriors, també suposen un repte de disseny i modificació (Li et al., 2020).

El fet de poder induir múltiples tall DSB en paral·lel amb la Cas9 fa que el sistema d'edició genètica guiat per RNA, CRISPR-Cas9, tingui un avantatge únic en relació a les meganucleases, a les ZFNs o a les TALENs.

1.2.2 CRISPR-CAS9

El descobriment d'un nou mecanisme de defensa del genoma en bacteris, anomenat sistema CRISPR-Cas, va fer augmentar l'interès per la seva aplicació en l'edició genètica. Aquest sistema està considerat com el sistema immunològic adaptatiu dels bacteris (Mojica et al., 2005; Barrangou et al., 2007).

Al voltant del 40 % dels genomes dels eubacteris i gairebé tots els genomes dels arqueobacteris seqüenciats contenen un o més loci de CRISPR, generalment flanquejats per gens associats a CRISPR, anomenats Cas (Makarova et al., 2006;

Marraffini i Sontheimer, 2008; Hale et al., 2009). Dins d'aquests loci hi ha varies repeticions no-contigües de 24 – 48 nucleòtids separades per seccions de seqüències variables anomenades *spacers*. Aquests *spacers* de 21 – 72 nucleòtids contenen seqüències de DNA extracromosòmic de virus, plasmidis o transposons que mostren la resposta immunològica (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Makarova et al., 2006; Hale et al., 2008; Garneau et al., 2010).

Aquesta resposta immunològica es porta a terme mitjançant dos passos, l'adaptació i la interferència. L'etapa d'adaptació està determinada per l'adquisició de nous *spacers* derivats de DNA exògen, coneguts com a *protospacers*, a l'extrem superior del locus CRISPR durant un repte immunològic, com per exemple una infecció viral (Horvath i Barrangou, 2010; Marraffini i Sontheimer, 2010). Aquesta adquisició fa que la cèl·lula sigui immune als patògens portadors de seqüències idèntiques. Per altra banda, a l'etapa d'interferència es transcriu el locus CRISPR des d'un promotor de l'extrem del locus (Pul et al., 2010). Un complex proteic talla l'RNA resultant, anomenat pre-crRNA, en fragments curts de CRISPR RNA, anomenats crRNA (Gesner et al., 2011). Aquests crRNA es dirigeixen aleshores als DNA o RNA exògens per complementaritat de bases i, per tant, faciliten el tall dirigit mitjançant nucleases funcionals Cas (Marraffini i Sontheimer, 2008; Hale et al., 2009; Jinek et al., 2012).

Hi ha tres tipus de sistemes CRISPR-Cas que difereixen en el processament dels pre-crRNA. En els sistemes I i III els pre-crRNA es processen amb endonucleases especialitzades. Quan els crRNA són madurs s'uneixen entre ells formant grans complexos amb varies proteïnes Cas per reconèixer i tallar àcids nucleics complementaris.

En el sistema II, en canvi, el pre-crRNA es processa de forma diferent. Un crRNA transactivador, tracrRNA, el qual és complementari a les seqüències repetides del pre-crRNA, és necessari no només per iniciar el procés de maduració a crRNA sinó

també pel tall dirigit a àcids nucleics extracromosòmics exògens. El processament es realitza a través d'una RNasa III RNA-específica i de doble cadena en presència de la nucleasa Cas9 (Mohanraju et al., 2016).

Les proteïnes Cas sovint porten dominis funcionals, com ara nucleases, helicases, polimerases o proteïnes d'unió a nucleòtids. Degut a aquesta diversitat, les proteïnes Cas realitzen múltiples funcions a diferents nivells dins del sistema CRISPR-Cas. La Cas9 és una endonucleasa amb la capacitat de tallar tant cadenes de DNA linealitzat com *supercoiled*. A més, conté dos dominis nucleasa, un domini tipus RuvC a N-terminal i un domini HNH al mig de la proteïna (Makarova et al., 2006; Saprunauskas et al., 2011).

El complex de crRNA i tracrRNA guia la nucleasa Cas9 a una seqüència extracromosòmica diana, que conté un lloc *protospacer adjacent motif* (PAM), per dur a terme el tall. Els llocs PAM, juxtaposats a la regió diana, consisteixen en NGG (Figura 5). El domini HNH de la Cas9 talla la cadena simple complementària a tres bases *upstream* del PAM. L'altra cadena es talla mitjançant el domini tipus RuvC en un punt entre els 3 – 8 bp *upstream* del PAM (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013; Wei et al., 2013).

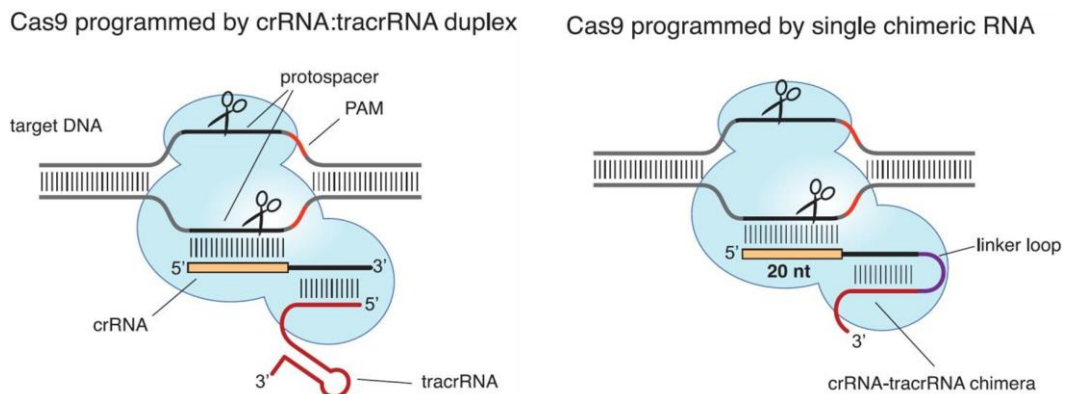


Figura 5. Sistema II de CRISPR-Cas9. L'endonucleasa Cas9 es guiada a la seva seqüència DNA diana pel dúplex crRNA-tracrRNA. Jinek et al. (2013) van aconseguir un tall dirigit i equivalent de la Cas9 guiada per una estructura de RNA quimèrica imitant la forma del dúplex crRNA-tracrRNA (Jinek et al., 2013).

Com es mostra a la Figura 5, Jinek et al. (2013) van publicar que el sistema II de CRISPR-Cas9 podia simplificar-se dissenyant un *single-guide* RNA (sgRNA), és a dir, una quimera de crRNA-tracrRNA. Aquesta guia RNA no només evita el pas de processar el pre-crRNA sinó que també redueix el número de components diferents que es necessiten sense perdre capacitat de tall en el lloc diana.

El sistema CRISPR-Cas9 es va poder simplificar gràcies a l'estudi complet de l'estructura del crRNA i del tracrRNA, que permetia mantenir la capacitat de tall i així poder-lo aplicar per editar genèticament mitjançant un DSB i dissenyant un sgRNA diana per seqüències específiques (Hwang et al., 2013; Jinek et al., 2013; Ran et al., 2013; Yang et al., 2013).

Fins a dia d'avui, l'edició mitjançant CRISPR-Cas9 ha suposat una autèntica revolució en el camp de la genètica i, concretament per la producció industrial de bioproductes, ha permès editar amb extrema precisió els genomes d'organismes tan diferents com els de bacteris, llevats, insectes, plantes o mamífers (Cho et al., 2018; Pickar-Oliver i Gersbach, 2019; Manghwar et al., 2019; Khan et al., 2020). A l'octubre del 2020, durant la redacció d'aquesta tesi, les investigadores Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna van rebre el premi Nobel de Química pel "desenvolupament de CRISPR-Cas9 com a mètode per l'edició genètica".

1.2.3 SISTEMA DE DOS PLASMIDIS EN *ESCHERICHIA COLI*

Tot i el descobriment del sistema CRISPR-Cas9 en bacteris, aquesta eina s'ha utilitzat principalment per modificar el genoma d'altres organismes ja que en molts bacteris el tall DSB és letal per les cèl·lules. El mecanisme de reparació NHEJ no és gens habitual en la majoria dels bacteris (Dillingham i Kowalczykowski, 2008) i la recombinació homòloga amb una seqüència exògena, anomenada *recombineering*, tampoc mostra una alta eficiència. La recombinació homòloga

per *recombineering* es basa en el sistema λ -Red, derivat del bacteriòfag λ -Red, i utilitza les proteïnes Exo, Beta i Gam. En presència d'un DNA lineal amb regions d'homologia majors de 50 bp, la proteïna Exo amb activitat exonucleasa 5'→3' degrada el DNA lineal deixant un extrem en cadena simple. La proteïna Beta protegeix i promou l'anellament d'aquest extrem de cadena simple a una seqüència complementaria. I finalment, la proteïna Gam impedeix que les nucleases endògenes RecBCD i SbcCD degradin el DNA lineal. La freqüència de recombinació del *recombineering* normalment és d'un positiu entre $10^4 - 10^5$ colònies (Yu et al., 2000; Constantino i Court, 2003; Sharan et al., 2009).

Amb el descobriment del sistema CRISPR-Cas9, el grup de recerca de Marraffini va desenvolupar un mètode d'edició del genoma d'*E. coli* que utilitzava la maquinària de recombinació del fag λ -Red conjuntament amb el sistema CRISPR-Cas9 com a pas de selecció per augmentar-ne l'eficiència (Jiang et al., 2013). Aquest desenvolupament consisteix en un sistema de dos plasmidis, pCas9 i pCRISPR, que codifiquen per la Cas9 i per la guia RNA, respectivament. Amb l'ús de cèl·lules *E. coli*, que expressen el sistema λ -Red, i l'addició d'un DNA donador lineal, que funciona com a motlle de reparació, s'aconsegueix l'edició per *recombineering* i es seleccionen les cèl·lules on no hi ha hagut recombinació homòloga amb CRISPR-Cas9.

Més endavant, Jiang et al. (2015) va publicar una millora del sistema de dos plasmidis, especialment eficient pel disseny de soques d'ús industrial, que permetia modificar el genoma més d'un cop i sense deixar-ne rastre.

En aquest cas, el plasmidi pTargetF conté tres elements a destacar. Per una banda, codifica per la guia RNA dirigida al gen d'interès, que s'ha de dissenyar sintèticament, sota el control del promotor constitutiu J23119(Spel). També codifica per la resistència a espectinomicina i conté l'origen de replicació ColE1.

El pCas, en canvi, expressa la proteïna Cas9 sota el control d'un promotor constitutiu, codifica per la resistència a kanamicina i conté els gens del sistema de recombinases Exo, Beta i Gam sota el control del promotor pBAD induïble amb L-arabinosa. El DNA donador que s'afegeix com a motlle de reparació mitjançant una co-transformació amb el pTargetF ha de ser de doble cadena (Figura 6).

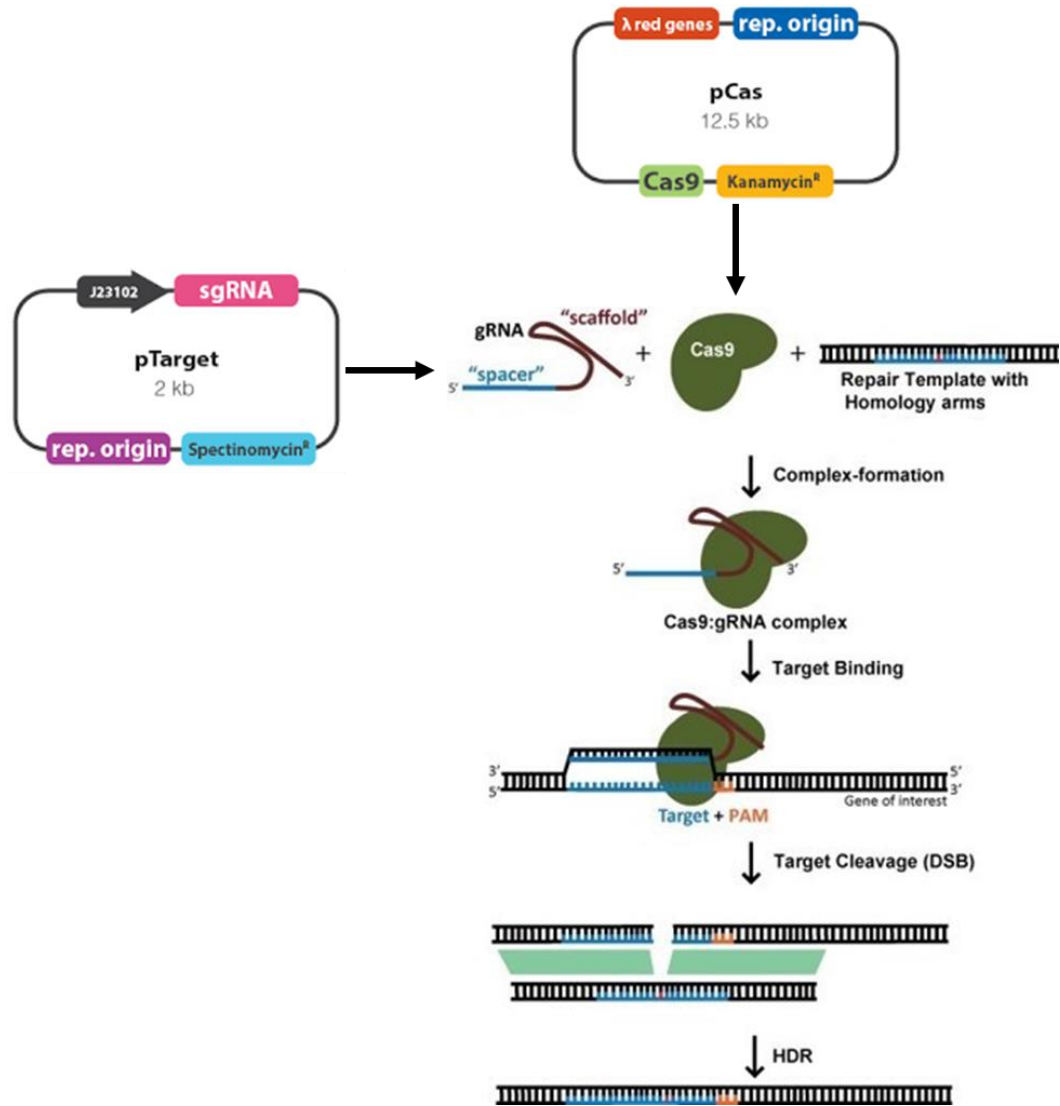


Figura 6. Sistema de dos plasmidis per editar el genoma d'*E. coli*. (Jiang et al., 2015).

L'eficiència d'aquest sistema varia segons si és una deleció, 69 %, o bé una inserció, que depèn de la longitud de les regions d'homologia del DNA donador, sent 6 % per 40 bp i 28 % per 400 bp. A més, en aquest estudi es demostra que es poden dur a terme varies rondes d'edició en un espai relativament curt de temps, ja que els plasmidis pTargetF i pCas es poden eliminar de les cèl·lules mitjançant un procés anomenat *curing*. Per una banda, el pCas inclou la seqüència d'un sgRNA que es dirigeix a l'origen de replicació del pTargetF, pMB1, sota el control d'un promotor induïble amb IPTG. D'aquesta forma es pot substituir el pTargetF que conté una guia RNA específica per un pTargetF amb una nova guia RNA. Per altra banda, el *curing* del pCas es pot dur a terme mitjançant el creixement a 37 °C, ja que la replicació d'aquest plasmidi depèn de la proteïna sensible a temperatura RepA101 que funciona correctament a 30 °C però s'inactiva a 37 °C.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral, emmarcada dins d'un projecte de Spinreact S.A.U., era l'estudi d'un procés de producció d'antígens recombinants de *T. gondii* que fossin útils pel futur desenvolupament d'un reactiu de serodiagnòstic de la toxoplasmosi. Per assolir aquest propòsit general, es van plantejar quatre objectius específics:

- i. Obtenir *cassettes* d'expressió d'antígens de *T. gondii*, incloent els elements per la inducció i la posterior purificació, adients per la producció en *E. coli* BL21 (DE3).
- ii. Generar soques d'*E. coli* BL21 (DE3) editades genèticament per la producció d'antígens de *T. gondii* des de diversos loci.
- iii. Avaluar els nivells d'expressió i recuperació de les proteïnes recombinants comparant soques transformades amb plasmidi i soques editades genèticament.
- iv. Comprovar la funcionalitat dels antígens produïts per detectar anticossos anti-*Toxoplasma* i estudiar la viabilitat de generar un kit de diagnòstic en dos formats diferents: test d'aglutinació en làtex (LAT) i immunoassaig enzimàtic (ELISA).

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 MATERIALS

3.1.1 EQUIPS I APARELLS

Taula 2. Llista d'equips i aparells.

Agitador d'incubació StickMax KS4000	IKA
Agitador Orbital i Rotabit 3000974	JP Selecta
Agitador magnètic RCT Basic/ HCT Basic	IKA
Ampolles Pyrex 50 mL – 2 L	Corning
Autoclau per esterilització a vapor Presoclave II75	JP Selecta
Balances analítiques i de precisió Series M-pact	Sartorius
Bany termostàtic Precisbat 6000148	JP Selecta
Bioreactor BIOSTAT-A	Sartorius
Bomba peristàtica de flux variable D-25VT	Dinko
Cabines de seguretat microbiològica BIO-IIA, BIO-IIA/P, BIO-IIA/M	Telstar
Centrífuga Allegra Microfuge 16	Beckman Coulter
Centrífuga Allegra Microfuge 22R	Beckman Coulter
Centrífuga 5415C	Eppendorf
Cubetes espectrofotòmetre	VWR
Espàtules	VWR
Espectrofotòmetre UV-1600PC	VWR
Estufa bacteriològica i de cultiu Incubig	JP Selecta
Filtres estèrils 0.2 µm	Sartorius
Flascons Erlenmeyer Duran 50, 100 mL	DWK Life Sciences
Flascons Erlenmeyer Duran <i>baffled</i> 250, 500 mL	DWK Life Sciences
Font d'alimentació electroforesi PowerPac 164-5050	Bio-Rad

Gels Mini-Protean TGX	Bio-Rad
Guants	VWR
Iman agitador	VWR
Lector de microplaques MultiScan Ex	Thermo Scientific
Màquina de gel	JP Selecta
Membranes de nitrocel·lulosa	Bio-Rad
Microones	LG
Mini-Protean TetraCell	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell 170-3930 / 170-3935	Bio-Rad
Nanodrop ONE	Thermo Scientific
Nevera	Beko
Nitrogen líquid	MVE
Paper Whatman	Sigma-Aldrich
Parafilm	VWR
pH-metre BASIC 30+	Crison Instruments
Pipeta automàtica Powerpette-Plus	Jencons
Pipetes PIPETMAN 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 1000 µL	Gilson
Plaques 96 pous Costar	Corning
Sistema d'electroforesi en gel per DNA	Bio-Rad
Sistema de purificació d'aigua MilliQ Simplicity	Merck-Millipore
Sonicador Model FB120 Sonic Dismembrator	Fisher Scientific
SpinTech 240	Spinreact
Termobloc sec TDB-120	Biosan
Termociclador C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
Transiluminador UV Tfx-20M	Life Technologies
Tub amb membrana de diàlisi Spectra-Por Float-A-Lyzer G2 1, 5 mL	Sigma-Aldrich
Tubs Eppendorf 1,5 i 2 mL	Eppendorf
Tubs Falcon estèrils NUNC 15, 50 mL	Thermo Scientific
Tubs PCR 250 µL	Eppendorf
Ultracongelador Revco ExF-86C ULT Upright	Thermo Scientific
Versadoc 4000	Bio-Rad
Vòrtex QL-861	CGoldenWall

3.1.2 SOFTWARE

Taula 3. Llista de tot el programari utilitzat.

Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
CRISPOR	http://crispor.tefor.net/
Everyvector	https://everyvector.com
Gene Snap	Syngene
Primer 3	https://primer3.ut.ee
QuantityOne	Bio-Rad

3.1.3 REACTIUS QUÍMICS

Taula 4. Llista de reactius químics.

Acetat de sodi	Sigma-Aldrich
Àcid acètic (99 %)	Sigma-Aldrich
Àcid clorhídric 1 M	Thermo Scientific
Àcid etilendiamintetraacètic (EDTA)	Thermo Scientific
Àcid tricloroacètic (TCA)	PanReac AppliChem
Àcid sulfúric 1 M	Sigma-Aldrich
Acrilamida/Bis-acrilamida (40 %)	Sigma-Aldrich
Agarosa	Sigma-Aldrich
Albúmina (BSA)	Sigma-Aldrich
Antiescumant SE-15	Sigma-Aldrich
Ampicil·lina	Sigma-Aldrich
β -mercaptoetanol 50 mM	Thermo Scientific
Blau brillant Coomassie R-250	Merck Millipore
Bromofenol blue	Merck Millipore
Clorur de calci	PanReac AppliChem
Clorur de magnesi	PanReac AppliChem
Clorur de potassi	PanReac AppliChem
Clorur de sodi	PanReac AppliChem
Complete Mini (còctel inhibidors de proteases)	Roche Diagnostics
Dihidrogen fosfat de potassi	PanReac AppliChem
Dimetil sulfòxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dodecilsulfat sòdic (SDS)	Sigma-Aldrich

Etanol (100 %)	PanReac AppliChem
Etanolamina	Merck Millipore
Espectinomicina	Sigma-Aldrich
Etil dimetil carbodiimida (EDC)	Thermo Scientific
Glicerina (99 %)	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma-Aldrich
Glucosa	PanReac AppliChem
Hidroclorur de guanidina (GuHCl)	Sigma-Aldrich
Hidrogenfosfat de sodi	PanReac AppliChem
Hidròxid de sodi 1 M	Thermo Scientific
Hidroxietil cel·lulosa (HEC)	Sigma-Aldrich
Imidazole	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Isopropil β -D-1-tiogalactopiranòsid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Kanamicina	Sigma-Aldrich
L-(+)-Arabinosa	Sigma-Aldrich
Metanol	PanReac AppliChem
N-Hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS)	Thermo Scientific
Persulfat d'amoni (APS)	Thermo Scientific
Polietilenglicol 8000 (PEG)	Promega
Proteïna A conjugada a peroxidasa	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris (Trizima Base)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl 1 M	Sigma-Aldrich
Tween 20	Thermo Scientific
Urea	Sigma-Aldrich
X-Gal	Promega

3.1.4 MEDIS, SOLUCIONS I TAMPONS

Taula 5. Llista de medis, solucions i tampions.

Làtex 300 nm AJ-30	Ikerlat
Làtex 300 nm AJ-30 COOH	Ikerlat
Luria, Base de Caldo (LB)	PanReac AppliChem
Marcador DNA 1 kb Plus	Invitrogen
Marcador proteïnes Kaleidoscope Prestained	Bio-Rad

Medi del bioreactor	5 g/L extracte de llevat, 20 g/L triptona, 0,6 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 4,9 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O i 7,2 g/L glucosa
Medi LB	0,5 % extracte de llevat, 1 % triptona, 10 mM NaCl
Medi SOB	0,5 % extracte de llevat, 1 % triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O
Medi SOC	0,5 % extracte de llevat, 1 % triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O i 20 mM glucosa
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O i 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS i 0,1 % Tween 20
Reactiu d'assaig de proteïnes <i>protein assay</i>	Bio-Rad
Solució Blau de Coomassie	2,5 g blau Coomassie, 450 mL metanol, 100 mL àcid acètic i fins a 1 L amb aigua
Solució de destinció	200 mL metanol, 150 mL àcid acètic i fins a 1 L amb aigua
Solució de competència I	60 – 200 mM CaCl ₂ i 10 mM HEPES a pH 7
Solució de competència II	60 – 200 mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES i 15 % glicerol
Solució KCM	1 M KCl, 0,3 M CaCl ₂ i 0,5 M MgCl ₂
Solució PEG	10 % PEG 8000
SYBR Safe 10000X	Invitrogen
Tampó de bloqueig	TBS-T i 5 % de llet en pols
Tampó de càrrega 6X al gel de poliacrilamida	375 mM Tris-HCl, 9 % SDS, 50 % glicerol i 0,03 % bromofenol blue
Tampó de càrrega 6X reductor	Tampó 6X i 1:10 de β-mercaptoetanol
Tampó de càrrega al gel d'agarosa	Invitrogen
Tampó de <i>coating</i> ELISA	0,1 M NaHCO ₃ i pH 9,6
Tampó de diàlisi 1	1 M urea, 50 mM Tris i pH 8
Tampó de diàlisi 2	0,1 M urea, 50 mM Tris i pH 8
Tampó d'electroforesi de proteïnes	25 mM Tris, 192 mM glicina i 0.1% SDS
Tampó de lisi	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M NaCl pH 7.4, còctel d'inhibidors de proteases i 0.8 g/L lisozima
Tampó de purificació <i>binding</i>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole i pH 8

Tampó de purificació <i>wash1</i>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole i pH 8
Tampó de purificació <i>wash2</i>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 50 mM imidazole i pH 8
Tampó de purificació <i>elution</i>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole i pH 8
Tampó de purificació desnaturalitzant <i>binding</i>	8 M urea / 6 M GuHCl, 0,5 M NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ i pH 7,8
Tampó de purificació desnaturalitzant <i>wash1</i>	8 M urea / 6 M GuHCl, 0,5 M NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ i pH 6
Tampó de purificació desnaturalitzant <i>wash2</i>	8 M urea / 6 M GuHCl, 0,5 M NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ i pH 5,3
Tampó de purificació desnaturalitzant <i>elution</i>	8 M urea / 6 M GuHCl, 0,5 M NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ i pH 4
Tampó de solubilització	8 M Urea, 50 mM Tris, 0,1 M DTT
Tampó de transferència de proteïnes	25 mM Tris, 192 mM glicina i 20 % metanol
Tetrametilbenzidina (TMB)	Sigma-Aldrich
Tris buffered saline (TBS)	10 mM Tris i 150 mM NaCl
TBS-T	TBS i 0,1 % Tween 20
Tris Acetate-EDTA (TAE) 10X	Sigma-Aldrich

3.1.5 KITS I ENZIMS

Taula 6. Llista de kits i enzims.

Agarosa Ni-NTA	Qiagen
Enzims de restricció	New England Biolabs
Lisozima	Fluka
Lligasa T4 Ligase	New England Biolabs
NZYMaxiprep	NZYTEch
Polimerasa Klenow DNA	New England Biolabs
Polimerasa KOD Hot Start DNA	Toyobo
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	Qiagen
Solució NBT/BCIP	Bio-Rad
Substrat Clarity western ECL	Bio-Rad
Toxo-Latex	Spinreact

3.1.6 PLASMIDIS

Taula 7. Llista de plasmidis.

pCas (62225)	Addgene
pTargetF (62226)	Addgene
pTarget-cadA	generat
pTarget-fecA	generat
pTarget-lacZ	generat
pTarget-ompA	generat
pTarget-ybbD	generat
pTarget-cadA (Amp)	generat
pTarget-fecA (Amp)	generat
pTarget-lacZ (Amp)	generat
pTarget-ompA (Amp)	generat
pTarget-ybbD (Amp)	generat
pTarget-panD (Amp)	generat
pET28a (+)	Novagen
pET28a-SAG2	generat
pET28a-GRA2	generat
pET28a-SAG2-GRA2	generat
pBlueScript II SK (+)	Agilent Technologies
pBlueScript-SAG2 Δ lacZ	generat
pBlueScript-GRA2 Δ cadA	generat

3.1.7 LÍNIES CEL·LULARS

Taula 8. Llista de línies cel·lulars.

<i>Escherichia coli</i> Top 10 (C404003)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) cèl·lules competents (C25271)	New England Biolabs

3.1.8 DNA GENÒMIC

El DNA genòmic de *Toxoplasma gondii* soca RH (50174D) es va adquirir a l'ATCC.

3.1.9 ANTICOSSOS I SÈRUMS

L'anticòs anti-histidines (His-probe G-18: sc-804) es va adquirir a Santa Cruz Biotechnology.

Els anticossos secundaris de cabra anti-IgG de conill conjugats a peroxidasa (12-348) o fosfatasa alcalina (12-448) es van adquirir a Sigma-Aldrich.

El sèrum de cabra, prèviament caracteritzat com a positiu pel kit Toxo-Latex, va ser facilitat per Spinreact S.A.U. per utilitzar-lo com a control positiu en els immunoassaigs.

Els sèrums humans es van caracteritzar amb el kit Toxo-Latex i van ser facilitats per Spinreact S.A.U., prèviament adquirits a Cerba Specimen Services.

3.2 MÈTODES

3.2.1 PREPARACIÓ DEL DNA GENÒMIC DE *TOXOPLASMA GONDII* I DELS PLASMIDIS PCAS – PTARGETF

Tant el DNA genòmic de *T. gondii* com els plasmidis pCas i pTargetF es van adquirir en forma liofilitzada. Per tant, es van reconstituir amb el volum adequat d'aigua o medi LB d'acord amb les instruccions del proveïdor. En el cas dels bacteris que contenien els plasmidis, posteriorment es va fer una estria en plaques LB amb els antibiòtics kanamicina, pel pCas, i espectinomicina, pel pTargetF. Finalment, es va fer créixer una colònia individual en un cultiu amb medi LB i l'antibiòtic corresponent per poder-ne purificar els plasmidis amb el kit *QIAprep Spin Miniprep*, seguint les instruccions del fabricant.

3.2.2 AMPLIFICACIÓ PER PCR

Les seqüències de tots els *primers* utilitzats en aquesta tesi es troben a l'Annex (Taula S1).

Les reaccions d'amplificació de DNA per PCR es van realitzar utilitzant la polimerasa KOD Hot Start DNA. Seguint les instruccions del fabricant, el protocol d'amplificació estàndard es va dur a terme afegint tampó 10X, dNTPs, MgSO₄, *primers* específics i aigua. A la Taula 9 es mostra un exemple de reacció i a la Taula 10 un exemple de condicions de reacció:

Taula 9. Volums d'una amplificació estàndard per PCR.

Component	Volum (μL)
DNA (20 ng/ μL) o dil. 1:10 cultiu O/N	1
KOD polimerasa	1
Tampó KOD 10X	5
dNTPS (2 mM de cada)	5
Mg ₂ SO ₄ (25 mM)	3
Primer FW (10 μM)	1,5
Primer RV (10 μM)	1,5
H ₂ O	Fins a 50

Taula 10. Condicions d'amplificació estàndards.

Temperatura	Temps
95 °C	2 min
95 °C	20 s
55 °C	10 s 25 x
70 °C	30 s
70 °C	5 min
4 °C	∞

Alguns paràmetres dels cicles, com la temperatura d'anellament o el temps d'elongació, variaven lleugerament segons la parella de *primers* utilitzada.

En el cas de la *overlap* PCR, la PCR inversa i la *colony* PCR, variaven paràmetres com el número de motlles en les *overlap* PCR, el número de cicles en la PCR inversa, passant de 25 a 35, o el tipus de motlle en la *colony* PCR. En aquest últim cas, s'havia de picar la colònia d'interès, diluir-la en 10 μL d'aigua i agafar-ne 1 μL com a motlle per la reacció de PCR.

3.2.3 ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

La separació de DNA per electroforesi es va realitzar en gels d'entre 1 – 2 % d'agarosa amb 2,5 μL de SYBR per cada 50 mL de TAE 1X. Es van carregar entre 5

i 50 µL de mostra amb 1 – 5 µL de colorant de càrrega i es van fer córrer a 90 – 120 V durant 45 – 90 min. El resultat dels gels es visualitzava a l'analitzador d'imatges Versadoc.

3.2.4 REACCIONS ENZIMÀTIQUES

Les digestions enzimàtiques es van dur a terme amb els enzims de restricció de New England Biolabs i el tampó corresponent per cada enzim. Un exemple genèric de reacció de digestió d'un plasmidi es mostra a la Taula 11:

Taula 11. Exemple de digestió enzimàtica.

Component	Reacció (µL)
DNA (≈50 ng/µL)	5
Enzim	1
Tampó 10X	3
H ₂ O	21

Aquestes reaccions de digestió s'incubaven a 37 °C durant 1 – 2 h i els productes de la digestió s'analitzaven per electroforesi en gel d'agarosa.

La lligació enzimàtica, en canvi, es duia a terme barrejant DNA d'un vector i DNA d'un fragment prèviament digerits amb els enzims de restricció adequats. Després de la digestió, es purificaven amb el kit *QIAquick Gel Extraction*, seguint les instruccions del fabricant, i es quantificaven llegint la Abs₂₆₀ al Nanodrop. Un exemple genèric de reacció de lligació d'un fragment en un plasmidi es mostra a la Taula 12:

Taula 12. Exemple de lligació enzimàtica.

Component	Reacció (μL)
DNA plasmidi (50 ng/ μL)	3
DNA insert (100 ng/ μL)	2
T4 Ligase	1
Tampó T4 10X	2
H ₂ O	12

En aquestes reaccions es mantenia una relació molar entre el vector i l'insert de 1:3. S'incubaven a temperatura ambient durant 1 h i posteriorment s'aturava la reacció inactivant l'enzim a 65 °C durant 10 min. Els productes de les lligacions es verificaven per digestió enzimàtica prèvia transformació bacteriana.

Un tercer tipus de reacció enzimàtica que es va dur a terme és la realitzada per la polimerasa Klenow DNA, que s'utilitza per convertir extrems cohesius en extrems roms mitjançant l'addició de nucleòtids (dNTPs) a l'extrem 5' o l'eliminació de dNTPs a l'extrem 3'. En aquesta reacció es dissolia el DNA i l'enzim en el tampó de la T4 Ligase suplementat amb 33 μM de cada dNTP (Taula 13). S'incubava a 25 °C durant 15 min i s'aturava la reacció afegint EDTA a 10 mM de concentració final i a 75 °C durant 20 min.

Taula 13. Exemple de reacció amb la polimerasa Klenow DNA.

Component	Reacció (μL)
DNA (≈ 30 ng/ μL)	30
Klenow	1
dNTPs	4
Tampó T4 10X	5

3.2.5 PROTOCOL DE CÈL·LULES COMPETENTS

Per dur a terme la generació de cèl·lules competents es va seguir un protocol estàndard. Inicialment s'havia de fer créixer un cultiu bacterià de 100 mL en medi

LB a 37 °C i 250 rpm a partir d'un pre-cultiu crescut O/N. Quan l'Abs₆₀₀ arribava a 0,375, és a dir, previsiblement al mig de la fase exponencial, es recollia el cultiu en tubs Falcon de 50 mL i es deixava en gel durant 10 min. Després es centrifugaven a 1600xg durant 10 min a 4 °C i sense desacceleració. Posteriorment es descartaven els sobrenedants i es resuspenien en 10 mL de solució estèril de CaCl₂ 60 mM i HEPES 10 mM. Es tornava a repetir el rentat un segon cop centrifugant a 1100xg durant 5 min i es deixava en gel durant 30 min. Finalment es repetia un tercer rentat amb les mateixes condicions que el segon i es resuspenien en 2 mL de solució estèril de CaCl₂ 60 mM, HEPES 10 mM i 15 % de glicerol. A partir d'aquests 2 mL es generaven les alíquotes i es congelaven ràpidament en N₂ líquid per emmagatzemar-les a -80 °C.

3.2.6 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

La transformació bacteriana, que consisteix en la introducció de DNA exògen a l'interior de la cèl·lula del bacteri, es duia a terme mitjançant el mètode químic. Es descongelava una alíquota de 100 µL de cèl·lules competents i es barrejava amb 1 – 100 ng del DNA amb sals, com es mostra a Taula 14:

Taula 14. Preparació de DNA i sals per la transformació bacteriana.

Component	Reacció (µL)
DNA (≈50 ng/µL)	2
Solució PEG	27
Solució KCM	10
H ₂ O	61

S'incubava en gel durant 30 min i seguidament es realitzava el xoc tèrmic en un bany d'aigua a 42 °C durant 60 s. Es retornava la preparació al gel durant 2 min i finalment s'afegien 800 µL de medi SOC.

Aquest cultiu d'1 mL es deixava créixer a 37 °C durant 1 h i a 250 rpm. Un cop finalitzat, es dispensaven 100 µL en una placa LB amb l'antibiòtic de selecció corresponent i s'incubava a 37 °C O/N.

L'anàlisi de competència, o eficiència de transformació, es duia a terme a través del següent càlcul: Eficiència = colònies/µg de DNA.

3.2.7 CULTIU BACTERIÀ

La majoria de cultius que es van realitzar eren de petit volum, entre 3 i 5 mL, amb motiu d'amplificació *in vivo* de plasmidis o clons individuals. En canvi, per produir proteïnes recombinants es van dur a terme dos tipus de cultius bacterians, en flascó d'agitació i en bioreactor.

Els medis havien de ser estèrils, per tant, es van autoclavar a 121 °C durant 20 min. S'afegien els antibiòtics corresponents a la concentració adequada, sent aquesta 50 µg/mL per kanamicina i espectinomicina, i 100 µg/mL per ampicil·lina.

Hi havia diversos flascons d'agitació on es podien fer créixer volums de cultius entre 10 i 100 mL. S'inoculaven amb una dilució 1:10 d'un pre-cultiu fet créixer a partir d'una colònia individual a 37 °C i 250 rpm O/N.

Per dur a terme el creixement amb densitats cel·lulars superiors es va utilitzar el bioreactor BIOSTAT-A amb una cuba de 2 L. Es va inocular un pre-cultiu de 100 mL en 1,5 L de medi esterilitzat. El pH i el pO₂ (percentatge d'oxigen dissolt) es van mesurar amb sondes introduïdes al bioreactor. En el cas del pH es mantenia el valor assignat mitjançant l'addició de HCl 1 M o NaOH 1 M. Per mantenir el percentatge d'oxigen dissolt es regulava l'entrada d'aire mitjançant un cabalímetre màssic. El medi de cultiu s'esterilitzava conjuntament amb el bioreactor ja muntat i la glucosa s'afegia un cop finalitzada l'esterilització per filtració amb un filtre estèril de 0,2 µm. La solució antiescumant s'afegia filtrada

amb el mateix procediment i a una concentració màxima de 10 mg/L per evitar alteracions a l'equilibri de l'oxigen dissolt entre fases líquida i gasosa que dificultessin la seva transferència.

Durant els cultius, tant en flascó d'agitació com en bioreactor, es prenen mostres per l'anàlisi de biomassa mesurant l' Abs_{600} i per l'anàlisi de proteïnes en SDS-PAGE.

3.2.8 ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La separació de proteïnes per electroforesi es va realitzar en gels Mini Protean TGX del 8 – 16 % de poliacrilamida seguint el protocol recomanat pel fabricant. Es van preparar les mostres amb el tampó de càrrega 6X reductor diluint-lo 1:6, es van escalfar durant 5 min a 100 °C i es van centrifugar durant 2 min a 13000 rpm abans de carregar-les. Els gels es van fer córrer a unes condicions de 35 mA per cada gel de poliacrilamida durant 45 – 60 min. Posteriorment, els gels es dipositaven en la solució de tinció Blau de Coomassie durant 1 h. Finalment, es destenyien els gels amb la solució de destinció durant 8 – 16 h. El resultat dels gels es visualitzava a ull nu i es fotografiaven al Versadoc.

3.2.9 SOLUBILITZACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

Els cultius de soques *E. coli* induïts amb IPTG per expressar les proteïnes recombinants es centrifugaven a 3000xg durant 15 min a 4 °C. Posteriorment es resuspenien en tampó de lisi en un volum corresponent al 10 % del volum del cultiu inicial i es procedia al trencament cel·lular o disrupció cel·lular per mètode físic mitjançant un sonicador. Finalment es centrifugaven a 9400xg durant 45 min a 4 °C per separar les fraccions soluble i insoluble.

Les proteïnes recombinants es poden produir en forma soluble, però en alguns casos agreguen formant cossos d'inclusió insolubles. La majoria de cossos

d'inclusió es poden solubilitzar utilitzant detergents o agents desnaturalitzants abans de la purificació.

Per dur a terme la solubilització de les proteïnes es va resuspendre la fracció insoluble en tampó de solubilització, amb presència d'un agent desnaturalitzant, en un volum corresponent al 10 % del volum del cultiu inicial. Es va fer rotar la fracció insoluble durant 1 h a temperatura ambient i es va centrifugar a 9400xg durant 10 min. Posteriorment es va dialitzar contra 500 volums dels tampons de diàlisi 1 i 2 durant 1 h. Finalment es va dialitzar dos cops contra 500 volums de PBS a 4 °C durant 24 h i durant 1 h. La fracció resultant d'aquesta diàlisi es va centrifugar a 9400xg. Per l'anàlisi de mostres en SDS-PAGE es va recollir una alíquota del sobrenedant i es va resuspendre el pellet en PBS.

3.2.10 PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS AMB NI-NTA

El sistema de purificació Ni-NTA es basa en una cromatografia d'afinitat amb metalls on l'etiqueta 6xHis, o cua d'histidines, té una gran afinitat amb els ions metàl·lics com el Ni²⁺, el qual es troba immobilitzat en una resina utilitzant l'agent quelant àcid nitrilotriacètic (NTA). L'imidazole competeix amb la cua d'histidines per unir-se al Ni-NTA i això permet la purificació de les proteïnes amb aquesta etiqueta. En el passos d'unió i rentats es recomana l'ús de baixes concentracions d'imidazole, entre 10 i 50 mM, per evitar la unió inespecífica de proteïnes. En canvi, en l'últim pas es requereix una alta concentració d'imidazole, 250 mM, per eluir les proteïnes amb 6xHis. El procés es va realitzar seguint les instruccions del fabricant.

En cas d'aparició de cossos d'inclusió, aquest sistema de purificació d'afinitat a Ni-NTA també permet realitzar el procés sota condicions desnaturalitzants substituint l'imidazole per agents desnaturalitzants, com ara la urea o l'hidroclorur de guanidina (GuHCl), conjuntament amb una reducció del pH.

3.2.11 PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES AMB TCA

L'anàlisi en SDS-PAGE de mostres provinents de la purificació en condicions desnaturalitzants de GuHCl 6 M formen un precipitat de color taronja-groc quan es tracten amb SDS. Per evitar-ho cal diluir les mostres 1:6 amb H₂O, dialitzar-les o bé separar-les de la guanidina a través de la precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA).

Primer es diluïen les mostres fins a 100 µL afegint volums iguals de 10 % TCA. Després es deixaven en gel durant 20 min i es centrifugaven 15 min a 13000 rpm i 4 °C. Posteriorment es rentaven els pellets amb 500 µL d'etanol 100 % de -20 °C i es centrifugaven 5 min a 13000 rpm i 4 °C. Finalment, es deixaven assecar 5 min i es resuspenien en tampó de càrrega 6X reductor. Cal destacar que s'havien de carregar les mostres immediatament després de bullir durant 10 min a 100 °C per evitar precipitacions de possibles traces de GuHCl.

3.2.12 WESTERN BLOT

Els Western blot es realitzaven després d'un procés de transferència de les proteïnes des del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF a 400 mA i durant 90 min, seguint les instruccions del fabricant. Un cop completada la transferència es bloquejava la membrana amb proteïna de llet durant 1 h a temperatura ambient. Per detectar les proteïnes recombinants amb cua d'histidines, s'incubava la membrana en una solució que contenia l'anticòs anti-His diluït 1:500 en tampó de bloqueig durant 16 h a 4 °C. Posteriorment es realitzaven cinc rentats amb TBS-T agitant a 100 rpm i s'incubava amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa o fosfatasa alcalina a una dilució 1:2000 o 1:10000, respectivament. Després d'una incubació de 60 – 120 min es procedia a fer cinc rentats amb TBS-T i finalment es detectava la senyal. L'activitat peroxidasa es detectava per quimioluminescència amb els reactius *Clarity western* i recollint

la imatge al Versadoc, en canvi, l'activitat de la fosfatasa es revelava amb els reactius NBT/BCIP i es podia veure a ull nu.

3.2.13 QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

Es va seguir el mètode colorimètric Bradford utilitzant el reactiu *protein assay* per determinar la concentració de proteïna total de les mostres d'interès seguint les instruccions del fabricant. La reacció entre els aminoàcids i el reactiu d'assaig de proteïnes forma un complex proteïna-pigment que es pot mesurar a 595 nm. La concentració es va determinar a partir d'una recta de calibració preparada amb albúmina BSA.

3.2.14 CÀLCUL DE PRODUCTIVITAT

La productivitat volumètrica és la relació entre la quantitat de producte obtingut per unitat de volum i temps.

Es realitzava el càlcul de la productivitat volumètrica de cada cultiu al final dels cultius bacterians induïts amb IPTG durant 16 h i després del procés de purificació amb Ni-NTA i quantificació mitjançant Bradford.

3.2.15 EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

L'extracció de DNA genòmic es va realitzar picant una colònia individual de la soca bacteriana d'interès i resuspenent-la en 100 µL d'aigua estèril, o bé utilitzant directament 100 µL de cultiu crescut O/N. Després s'escalfava el tub a 94 °C durant 5 min i es centrifugava a 10000 rpm durant 5 min recollint el sobrenedant. Aquest sobrenedant es podia emmagatzemar congelant-lo a -20 °C, o bé podia ser utilitzat, directament o diluït, com a motlle en una amplificació per PCR.

3.2.16 PRECIPITACIÓ DE DNA

La precipitació del DNA amb acetat sòdic i etanol es va utilitzar per concentrar i dessalinitzar preparacions aquoses d'àcids nucleics. Amb l'addició de 10 µL d'acetat sòdic 3M a pH 5,2 i de 290 µL d'etanol 100 % es va provocar la precipitació del DNA en una solució de 100 µL. Després d'afegir la sal i l'alcohol, es barrejava amb vòrtex i es mantenia la mostra a -20 °C durant 30 min. Posteriorment es centrifugava a 13000 rpm durant 25 min i es feia un rentat amb etanol 70 %. Finalment, es deixava assecar el pellet a temperatura ambient durant 15 min i es resuspensia en el volum desitjat. La concentració del DNA es podia comprovar llegint la Abs₂₆₀ al Nanodrop.

3.2.17 EDICIÓ GENÈTICA

L'edició genètica d'*E. coli* amb els sistema de dos plasmidis és un tipus de transformació bacteriana on es transforma primer el pCas i es co-transformen finalment el pTarget específic i el DNA donador.

Diferia del protocol estàndard de transformació bacteriana en tres paràmetres, la temperatura de creixement en SOC i d'incubació de les plaques LB amb antibiòtics era 30 °C, el temps d'incubació de les plaques era de 24 – 36 h, i les quantitats de pTarget i DNA donador en la co-transformació venien donades pel protocol dissenyat a Jiang et al. (2015). A la Taula 15 es pot veure un exemple genèric de co-transformació:

Taula 15. Preparació de DNA i sals per l'edició genètica.

Component	Reacció (µL)
pTarget (100 ng/µL)	1
DNA donador (40 ng/µL)	10
Solució PEG	27
Solució KCM	10
H ₂ O	52

3.2.18 CRIBRATGE BLAU – BLANC

L'anàlisi de l'edició genètica es feia per *colony* PCR utilitzant *primers* indicadors d'edició. Tot i això, en el cas del locus *lacZ* es podia fer un anàlisi previ, més ràpid i fàcil que la *colony* PCR.

Utilitzant el cribratge blau – blanc es podien distingir les colònies que havien patit disrupció del gen *lacZ* segons si tenien color blau o color blanc. Això es dona gràcies a que el gen *lacZ*, que codifica per la β -galactosidasa, es troba a dins de l'operó *lac* l'expressió del qual és induïble per la lactosa o per un anàleg de la lactosa com l'IPTG. L'enzim β -galactosidasa és capaç de trencar el substrat X-Gal, que conté una galactosa unida al pigment blau insoluble 4-cloro-3-bromo-indigo. D'aquesta forma, en plaques amb X-Gal i IPTG es podien distingir colònies blaves (sense disrupció a *lacZ*) i blanques (amb disrupció a *lacZ*).

3.2.19 PES HUMIT I PES SEC CEL·LULAR

Una forma de quantificar la biomassa més acurada que la densitat òptica és la mesura del pes humit cel·lular i del pes sec cel·lular.

Per comparar pesos entre soques es van fer créixer cultius en condicions equivalents, és a dir, amb medi SOC, induït amb 1 mM d'IPTG a 0,6 d' Abs_{600} , durant 16 h i a 30 °C. A les 4 h i a les 16 h es van prendre mostres de 30 mL, es va mesurar l' Abs_{600} i després es van centrifugar a 4500xg durant 10 min per mesurar el pes dels pellets (pes humit cel·lular). Posteriorment es van resuspendre els pellets en 30 mL d'una solució de 9 g/L NaCl i es van centrifugar de nou a 4500xg durant 10 min. Finalment es van deixar assecar a 85 °C durant 24 h fins a mesurar un pes sec cel·lular constant.

3.2.20 EMMAGATZEMATGE A LLARG TERMINI AMB GLICEROL

Els estocs bacterians amb glicerol tenen una gran importància en l'emmagatzematge a llarg termini de genotips o plasmidis d'interès. Al contrari de l'emmagatzematge a 4 °C de plaques LB o a -20 °C de plasmidis, l'estoc de glicerol a -80 °C és estable durant anys. L'addició de glicerol al 20 % de concentració final estabilitza els bacteris congelats impedit el dany de les membranes i, per tant, assegurant la seva supervivència.

3.2.21 SENSIBILITZACIÓ DEL LÀTEX I IMMUNOTURBIDIMETRIA

La sensibilització del làtex es podia dur a terme via adsorció passiva o via unió covalent.

En l'adsorció passiva, que es dona com a conseqüència d'atraccions electrostàtiques i forces de van der Waals entre antígens i làtex, s'havia de tenir en compte la càrrega elèctrica dels antígens directament relacionada amb el pH del medi. Es van fer les adsorcions en tampó Tris a pH 8 amb 1 % de làtex final durant 3 h i a temperatura ambient, havent afegit 0,2 % de HEC com a anticoagulant i 6,5 mg/mL de BSA com a estabilitzant.

Per la unió covalent, per altra banda, es necessitaven partícules de poliestirè carboxilades, és a dir, amb grups carboxil que requerien un pas previ d'activació amb 2 mM d'EDC i 5 mM de sulfo-NHS. Posteriorment es va realitzar el revestiment en un tampó PBS a pH 6 amb 1 % de làtex final durant 3 h i a 4 °C, havent afegit 0,75 mg/mL d'etanolamina i glicina com a neutralitzants i 20 mg/mL de BSA com a estabilitzant.

Per últim, l'assaig immunoturbidimètric es realitzava a l'equip SpinTech 240 barrejant mostres de sèrum o solució salina (9 g/L NaCl) amb un tampó TBS amb 0,2 % de HEC. Posteriorment s'afegia un segon tampó que incloïa el làtex

sensibilitzat amb antígens. Durant el procés de reacció es feien dues lectures de l'Abs₃₄₀, a l'inici d'afegir el làtex i al cap de 5 min.

3.2.22 IMMUNOASSAIG ENZIMÀTIC (ELISA)

L'immunoassaig enzimàtic es va utilitzar per avaluar la funcionalitat dels antígens recombinants amb sèrums positius i negatius per la toxoplasmosi.

Les plaques de poliestirè de 96 pous es van recobrir amb les proteïnes antigèniques a una concentració de 2,5 µg/mL mitjançant el tampó de *coating* durant la nit i a 4 °C. Com a control positiu es va afegir una preparació de TLA facilitada per Spinreact S.A.U. i com a control negatiu hi havia la proteïna GST produïda i purificada en *E. coli*. Es van realitzar dos rentats amb PBS-T i BSA al 0,5 %, i posteriorment es va realitzar un bloqueig amb el mateix tampó durant 1 h a 37 °C. 100 µL dels *pools* de sèrums humans, diluïts a 1:25 en el tampó de bloqueig, es van afegir als pous i es van incubar durant 30 – 60 min a 37 °C i 100 rpm. Després del pas d'unió als anticossos, es va fer un rentat amb el mateix tampó utilitzat anteriorment i es va realitzar una incubació amb proteïna A conjugada a peroxidasa diluïda entre 1:1000 – 1:25000 en PBS-T a 37 °C i durant 20 min agitant a 100 rpm. Finalment, després de sis rentats amb el tampó PBS-T i BSA 0,5 %, es van afegir 100 µL del substrat TMB i es va incubar la placa durant 15 – 60 min a 37 °C. La reacció es va aturar amb 100 µL de H₂SO₄ 1 M i es va mesurar l'Abs₄₅₀ en el lector d'ELISA.

4. RESULTATS

Tal com s'ha introduït prèviament, la idea d'aquest projecte rau en el desenvolupament d'un sistema de producció de proteïnes recombinants. Més concretament, en aquesta tesi es mostra l'obtenció de soques transformades amb plasmidi i soques editades genèticament amb la capacitat de produir antígens de *T. gondii* vàlids pel diagnòstic de la toxoplasmosi.

4.1 GENERACIÓ DE SOQUES TRANSFORMADES AMB PLASMIDI

Com a primer pas, es van establir soques d'*E. coli* transformades amb plasmidi, per la qual cosa calia seleccionar els antígens de *Toxoplasma*. A partir de la literatura científica es van poder triar els antígens que obtenien una alta sensibilitat i especificitat comparats amb el TLA. Posteriorment es van clonar les seqüències genètiques rellevants dels antígens en un plasmidi adequat en relació a la soca bacteriana.

4.1.1 SELECCIÓ DELS ANTÍGENS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Es va decidir treballar amb les proteïnes SAG2 i GRA2 com a representatives de la superfície i dels grànuls del *Toxoplasma*, respectivament. Segons Holec-Gasior (2013), SAG2 i GRA2 mostren ambdues una sensibilitat >90 % en sèrums prèviament classificats de fase aguda i >67 % en sèrums prèviament classificats de fase crònica.

Les seqüències de DNA que codifiquen els antígens de *T. gondii* SAG2 i GRA2 es van obtenir de la base de dades GenBank (número d'accés AF249698.1 i L01753.1, respectivament). En el cas de SAG2, la seqüència genètica anava del residu 28 al 172, corresponent al 100 % de la proteïna madura excloent el pèptid senyal,

mentre que la seqüència de GRA2 anava del residu 51 al 185, corresponent a l'exó 2 (C-terminal) el qual conté el 85 % de la proteïna madura excloent, també, el pèptid senyal.

Les seqüències de SAG2 i GRA2 es van amplificar per PCR a partir del DNA genòmic de *T. gondii* seguint un protocol estàndard d'amplificació i utilitzant la polimerasa amb activitat correctora KOD (apartats 3.2.1 i 3.2.2). El disseny dels *primers* va tenir en compte la pauta de lectura de la cua d'histidines del plasmidi pET28a (+), i els llocs de tall dels enzims de restricció BamHI i HindIII es van incloure per facilitar el clonatge dels fragments.

Després de fer la reacció, una alíquota dels productes de PCR es va córrer en un gel a l'1 % d'agarosa (apartat 3.2.3) per verificar que s'havia amplificat el producte desitjat (Figura 7).

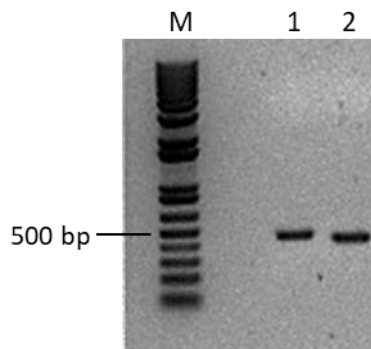


Figura 7. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de les seqüències codificants pels antígens SAG2 i GRA2. Les seqüències codificants per SAG2 i GRA2 es van amplificar per PCR utilitzant DNA genòmic i els *primers* sag2_FW/sag2_RV. Una alíquota de cada reacció es va analitzar per electroforesi en gel d'agarosa. Carril 1: SAG2. Carril 2: GRA2.

Previsiblement, els fragments de SAG2 i GRA2 eren de 435 bp i 408 bp, respectivament. El gel d'electroforesi va mostrar les bandes amb la mida correcta i els fragments es van purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction*.

4.1.2 GENERACIÓ DELS CASSETTES D'EXPRESSIONI

Per generar els *cassettes* d'expressió, tal com s'ha explicat a l'apartat anterior, seqüències parcials de SAG2 i GRA2 es van amplificar per PCR amb *primers* específics utilitzant el DNA genòmic. Aquests fragments, conjuntament amb el plasmidi, es van digerir amb els enzims de restricció BamHI i HindIII (apartat 3.2.4), cosa que permetia respectar l'orientació dels fragments. Posteriorment, aquests fragments es van lligar al vector pET28a amb l'enzim T4 Ligase i en pauta de lectura amb l'etiqueta d'histidines N-terminal present en el plasmidi, que serveix per facilitar la purificació i detecció de les proteïnes (Figura 8). Els plasmidis resultants es van transformar en cèl·lules competents *E. coli* Top 10 (apartats 3.2.5 i 3.2.6).

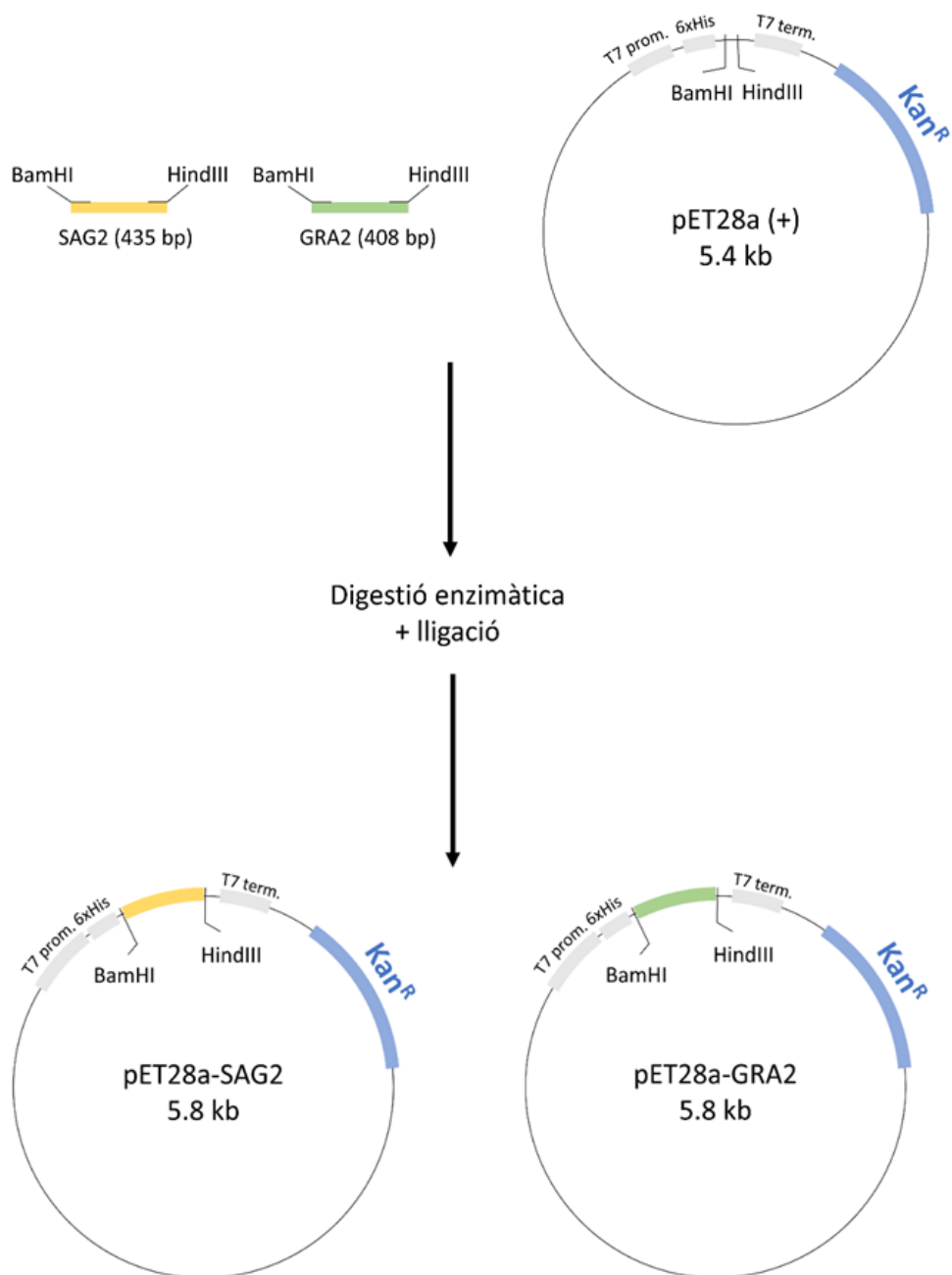


Figura 8. Estratègia de clonació dels plasmidis pET28a-SAG2 i pET28a-GRA2.

Després de la transformació, colònies de les soques desitjades es van fer créixer en cultius O/N (apartat 3.2.7) en presència de kanamicina per poder-ne purificar els plasmidis amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* i comprovar-ne la mida per digestió enzimàtica utilitzant PvuII. Un cop realitzada la incubació d'1 h a 37 °C, els

plasmidis digerits es van analitzar en un gel d'agarosa a l'1 % per visualitzar la mida dels fragments resultants del tall (Figura 9). El patró dels fragments en el gel indicava que els plasmidis contenien els inserts esperats. Per una banda, el pET28a-SAG2 s'esperava que fos digerit en tres fragments de 100 bp, 1 kb i 4,7 kb; mentre que en el cas del pET28a-GRA2 s'esperava un resultat de quatre fragments de 100 bp, 1 kb, 1,7 kb i 2,9 kb.

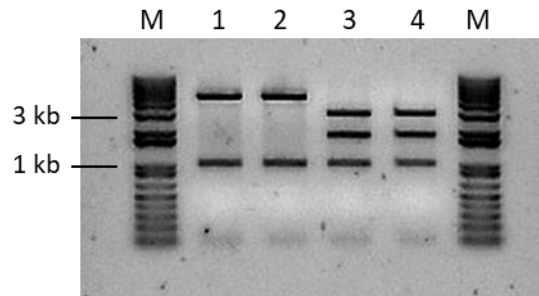


Figura 9. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pET28a-SAG2 i pET28a-GRA2. La digestió de dues colònies de cada transformació amb l'enzim PvuII va donar com a resultat tres fragments en el cas del pET28a-SAG2 (carrils 1 i 2) i quatre fragments en el cas del pET28a-GRA2 (carrils 3 i 4).

Després de l'anàlisi per digestió enzimàtica, es van purificar els dos plasmidis per confirmar-ne la seqüència via seqüenciació de Sanger (Figura S1 de l'Annex). Un cop comprovat que els plasmidis pET28a contenien les seqüències codificants pels antígens SAG2 i GRA2, es va dur a terme la transformació en cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3). Es va triar aquesta soca perquè està específicament dissenyada per la producció de proteïnes recombinants, degut a la seva deficiència en proteases Lon i OmpT que prevenen la degradació de proteïnes exògenes, i perquè inclou el lisogen λ DE3 que permet la síntesi de la T7 RNA polimerasa sota el control d'un promotor induïble amb IPTG. Amb aquest sistema, la inducció de la polimerasa es maximitza i l'expressió de les proteïnes, que estan sota el control del promotor T7 del pET28a, es troben indirectament induïdes per IPTG.

Tal com s'ha introduït en l'apartat 1.1.4, la bibliografia més recent ha descrit l'ús de proteïnes químiques en la diagnòsi de la toxoplasmosi. En aquesta tesi es va

considerar la producció d'una proteïna quimèrica nova que contenia seqüències de SAG2 i GRA2, ja que podia incrementar el rendiment del reactiu de diagnòstic a més de reduir els costos de producció.

Els plasmidis pET28a-SAG2 i pET28a-GRA2 van servir com a motlle per amplificar les seqüències de SAG2 i GRA2. Aquest cop amb una diana de restricció a un extrem i amb una regió de superposició entre fragments a l'altre extrem, de manera que servís posteriorment per generar l'antigen quimèric SAG2-GRA2 per *overlap* PCR. La primera amplificació es va realitzar amb els *primers* sag2_fusion_FW/sag_fusion_RV i gra2_fusion_FW/gra_fusion_RV, i els productes d'aquestes PCR es van fer servir com a motlle per a la segona amplificació amb els *primers* sag2_fusion_FW/gra2_fusion_RV.

El producte final de la *overlap* PCR es va purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction*, i seguidament es va digerir amb els enzims BamHI i HindIII. Després de la incubació, el producte de la digestió es va fer córrer en un gel d'agarosa a l'1 % per avaluar-ne la puresa i la mida (Figura 10).

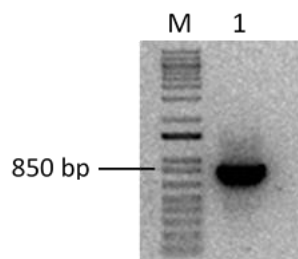


Figura 10. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació i la digestió enzimàtica de la seqüència codificant per l'antigen quimèric SAG2-GRA2. La seqüència codificant per SAG2-GRA2 es va generar per *overlap* PCR i es va digerir amb BamHI i HindIII. Una alíquota de la digestió es va analitzar per electroforesi en gel d'agarosa. Carril 1: SAG2-GRA2.

El fragment que es mostra a la Figura 10 correspon a la mida esperada de la seqüència quimèrica SAG2-GRA2, és a dir, 843 bp. Després d'aquest pas es va poder realitzar la lligació amb el plasmidi pET28a prèviament digerit amb els mateixos enzims de restricció (Figura 11).

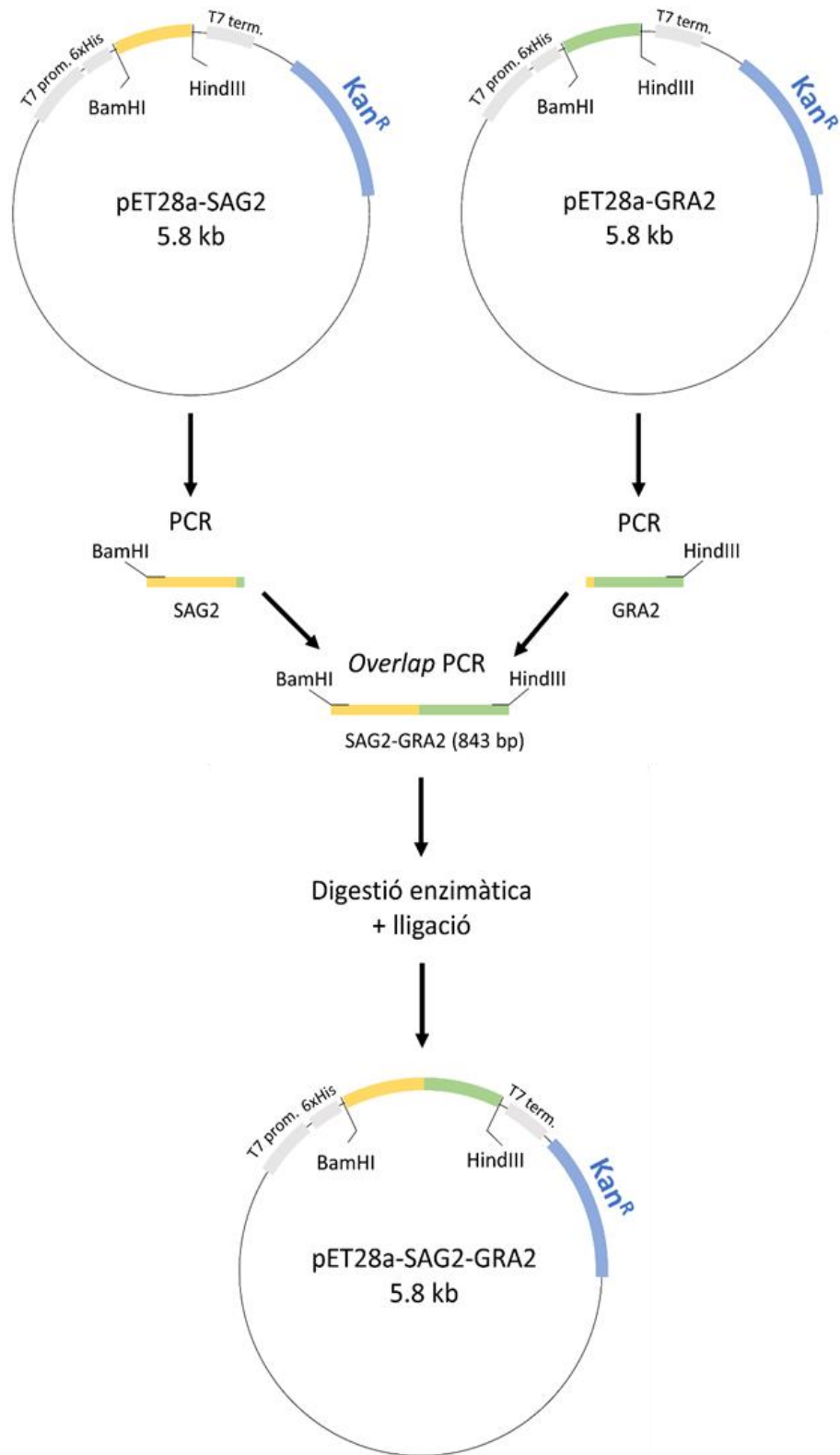


Figura 11. Estratègia de clonació del plasmidi pET28a-SAG2-GRA2.

Tal com s'havia procedit amb els anteriors dos plasmidis, el pET28a-SAG2-GRA2 es va transformar en cèl·lules competents *E. coli* Top 10. Posteriorment es va fer créixer la soca en cultius O/N en presència de kanamicina i es va purificar el plasmidi per comprovar que la lligació s'havia donat correctament mitjançant una digestió enzimàtica amb l'enzim XhoI (Figura 12).

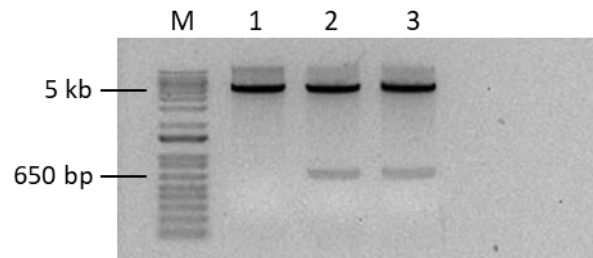


Figura 12. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica del plasmidi pET28a-SAG2-GRA2. La digestió de tres colònies (carrils 1, 2 i 3) de la transformació amb l'enzim XhoI havia de donar com a resultat dos fragments.

El patró de bandes esperat per aquesta digestió era de dues bandes amb mides de 715 bp i 5495 bp. Com es pot veure a la Figura 12, dues de les tres colònies (carrils 2 i 3) tenien l'insert correctament clonat.

Finalment, es va seleccionar un d'aquests dos plasmidis pET28a-SAG2-GRA2 per poder confirmar la seva seqüència via seqüenciació de Sanger (Figura S2 de l'Annex) i, posteriorment, es va transformar en cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3), tal com s'havia fet amb el pET28a-SAG2 i el pET28a-GRA2.

4.2 PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT EN SOQUES TRANSFORMADES AMB PLASMIDI

Les soques d'*E. coli* BL21 (DE3) generades amb els plasmidis pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2 es van utilitzar en processos de producció de proteïna recombinant amb el propòsit de verificar i millorar el nivell d'expressió d'aquest sistema.

4.2.1 DETERMINACIÓ D'UN PROTOCOL DE PURIFICACIÓ ADIENT

Les soques transformades amb els plasmidis pET28a es van incubar en 5 mL de medi LB amb kanamicina, concretament a 37 °C i a 200 rpm durant 16 h com a pre-cultiu fins arribar a la fase estacionaria. Seguidament els bacteris es van diluir 10 vegades en medi LB amb kanamicina utilitzant un flascó de 100 mL. Es va iniciar així el cultiu mantenint els paràmetres del pre-cultiu fins arribar a una Abs_{600} de 0,6 (fase mig-exponencial), moment en el que es va induir la presència de T7 RNA polimerasa mitjançant l'adició d'1 mM IPTG. Durant el cultiu es van prendre mostres per l'anàlisi de proteïnes abans d'induir amb IPTG, a les 6 h i a les 16 h de creixement.

Després de 16 h de creixement del cultiu, i com a primer pas de purificació proteica, els bacteris es van recollir via centrifugació durant 15 min a 3000xg i a 4 °C. Els pellets es van resuspendre en un 10 % del volum original del cultiu en tampó de lisi (Taula 5). Es va realitzar la disrupció de les cèl·lules per sonicació al 80 % d'amplitud durant 8 min, alternant 2 s en ON i 2 s en OFF. Tot seguit, els bacteris es van centrifugar durant 45 min a 9400xg i a 4 °C. El sobrenedant corresponia a la fase soluble, mentre que el pellet corresponia a la fase insoluble. També es van agafar mostres per l'anàlisi de proteïnes tant de la fase soluble com de la fase insoluble.

Totes les mostres es van analitzar en SDS-PAGE (apartat 3.2.8) i mitjançant la tinció amb blau de Coomassie (Figura 13).

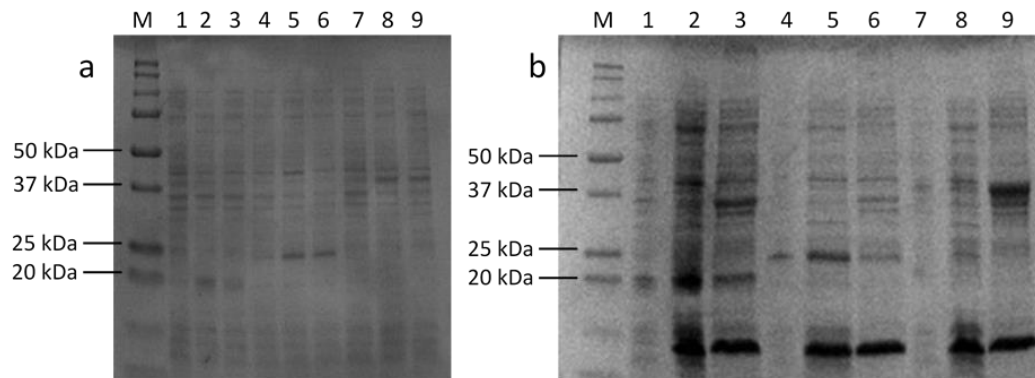


Figura 13. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció i solubilitat dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. a) Els cultius de bacteris amb pET28a-SAG2 (carrils 1, 2 i 3), pET28a-GRA2 (carrils 4, 5 i 6) i pET28a-SAG2-GRA2 (carrils 7, 8 i 9) es van induir amb IPTG per analitzar la producció de les proteïnes d'interès. Carrils 1, 4 i 7: no-induïts. Carrils 2, 5 i 8: 6 h en IPTG. Carrils 3, 6 i 9: 16 h en IPTG. b) Anàlisi de les fraccions soluble i insoluble després de trencar les cèl·lules amb pET28a-SAG2 (carrils 1, 2 i 3), pET28a-GRA2 (carrils 4, 5 i 6) i pET28a-SAG2-GRA2 (carrils 7, 8 i 9). Carrils 1, 4 i 7: extracte total de cèl·lules cultivades 16 h en IPTG. Carrils 2, 5 i 8: fracció soluble. Carrils 3, 6 i 9: fracció insoluble.

A la Figura 13a, es pot veure que s'indueïa la transcripció dels *cassettes* d'expressió i que hi havia producció de les proteïnes d'interès SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 tant a les 6 h com a les 16 h després de la inducció. Les bandes obtingudes van migrar en el gel segons esperàvem d'acord amb el seu pes molecular teòric (SAG2 és de 19,3 kDa, GRA2 és de 22 kDa i SAG2-GRA2 és de 37,8 kDa). Pel que fa a la Figura 13b, es mostra que la solubilitat de les proteïnes SAG2 i GRA2 era bastant alta, mentre que la nova proteïna quimèrica SAG2-GRA2 es trobava majoritàriament a la fracció insoluble.

Tenint en compte aquests resultats, on es va treballar amb unes condicions de cultiu d'inducció i de sonicació estàndards, totes tres proteïnes tenien nivells d'expressió semblants però la proteïna quimèrica SAG2-GRA2 era insoluble, és a dir, formava agregats citoplasmàtics o cossos d'inclusió.

Es va optar per la solubilització de l'antigen quimèric seguint l'exemple d'altres estudis de proteïnes quimèriques de *Toxoplasma* pel serodiagnòstic (Holec-Gasior et al., 2012a; Ferra et al., 2015; Ferra et al., 2019).

Per dur a terme aquest pas de solubilització, es va resuspendre el pellet provinent del lisat cel·lular de la soca transformada amb pET28a-SAG2-GRA2 (carril 9 de la Figura 13b) en un 10 % del volum original del cultiu en tampó de solubilització (Taula 5), que incloïa urea 8 M com a agent solubilitzant. Després d'1 h d'incubació a temperatura ambient es van separar les fraccions soluble i insoluble, guardant el pellet per l'anàlisi de mostres posterior. Seguidament es va realitzar una diàlisi gradual a PBS en un tub de membrana Float-A-Lyzer (Taula 2 i apartat 3.2.9). L'objectiu d'aquesta diàlisi era eliminar la urea per facilitar la posterior utilització de la proteïna en immunoassaigs. Es van obtenir un sobrenedant i un pellet dialitzats que es van analitzar en SDS-PAGE (Figura 14).

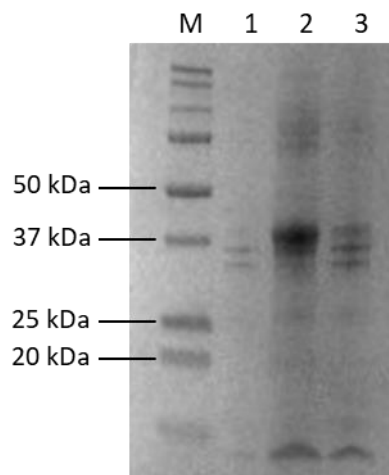


Figura 14. Anàlisi en SDS-PAGE de la diàlisi de l'antigen SAG2-GRA2. Després de la solubilització amb urea es va recollir el pellet (carril 1), i posteriorment a la diàlisi gradual a PBS es van separar per centrifugació les fraccions soluble (sobrenedant, carril 2) i insoluble (pellet, carril 3).

La proteïna quimèrica SAG2-GRA2 es va solubilitzar i no va precipitar en presència d'urea (Figura 14, carril 1). A més, com es pot observar als carrils 2 i 3, es va

mantenir majoritàriament soluble en el pas a PBS i només una petita part va precipitar.

Un cop teníem totes tres proteïnes d'interès en forma soluble es va procedir a purificar-les seguint un mateix protocol en condicions natives. Per purificar les proteïnes recombinants que contenen l'etiqueta d'histidines 6xHis es va usar la resina de Qiagen Ni-NTA seguint el protocol de la casa comercial. Els tres extractes cel·lulars, corresponents a les fraccions solubles de cada proteïna es van purificar per cromatografia d'afinitat en columna utilitzant els quatre tampons de purificació amb concentració creixent d'imidazole (Taula 5 i apartat 3.2.10), la qual cosa provoca primer una competició amb la cua d'histidines, després uns rentats de les proteïnes sense el *tag* i finalment l'elució de les proteïnes recombinants. Es van recollir i analitzar mostres de totes les fases de purificació (Figura 15).

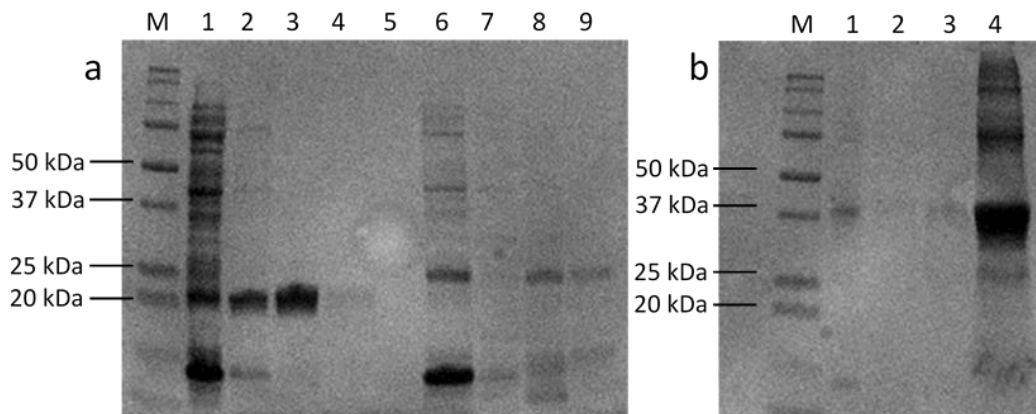


Figura 15. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions natives de SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. a) Fases de purificació proteica de SAG2 (carrils 1, 2, 3 i 4) i GRA2 (carrils 6, 7, 8 i 9). b) Fases de purificació proteica de SAG2-GRA2 (carrils 1, 2, 3 i 4). Carrils 1a, 6a i 1b: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carrils 2a, 7a i 2b: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carrils 3a, 8a i 3b: extracte de proteïnes eluïdes de la columna. Carrils 4a, 9a i 4b: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

La Figura 15a mostra que tant SAG2 com GRA2 van ser purificades amb èxit seguint el protocol estàndard d'augment de concentració d'imidazole. Tot i que l'eficiència no va ser del 100%, com es pot observar als carrils 1, 2 i 6 hi van haver

pèrdues de proteïna d'interès ja sigui perquè aquesta no es va unir a les esferes de Ni-NTA o perquè s'havia de millorar el pas de rentats (augmentant el número de rentats o modificant les concentracions d'imidazole). Per altra banda, la proteïna SAG2-GRA2 (Figura 15b) no es va poder purificar en condicions natives i va tornar a agregar precipitant conjuntament amb les esferes, tal com es pot veure al carril 4.

Per solucionar aquesta dificultat es va decidir treballar amb dos protocols de purificació diferents, aplicant així condicions desnaturalitzants amb urea 8 M a la proteïna SAG2-GRA2 durant tot el procés. Així, en comptes d'afegir concentracions creixents d'imidazole, es va mantenir la concentració d'urea 8 M i es va anar reduint el pH progressivament per establir condicions restringents en absència d'imidazole.

Una nova producció de SAG2-GRA2, en condicions equivalents a l'anterior, va donar lloc a una fracció insoluble on molt majoritàriament es trobava la proteïna quimèrica. Aquest pellet es va resuspendre en el primer tampó de purificació en condicions desnaturalitzants, amb urea 8 M a pH 7,8. Després de carregar la mostra a la columna, aquesta es va rentar amb dos tampons a pH 6 i pH 5,3. Finalment es va eluir amb un tampó a pH 4 (Taula 5; Figura 16).

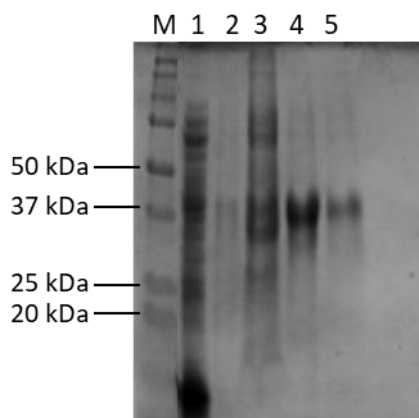


Figura 16. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions desnaturalitzants (urea 8 M) de SAG2-GRA2. Fases de purificació proteica de SAG2-GRA2 amb urea. Carril 1: fracció insoluble de cèl·lules cultivades 16 h en IPTG. Carril 2: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carril 3: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carril 4: extracte de proteïnes eluïdes de la columna. Carril 5: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

Sota condicions desnaturalitzants, concretament urea 8 M, l'antigen quimèric es va poder purificar correctament, tot i que encara hi havia un percentatge menor de proteïna que seguia precipitant (Figura 16).

Si bé aquest protocol va funcionar impedit l'agregació de la proteïna, es va canviar d'agent reductor de la urea a l'hidroclorur de guanidina (GuHCl) per intentar augmentar el rendiment del procés de purificació i alhora perquè la urea podia causar carbamilació a la proteïna SAG2-GRA2. La carbamilació és una modificació química generada per la reacció entre grups amino i la molècula d'àcid isociànic. Com que la urea en solució aquosa existeix en equilibri amb el cianat d'amoni, i aquest es degrada en àcid isociànic, existia el risc de carbamilació, és a dir, d'un canvi estructural que resultés en la pèrdua funcional de la proteïna d'interès.

La purificació proteica es va realitzar duent a terme condicions equivalents a les anteriorment mencionades, però aquest cop en presència de GuHCl 6 M durant tot el procés (Figura 17). Per poder analitzar les mostres amb GuHCl en SDS-PAGE

calia preparar-les fent una precipitació amb TCA (apartat 3.2.11), ja que sinó es formava un precipitat per la interacció entre GuHCl i SDS.

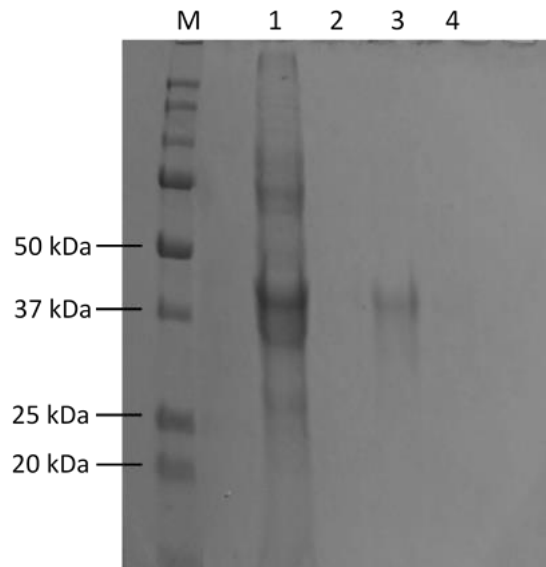


Figura 17. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions desnaturalitzants (GuHCl 6 M) de SAG2-GRA2. Fases de purificació proteica de SAG2-GRA2 amb GuHCl. Carril 1: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carril 2: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carril 3: extracte de proteïnes eluïdes de la columna. Carril 4: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

Com es pot observar a la Figura 17, una part majoritària de la proteïna quimèrica no es va unir al níquel, però la puresa amb la que es va eluir la resta de la proteïna de la columna va ser molt alta, evitant pèrdues en els rentats i impedit la re-agregació proteica.

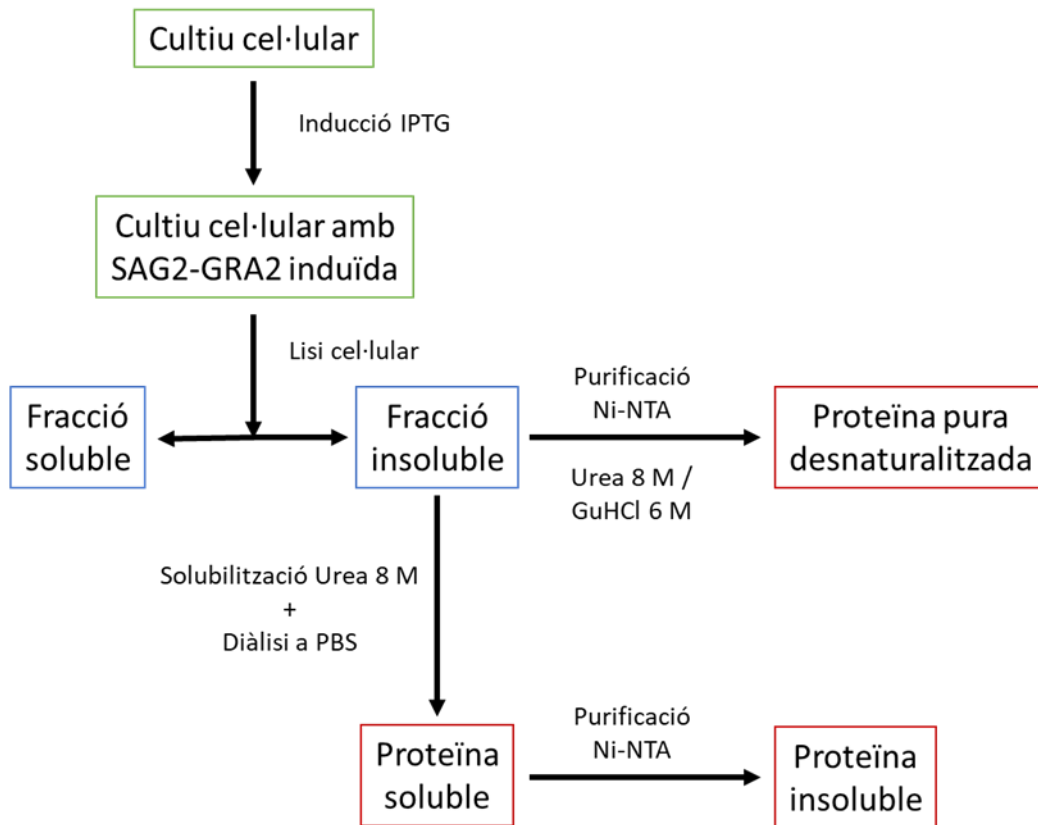


Figura 18. Esquema dels passos seguits en la purificació de SAG2-GRA2.

4.2.2 OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE *UPSTREAM*

Veient els nivells d'expressió que presentaven les soques *E. coli* BL21 (DE3) transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2 es va plantejar l'optimització d'alguns paràmetres del cultiu a escala de laboratori amb flascó d'agitació de 500 mL. A més, la producció de la proteïna quimèrica en *E. coli* tenia la limitació de la formació de cossos d'inclusió, i aquests agregats requerien processos de purificació relativament més complexos i més cars, principalment en l'escalat industrial. Per aquesta raó també es va optar per canvis al *upstream* que poguessin augmentar la solubilització de SAG2-GRA2.

Entre els paràmetres més importants d'un cultiu bacterià que admeten modificació a escala de flascó es troben la concentració d'IPTG, el medi de cultiu, la ràtio volum de cultiu/volum total, la temperatura i l'agitació.

La concentració d'IPTG emprada, 1 mM, es va considerar que era un valor correcte basat en altres estudis amb el mateix hoste, mateix vector i proteïnes similars (Ching et al., 2015; Costa et al., 2016; Abdelbaset et al., 2017; Ferrà et al., 2019).

Pel que fa al canvi de medi de cultiu, es van provar dos medis complexos que tenien com a base el medi utilitzat com a estàndard fins al moment, el medi LB, però amb el doble de triptona i amb suplementes de sals i glucosa (Taula 16).

Taula 16. Composició dels tres medis LB, SOB i SOC.

Components	LB	SOB	SOC
Extracte de llevat	0,5 % p/v	0,5 % p/v	0,5 % p/v
Triptona	1 % p/v	2 % p/v	2 % p/v
NaCl	10 mM	10 mM	10 mM
KCl	-	2,5 mM	2,5 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	10 mM	10 mM
Glucosa	-	-	20 mM

Es van analitzar les diferències a cada soca en les velocitats de creixement abans d'induir amb IPTG, és a dir, fins a una Abs₆₀₀ de 0,6 – 0,8, i mantenint la resta de paràmetres que s'havien utilitzat fins al moment (Figura 19).

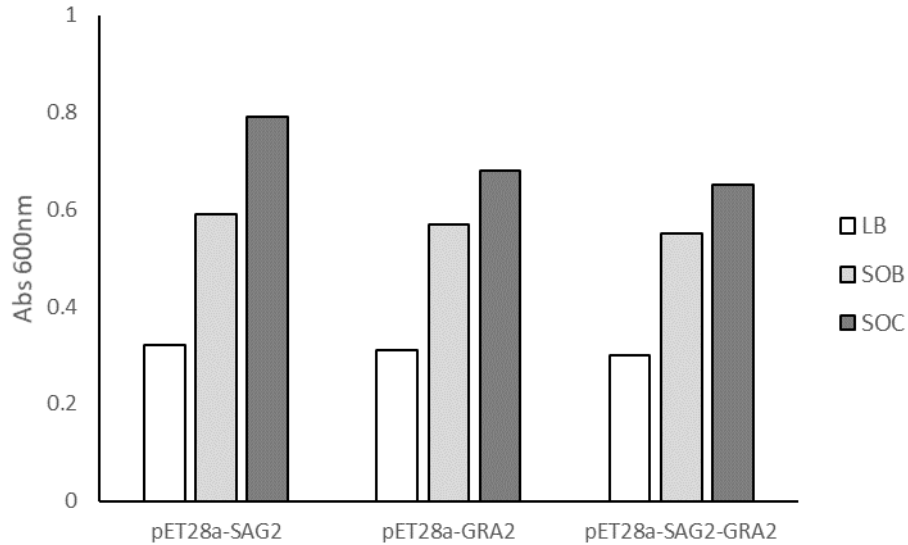


Figura 19. Creixement pre-IPTG de les soques transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2 amb medis LB, SOB i SOC. Les dades que es mostren són les absorbàncies als 90 min i corresponen a un experiment representatiu. Amb els medis rics SOB i SOC es va assolir la biomassa necessària per induir amb IPTG (Abs_{600} de 0,6 – 0,8) als 90 min. En canvi, amb el medi LB es va trigar 180 min.

Com es pot observar, els medis SOB i SOC, que contenen el doble de triptona i suplementes de sals, van permetre arribar a la densitat desitjada en 1h i 30 min, mentre que en el medi LB les soques van necessitar 3 h (dades no mostrades). També es pot veure que el fet que el medi SOC inclogui glucosa, que és la font de carboni que es metabolitza primer, va influir en arribar a les densitats més altes en menys temps. Per tant, amb el SOC es podia optimitzar el creixement abans d'induir per tal d'afavorir una productivitat més alta.

També es va veure que la ràtio entre volum de cultiu i volum total del flascó tenia un impacte en el creixement. Seguint dades publicades (Doran, 2013), establir una ràtio de 1:5 en el flascó de 500 mL podia millorar la taxa de transferència d'oxigen. Amb la nova ràtio 1:5 es va observar un major creixement respecte a la ràtio anterior 1:3 fent cultius prova de 20 mL (dades no mostrades).

El canvi de temperatura a les produccions de proteïnes recombinants a petita escala normalment donen lloc a productivitats més altes degut a la reducció de la

taxa de síntesi proteica (San-Miguel et al., 2013). Es van dur a terme experiments de cultius d'inducció a diferents temperatures amb la soca transformada amb pET28a-SAG2-GRA2. Concretament, es va mesurar la biomassa que es podia assolir al canviar a 25 °C, 30 °C i 37 °C després de la inducció i amb medi SOC (Figura 20).

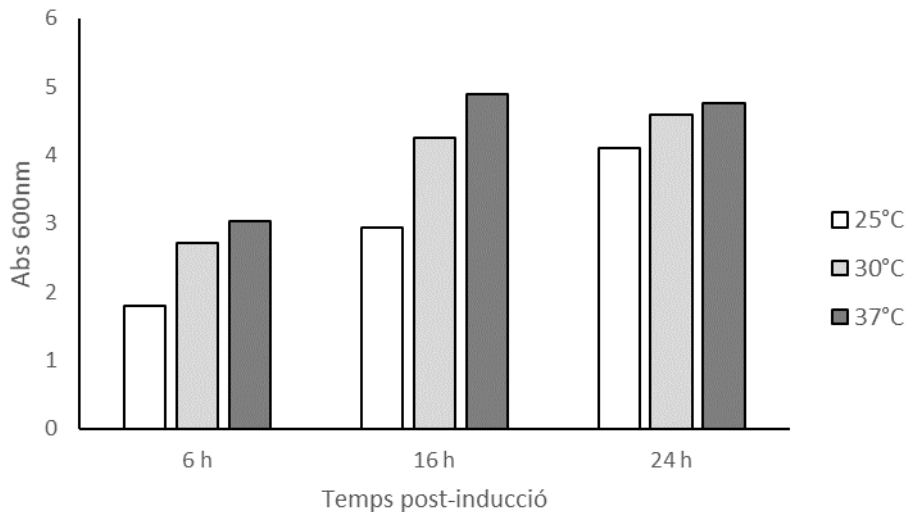


Figura 20. Creixement post-IPTG de la soca transformada amb pET28a-SAG2-GRA2 a 25 °C, 30 °C i 37 °C. Les dades que es mostren són les absorbàncies a les 6 h, 16 h i 24 h, i corresponen a un experiment representatiu. A 25 °C, la biomassa final que s'assolia era molt menor que a 30 °C o 37 °C, sobretot a les 6 h i a les 16h després d'induir. A les 24 h, en canvi, hi havia menys diferències entre les biomasses dels tres cultius ja que es trobaven en fase estacionària o de declivi.

A la Figura 20 es pot veure que el canvi de temperatura a 25 °C després de la inducció amb IPTG va reduir la velocitat de creixement cel·lular, cosa que podia afavorir la síntesi de proteïna recombinant i també la solubilitat d'aquesta.

L'agitació és un paràmetre que modifica l'aeració del cultiu, que té a veure amb la disponibilitat d'oxigen i l'eficiència de mescla. A mesura que el número de cèl·lules per litre augmenta a dins del flascó, la disponibilitat d'oxigen esdevé un factor important, fins i tot limitant, del creixement. La manera més senzilla d'incrementar la disponibilitat d'oxigen en un flascó és augmentant la velocitat d'agitació. Es va realitzar un canvi en la velocitat d'agitació establerta tenint en

compte el tipus de flascó d'agitació (Taula 2), la soca *E. coli* BL21 (DE3) i el seu rang òptim de velocitat d'agitació, passant així de 250 rpm abans de la inducció a 200 rpm després de la inducció. Aquest canvi va causar la reducció en la quantitat d'escuma produïda a les 16 h i les 24 h després de la inducció.

Incorporant tots aquests canvis, es van dur a terme cultius d'inducció de 100 mL de les tres soques recombinants seguint el procediment explicat a l'apartat 4.2.1, i es van prendre mostres per l'anàlisi de proteïnes (Figura 21).

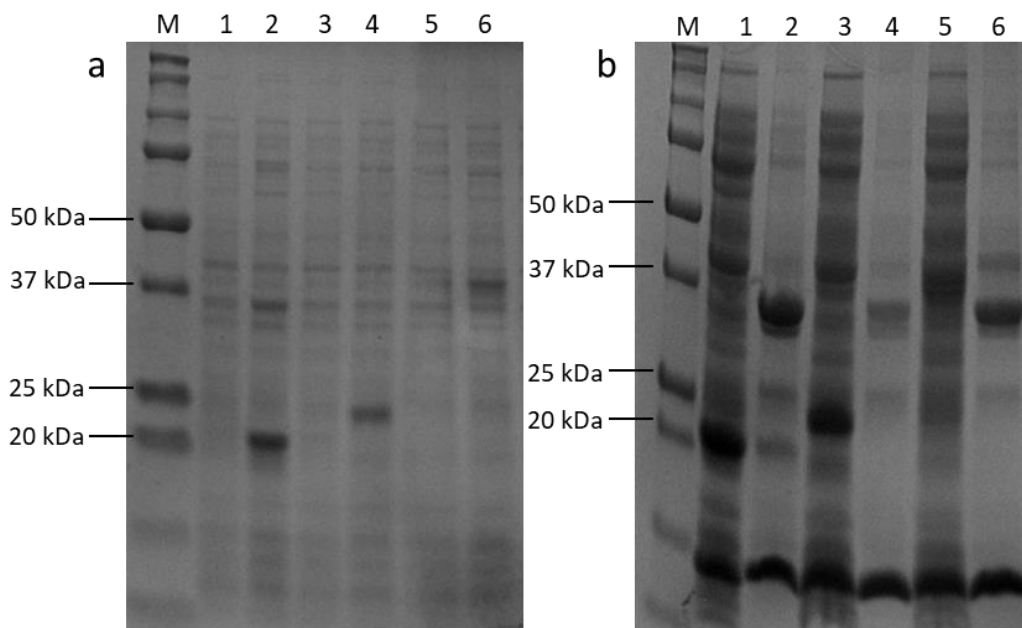


Figura 21. Anàlisi en SDS-PAGE amb les noves condicions de producció dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. a) Es van induir amb IPTG els cultius de bacteris amb pET28a-SAG2 (carrils 1 i 2), pET28a-GRA2 (carrils 3 i 4) i pET28a-SAG2-GRA2 (carrils 5 i 6) per analitzar la producció de les proteïnes d'interès. Carrils 1, 3 i 5: no induïts. Carrils 2, 4 i 6: 16 h en IPTG. b) Anàlisi de les fraccions soluble i insoluble després de trencar les cèl·lules amb pET28a-SAG2 (carrils 1 i 2), pET28a-GRA2 (carrils 3 i 4) i pET28a-SAG2-GRA2 (carrils 5 i 6). Carrils 1, 3 i 5: fracció soluble. Carrils 2, 4 i 6: fracció insoluble.

A la Figura 21a es pot veure que hi va haver un augment dels nivells d'expressió de les proteïnes recombinants en comparació amb la Figura 12a. El fet d'haver crescut menys a 25 °C després de la inducció va afavorir la síntesi de les proteïnes. Per tant, amb un creixement a 37 °C abans d'induir amb IPTG es va generar una gran quantitat de cèl·lules en fase mig-exponencial en poc temps, i la reducció a

25 °C en el moment de la inducció conjuntament amb la reducció de l'agitació a 200 rpm va provocar un canvi en el metabolisme que prioritzava la síntesi més lenta, i per tant, afavoria la síntesi i la solubilitat de les proteïnes exògenes SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 per sobre del creixement cel·lular (Figura 21b).

Per comprovar que les proteïnes antigèniques s'estaven produint correctament amb la cua d'histidines, es va realitzar una immunodetecció per Western blot (apartat 3.2.12) amb un anticòs anti-His (apartat 3.1.9) de les mostres dels tres cultius revelada amb fosfatasa alcalina (Figura 22).



Figura 22. Anàlisi per Western blot dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. Els cultius de bacteris amb pET28a-SAG2 (carrils 1 i 2), pET28a-GRA2 (carrils 3 i 4) i pET28a-SAG2-GRA2 (carrils 5 i 6) es van utilitzar per immunodetectar proteïnes amb la cua d'histidines 6xHis. Carrils 1, 3 i 5: no induït. Carrils 2, 4 i 6: 16 h en IPTG.

Finalment, es va realitzar la purificació d'aquests cultius d'inducció seguint el procediment explicat a l'apartat 4.2.1, però en condicions natives per SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 (Figura 23).

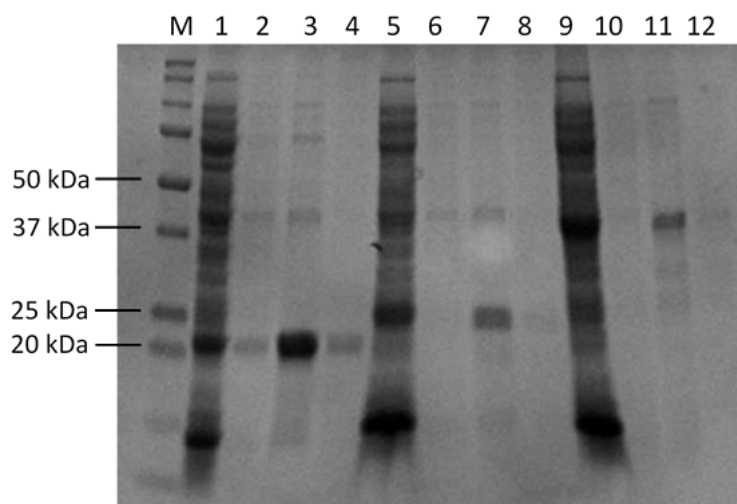


Figura 23. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions natives de SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. Fases de purificació proteica de SAG2 (carrils 1, 2, 3 i 4), GRA2 (carrils 5, 6, 7 i 8) i SAG2-GRA2 (carrils 9, 10, 11 i 12). Carrils 1, 5 i 9: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carrils 2, 6 i 10: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carrils 3, 7 i 11: extracte de proteïnes eluides de la columna. Carrils 4, 8 i 12: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

Totes tres proteïnes antigèniques es van purificar amb un alt grau de puresa després de les millores aplicades al *upstream* del procés productiu.

4.2.3 SCALE-UP I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA

L'objectiu principal de les fermentacions microbianes és produir altes densitats cel·lulars per assegurar un alt rendiment del producte (Liu et al., 2012). Per poder assolir aquestes altes densitats s'ha de superar la limitació que suposa la producció en flascó d'agitació, principalment la impossibilitat de controlar paràmetres crítics com el pH, l'aeració, o fins i tot, la impossibilitat d'afegir antiescumant. Quan un dels substrats es consumeix o un del productes arriba a nivells inhibitoris, el creixement s'atura ràpidament i s'arriba a la fase estacionària.

Per aquestes raons, es va decidir dur a terme la fermentació en batch d'una de les soques *E. coli* BL21 (DE3), concretament la transformada amb pET28a-SAG2, en

un bioreactor de 2 L. Una colònia individual d'aquesta soca recombinant es va inocular en 100 mL de medi SOC amb kanamicina a 37 °C i a 200 rpm durant 16 h com a pre-cultiu fins arribar a la fase estacionaria. Posteriorment aquest pre-cultiu es va inocular en 1,5 L d'un medi no-definit que contenia 5 g/L d'extracte de llevat, 20 g/L de triptona, 0,6 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 4,9 g/L de MgSO₄·7H₂O, 7,2 g/L de glucosa i suplementat amb kanamicina (Taula 5 i apartat 3.2.7).

En el fermentador es van poder assolir nivells de densitat cel·lular molt més alts que els del flascó d'agitació, arribant a una Abs₆₀₀ màxima de 12,27 a les 18 h de cultiu (Figura 24).

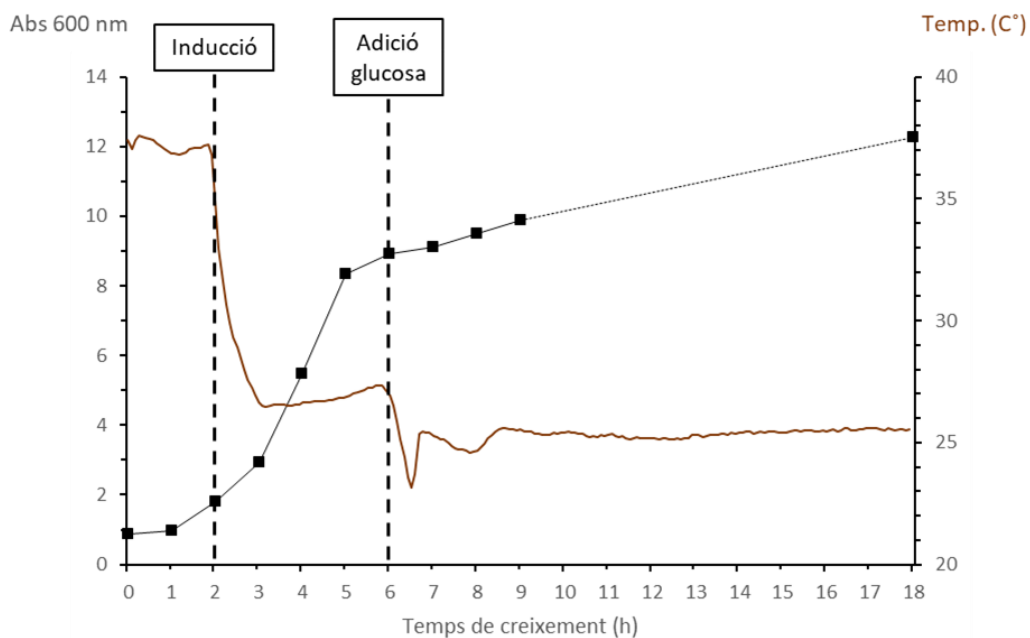


Figura 24. Creixement de la soca transformada amb pET28a-SAG2 en un cultiu batch del bioreactor de 2 L. Cultiu del bacteri *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-SAG2 en un medi complex enriquit amb 7,2 g/L de glucosa. Es mostren les dades d'Abs₆₀₀ al llarg del creixement i el canvi de temperatura de 37 °C a 25 °C en el moment de la inducció amb 1mM d'IPTG (Abs₆₀₀ = 1,81).

Com es mostra a la Figura 24, el cultiu es va induir a les 2 h, concretament a una Abs₆₀₀ de 1,81, amb 1mM d'IPTG, i es va reduir la temperatura a 25 °C en el moment de la inducció. A les 6 h es van afegir 7,2 g/L de glucosa en batch perquè

hi havia senyals d'esgotament de la font de carboni, com ara l'aturada en l'adició de la base i en el creixement cel·lular. Per altra banda, els paràmetres de pH i pO_2 es van mantenir constants durant tota la fermentació, el primer a pH 7 mitjançant l'adició de NaOH 1 M i HCl 1 M, i el segon al 20 % d'oxigen dissolt amb una adició d'aire constant de 1 vvm i una agitació variable en un rang de 250 – 800 rpm.

Durant el procés de fermentació, la disrupció cel·lular i el procés de purificació es van agafar mostres per l'anàlisi de proteïnes (Figura 25).

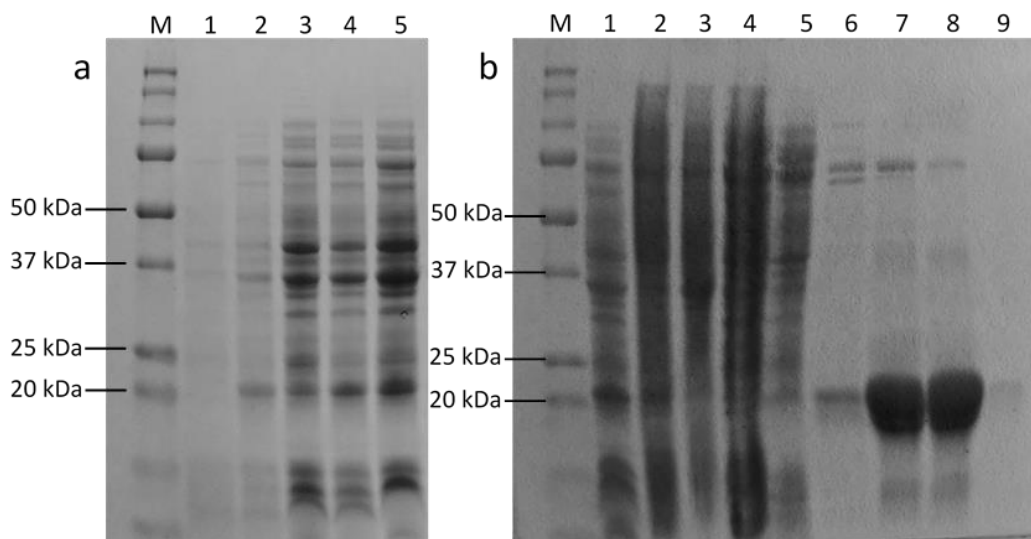


Figura 25. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció i de la purificació de l'antigen SAG2 en el bioreactor de 2 L. a) Es va cultivar la soca amb pET28a-SAG2 en el bioreactor de 2 L per analitzar-ne la producció després d'induir a les 2 h de cultiu. Carril 1: no induït. Carril 2: 4 h en IPTG. Carril 3: 6 h en IPTG. Carril 4: 8 h en IPTG. Carril 5: 10 h en IPTG. b) Anàlisi de les fraccions soluble, insoluble i de les fases de purificació de SAG2. Carrils 1: 18 h en IPTG. Carril 2: fracció soluble. Carrils 3 i 4: fracció insoluble. Carril 5: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carril 6: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carrils 7 i 8: extracte de proteïnes eluïdes de la columna. Carril 9: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

Posteriorment, es van quantificar les proteïnes SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 obtingudes en el flascó d'agitació de 500 mL (100 mL de volum de treball) i la proteïna SAG2 produïda en el bioreactor de 2 L (1,5 L de volum de treball). La quantificació es va realitzar mitjançant l'assaig de proteïnes Bradford amb la

proteïna BSA com a estàndard (apartat 3.2.13) i es va calcular la productivitat volumètrica amb dades d'un experiment representatiu (Taula 17 i apartat 3.2.14).

Taula 17. Productivitats volumètriques de les soques transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2.

Proteïnes	Productivitat volumètrica en flascó (mg/L·h)	Productivitat volumètrica en bioreactor (mg/L·h)
SAG2	0,375	1,48
GRA2	0,3	
SAG2-GRA2	0,263	

Aquesta fermentació en batch en un bioreactor de 2 L va produir 1,48 mg/L·h de SAG2. Es va demostrar que, tot i els nivells d'expressió inicials a escala de *shake flask*, les soques *E. coli* BL21 (DE3) transformades amb pET28a tenien molt marge de millora en termes de productivitat.

4.3 GENERACIÓ DE SOQUES EDITADES GENÈTICAMENT

Un dels objectius de la present tesi era l'establiment de soques *E. coli* BL21 (DE3) editades genèticament amb una o més còpies dels *cassettes* que codifiquen pels antigens seleccionats de *T. gondii*.

4.3.1 ESTABLIMENT DEL SISTEMA CRISPR-CAS9

Per dur a terme l'edició del genoma d'*E. coli* es va utilitzar el sistema de dos plasmidis publicat per Jiang et al. (2015) i disponible a Addgene, tal com s'ha introduït en l'apartat 1.2.3.

4.3.1.1 Generació dels pTarget

Per una banda, es necessitaven generar els plasmidis pTarget amb seqüències sgRNA específiques del genoma d'*E. coli* BL21 (DE3) obtingut de la base de dades GenBank (número d'accés CP001509.3). Aquestes seqüències sgRNA consistien en guies de 20 nt (N₂₀) de regions del genoma bacterià on hi havia gens dispensables o no-essencials. Es van escollir els gens *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *ybbD*, perquè s'havien usat amb èxit en altres estudis d'edició genètica d'*E. coli* (Jiang et al., 2015; Englaender et al., 2017; Zerbini et al. 2017).

Per dissenyar quines havien de ser les seqüències sgRNA d'aquests gens, es va utilitzar el software online CRISPOR (Taula 3). CRISPOR identifica els llocs PAM per l'endonucleasa Cas9 en una seqüència gènica donada, genera les guies RNA a partir dels PAM i les classifica segons els *off-target* potencials i la predicció d'activitat *on-target* (Concordet i Haeussler, 2018).

Les guies RNA escollides (Taula 18) s'havien de situar sota el control del promotor constitutiu J23119(SpeI), així es sintetitzarien conjuntament amb el gRNA scaffold. La Cas9, guiada per el sgRNA, podia trobar el lloc de tall gràcies al PAM i induir el DSB.

Taula 18. Gens diana, guies RNA i llocs de tall per l'edició genètica d'*E. coli* BL21 (DE3).

*Les seqüències PAM es mostren en cursiva.

Gen diana d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	sgRNA (N ₂₀) + PAM*	Coordenades del lloc de tall
<i>cadA</i>	5'-GCAGGTAAGCGTCTGATCAA <i>CGG</i> -3'	4264426
<i>fecA</i>	5'-GTGGGCGGCACAGCGGACAA <i>CGG</i> -3'	4429209
<i>lacZ</i>	5'-GGTGAACGCAGGTCGCCAG <i>CGG</i> -3'	335032
<i>ompA</i>	5'-GACAACGGCATGCTGAGCCT <i>GGG</i> -3'	1024589
<i>ybbD</i>	5'-TCCCTAACAAATGATGATGG <i>GGG</i> -3'	498065

Per generar els pTarget específics de cada gen, es va substituir la guia original (CATCGCCGACGCGTTTCAG) del plasmidi pTargetF (Taula 7) mitjançant PCR inversa (Figura 26).

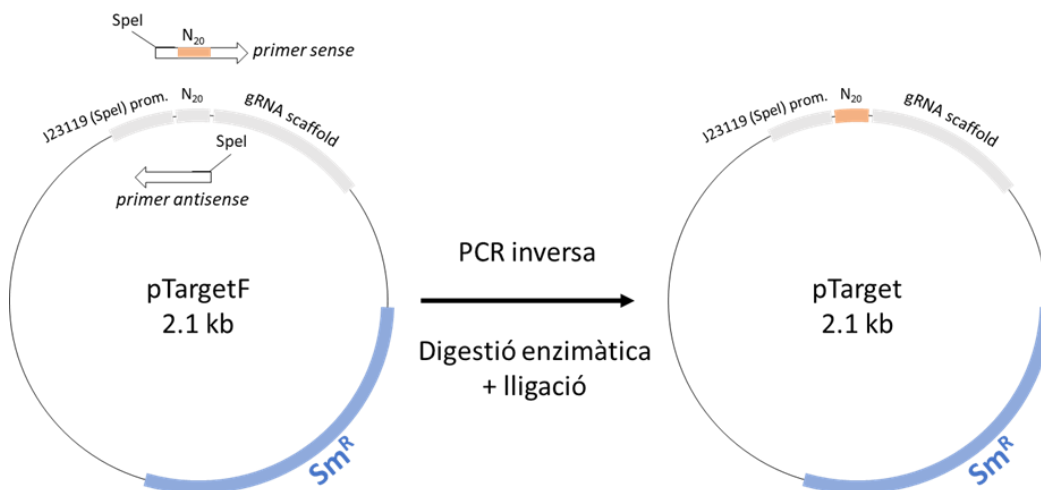


Figura 26. Esquema resum de la PCR inversa en la generació dels pTarget.

Per una banda, es van dissenyar els cinc *primers sense* específics (pTargetF_FW de cada gen) que inclouen els 20 nt de les guies RNA i el lloc de tall de l'enzim de restricció SpeI a 5'. I per l'altra, es va dissenyar el *primer antisense* (pTargetF_RV) amb la diana de restricció de SpeI a 5' també.

Es va dur a terme la PCR inversa seguint un protocol estàndard d'amplificació d'un plasmidi (apartat 3.2.3), en aquest cas pTargetF. Després de la PCR inversa, una

alíquota de cada producte de PCR es va córrer en un gel a l'1 % d'agarosa per verificar que s'havia amplificat el producte desitjat (Figura 27).

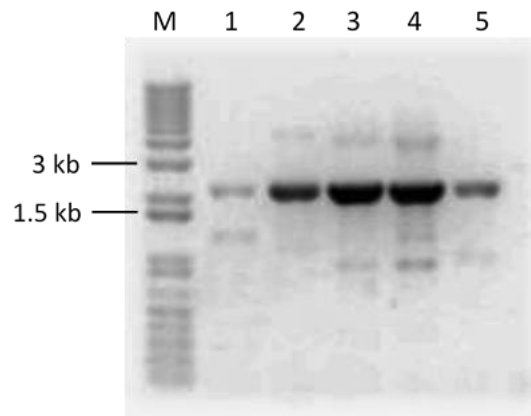


Figura 27. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels plasmidis pTarget-cadA, pTarget-fecA, pTarget-lacZ, pTarget-ompA i pTarget-ybbD per PCR inversa. Les seqüències dels plasmidis pTarget es van amplificar per PCR inversa utilitzant el pTargetF com a motlle i amb *primers* específics. Carril 1: pTarget-cadA. Carril 2: pTarget-fecA. Carril 3: pTarget-lacZ. Carril 4: pTarget-ompA. Carril 5: pTarget-ybbD.

La mida esperada dels pTarget lineals era 2117 bp i aquesta corresponia amb la banda majoritària que es mostra a la Figura 27, però no era l'única banda que es va amplificar. Per aquesta raó, es van purificar les bandes de 2.1 kb mitjançant el kit *QIAquick Gel Extraction*. Seguidament es van digerir els plasmidis lineals amb *SpeI* i es van lligar amb la T4 Ligase. Els plasmidis resultants es van transformar en cèl·lules competents *E. coli* Top 10.

Aquests bacteris, resistents a l'espectinomicina com a conseqüència d'haver-se transformat correctament amb el pTarget, es van fer créixer en cultius O/N per purificar-ne els plasmidis amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* i comprovar-ne la seva seqüència via seqüenciació de Sanger (Figura S3 de l'Annex).

A més dels pTarget, el segon plasmidi necessari per l'edició genètica era el pCas (Taula 7), que contenia les recombinases λ -Red expressades sota el control del promotor induïble per L-arabinosa, pBAD, i la Cas9 expressada constitutivament.

4.3.1.2 Generació dels DNA donadors

Com s'ha introduït a l'apartat 1.2.3, per dur a terme l'edició genètica en *E. coli* amb el sistema de dos plasmidis era necessari un tercer element anomenat DNA donador, que incloïa el *cassette* amb la seqüència codificant per l'antigen de *T. gondii* conjuntament amb els elements necessaris per la inducció i la purificació d'aquest, i flanquejat per seqüències d'homologia amb el genoma d'*E. coli* BL21 (DE3).

Aquestes seqüències d'homologia, també anomenades braços d'homologia, corresponien a uns 300 bp de les regions *upstream* i *downstream* dels llocs de tall de la Cas9, és a dir, tres parells de bases *upstream* del PAM (Jiang et al., 2015).

Les seqüències dels braços d'homologia de cada gen (*cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *ybbD*) es van amplificar per PCR a partir del DNA genòmic d'*E. coli* BL21 (DE3) extret d'un cultiu O/N (apartat 3.2.15). En el disseny dels *primers* (*cadA_FW_300/cadA_SbfI*, *cadA_PACI/cadA_RV_300*, i els equivalents per la resta de gens) es van incorporar llocs de tall pels enzims de restricció SbfI i PACI per la lligació posterior amb el *cassette* (Figura 28).

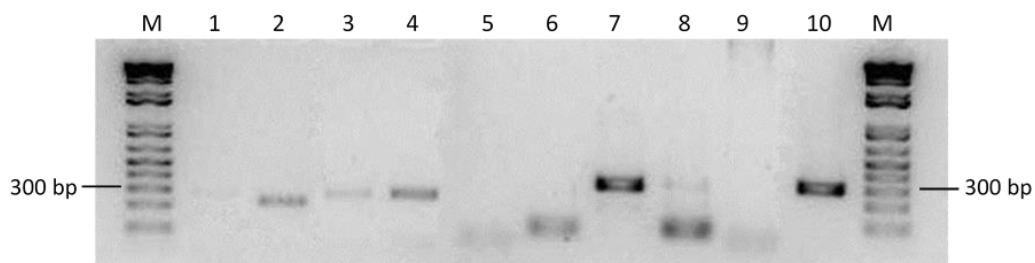


Figura 28. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels braços d'homologia de *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *ybbD*. Les seqüències dels braços d'homologia, tant *upstream* (carrils 1, 3, 5, 7 i 9) com *downstream* (carrils 2, 4, 6, 8 i 10), es van amplificar per PCR usant DNA genòmic com a motlle i amb *primers* específics. Carrils 1 i 2: braços *cadA*. Carrils 3 i 4: braços *fecA*. Carrils 5 i 6: braços *lacZ*. Carrils 7 i 8: braços *ompA*. Carrils 9 i 10: braços *ybbD*.

El gel d'electroforesi va mostrar els fragments dels braços d'homologia amb una mida esperada d'entre 260 i 300 bp, segons el braç, excepte els braços *upstream*

i *downstream* de *lacZ* (carrils 5 i 6), i el braç *upstream* de *ybbD* (carril 9). En aquests casos es va repetir l'amplificació per PCR diverses vegades modificant alguns factors respecte del protocol estàndard. Es va augmentar la concentració de magnesi de 1,5 mM a 3 mM, es va afegir DMSO al 2,5 % del volum de la reacció i, respecte els paràmetres del programa de cicles, es va reduir la temperatura d'anellament de 55 a 52 °C i es va incrementar el temps d'elongació de 30 a 35 s. Amb aquests canvis finalment es van poder obtenir els braços d'homologia restants (Figura 29).

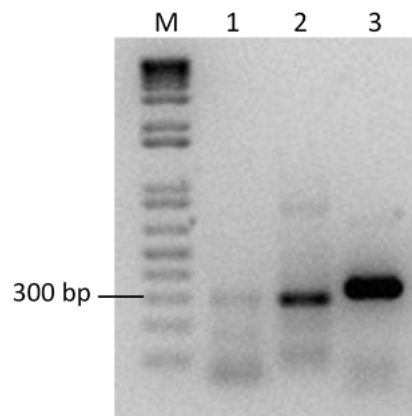


Figura 29. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels braços d'homologia restants de *lacZ* i *ybbD*. Les seqüències dels braços d'homologia *upstream* i *downstream* de *lacZ*, i *upstream* de *ybbD* es van amplificar per PCR i amb *primers* específics. Carrils 1 i 2: braços *lacZ*. Carril 3: braç *upstream ybbD*.

Una vegada amplificats tots els braços d'homologia, els fragments d'interès es van purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction*. Tot seguit, es va procedir a l'amplificació dels *cassettes* de SAG2 i GRA2 amb els *primers* pET28_cassette_FW/pET28_cassette_RV per incloure les dianes dels enzims de restricció SbfI i PACI (Figura 30).

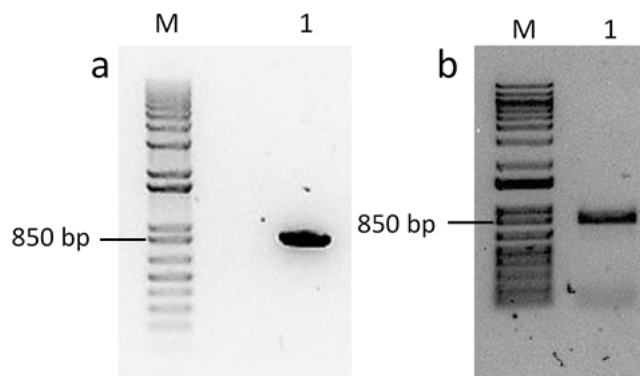


Figura 30. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels *cassettes* SAG2 i GRA2 amb les dianes de restricció per la lligació amb els braços d'homologia. a) La seqüència del *cassette* SAG2 es van amplificar per PCR usant el plasmidi pET28a-SAG2 com a motlle i amb els *primers* pET28_cassette_FW/pET28_cassette_RV. b) La seqüència del *cassette* GRA2 es van amplificar per PCR usant el plasmidi pET28a-GRA2 com a motlle i amb els *primers* pET28_cassette_FW/pET28_cassette_RV. Carril 1a: SAG2. Carril 1b: GRA2.

En aquesta electroforesi es va poder comprovar la correcta amplificació dels *cassettes* amb la seva mida esperada (852 bp per SAG2 i 822 bp per GRA2) i, seguidament, es van purificar els fragments amb el kit *QIAquick Gel Extraction*.

Un cop es disposava de les tres parts de seqüència que havien de conformar els DNA donadors, es va poder realitzar la digestió amb els enzims *SbfI* i *PACI*, tant dels braços d'homologia com dels *cassettes* SAG2 i GRA2.

El primer DNA donador que es va generar, a través de la lligació amb la T4 Ligase, estava format pel *cassette* codificant de SAG2 flanquejat amb els braços d'homologia per la recombinació en el gen *lacZ* (SAG2 Δ lacZ). Aquest producte de la lligació es va amplificar per PCR amb els *primers* lacZ_FW_300/lacZ_RV_300, esperant una banda de 1366 bp (Figura 31).

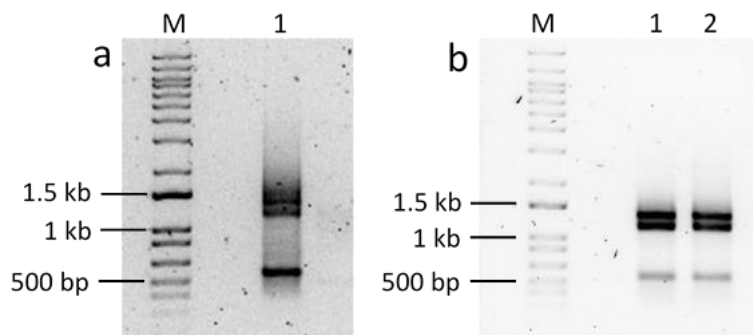


Figura 31. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador SAG2ΔlacZ. a) La seqüència del DNA donador SAG2ΔlacZ es va amplificar per PCR seguint el protocol estàndard usant el producte de la lligació com a motlle i amb els *primers* específics. b) La seqüència del SAG2ΔlacZ es va amplificar modificant el protocol de la PCR per reduir la presència de bandes inespecífiques. Carril 1a, 1b i 2b: SAG2ΔlacZ.

Com es pot observar a la Figura 31a, la PCR seguint un protocol estàndard va donar com a resultat l'amplificació de dues bandes inespecífiques. La primera formant un doblet amb la banda d'interès entre els 1000 i els 1500 bp, i la segona a 500 – 650 bp. Davant l'aparició d'aquestes bandes inespecífiques es van modificar els paràmetres de la PCR, disminuint la concentració de magnesi de 1,5 mM a 0,75 mM, afegint DMSO al 2,5 % del volum de la reacció, i reduint el número de cicles de 25 a 20. Fins i tot duent a terme aquests canvis no es va amplificar la banda d'interès únicament, però sí es va reduir la presència de la banda de menor pes molecular (Figura 31b).

Donat els problemes que tenia l'amplificació del DNA donador SAG2ΔlacZ, entre d'altres la impossibilitat de separar la banda d'interès del doblet, la poca repetibilitat i la poca quantitat de DNA que s'obtenia, es va generar un segon DNA donador que requerís de nous *primers*. Aquest segon DNA donador era producte de la lligació entre el *cassette* GRA2 i els braços d'homologia de *cadA* (GRA2Δ*cadA*). L'amplificació per PCR d'aquest producte de lligació es va dur a terme amb els *primers* *cadA_FW_300/cadA_RV_300*, i s'esperava amb una mida de 1422 bp (Figura 32).

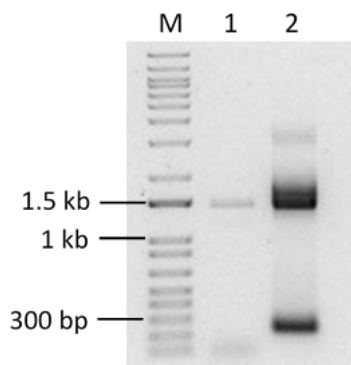


Figura 32. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador GRA2ΔcadA. La seqüència del DNA donador GRA2ΔcadA es va amplificar per PCR seguint l'última modificació del protocol per reduir la presència de bandes inespecífiques, usant el producte de la lligació com a motlle i amb *primers* específics. Carril 1: alíquota de la lligació del GRA2 i els braços de *cadA*. Carril 2: GRA2ΔcadA.

Fins i tot amb el nou protocol de PCR i amb el canvi de donador, i per tant de *primers* d'amplificació, l'aparició de bandes inespecífiques es va seguir donant. En aquest cas amb un altre doblet, conjuntament amb la banda d'interès, i amb una tercera banda de 250 bp aproximadament.

El fet d'haver d'assolir una quantitat considerable de DNA donador pur per cada experiment d'edició, concretament 400 ng, feia impossible aquesta estratègia de generació de donadors. Per resoldre-ho, es va optar per la clonació dels DNA donadors en el plasmidi pBluescript II SK+ de 2961 bp (Taula 7). Per dur-ho a terme, es van dissenyar nous *primers* que amplifiquessin externament els braços d'homologia de *cadA* i *lacZ* afegint una diana per l'enzim de restricció XmaI a l'extrem 5' del DNA donador i una altra diana per l'enzim de restricció SpeI a l'extrem 3' del DNA donador.

Els productes de les lligacions SAGΔlacZ i GRA2ΔcadA es van amplificar per PCR amb els *primers* lacZ_FW_300_xmaI/lacZ_RV_300_speI en el cas del primer i els *primers* cadA_FW_300_xmaI/cadA_RV_300_speI en el segon cas. Es van obtenir uns perfils de bandes com els que es mostren a les Figures 31 i 32, de forma que es va haver de purificar la banda d'interès del gel amb el kit *QIAquick Gel*

Extraction. Seguidament, es va realitzar la digestió amb XmaI i SpeI, tant dels fragments purificats SAG2ΔlacZ i GRA2ΔcadA com del plasmidi pBluescript. I finalment es van lligar els DNA donadors en el vector.

Els plasmidis generats pBluescript-SAG2ΔlacZ i pBluescript-GRA2ΔcadA es van transformar en cèl·lules competents *E. coli* Top 10. A partir d'aquests bacteris es va poder realitzar una amplificació "*in vivo*" dels DNA donadors, fent créixer les soques transformades en cultius O/N i purificant els plasmidis amb el kit *QIAprep Spin Miniprep*. Un cop s'obtenien els plasmidis purs, es procedia a seqüenciar la part dels plasmidis que codificava pels DNA donadors via seqüenciació de Sanger (Figura S4 de l'Annex), i posteriorment es digeriria amb els enzims seleccionats XmaI i SpeI (Figura 33).

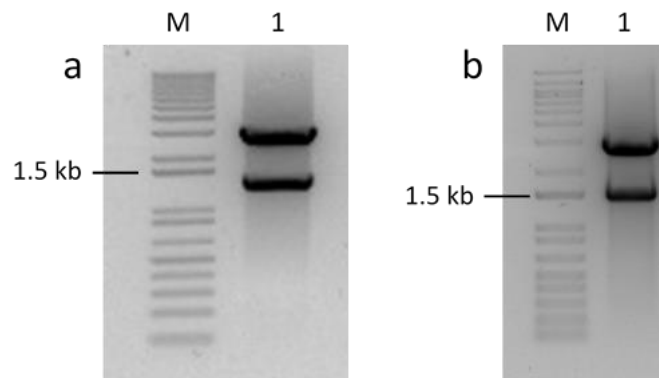


Figura 33. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pBluescript-SAG2ΔlacZ i pBluescript-GRA2ΔcadA. a) La digestió del plasmidi pBluescript-SAG2ΔlacZ amb els enzims XmaI i SpeI va donar com a resultat l'alliberament del fragment SAG2ΔlacZ. b) La digestió del plasmidi pBluescript-GRA2ΔcadA amb els enzims XmaI i SpeI va donar com a resultat l'alliberament del fragment GRA2ΔcadA.

Com es pot observar a la Figura 33, els fragments que corresponien als DNA donadors SAG2ΔlacZ i GRA2ΔcadA, amb 1366 bp i 1422 bp respectivament, es van separar correctament per digestió enzimàtica de la resta del plasmidi, de 2961 bp. Les bandes de menor pes molecular es van purificar dels gels amb el kit *QIAquick Gel Extraction*, es van precipitar amb acetat sòdic i etanol (apartat 3.2.16) i finalment es van quantificar llegint la Abs₂₆₀ amb el Nanodrop (Taula 2).

Mitjançant aquesta estratègia es van poder generar aquests dos primers DNA donadors en la quantitat i puresa necessària per les edicions. Però, malgrat haver augmentat la quantitat obtinguda, aquest mètode d'amplificació "in vivo" era tediós i lent, i això complicava la seva aplicació en la generació de nous DNA donadors, per exemple amb el *cassette* SAG2-GRA2 o per intercanviar els braços d'homologia disponibles, en cas que fos d'interès.

Com a conseqüència d'aquestes limitacions, es va posar a punt la generació dels DNA donadors a través de la *overlap* PCR. Es van dissenyar nous *primers*, per tots els gens, que permetessin el solapament entre braços d'homologia i *cassettes*. Com a primer pas, es van fer les amplificacions del *cassette* SAG2-GRA2 amb els *primers* P1_lacZ/P4_lacZ, i dels braços d'homologia de *lacZ* amb els *primers* lacZ_FW_300/P2_lacZ i P3_lacZ/lacZ_RV_300 (Figura 34). A la Figura 35 es presenta un resum de les estratègies de generació dels DNA donadors.

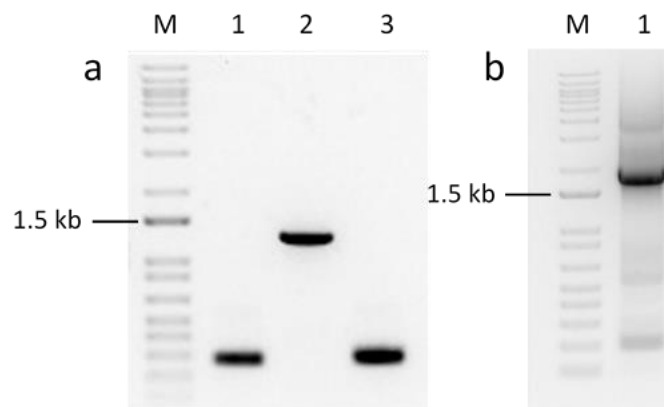


Figura 34. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador SAG2-GRA2 Δ lacZ per *overlap* PCR. a) Els tres fragments amb regions de solapament, braç *lacZ upstream*, *cassette* i braç *lacZ downstream*, es van generar per PCR amb el pET28a-SAG2-GRA2 com a motlle en el cas del *cassette*, amb DNA genòmic com a motlle en el cas dels braços i amb *primers* específics. b) La seqüència del SAG2-GRA2 Δ lacZ es va generar per *overlap* PCR entre els tres elements generats a la PCR anterior. Carril 1a: braç *lacZ upstream* amb solapament al *cassette* SAG2-GRA2. Carril 2a: *cassette* SAG2-GRA2 amb solapaments als braços d'homologia *lacZ*. Carril 3a: braç *lacZ downstream* amb solapament al *cassette* SAG2-GRA2. Carril 1b: SAG2-GRA2 Δ lacZ.

Seguint l'exemple d'aquesta *overlap* PCR (Figura 34), es van poder generar la resta de DNA donadors que es van utilitzar posteriorment en les edicions genètiques. Els productes de la *overlap* PCR es van purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction*, es van precipitar amb acetat sòdic i etanol, i finalment es van quantificar amb el Nanodrop abans del seu ús en les co-transformacions d'*E. coli* BL21 (DE3).

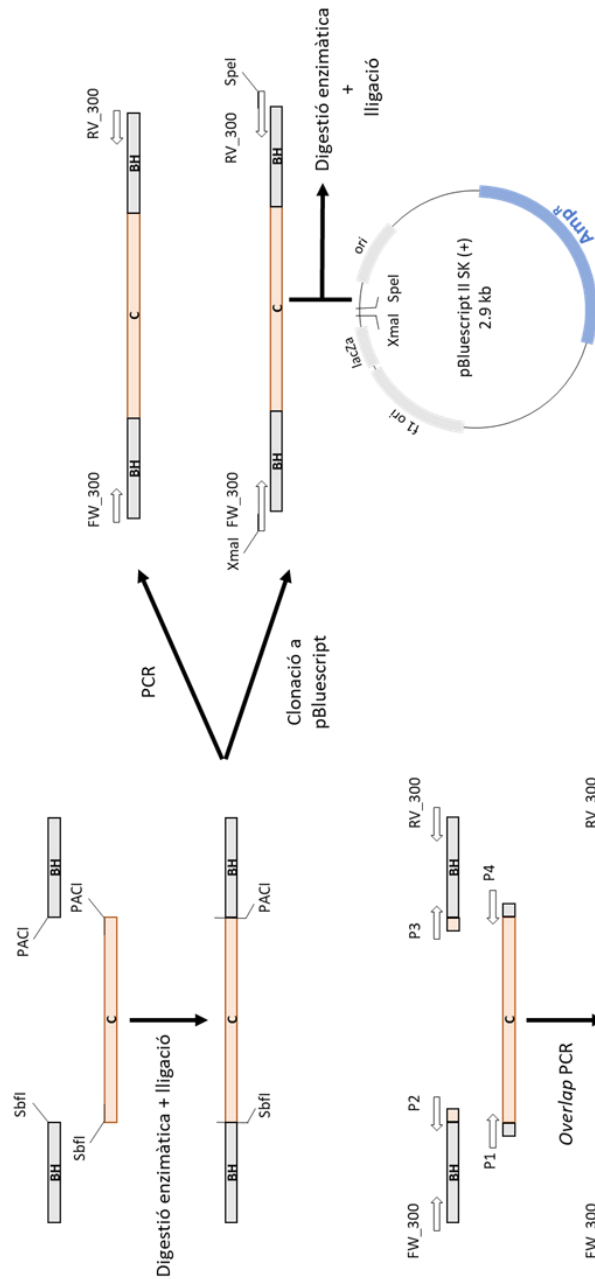


Figura 35. Resum de les estratègies de generació dels DNA donadors.

4.3.2 EDICIÓ GENÈTICA

4.3.2.1 Edicions dirigides als loci *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *ybbD*

Un cop es disposava dels tres elements necessaris per dur a terme les edicions genètiques, és a dir, el plasmidi pCas, els plasmidis pTarget i els DNA donadors lineals, es va procedir amb els experiments d'edició (apartat 3.2.17).

L'estratègia escollida va consistir en transformar el pCas a les cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3). Els bacteris resultants de la transformació es van de fer créixer en cultius O/N a 30 °C i amb presència de kanamicina ja que el plasmidi pCas, que no requeria de cap modificació, tenia l'origen de replicació repA101 sensible a temperatura i conferia resistència a l'antibiòtic mencionat. Una alíquota d'aquest cultiu es va diluir 1:50 en medi SOC amb kanamicina en un flascó d'agitació i es va fer créixer a 30 °C fins arribar a una Abs₆₀₀ de 0,3 – 0,4, moment en el que es va induir l'expressió del sistema de recombinases λ-Red del pCas amb 10 mM de L-arabínosa, i es va deixar creixent fins a una Abs₆₀₀ de 0,6. Posteriorment es van preparar les cèl·lules competents amb una solució 60 mM de CaCl₂ seguint el protocol estàndard (apartat 3.2.5).

Els experiments d'edició genètica consistien en co-transformar un pTarget i un DNA donador a les cèl·lules competents amb pCas, ja que la Cas9 es trobava a l'interior d'aquestes cèl·lules sent expressada constitutivament, i el sistema λ-Red s'havia induït just abans de fer-les competents. D'aquesta forma es podia produir consecutivament el tall en un lloc del genoma concret i la seva reparació per recombinació homòloga, tal com s'explica a l'apartat 1.2.3.

El primers experiments d'edició genètica es van dur a terme amb el pTarget-lacZ i el donador SAG2ΔlacZ, ja que la interrupció del gen *lacZ* permetia un primer anàlisi a través del cribratge blau – blanc directament a les plaques de LB agar (apartat 3.2.18). Es van co-transformar 100 ng de pTarget-lacZ i 400 ng de SAG2ΔlacZ

seguint un protocol estàndard de transformació exceptuant la temperatura de recuperació de la barreja en SOC, que havia de ser 30 °C. A les plaques LB amb kanamicina i espectinomicina hi va créixer un número baix de colònies de l'ordre de $0,7 - 1,2 \times 10^2$ ufc/ μ g de pTarget, i en varies repeticions de l'experiment no hi van créixer colònies.

Degut a que el cribratge blau – blanc s'havia de realitzar en plaques amb X-gal i IPTG, i que l'IPTG provocava el *curing* del pTarget, no es podia fer la transformació directament en plaques amb kanamicina, espectinomicina, X-gal i IPTG, i es van generar plaques rèplica de LB amb kanamicina, X-gal i IPTG. Entre el 57 % i el 83 % de les colònies que hi van créixer eren blanques, per tant, indicadores del trencament del gen *lacZ*.

L'anàlisi de l'edició en aquestes colònies es va realitzar a través de *colony* PCR (apartat 3.2.2) amb els *primers* dissenyats per generar fragments en colònies editades (*colonyPCR_lacZ/SAG2_RV* o *pET28_cassette_RV*). El *primer* *colonyPCR_lacZ*, i els equivalents per la resta de gens, amplificaven des de 60 bp *upstream* de la seqüència del donador, per tant en una zona del genoma no present en el DNA donador. També es van amplificar controls per la seqüència de SAG2 o del *cassette*, i per la seqüència d'una part del genoma no implicada com a control positiu de l'amplificació, per exemple amb els *primers* del braç d'homologia 5' de *fecA* (*fecA_FW_300/P2_fecA*).

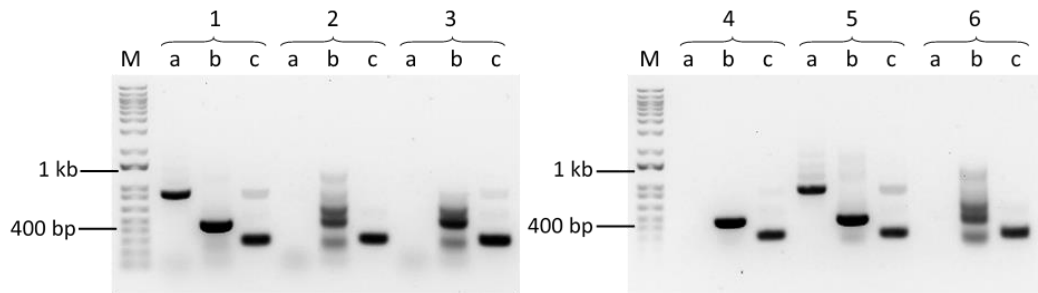


Figura 36. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2 Δ lacZ per *colony* PCR. Es van analitzar sis colònies, quatre de les quals eren blanques en el cribratge blau – blanc (1, 2, 4 i 5) i les altres dues eren blaves (3 i 6). A totes les colònies es va amplificar el control positiu (c) i la seqüència SAG2 (b), però només a les colònies 1 i 5 es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (*colonyPCR_lacZ/SAG2_RV*). b) *Primers* de SAG2 (*SAG2_FW/SAG2_RV*). c) *Primers* del control positiu (*fecA_FW_300/P2_fecA*).

A la Figura 36 es pot observar que a totes les colònies s'amplificava el control positiu de la PCR de 263 bp amb els *primers* que s'unien a una part del genoma no modificada. A més, tant a les quatre colònies blanques com a les dues negres s'amplificava la seqüència de SAG2 (435 bp), per tant, els *primers* que només s'unien al DNA donador indicaven presència d'aquest en totes les colònies. Per últim, a dues de les quatre colònies blanques s'amplificava el fragment que indicava que hi havia hagut edició (941 bp) ja que un del *primers* s'unia al genoma original i l'altre al DNA donador.

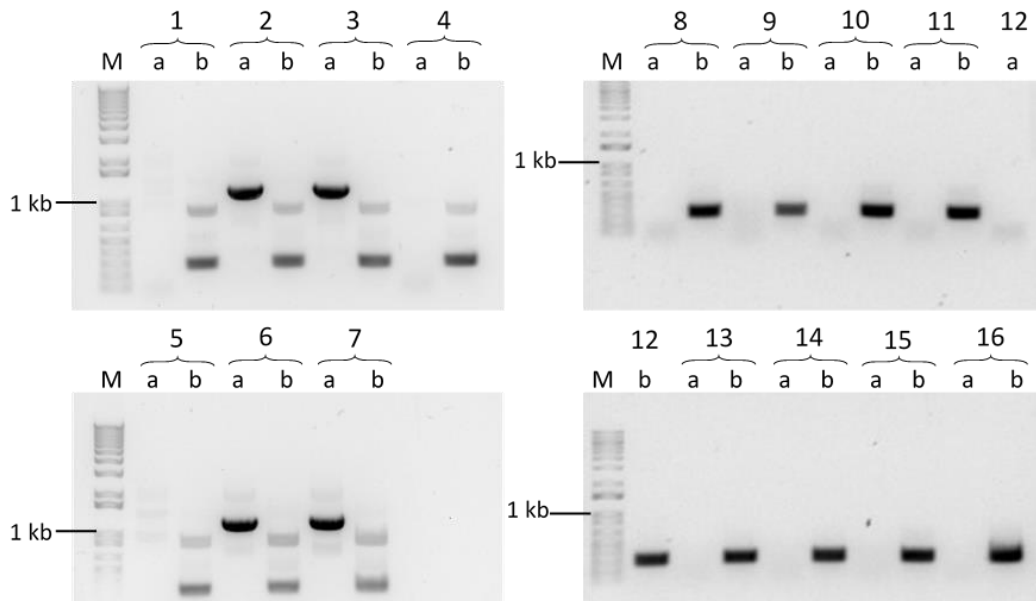


Figura 37. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2ΔlacZ per colony PCR (2). Es van analitzar setze colònies, dotze blanques en el cribratge blau – blanc (1 – 12) i quatre blaves (13 – 16). A totes les colònies es va amplificar el control positiu (b), però només a les colònies 2, 3, 6 i 7 es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_lacZ/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

A la Figura 37 també s'observa que a totes les colònies s'amplificava el control positiu (263 bp) i que hi havia colònies blanques, és a dir, amb disrupció en el gen *lacZ*, que no presentaven edició (1136 bp). Tot i això, un 33 % de les colònies blanques estaven editades segons l'anàlisi per *colony* PCR.

A part dels exemples mostrats, es van analitzar fins a un total de 22 colònies blanques sense trobar-ne de noves positives per l'edició. Dues de les colònies editades amb SAG2ΔlacZ es van fer créixer en un cultiu O/N per poder-ne extreure el DNA genòmic i fer una doble confirmació de la seva edició per PCR (Figura 38). Els productes de PCR amb els fragments que indicaven que hi havia edició es van purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction*, i seguidament es va comprovar la seva seqüència per seqüenciació de Sanger (Figura 38 i Figura S5 de l'Annex).

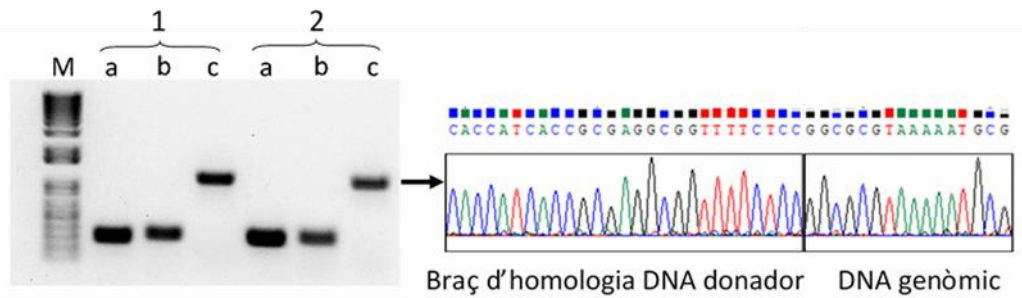


Figura 38. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació i seqüenciació de l'edició SAG2ΔlacZ. Es van analitzar dues de les colònies editades amb SAG2ΔlacZ usant el DNA genòmic com a motlle i posteriorment es va seqüenciar un fragment indicador d'edició on es veia la unió entre el DNA donador i el DNA genòmic amb el *primer* T7_promoter_RV. a) *Primers* de control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA). b) *Primers* de segon control positiu (ompA_FW_300/P2_ompA). c) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_lacZ/pET28_cassette_RV).

Posteriorment a aquesta primera edició, es van generar els DNA donadors GRA2ΔcadA, GRA2ΔfecA i GRA2ΔompA mitjançant *overlap* PCR, tal com s'ha explicat a l'apartat 4.3.1.2, fins a assolir els 400 ng necessaris per dur a terme els experiments d'edició. Un cop a punt, aquests donadors es van co-transformar amb els seus pTarget respectius, pTarget-cadA, pTarget-fecA i pTarget-ompA, en cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3) pCas. En aquests casos, no es va poder fer un cribratge metabòlic previ com el blau – blanc, de manera que es van analitzar les colònies directament per *colony* PCR amb els *primers* corresponents, seguint l'exemple de l'edició anterior (Figura 39, Figura 40 i Figura 41).

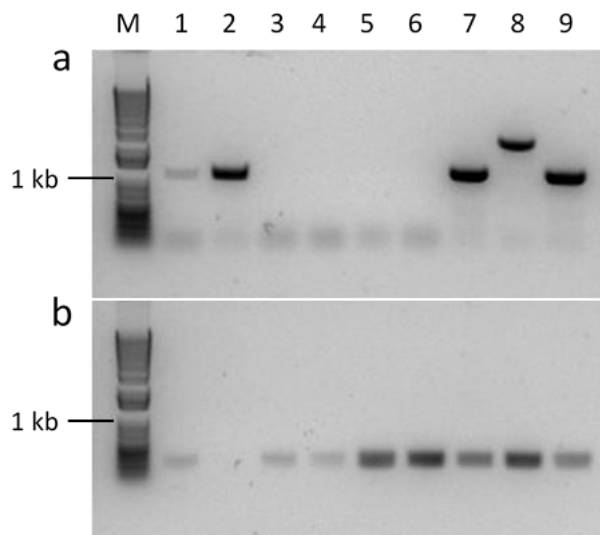


Figura 39. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2 Δ cadA per colony PCR. Es van analitzar nou colònies. A totes es va amplificar el control positiu (b) excepte a la colònia 2, i a cinc colònies es va amplificar un fragment amb els *primers* indicadors d'edició (1, 2, 7, 8 i 9), malgrat que el fragment de la colònia 8 no correspon amb la mida esperada. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_cadA/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

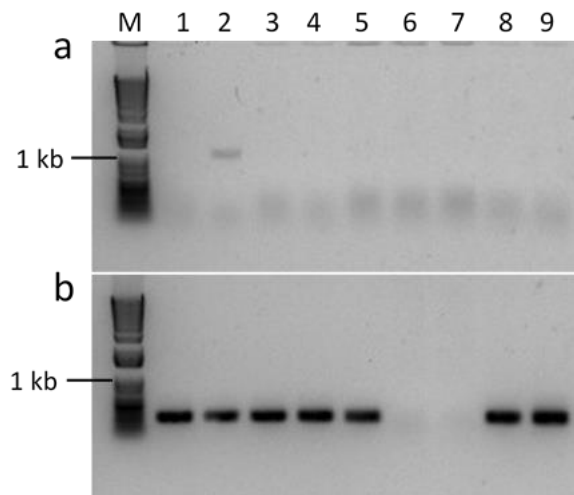


Figura 40. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2 Δ fecA per colony PCR. Es van analitzar nou colònies. A totes es va amplificar el control positiu (b) excepte a les colònies 6 i 7, i a la colònia 2 es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_fecA/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (ompA_FW_300/P2_ompA).

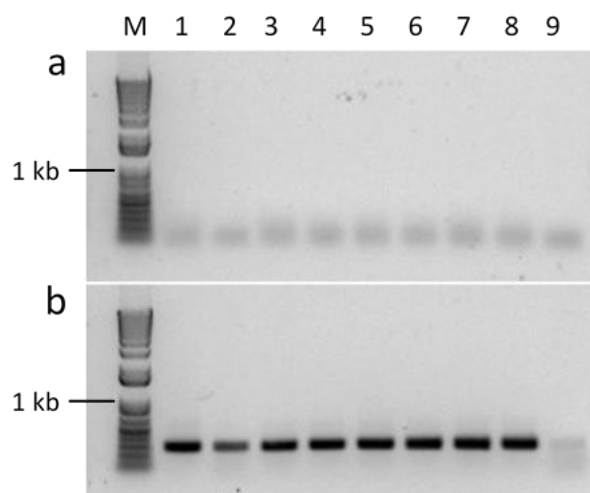


Figura 41. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔompA per colony PCR. Es van analitzar nou colònies. A totes es va amplificar el control positiu (b) excepte a la colònia 9, i a cap colònia es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_ompA/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

Diverses repeticions d'aquestes co-transformacions no van donar com a resultat colònies editades, de manera que, tot i obtenir les edicions de GRA2ΔcadA i GRA2ΔfecA, l'eficiència d'edició era molt baixa. Els fragments de les colònies que indicaven presència de l'edició es van analitzar per seqüenciació de Sanger amb resultat positiu (Figura S6 i Figura S7 de l'Annex).

Hi havia dues dificultats a l'hora de trobar cèl·lules editades. Per una banda, la baixa competència de les cèl·lules *E. coli* BL21 (DE3) transformades amb pCas, que per aquestes edicions havien exhibit unes competències de l'ordre de $2,2 \times 10^3$ – $5,6 \times 10^4$ ufc/ μ g de pBluescript. I per l'altra, un problema que dificultava el cribratge de colònies a les plaques d'edició de LB agar amb kanamicina i espectinomicina, l'aparició de colònies satèl·lit al voltant de les colònies d'*E. coli*. Això era conseqüència de l'ús de l'espectinomicina, la resistència a la qual es generava espontàniament amb molta facilitat (Anderson, 1969; Mark et al., 1983; Johanson i Hughes, 1995). Per aquesta raó es va procedir a fer un canvi per

l'ampicil·lina, ja que és una resistència a antibiòtic amb una sensibilitat i estabilitat més altes.

Per dur a terme aquest canvi, es va amplificar la seqüència codificant de la resistència a ampicil·lina del pBluescript mitjançant *primers* que incorporaven una diana de restricció XhoI a 5' i cap diana a 3' (AmpFW/AmpRV), per mantenir així l'orientació de l'insert en el vector. Els plasmidis pTarget (pTarget-cadA, pTarget-fecA, pTarget-lacZ, pTarget-ompA i pTarget-ybbD) es van digerir amb MluI, i seguidament es van tractar amb la polimerasa Klenow DNA per fer rom aquest extrem (apartat 3.2.4). Un cop obtingut el fragment d'ampicil·lina, aquest es va digerir conjuntament amb els vectors amb l'enzim XhoI. Finalment, es van lligar els fragments en els vectors mitjançant la T4 Ligase i es van transformar els plasmidis resultants en cèl·lules competents *E. coli* Top10. Després de fer créixer els bacteris en presència d'ampicil·lina, es van purificar el plasmidis amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* i es va analitzar la seqüència del pTarget-lacZ per seqüenciació de Sanger (Figura S8 de l'Annex). Des d'aquest punt, es va treballar exclusivament amb els nous pTarget resistents a ampicil·lina.

Es van realitzar els experiments d'edició del SAG2-GRA2 Δ lacZ i el SAG2-GRA2 Δ ybbD en noves cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3) transformades amb pCas, que presentaven una competència de l'ordre de $1,7 \times 10^3 - 4,5 \times 10^3$ ufc/ μ g de pBluescript. El creixement de colònies satèl·lits que dificultava el cribratge de colònies editades va desaparèixer amb el reemplaçament de la resistència a antibiòtic. En el cas del SAG2-GRA2 Δ lacZ, es van analitzar les colònies pel cribratge blau – blanc obtenint un alt nombre de colònies blanques per placa, entre el 66 % i el 93 %. Seguidament, aquestes colònies es van analitzar per *colony* PCR (Figura 42).

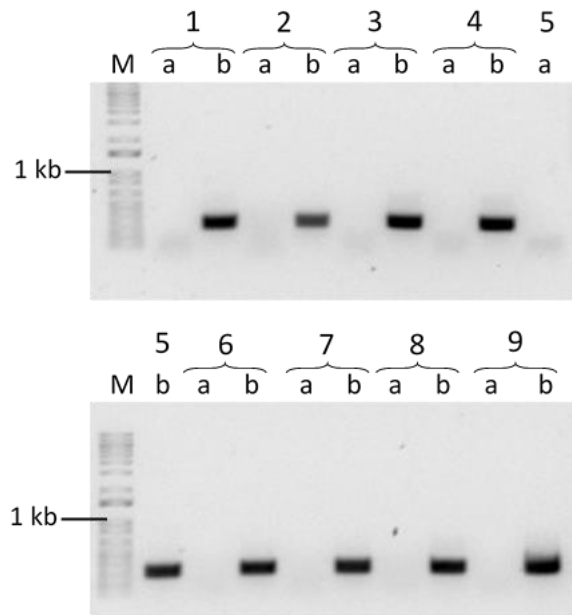


Figura 42. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2 Δ lacZ per *colony* PCR. Es van analitzar nou colònies, vuit blanques en el cribratge blau – blanc (1 – 8) i una blava (9). A totes les colònies es va amplificar el control positiu (b) però a cap de les vuit colònies blanques es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_lacZ/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

Com es pot veure a la Figura 42, que es representativa de l'anàlisi d'un número més gran de colònies, no es va obtenir l'edició de SAG2-GRA2 Δ lacZ.

Partint dels resultats de la Figura 42, i en general de les colònies blanques en les *colony* PCR, es van analitzar colònies blanques que presentaven edició SAG2 Δ lacZ i colònies blanques que no presentaven edició amb nous *primers* per esbrinar com s'havia resolt el genoma tenint en compte que *E. coli* no presenta mecanisme de reparació conegut davant d'un DSB. Per dur-ho a terme, es van dissenyar *primers* que amplifiquessin regions més grans al voltant del punt de tall de la Cas9 en el gen *lacZ* (lacZ_FW_a/lacZ_RV_a amplifica 629 bp, lacZ_FW_b/lacZ_RV_b amplifica 793 bp, lacZ_FW_c/lacZ_RV_c amplifica 1355 bp, lacZ_FW_d/lacZ_RV_d amplifica 1559 bp i lacZ_FW_e/lacZ_RV_e amplifica 1909 bp). Primer es va

analitzar el DNA genòmic d'una colònia editada amb SAG2 Δ lacZ i d'una colònia blava (Figura 43).

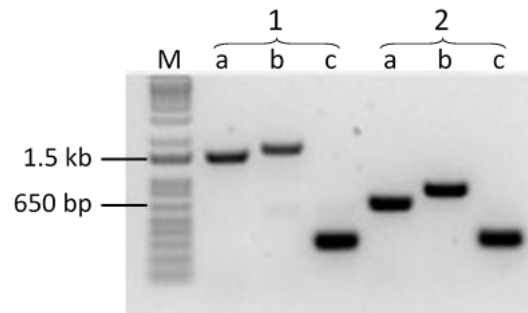


Figura 43. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació d'una colònia blanca editada (SAG2 Δ lacZ) i una colònia blava no-editada per *colony* PCR. Es va analitzar amb nous *primers* un clon SAG2 Δ lacZ editat (1) i una colònia blava en el cribratge blau – blanc (2). a) *Primers* lacZ_FW_a/lacZ_RV_a. b) *Primers* lacZ_FW_b/lacZ_RV_b. c) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

A la Figura 43 es mostra que els nous *primers* podien amplificar la regió del genoma editada i comparar-ne la diferència amb un genoma no-editat. El fragment *a* havia de ser de 629 bp en cas de no estar editat i de 1462 bp en cas d'estar editat. I el fragment *b* havia de ser de 793 bp en cas de no estar editat i de 1629 bp en cas d'estar-ho.

Amb aquestes noves parelles de *primers* es van analitzar colònies blanques que no havien presentat fragment indicador d'edició SAG2-GRA2 Δ lacZ obtenint un resultat no-conclusiu en tots els casos, ja que no s'amplificaven els fragments indicadors d'edició ni els fragments indicadors de no-edició. A la Figura 44 hi ha un exemple representatiu d'aquests resultats.

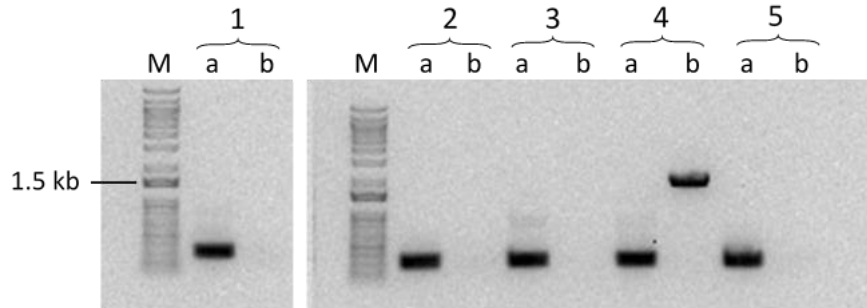


Figura 44. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2 Δ lacZ per colony PCR (2). Es van analitzar cinc colònies, quatre blanques en el cribratge blau – blanc (1, 2, 3 i 5) i una blava (4). A totes les colònies es va amplificar el control positiu (a) però només a una, la 4, es va amplificar el fragment indicador de no-edició. a) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA). b) *Primers* lacZ_FW_e/lacZ_RV_e.

A la colònia blava (4) es va amplificar el fragment de 1909 bp que indicava que no hi havia hagut edició, mentre que a la resta de colònies blanques no es va amplificar cap fragment. Aquests resultats no-conclusius suggerien que hi havia hagut re-ordenaments en el lloc del DSB permeten circularitzar el cromosoma sense haver-hi l'edició desitjada per recombinació homòloga.

Per últim, es van generar noves cèl·lules competents *E. coli* BL21 (DE3) pCas per realitzar l'edició de SAG2-GRA2 al locus *ybbD*, i també cèl·lules competents a partir de les soques editades amb GRA2 Δ cadA per realitzar una segona edició, amb SAG2 Δ lacZ, a la mateixa soca (Figura 45 i Figura 46). A tots dos lots de cèl·lules competents es va obtenir una competència similar a les anteriors.

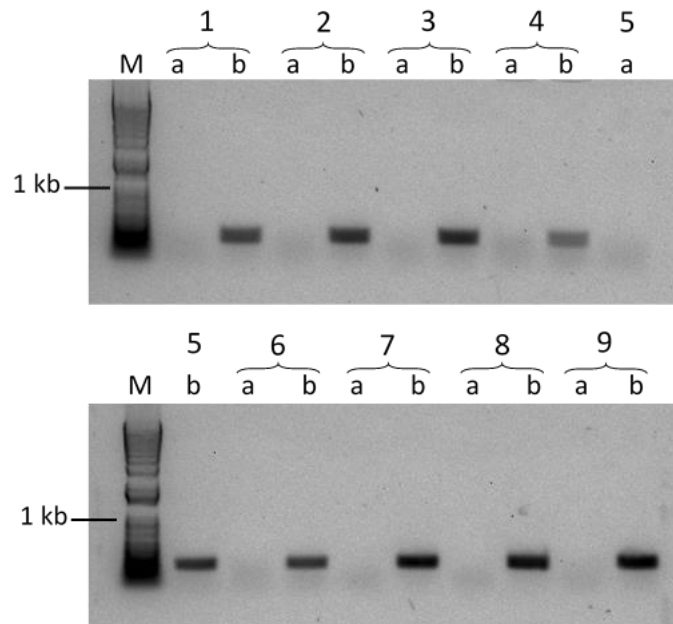


Figura 45. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2 Δ ybbD per colony PCR. Es van analitzar nou colònies. A totes es va amplificar el control positiu (b) però a cap colònia es va amplificar el fragment indicador d'edició. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_ybbD/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA).

La co-transformació del SAG2-GRA2 Δ ybbD i el pTarget-ybbD generava un número baix de colònies a la placa de kanamicina i ampil·lina, un problema també constant a la resta d'experiments d'edició, i a més no va generar cap colònia editada.

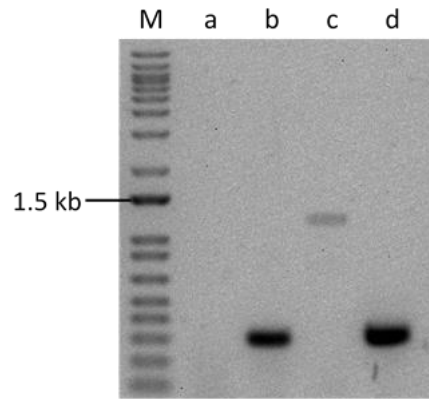


Figura 46. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2ΔlacZ en cèl·lules GRA2ΔcadA per colony PCR. Es va analitzar una colònia positiva pels controls positius (b i d) i l'edició prèvia (c), però no amplificava el fragment indicador de la nova edició (a). a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_lacZ/pET28_cassette_RV). b) *Primers* del control positiu (fecA_FW_300/P2_fecA). c) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_cadA/pET28_cassette_RV). d) *Primers* del control positiu (ompA_FW_300/P2_ompA).

Pel que fa a la segona edició, es va co-transformar el SAG2ΔlacZ i el pTraget-lacZ en cèl·lules competents que ja tenien l'edició de GRA2ΔcadA en el seu genoma, sense èxit en l'edició, tal com es mostra en una colònia representativa a la Figura 46.

4.3.2.2 Establiment d'un nou protocol de cèl·lules competents

L'ús de l'electroporació com a mètode de generació de cèl·lules competents i de co-transformació dels elements d'edició podia haver augmentat la freqüència de transformació de les cèl·lules i, conseqüentment, l'eficiència d'edició (Jiang et al., 2013, 2015; Li et al., 2015; Zerbini et al., 2017). Però la no-disponibilitat i el cost d'un nou equipament dificultava el seva utilització. De manera que es va plantejar el canvi de protocol químic de cèl·lules competents com a conseqüència de les competències baixes obtingudes fins aquest punt.

En el primer pas del protocol de cèl·lules competents pels experiments d'edició s'havia de fer créixer una colònia individual d'*E. coli* BL21 (DE3) pCas en un pre-cultiu O/N i posteriorment en un cultiu per induir les recombinases λ-Red amb L-

arabinosa. L'ús de medi SOC en aquests cultius podia reprimir el promotor pBAD, induïble amb L-arabinosa, degut a la presència de glucosa en aquest (Guzman et al., 1995). Per resoldre-ho, es va utilitzar medi SOB tant en la generació de cèl·lules competents com en les co-transformacions de pTarget i DNA donador.

El moment d'inducció del sistema λ -Red es va canviar d'una Abs_{600} de 0,3 – 0,4 a una Abs_{600} de 0,2 – 0,3, i el moment d'aturar el creixement per iniciar el protocol químic de cèl·lules competents es va canviar d'una Abs_{600} de 0,6 a 0,45, assegurant així la inducció en fase exponencial i evitant la fase estacionària, que genera cèl·lules menys competents.

A més d'això, davant la possibilitat que les baixes eficiències d'edició fossin conseqüència de l'absència de recombinació homòloga per reparar el tall en el genoma, la quantitat de L-arabinosa que s'afegia per la inducció, 10 mM, es va augmentar fins a 100 mM.

Un cop es recollien els bacteris per centrifugació a 1600xg durant 10 min i a 4 °C, es feien dos rentats amb una solució de $CaCl_2$ 60 mM i finalment un tercer rentat amb una solució de $CaCl_2$ 60 mM i 15 % de glicerol. Per optimitzar l'efecte de la concentració de $CaCl_2$, es van avaluar tres concentracions majors, 100 mM, 150 mM i 200 mM, obtenint l'eficiència de transformació més alta amb 150 mM de $CaCl_2$ (Figura 47).

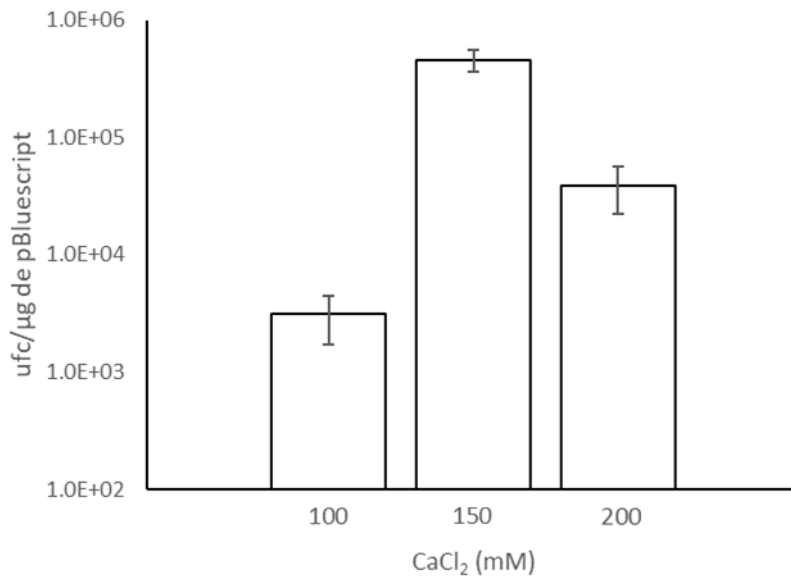


Figura 47. Eficiència de transformació d'*E. coli* BL21 (DE3) pCas amb diferents concentracions de CaCl₂ en el protocol de cèl·lules competents. Es van comparar les eficiències de transformació de tres lots de cèl·lules *E. coli* BL21 (DE3) pCas transformades amb pBluescript, la diferència entre lots era la concentració de CaCl₂ usada durant el protocol de generació de cèl·lules competents (100, 150 i 200 mM). Les dades corresponen a la mitjana ± la desviació estàndard.

4.3.2.3 Modificacions a les edicions i nou locus *panD*

Es van realitzar diverses modificacions en els experiments d'edició amb l'objectiu de generar una soca editada amb l'antigen quimèric SAG2-GRA2 i una soca editada amb una còpia de l'antigen SAG2 i una còpia de l'antigen GRA2.

Els canvis que es van introduir requerien la generació d'un nou pTarget dirigit a *panD*, l'ampliació de la llargada dels braços d'homologia flanquejants dels *cassettes* i l'increment de la quantitat de pTarget i DNA donador seguint la metodologia publicada per Sun et al. (2019).

Amb el nou locus *panD* es va utilitzar la mateixa guia RNA que es va fer servir a l'article citat (GATATCTGGAATGTCACCAA), les coordenades de tall del qual eren 149347 (CP001509.3). Per generar aquest nou pTarget-*panD* amb 20 nt coneguts, es va seguir la mateixa estratègia que a l'apartat 4.3.1.1.

També es va seguir la mateixa estratègia explicada a l'apartat 4.3.1.2 per la generació de nous braços d'homologia de 1000 bp per *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA*, *ybbD* i *panD*. Per tant, es van dissenyar nous *primers* per la seva amplificació via *overlap* PCR (*panD_FW_1000/panD_RV_1000*, i els equivalents per la resta de gens).

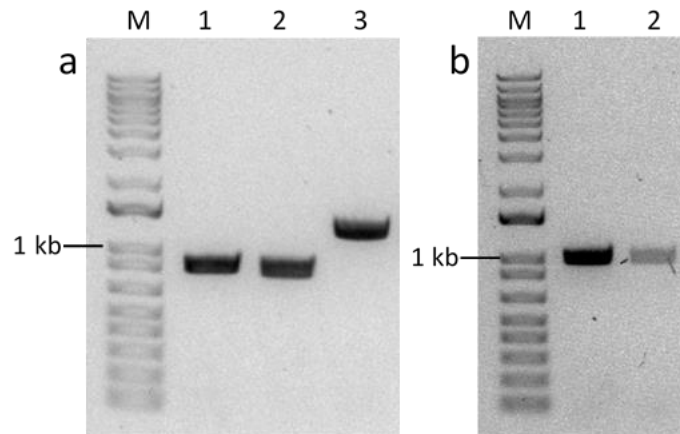


Figura 48. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels *cassettes* SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 amb seqüències de solapament amb *panD*, i dels braços d'homologia de *panD*. a) Els tres *cassettes* amb regions de solapament amb *panD* es van generar per PCR amb els pET28a com a motlle. b) Les seqüències dels braços d'homologia *upstream* i *downstream* de *panD* es van amplificar per PCR usant DNA genòmic com a motlle. Carril 1a: *cassette* SAG2. Carril 2a: *cassette* GRA2. Carril 3a: *cassette* SAG2-GRA2. Carril 1b: braç d'homologia *upstream* de *panD*. Carril 2b: braç d'homologia *downstream* de *panD*.

A la Figura 48 es pot observar l'amplificació dels elements necessaris per generar els DNA donadors dirigits al nou locus *panD*.

Per últim, es van incrementar considerablement les quantitats de pTarget i DNA donador que s'utilitzaven en els experiments d'edició, passant de 100 ng a 1000 ng en el cas del pTarget, i de 400 ng a 1500 ng en el cas del DNA donador. Per poder produir aquestes quantitats del plasmidi, es van realitzar purificacions de cultius de 250 mL amb el kit *NZYMaxiprep*, i, pels DNA donadors, es va realitzar un número major de reaccions d'amplificació per *overlap* PCR.

Amb totes aquestes millores es va aconseguir l'edició tant de l'antigen quimèric SAG2-GRA2 a *panD* com la segona edició de GRA2 a *panD* a una soca editada prèviament amb SAG2 Δ lacZ (Figura 49 i Figura 50).

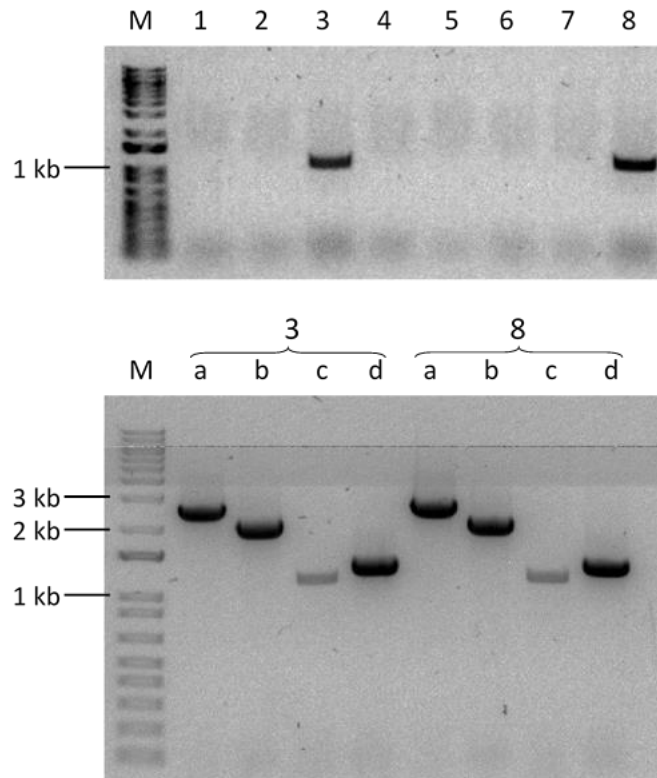


Figura 49. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2 Δ panD per colony PCR. Es van analitzar vuit colònies amb els *primers* indicadors d'edició *a* (imatge superior). A totes es va amplificar el control positiu (dades no mostrades) i a les colònies 3 i 8 es va amplificar el fragment indicador d'edició. A la imatge inferior es confirmen les edicions de les colònies 3 i 8 amb noves parelles de *primers*. a) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_panD/T7_terminal_RV). b) *Primers* indicadors d'edició (colonyPCR_panD/sag2_RV). c) *Primers* indicadors de *cassette* (T7_promoter_FW/T7_terminal_RV). d) *Primers* indicadors de *cassette* (P1_panD/P4_panD).

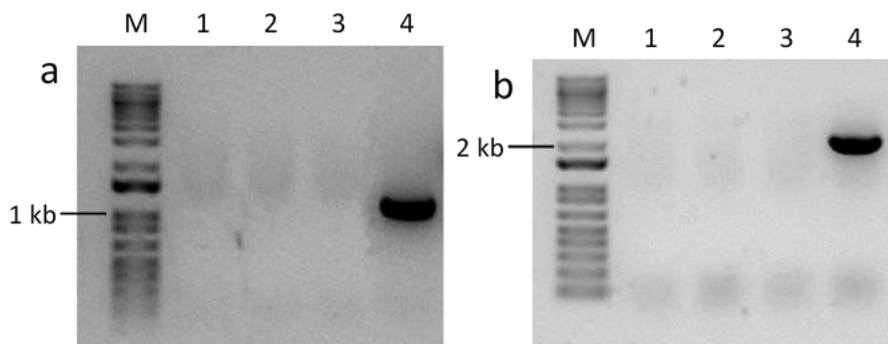


Figura 50. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔpanD en una soca editada amb SAG2ΔlacZ per colony PCR. Es van analitzar quatre colònies. A una colònia es va amplificar el control positiu, en aquest cas l'edició de SAG2ΔlacZ (4), i en aquesta mateixa colònia es va amplificar el fragment indicador de l'edició GRA2ΔpanD. a) *Primers* indicadors del control positiu i indicadors de l'edició SAG2ΔlacZ (colonyPCR_lacZ/pET28_cassette_RV). b) *Primers* indicadors de l'edició GRA2ΔpanD (colonyPCR_panD/T7_terminal_RV).

Tal com s'havia fet anteriorment, els productes de PCR que indicaven les edicions es van seqüenciar per seqüenciació de Sanger amb resultats positius (Figura S9 i Figura S10 de l'Annex).

Per dur a terme la segona edició en una soca ja editada prèviament, es va fer el *curing* del plasmidi pTarget-lacZ. Per fer-ho es va fer créixer una colònia individual de la soca editada amb SAG2ΔlacZ en presència d'IPTG 1 mM i només l'antibiòtic kanamicina pel manteniment del pCas. L'IPTG induïa l'expressió d'un sgrRNA que es trobava al pCas i que anava dirigit a trencar el pTarget, tal com s'ha introduït en l'apartat 1.2.3.

Malgrat l'establiment de les soques editades amb SAG2-GRA2ΔpanD i la doble editada amb SAG2ΔlacZ i GRA2ΔpanD, diverses repeticions d'aquests experiments no van resultar en colònies editades, assolint una eficiència d'edició màxima del 57 %.

El conjunt d'edicions generades en aquesta tesi es troben a la Taula 19:

Taula 19. Resum de les edicions generades a la soca *E. coli* BL21 (DE3).

Soques <i>E. coli</i> BL21 (DE3) editades
SAG2ΔlacZ
GRA2ΔcadA
GRA2ΔfecA
SAG2-GRA2ΔpanD
SAG2ΔlacZ
GRA2ΔpanD

4.3.2.4 Transformació amb pTarget-∅

Després de descartar problemes de sensibilitat a l'espectinomicina, de quantitat de DNA donador, de competència de les cèl·lules i de longitud dels braços d'homologia, la baixa eficiència d'edició respecte altres estudis similars podia ser deguda a la baixa activitat de les recombinases λ-Red o de la Cas9.

Malgrat no poder-se verificar directament l'expressió d'aquestes proteïnes, es va incrementar la concentració d'arabinosa per una banda (apartat 4.3.2.2) i es va examinar l'eficiència de tall de la Cas9 mitjançant la transformació d'un pTarget sense guia RNA, és a dir, un pTarget-∅.

Primer es va generar el pTarget-∅ mitjançant una digestió enzimàtica del pTarget-lacZ amb AvrII i XbaI que eliminava 127 bp on es trobaven els 20 nt i el gRNA scaffold. A més, aquests enzims permeten la lligació posterior entre sí. Posteriorment, aquest plasmidi resultant es va transformar en cèl·lules competents *E. coli* Top10, i per últim, es va verificar la mida del plasmidi pTarget-∅ respecte a la del pTarget-lacZ mitjançant una digestió amb l'enzim XhoI (Figura 51).

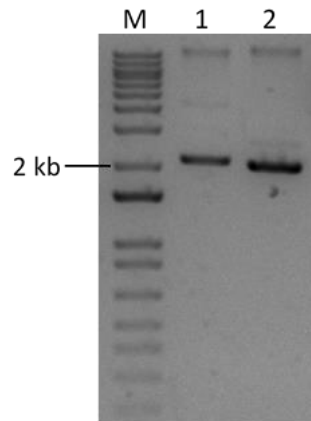


Figura 51. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pTarget-lacZ i pTarget-Ø. La digestió amb els enzims ArvII i XbaI, i la seva re-ligació posterior va donar com a resultat el pTarget-Ø. La digestió amb l'enzim XhoI mostrava la diferència de mida entre plasmidis. Carril 1: pTarget-lacZ. Carril 2: pTarget-Ø.

Seguint el que s'havia fet amb altres plasmidis, la seqüència del pTarget-Ø es va verificar per seqüenciació de Sanger (Figura S11 de l'Annex).

Finalment es va comparar l'eficiència de transformació dels pTarget que dirigien als loci *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA*, *ybbD* i *panD* amb l'eficiència de transformació del pTarget-Ø a la soca *E. coli* BL21 (DE3) pCas.

A les plaques de les cèl·lules transformades amb els pTarget amb sgRNA hi van créixer molt poques colònies, entre $10^1 - 10^2$ ufc/ μ g. Mentre que les cèl·lules transformades amb el plasmidi pTarget-Ø van donar lloc al creixement d'aproximadament 10^5 ufc/ μ g, evidenciant així que l'activitat de la Cas9 era alta.

4.3.3 CURING DELS PLASMIDIS PTARGET – PCAS I ESTABILITAT DE L'EDICIÓ

Un cop es van generar totes les soques editades, es va dur a terme el *curing* dels pTarget i els pCas que es trobaven a l'interior de les cèl·lules. Com s'ha descrit abans, el pCas incloïa una seqüència de sgRNA dirigida al pTarget l'expressió de la qual estava sota control del promotor lac. El pCas, per altra banda, contenia l'origen de replicació repA101 sensible a temperatura.

Es van fer créixer els clons positius d'edició en medi LB sense antibiòtics suplementat amb 1 mM d'IPTG, a 37 °C i 200 rpm O/N. Després d'aquest primer cultiu, es va examinar el creixement dels bacteris en plaques de LB agar amb kanamicina i plaques LB agar amb ampil·lina. Totes les soques eren sensibles a ampil·lina, però hi havia creixement d'aproximadament 100 colònies resistents a kanamicina. Es van realitzar dos sub-cultius successius del primer en medi sense antibiòtic i a 40 °C, i el creixement de colònies resistents a kanamicina es va reduir a 10 – 20. Per seleccionar una colònia individual lliure de pCas es va fer una estria en una placa rèplica LB agar sense kanamicina a partir de l'últim sub-cultiu i es van aïllar diverses colònies per comprovar-ne la seva sensibilitat a kanamicina.

A més del *curing*, es va avaluar l'estabilitat en el temps d'aquestes edicions en el cromosoma d'*E. coli* mitjançant el creixement de quatre cultius O/N consecutius a 37 °C en absència d'antibiòtics. Posteriorment, es van plaquejar en LB agar sense antibiòtics per aïllar-ne deu colònies i analitzar-les per *colony* PCR amb els *primers* indicadors d'edició corresponents (Figura 52).

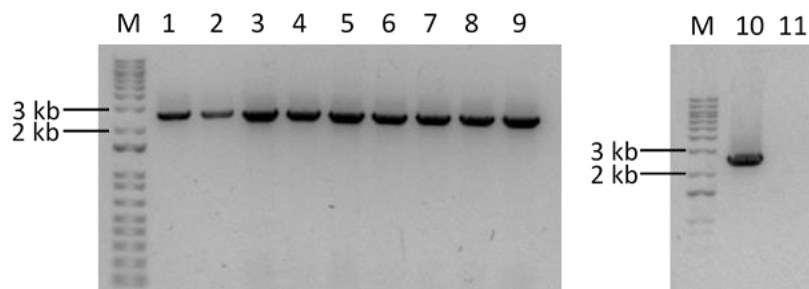


Figura 52. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'estabilitat de l'edició SAG2-GRA2ΔpanD per *colony* PCR. Es van analitzar 10 colònies de la soca editada amb SAG2-GRA2ΔpanD després de cinc creixements O/N sense antibiòtics a 37 °C amb els *primers* indicadors d'edició (*colony*PCR_panD/T7_terminal_RV). La colònia 11 correspon a la soca *E. coli* BL21 (DE3) no-editada (control negatiu).

Com es mostra a la Figura 52, es va amplificar el fragment de 2,5 kb indicador de l'edició SAG2-GRA2ΔpanD, que va des d'una regió del genoma no modificada fins al *cassette*, en totes les colònies excepte en el control negatiu.

4.4 PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT EN SOQUES EDITADES GENÈTICAMENT

Les soques editades genèticament es van utilitzar per la producció d'antígens recombinants de *T. gondii* comparant els nivells de producció amb els de les soques transformades amb plasmidi.

4.4.1 DIFERÈNCIES EN LA PRODUCCIÓ DE BIOMASSA I DE PROTEÏNA RECOMBINANT ENTRE SOQUES

Seguint els procediments realitzats amb les soques transformades amb el plasmidi pET28a (apartat 4.2), es van fer créixer cultius de les soques editades en flascons de 500 mL amb medi LB, SOB i SOC (Figura 53).

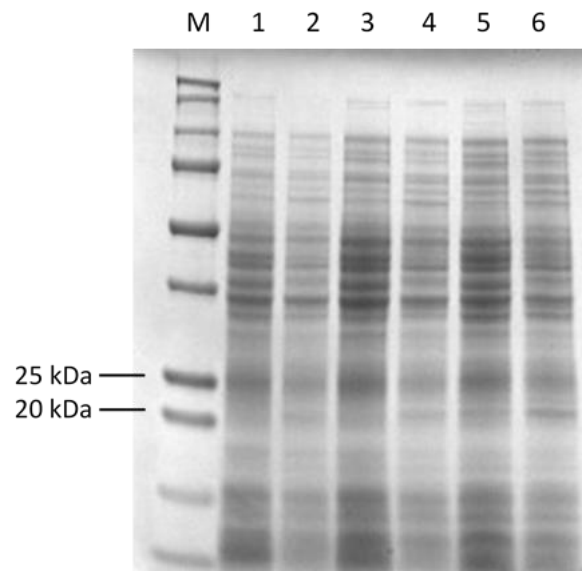


Figura 53. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció de l'antigen SAG2 a la soca *E. coli* BL21 (DE3) SAG2ΔlacZ. Es va cultivar la soca editada amb SAG2ΔlacZ en tres medis diferents, LB, SOB i SOC, sent aquest últim el que mostrava una expressió més visible (6). Carril 1: no induït en LB. Carril 2: 16 h en IPTG en LB. Carril 3: no induït en SOB. Carril 4: 16 h en IPTG en SOB. Carril 5: no induït en SOC. Carril 6: 16 h en IPTG en SOC.

A la Figura 53 es mostra l'expressió de les proteïnes de la soca *E. coli* BL21 (DE3) SAG2ΔlacZ amb resultats representatius per la resta de soques editades. Tal com

s'havia vist amb la soca transformada amb pET28a-SAG2, en medi SOC es pot veure un millor nivell de l'expressió del *cassette* codificant per l'antigen.

També es van avaluar tres temperatures de creixement post-inducció diferents, 25 °C, 30 °C i 37 °C, i es van comparar els nivells d'expressió de les soques *E. coli* BL21 (DE3) SAG2Δ*lacZ* i *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-SAG2 (Figura 54).

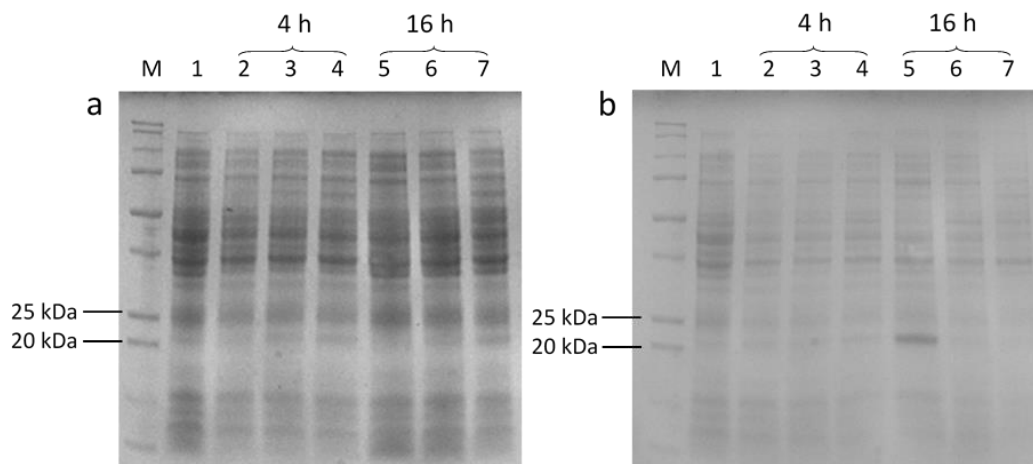


Figura 54. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció de l'antigen SAG2 a les soques *E. coli* BL21 (DE3) SAG2Δ*lacZ* i *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-SAG2. Es va cultivar la soca editada amb SAG2Δ*lacZ* (a) i la soca transformada amb pET28a-SAG2 (b) en tres temperatures diferents, 25 °C, 30 °C i 37 °C. Es van prendre mostres a les 4 h i a les 16 h. Carrils 1a i 1b: no induïts. Carrils 2a i 2b: 4 h en IPTG a 25 °C. Carrils 3a i 3b: 4 h en IPTG a 30 °C. Carrils 4a i 4b: 4 h en IPTG a 37 °C. Carrils 5a i 5b: 16 h en IPTG a 25 °C. Carrils 6a i 6b: 16 h en IPTG a 30 °C. Carrils 7a i 7b: 16 h en IPTG a 37 °C.

Els nivells d'expressió de la soca editada mostrats a la Figura 54 són representatius de la resta de soques editades. Es pot observar una diferència clara entre l'expressió proteica d'una còpia del *cassette* d'interès en el genoma (SAG2Δ*lacZ*) i moltes còpies del *cassette* d'interès en els plasmidis pET28a-SAG2. A diferència del que s'havia publicat prèviament (Englaender et al., 2017), no es van observar diferències entre els loci (*cadA*, *fecA*, *lacZ* i *panD*), obtenint nivells d'expressió similars per tots ells.

Per altra banda, es van observar diferències en la quantitat de biomassa que generaven les soques transformades amb plasmidi i les soques editades

genèticament. Aquesta diferència es va verificar mesurant la Abs_{600} , el pes humit cel·lular i el pes sec cel·lular (apartat 3.2.19) a les 4 h i a les 16 h de cultiu de les soques *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-SAG2 i *E. coli* BL21 (DE3) SAG2 Δ lacZ. A més, a partir d'aquestes dades es pot estimar el número de cèl·lules per mL d'*E. coli* BL21 (DE3) ja que, com a regla general, una Abs_{600} d'1 correspon aproximadament a 8×10^8 cèl·lules/mL (Taula 20).

Taula 20. Dades d' Abs_{600} , pes humit cel·lular i pes sec cel·lular a les 4 h i a les 16 h de cultiu de la soca transformada amb pET28a-SAG2 i de la soca editada SAG2 Δ lacZ.

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Temps (h)	Abs_{600}	Pes humit (g/L)	Pes sec (g/L)	Cèl·lules/mL
pET28a-SAG2	4	2,71	1,012	0,209	$2,17 \times 10^9$
	16	3,54	1,064	0,224	$2,83 \times 10^9$
SAG2 Δ lacZ	4	3,77	1,1	0,25	$3,02 \times 10^9$
	16	4,79	1,196	0,264	$3,82 \times 10^9$

Com es pot veure a la Taula 20, en les condicions de cultiu que es van utilitzar hi havia un major creixement cel·lular de les soques editades comparades amb les cèl·lules transformades amb plasmidi segurament degut a la menor càrrega metabòlica.

4.4.2 PURIFICACIÓ PROTEICA I QUANTIFICACIÓ

Després de la disrupció cel·lular, es va dur a terme la purificació dels antígens en condicions natives per cromatografia d'afinitat amb la resina de Qiagen Ni-NTA utilitzant els cultius de les soques editades amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i la doble editada amb SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD (Figura 55).

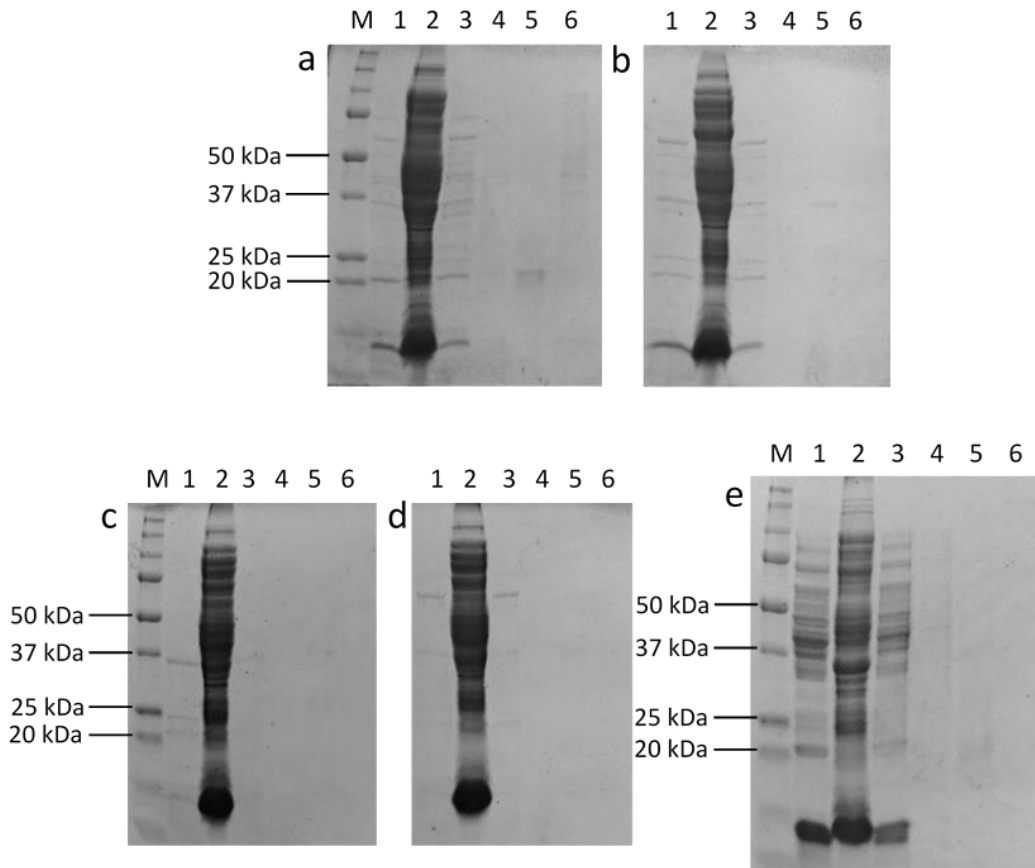


Figura 55. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació de les proteïnes SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 a partir de les soques editades amb SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA, GRA2ΔfecA, SAG2-GRA2ΔpanD i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD. Fases de purificació proteica a partir de les soques editades amb SAG2ΔlacZ (a), SAG2-GRA2ΔpanD (b), GRA2ΔcadA (c), GRA2ΔfecA (d) i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD (e). Carrils 1: extracte total de cèl·lules cultivades 16 h en IPTG. Carrils 2: fracció soluble. Carrils 3: extracte de proteïnes no unides a la columna. Carrils 4: extracte de proteïnes rentades de la columna. Carrils 5: extracte de proteïnes eluïdes de la columna. Carrils 6: extracte de proteïnes precipitades amb les esferes d'agarosa.

La concentració de proteïna de les diferents mostres es va mesurar utilitzant l'assaig de proteïnes Bradford amb la proteïna BSA com a estàndard i es va calcular la productivitat volumètrica dels cultius amb dades d'un experiment representatiu (Taula 21).

Taula 21. Productivitats volumètriques de les soques editades amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i la doble editada amb SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD.

Soca editada	Productivitat volumètrica en flascó (mg/L·h)
SAG2 Δ lacZ	0,1
GRA2 Δ cadA	0,04
GRA2 Δ fecA	0,04
SAG2-GRA2 Δ panD	0,06
SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD	0,08

Davant la dificultat de veure les proteïnes recombinants pures en el gel com a conseqüència de la baixa expressió (Figura 55), es van realitzar dues immunodeteccions per Western blot amb un anticòs anti-His revelades amb peroxidasa (apartat 3.1.19). Primer, utilitzant els extractes totals dels cultius de les soques editades SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA i SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD després de 16 h en IPTG (Figura 56), i després, utilitzant les proteïnes pures produïdes per les soques editades amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD i SAG2-GRA2 Δ panD (Figura 57).

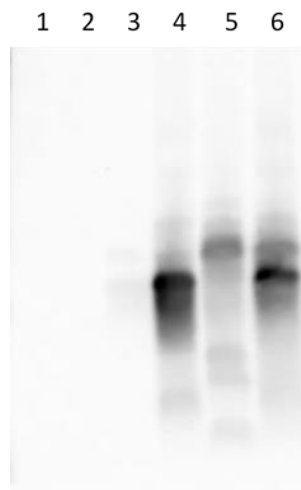


Figura 56. Anàlisi per Western blot dels antígens produïts per les soques SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD. Els cultius de bacteris amb SAG2ΔlacZ (carrils 1 i 4), GRA2ΔcadA (carrils 2 i 5) i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD (carrils 3 i 6) es van utilitzar per immunodetectar proteïnes amb la cua d'histidines 6xHis. Carrils 1, 2 i 3: no induït. Carrils 4, 5 i 6: 16 h en IPTG.

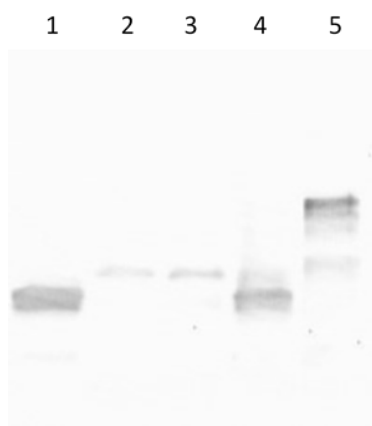


Figura 57. Anàlisi per Western blot dels antígens purs produïts per les soques SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA, GRA2ΔfecA, SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD i SAG2-GRA2ΔpanD. Els extractes de proteïnes eluïdes de la columna de purificació es van utilitzar per immunodetectar proteïnes amb la cua d'histidines 6xHis. Carril 1: SAG2ΔlacZ. Carril 2: GRA2ΔcadA. Carril 3: GRA2ΔfecA. Carril 4: SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD. Carril 5: SAG2-GRA2ΔpanD.

Com es mostra a la Figura 57, els cinc clons editats estaven produint els antígens de *T. gondii* amb èxit. Tot i que, sota les condicions de creixement estudiades en aquesta tesi, el rendiment productiu d'aquestes soques era inferior al de les soques transformades amb el plasmidi pET28a.

4.5 FUNCIONALITAT DELS ANTÍGENS RECOMBINANTS

El disseny del sistema de producció de proteïnes recombinants tenia un objectiu comercial per Spinreact S.A.U. ja que aquests antígens de *T. gondii* havien de ser la matèria primera per un immunoassaig serològic. Més concretament, hi havia dues opcions de desenvolupament d'un reactiu pel serodiagnòstic de la toxoplasmosi, un test d'aglutinació en làtex (LAT) que discriminés pacients positius i negatius per turbidimetria o un test basat en un immunoassaig enzimàtic (ELISA).

Tenint aquestes premisses en consideració, es va estudiar la funcionalitat de les proteïnes recombinants SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 en assaigs preliminars de LAT i ELISA.

4.5.1 TEST D'AGLUTINACIÓ EN LÀTEX PER TURBIDIMETRIA

El principi de l'aglutinació en làtex es basa en microesferes de poliestirè de 50 – 300 nm de diàmetre que en solució aquosa es poden sensibilitzar amb antígens o anticossos específics per determinats analits. Una mostra que contingui l'analit en qüestió es barreja amb la suspensió i les esferes de làtex floclen com a conseqüència de la unió antigen – anticòs.

Com que l'aglutinació en làtex pot veure's a ull nu, es podia haver verificat la funcionalitat dels antígens qualitativament, però en aquest cas es volia desenvolupar un immunoassaig quantitatiu per turbidimetria, tal com s'ha introduït a l'apartat 1.1.3, per tant es va avaluar la funcionalitat dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 mitjançant aquest mètode quantitatiu. A més, la immunoturbidimetria permet llegir la turbiditat, la pèrdua de llum que passa a través de la mostra, per sota del rang visible dels 380 – 740 nm, la qual cosa

contribueix a tenir més sensibilitat en la detecció de l'analit, en aquest cas, anticossos anti-*Toxoplasma*.

La concentració de l'analit és inversament proporcional a la senyal de llum transmesa, per tant es podia detectar la resposta dels antígens recombinants en funció del nivell d'anticossos anti-*Toxoplasma* expressat en unitats internacionals de *Toxoplasma* per mL (UI/mL). El límit de sensibilitat analítica del reactiu a partir del qual els antígens havien de detectar mostres positives, és a dir, el *cut-off* positiu, estava determinat en 3 – 7 UI/mL segons el 3er Estàndard Internacional de la OMS (Hansen et al., 1994). D'aquesta manera, totes les mostres de pacients amb una titulació major a 7 UI/mL havien de donar senyal positiva amb els antígens recombinants.

Per realitzar un estudi preliminar de la funcionalitat dels antígens de *T. gondii*, es va utilitzar un sèrum de cabra immunitzada amb el lisat d'antígens de *Toxoplasma*, prèviament caracteritzat amb el kit Toxo-Latex de Spinreact S.A.U. i diluït fins a obtenir 50, 200 i 1000 UI/mL d'anticossos de *Toxoplasma*. Es va treballar amb altes concentracions d'anticossos per mantenir una relació proporcional directa entre la floculació i la concentració d'antigen, buscant així la zona d'equivalència òptima per la precipitació i evitant la post-zona on la proporcionalitat s'inverteix (Figura 58; Heidelberger i Kendall, 1935).

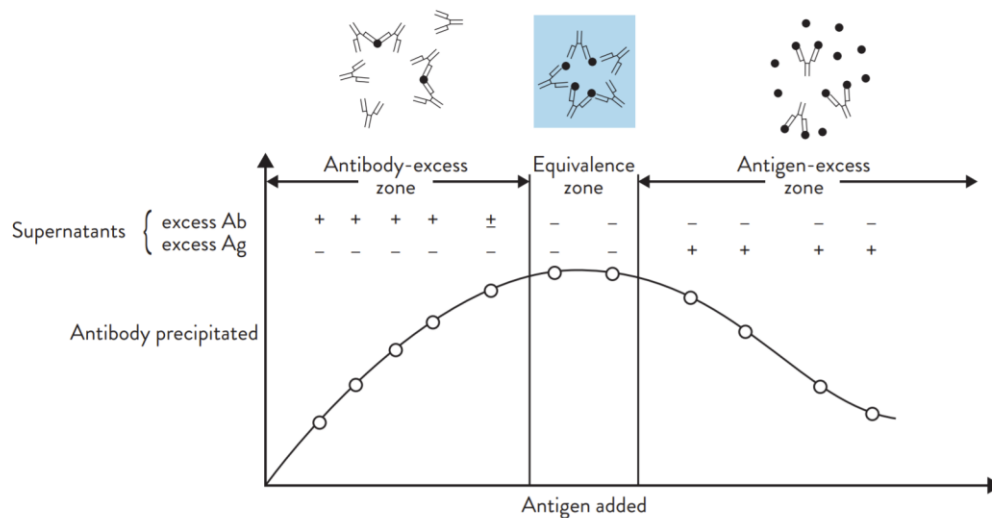


Figura 58. Corba de la reacció d'immunoprecipitació descrita per Heidelberger i Kendall. A concentració constant d'anticossos, la precipitació augmenta proporcionalment a la quantitat d'antigen fins arribar a la zona d'equivalència on es formen grans agregats. Posteriorment, a la post-zona, s'inverteix la proporcionalitat i la senyal mesurada és equívocament baixa (Dai i Hansson, 2020).

Per dur a terme la sensibilització del làtex, és a dir, per poder recobrir les esferes de làtex per que aquestes fossin portadores passives d'antígens solubles, es va provar tant l'adsorció passiva com la unió covalent.

Inicialment calia escollir la mida del làtex per una reactivitat òptima. Les esferes amb mides grans sovint generen un valor de blanc alt i, posteriorment, la sensibilitat és menor quan es mesura l'absorbància corresponent al complex antigen – anticòs. Per altra banda, les esferes de poc diàmetre augmenten la superfície reactiva, per tant es necessita més quantitat d'antigen pel seu revestiment, incrementant el cost de l'assaig. A més, les partícules massa petites requereixen formar més agregats per produir una senyal prou mesurable. Per aquestes raons es va treballar amb partícules de làtex de 300 nm de diàmetre.

Es va realitzar el revestiment mitjançant tant adsorció passiva com unió covalent (apartat 3.2.21). Les concentracions de SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2, obtingudes en les purificacions realitzades, eren adequades per poder tenir una concentració

inicial baixa d'entre 0,3 – 0,9 mg/mL, la qual cosa afavoria la reacció d'aglutinació (Peretti et al., 2016). Amb l' Abs_{340} es podien detectar dímers i no era necessari obtenir grans agregats de complexos antigen – anticòs, per tant no calia ajustar la concentració d'antigen en aquest punt.

L'assaig immunoturbidimètric automatitzat de làtex es va dur a terme a l'equip SpinTech 240 (apartat 3.2.21). A les cubetes de reacció es van introduir entre 50 – 250 μ L de les mostres de sèrum (S) de cabra de 50, 200 i 1000 UI/mL d'anticossos de *Toxoplasma*, conjuntament amb un blanc (B) de solució salina (9 g/L NaCl). Seguidament es van afegir entre 50 – 250 μ L de TBS amb 0,2 % de HEC com a tampó reactiu (R1). Finalment es van introduir entre 100 – 150 μ L del reactiu de làtex 0,1 % sensibilitzat amb antigen (R2) i es va agitar a temperatura ambient. Així s'iniciava la reacció, que comportava la mesura de l' Abs_{340} als 20 s i als 5 – 10 min (Figura 59).

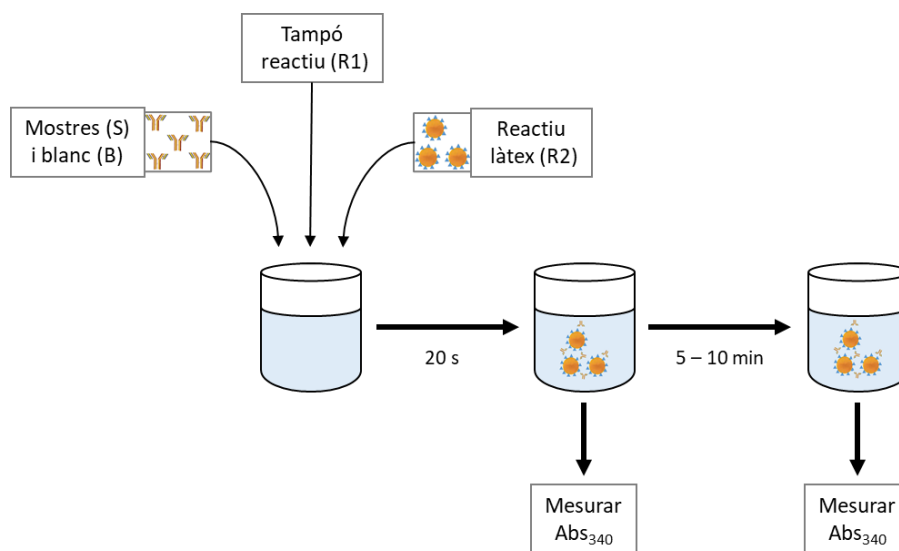


Figura 59. Esquema de l'assaig immunoturbidimètric automatitzat de làtex.

La lectura de dos punts respecte a un blanc per turbidimetria es va dur a terme en el mateix equip SpinTech 240. Amb els protocols optimitzats d'adsorció passiva

i d'unió covalent es van recollir els resultats de la resposta turbidimètrica per avaluar la funcionalitat dels antigens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 (Taula 22 i 23).

Taula 22. Resultats de l'assaig immunoturbidimètric de làtex amb protocol d'adsorció passiva.

Antigen	Titulació del sèrum de cabra (UI/mL)	Resposta turbidimètrica (mAbs)
SAG2	0	0 ± 1,3
	50	3,6 ± 1,1
	200	23 ± 3,7
	1000	443,6 ± 16,1
GRA2	0	0 ± 0,8
	50	2,9 ± 0,8
	200	15,3 ± 2,1
	1000	398,2 ± 23,8
SAG2-GRA2	0	0 ± 0,7
	50	3,9 ± 1,2
	200	44,4 ± 3,2
	1000	410,7 ± 25,7

Taula 23. Resultats de l'assaig immunoturbidimètric de làtex amb protocol d'unió covalent.

Antigen	Titulació del sèrum de cabra (UI/mL)	Resposta turbidimètrica (mAbs)
SAG2	0	0 ± 0,6
	50	2,3 ± 0,9
	200	98,7 ± 7,3
	1000	418,3 ± 16,4
GRA2	0	0 ± 0,7
	50	3 ± 0,5
	200	100,2 ± 7,2
	1000	423 ± 14,8
SAG2-GRA2	0	0 ± 0,6
	50	4,8 ± 1
	200	155,2 ± 6,2
	1000	599,8 ± 14,1

Aquests experiments es van realitzar per triplicat i les dades que es mostren són les mitjanes amb les desviacions estàndard respectives. L'augment de la senyal a mesura que s'incrementava la concentració d'anticossos a la preparació indicava que no hi havia post-zona i, per tant, s'estava mantenint la proporcionalitat.

Els antígens SAG2 i GRA2 van mostrar una senyal menor, utilitzant tant l'adsorció passiva com la unió covalent, comparats amb la proteïna quimèrica SAG2-GRA2, que va obtenir una senyal màxima de $599,8 \pm 14,1$ mAbs amb el sèrum de 1000 UI/mL i el protocol d'unio covalent. Tot i així, el fet d'obtenir senyals de resposta generalment baixes i poc repetitives dificultava la interpretació dels resultats i la comparativa entre els antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2. A més, per dur a terme els experiments amb làtex, es requeria una quantitat de proteïna massa alta per produir a escala de laboratori. Per aquestes raons es va optar per avaluar la seva funcionalitat amb test ELISA.

4.5.2 TEST ELISA

Per poder re-avaluar la funcionalitat dels antígens recombinants SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 es van utilitzar els immunoassaigs enzimàtics ELISA, que presenten una sensibilitat i una estabilitat més altes que l'immunoturbidimetria de làtex.

L'ELISA es basa en la unió d'antígens o anticossos a la superfície de poliestirè de les plaques de 96 pous (Taula 2) en presència de 0,1 M de carbonat-bicarbonat a pH 9,6. Després d'un pas de bloqueig i rentats, amb el contacte de les mostres es produeix el complex antigen – anticòs, que es pot detectar amb un anticòs secundari conjugat a un enzim marcador, o com en aquest cas, amb proteïna A conjugada a peroxidasa (apartat 3.2.22).

A diferència de l'anàlisi d'aglutinació en làtex, a més del sèrum de cabra de 200 UI/mL, també es van avaluar dos *pools* de deu mostres de sèrum humà cadascun

(apartat 3.1.19), un amb deu mostres positives i l'altre amb deu mostres negatives determinades amb el kit Toxo-Latex de Spinreact S.A.U.

Les proteïnes SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 van mostrar una reactivitat específica amb les mostres d'individus que havien estat exposats al paràsit *T. gondii*, i també al sèrum de cabra positiu, en comparació amb les mostres dels individus negatius per la toxoplasmosi. En el cas del sèrum de cabra, la suma dels dos antígens per separat, SAG2 + GRA2, va mostrar una reactivitat lleugerament més alta que la de SAG2, mentre que la proteïna quimèrica SAG2-GRA2, que també conté els epítops d'aquests dos antígens, va obtenir una resposta clarament més alta que SAG2 + GRA2. No hi havia grans diferències entre proteïnes en el *pool* de deu sèrums positius (Figura 60).

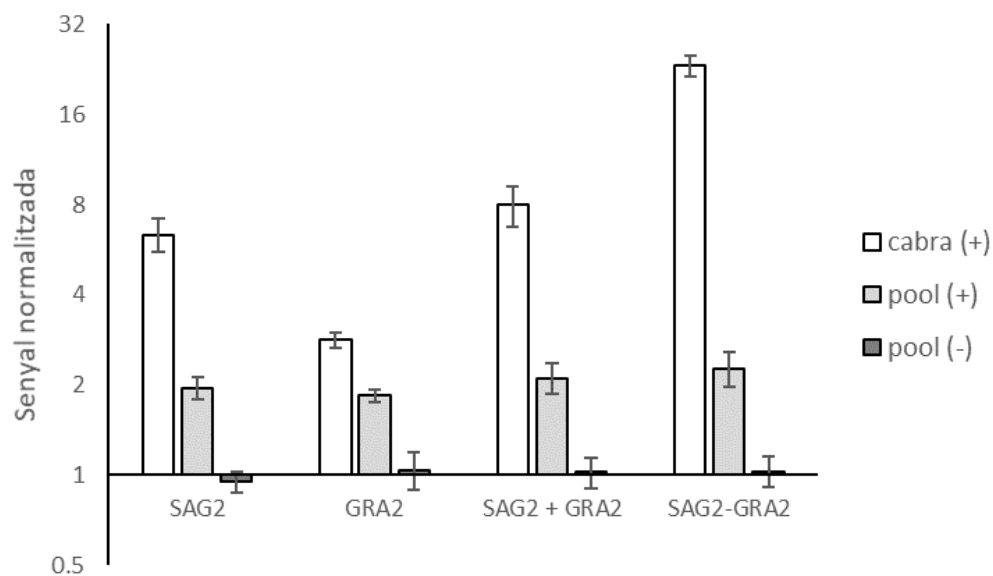


Figura 60. Test ELISA de la funcionalitat dels antígens SAG2, GRA2, SAG2 + GRA2 i SAG2-GRA2. Els antígens recombinants es van immobilitzar en plaques de poliestirè i es van incubar amb els sèrums indicats. La senyal obtinguda es va normalitzar amb la senyal obtinguda de la proteïna GST produïda i purificada en *E. coli*. Les dades corresponen a la mitjana de deu repeticions amb les respectives desviacions estàndards.

5. DISCUSSIÓ

5.1 GENERACIÓ DE SOQUES TRANSFORMADES AMB PLASMIDI

La generació de soques transformades amb plasmidi va suposar primerament l'elecció de la factoria cel·lular, i més concretament de la soca, que en aquest cas va ser el bacteri *E. coli* BL21 (DE3). Existien diverses raons per aquesta tria, per una banda, el coneixement de la seva manipulació genètica és dels més avançats entre els organismes model i per la producció d'antígens de *Toxoplasma* és el sistema més utilitzat (Holec-Gasior, 2013; Ybañez et al., 2020). Per altra banda, la possibilitat del futur escalat de la producció havia de tenir el vistiplau de Toyobo Co., empresa matriu de Spinreact S.A.U., amb una divisió especialitzada en la producció d'enzims recombinants amb l'organisme *E. coli* BL21 (DE3).

Conjuntament amb l'elecció de la soca bacteriana es va triar el vector pET28a (+), que permetia el control de l'expressió de la proteïna recombinant amb el promotor T7 induïble indirectament per IPTG, sent aquest un dels sistemes amb el nivell d'expressió més alt (Hayat et al., 2018).

Pel que fa a la selecció dels antígens del paràsit *T. gondii*, es va fer una cerca bibliogràfica on s'ha de destacar la feina realitzada pel grup de recerca d'Holec-Gasior en la seva revisió publicada al 2013. Es van triar dos antígens (SAG2 i GRA2) amb alta sensibilitat i especificitat, i amb la intenció de generar un antigen quimèric (SAG2-GRA2) que no s'havia generat mai, la funcionalitat del qual era desconeguda.

Es van establir amb èxit les tres soques recombinants *E. coli* BL21 (DE3) transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2, respectivament.

5.2 PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT EN SOQUES TRANSFORMADES AMB PLASMIDI

L'expressió dels antígens recombinants SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 era adequada en els experiments amb les condicions inicials de cultiu. En canvi, després de la disrupció cel·lular via sonicació, es va observar que SAG2 i GRA2 eren solubles, mentre que l'antigen quimèric SAG2-GRA2 era majoritàriament insoluble. L'antigen natiu SAG2 tenia una alta solubilitat tal com s'havia demostrat en estudis previs utilitzant soques i vectors similars (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2005), i l'antigen GRA2, concretament la proteïna codificada en la seqüència utilitzada en aquesta tesi, corresponent a l'exó 2, havia mostrat una major solubilitat que la proteïna codificada en la seqüència completa (Holec-Gasior et al., 2009; Ching et al., 2013).

La purificació de les proteïnes quimèriques sempre és complexa, i en el cas de SAG2-GRA2 no va ser menys difícil ja que precipitava formant cossos d'inclusió probablement degut a que els fragments hidrofòbics d'un polipèptid a altes concentracions es troben disponibles per la interacció amb regions similars de l'altre polipèptid (Carrió i Villaverde, 2002). La fusió a una etiqueta de purificació com a potenciador de la solubilització no va funcionar amb la cua d'histidines. El canvi a glutatió-S-transferasa (GST) comportava, o bé un canvi de disseny genètic pels tres antígens, tenint en compte que la GST augmentava el pes molecular en 20 kDa i que podia comprometre la producció dels antígens a més de tenir la necessitat d'afegir un pas d'eliminació d'aquest *tag*, o bé un procés de purificació diferenciat entre els antígens la qual cosa incrementava els costos de l'escalat (Waugh, 2005).

Es va evitar l'ús de detergents no-iònics com el Tritó-X o el Tween ja que, segons la nova directiva europea EU 2020/439 sobre productes pel diagnòstic *in vitro*, es

controlarà per traçabilitat l'ús d'aquests detergents pels seus efectes en el medi ambient. Inicialment, es va estudiar la solubilització d'aquest antigen quimèric *a posteriori* impedit la formació dels agregats amb l'ús tant d'urea com d'hidroclorur de guanidina abans i durant el procés de purificació.

Tenint en compte que la formació d'agregats podia ser deguda a la diferència de la taxa de traducció entre procariotes i eucariotes, deu vegades menor en aquests últims, i buscant la simplificació en el procés de purificació i la reducció de costos a l'escalat industrial, es va prioritzar la solubilització de SAG2-GRA2 via modificació de les condicions del cultiu. Aquestes modificacions requerien la reducció de la temperatura del cultiu fins a 16 °C – 20 °C, cosa que encaria la seva aplicació a escala de laboratori i a escala industrial.

Tot i així, amb les millores introduïdes en el *upstream*, entre d'altres la reducció de temperatura post-inducció a 25 °C i la reducció de l'agitació post-inducció a 200 rpm, la proteïna SAG2-GRA2 va passar a ser majoritàriament soluble.

El canvi a un medi de cultiu amb glucosa com a font de carboni va permetre un major creixement pre-IPTG (Collins et al., 2013), arribant a la biomassa necessària per induir en 90 min. Pel que fa a la variació en la ràtio volum del cultiu/volum total, el canvi afavoria l'increment de la taxa de transferència d'oxigen, que té una influència directa en el creixement (Losen et al., 2004), ja que la limitació d'oxigen dona lloc a l'expressió de més de dos-cents gens per ajustar la capacitat metabòlica de la cèl·lula a l'oxigen disponible (Unden et al., 1995). Amb aquestes modificacions es va augmentar l'expressió de tots tres antígens.

Per últim, es va avaluar la producció d'un dels antígens, SAG2, a escala de bioreactor de 2 L. En aquesta fermentació es va utilitzar un medi de cultiu amb 7,2 g/L de glucosa, el doble de la concentració inicial del medi SOC, i posteriorment es van re-introduir 7,2 g/L de glucosa en batch. Mantenint el pH i

el pO₂ constant a 7 i 20 %, respectivament, i afegint antiescumant, es va obtenir una productivitat volumètrica 4 vegades major que la productivitat volumètrica en el flascó d'agitació.

La comparació de nivells de productivitat amb altres estudis no es va poder dur a terme ja que no s'han publicat aquestes dades pels antigens de *T. gondii*. En tot cas, els resultats de productivitat volumètrica d'aquesta tesi suggereixen que hi ha molt marge de millora en la producció d'aquestes matèries primeres tant a escala pilot com a escala industrial.

5.3 GENERACIÓ DE SOQUES EDITADES GENÈTICAMENT

La generació de soques editades genèticament, és a dir, amb la integració d'un DNA exògen al cromosoma d'*E. coli*, presenta diversos avantatges. A diferència del sistema tradicional d'expressió de proteïnes heteròlogues basat amb plasmidis, l'ús de soques productores lliures de plasmidi a escala industrial té el potencial d'estalviar costos d'antibiòtic de selecció (Englaender et al., 2017) i de reduir la presència d'antibiòtics en els residus i, per tant, en el medi ambient, la qual cosa pot donar lloc a l'augment de les resistències microbianes a antibiòtics sent aquesta una de les grans preocupacions de la salut global (Bush et al., 2011). A més, les soques lliures de plasmidi no pateixen la càrrega metabòlica pel manteniment dels plasmidis multicòpia, que suposa un problema a nivell transcripcional per l'optimització de la producció de proteïnes exògenes (Mairhofer et al., 2013; Wu et al., 2016).

Utilitzant el sistema de dos plasmidis descrit per Jiang et al. (2015), es van modificar satisfactòriament els loci *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *panD* per introduir per recombinació homòloga els *cassettes* d'expressió dels antígens de *T. gondii* SAG2, GRA2 i de l'antigen quimèric SAG2-GRA2. També es va establir amb èxit una soca doble editada als loci *lacZ* i *panD* amb SAG2 i GRA2, respectivament. Per verificar totes aquestes edicions es va amplificar per *colony* PCR un fragment que contenia la unió entre el DNA integrat i el genoma no modificat, i posteriorment es van seqüenciar els productes de PCR amb resultat satisfactori en tots els casos. D'aquesta manera es podia assegurar l'edició i la localització exacta en el cromosoma.

Tot i haver establert les soques editades amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD, durant els experiments d'edició van sorgir problemes, com ara l'aparició de colònies satèl·lit

amb resistència espontània a espectinomicina, la baixa competència de les cèl·lules *E. coli* BL21 (DE3) pCas, l'aparició de colònies *knock-out* per *lacZ* sense presència d'edició o la baixa eficiència d'edició.

L'aparició de colònies satèl·lit amb resistència espontània a espectinomicina (Anderson, 1969; Mark et al., 1983; Johanson i Hughes, 1995) es va resoldre satisfactòriament després del canvi de l'espectinomicina per l'ampicil·lina.

Pel que fa a la baixa competència de les *E. coli* BL21 (DE3) pCas, es va avançar el moment d'iniciar el protocol de competència a una Abs_{600} de 0,45 evitant la fase estacionària que sovint genera menys competència. També es va avaluar l'impacte que tenia un augment de la concentració de $CaCl_2$ en el protocol de competència, tal com va estudiar en paral·lel Sun et al. (2018). La freqüència de transformació va augmentar de $10^3 - 10^4$ a l'ordre de 10^5 utilitzant 150 mM de $CaCl_2$.

Respecte a les colònies no-editades però blanques pel cribratge blau – blanc, tenint en compte que el mecanisme de reparació NHEJ no és gens eficient en *E. coli* (Dillingham i Kowalczykowski, 2008; Jiang et al., 2013; Jiang et al., 2015) i que la transformació amb pTarget es donava en excés de quantitat del DNA donador, s'esperaven unes eficiències més altes d'edició/reparació.

Segons Jiang et al. (2015), la co-transformació del DNA donador i la guia RNA mitjançant el plasmidi pTargetF hauria d'assolir eficiències de deleció del 69 % i eficiències d'inserció genètica del 28 % utilitzant DNA donadors amb braços d'homologia de 400 bp. En aquesta tesi, depenent de l'experiment, es van arribar a assolir eficiències d'entre 11 – 57 %, però en molts dels experiments no es va obtenir cap cèl·lula editada correctament.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi es van publicar alguns estudis descrivint grans delecions o re-agrupaments en el genoma després d'un DSB

sense saber-se el mecanisme exacte (Adikusuma et al., 2018; Lee i Kim, 2018). També es van publicar estudis millorant el sistema de dos plasmidis de Jiang et al. (2015), en alguns casos afegint les modificacions que també s'estaven realitzant en aquesta tesi. Fins i tot, l'any 2019, Sigma-Aldrich va treure al mercat el producte CAS9BAC1P per realitzar edicions en el genoma d'*E. coli* amb el sistema de dos plasmidis dirigits al locus *lacZ*, pel seu anàlisi posterior mitjançant el cribratge blau – blanc.

Les dades obtingudes amb la transformació del pTarget-Ø indicaven que el tall DSB en el lloc desitjat del cromosoma s'estava donant de forma correcte i eficient, és a dir, que tant la Cas9 com la guia RNA estaven presents i eren funcionals a l'interior de les cèl·lules. Amb el disseny experimental s'estava forçant la co-transformació d'una gran quantitat de DNA donador, amb la funció de reparar el genoma per recombinació homòloga alhora que introduïa el *cassette* d'expressió.

Tot i així, es va seguir observant una molt baixa eficiència d'obtenció de clons editats la qual cosa va portar a formular la hipòtesi de que hi havia una activitat de recombinació insuficient per part del sistema de recombinases λ-Red. Malgrat que no es va verificar la quantitat de proteïnes específiques del λ-Red ni la seva activitat de manera directa, es va augmentar la quantitat de L-arabinosa que s'afegia al cultiu d'*E. coli* BL21 (DE3) pCas per induir l'expressió de λ-Red en un factor de 10, de 10 mM a 100 mM com es descriu en altres estudis (Serra-Moreno et al., 2006; CAS9BAC1P, Sigma-Aldrich). També es va avançar el moment d'inducció de λ-Red fins a una Abs₆₀₀ de 0,2 – 0,3, assegurant així la inducció en la fase exponencial. S'esperava que un augment de l'expressió de les proteïnes λ-Red resultés en una major taxa de recombinació homòloga. Per últim, com és conegut, el promotor pBAD, induïble amb L-arabinosa, és reprimible amb una concentració de glucosa d'entre 0,4 – 1 % (Roux et al., 2005) i el medi SOC conté 0,36 % de glucosa, per tant, una de les possibles raons que explicaven la baixa

eficiència d'edició a l'apartat 4.3.2.1 era la repressió amb glucosa de la inducció de les recombinases λ -Red. Com a conseqüència d'això es va canviar el medi SOC per SOB durant el protocol de cèl·lules competents.

Tot i les modificacions afegides en els experiments d'edició i l'obtenció d'una alta eficiència de tall de la Cas9, la recombinació homòloga per la introducció del *cassette* d'interès no es va donar amb unes eficiències tant altes com les publicades (Jiang et al., 2015; Li et al., 2015; Ng et al., 2016; Zerbini et al., 2017; Ao et al., 2018; Sun et al., 2018). Tal com indica Pyne et al. (2015), la inserció per recombinació homòloga de fragments major de 560 bp pot fer caure dràsticament l'eficiència d'edició. I segons Seo et al. (2017), existeixen diferències entre soques obtenint una eficiència d'integració més baixa en *E. coli* BL21 que en *E. coli* K-12. Per tant, el fet d'haver utilitzat la soca *E. coli* BL21 (DE3) i d'haver dissenyat *cassettes* d'inserció clarament més grans de 600 bp podria explicar les eficiències d'edició obtingudes.

Malgrat les dificultats sorgides, es van generar amb èxit soques editades genèticament amb diferents *cassettes* i a diferents loci. Aquest èxit depenia principalment de l'estabilitat de les modificacions genètiques introduïdes i de la correcta eliminació dels plasmidis pCas i pTarget, aquesta última especialment crítica per dur a terme la segona edició en una mateixa soca. Tant el *curing* dels plasmidis com l'estabilitat de les edicions es van poder avaluar amb certa facilitat i amb resultats positius. L'estabilitat de les edicions en les soques BL21 (DE3) SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD contrasta amb la inestabilitat sovint habitual dels plasmidis episòmics (Ganusov i Brilkov, 2002), sent aquest un gran avantatge per l'aplicació industrial d'aquestes soques editades.

5.4 PRODUCCIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT EN SOQUES EDITADES GENÈTICAMENT

Les soques editades genèticament amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD tenien els avantatges productius, abans mencionats, de l'estalvi en l'adició d'antibiòtics durant les fermentacions a escala industrial, la reducció en la càrrega metabòlica, la major estabilitat de l'edició respecte a la dels plasmidis episòmics, a més de la co-producció de més d'un antigen recombinant (SAG2 i GRA2) en un sol procés de fermentació i purificació reduint considerablement els costos de producció.

A part d'això, alguns estudis han demostrat que les soques lliures de plasmidis, amb una sola còpia del gen d'interès integrat en el genoma de l'hoste, presenten un nivell d'expressió major que el del sistema basat amb plasmidis segons la localització del gen inserit en el cromosoma (Bassalo et al., 2016; Sauer et al., 2016; Wang et al., 2016; Englaender et al., 2017). En aquesta tesi no es va observar cap modulació en els nivells d'expressió entre els loci *cadA*, *fecA*, *lacZ*, *ompA* i *panD*, mantenint en tots els casos unes productivitats volumètriques d'entre 4 – 7,5 vegades menors respecte als plasmidis pET28a en condicions de cultiu equiparables a escala de laboratori. Això no descarta que en posteriors estudis d'optimització del bioprocés, modificant els paràmetres controlables amb bioreactors, es pugui millorar la productivitat d'aquestes soques.

5.5 FUNCIONALITAT DELS ANTÍGENS RECOMBINANTS

La funcionalitat dels antígens escollits, SAG2 i GRA2, ja s'havia analitzat prèviament demostrant que aquestes proteïnes produïdes en bacteris podien ser bones candidates pel serodiagnòstic de la toxoplasmosi (Parmley et al., 1992; Hyszczynska-Sawicka et al., 2005; Holec-Gasior et al., 2009; Ching et al., 2013; Costa et al., 2017). En canvi, la proteïna quimèrica formada per les seqüències de SAG2 i GRA2 no s'havia generat mai fins ara.

Inicialment es va verificar la funcionalitat dels antígens de *T. gondii* mitjançant immunoturbidimetria de làtex ja que és un mètode homogeni, és a dir, mesura la senyal generada per la unió antígen – anticòs en el mateix medi que s'utilitza per la formació del complex immune. Això fa que no requereixi la separació del complex antígen – anticòs i, per tant, és un mètode més ràpid, fàcil de realitzar i econòmic comparat amb els mètodes heterogenis com l'ELISA. Per altra banda, la turbidimetria és un mètode amb una menor sensibilitat, com es va comprovar experimentalment pels tres antígens d'interès, SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.

Tot i així, es van obtenir resultats on es pot observar, especialment mitjançant la unió covalent, una senyal positiva tant a 1000 com a 200 UI/mL d'anticossos anti-*Toxoplasma*. A més, aquestes senyals eren més estables que les obtingudes en l'adsorció passiva al làtex, ja que la unió covalent és més forta i indueix a una orientació preferent de la proteïna reduint els possibles canvis conformacionals que afecten la seva funcionalitat.

L'ELISA, en canvi, permetia generar un kit de diagnòstic versàtil amb la possibilitat d'afegir-hi millores en el futur, com ara la diferenciació entre infecció aguda i infecció crònica detectant IgM i IgG per separat o bé mesurant l'aviditat de les IgG.

Els resultats de funcionalitat obtinguts amb aquest test van permetre analitzar quant específica era la unió dels antígens recombinants, comparant-la entre un *pool* de deu mostres de pacients positius per toxoplasmosi i un *pool* de deu mostres negatives.

A més de confirmar la ja coneguda existència d'anticossos específics per SAG2 i GRA2, presents en mostres de sèrum de pacients exposats al *Toxoplasma*, també es va observar una millor resposta per part de la nova proteïna quimèrica SAG2-GRA2 comparat tant a SAG2 o a GRA2 individualment com a la suma de SAG2 més GRA2. Això pot ser conseqüència de l'aparició d'alguns epítops lineals exposats a partir de la fusió dels dos antígens. Per tant, la nova proteïna quimèrica SAG2-GRA2 pot ser una molt bona matèria primera per un nou kit de diagnòstic, ja que és fàcil de produir, tant en soca transformada amb plasmidi com en soca editada genèticament, i detecta eficientment la presència d'anticossos en mostres positives per la toxoplasmosi.

6. CONCLUSIONS I PROPOSTES DE FUTUR

- i. S'han generat tres plasmidis pET28a recombinants útils per l'expressió de tres proteïnes de *T. gondii* a *E. coli*. A més, una d'aquestes tres proteïnes és una nova proteïna quimèrica resultat de la fusió dels antígens SAG2 i GRA2, és a dir, que conté epítops de les dues proteïnes individuals.
- ii. S'han generat soques *E. coli* editades genèticament per la producció industrial de les proteïnes antigèniques de *T. gondii* amb diversos avantatges respecte a soques transformades amb plasmidi, destacant el fet d'estalviar-se l'ús d'antibiòtic en el medi de creixement.
- iii. S'ha generat una soca *E. coli* amb doble edició per co-produir i co-purificar els antígens SAG2 i GRA2 de *T. gondii*.
- iv. A escala de laboratori, utilitzant flascons d'agitació, la producció a partir de soques transformades amb plasmidis portadors dels *cassettes* d'expressió és superior a la producció obtinguda amb les soques editades genèticament amb una còpia d'aquests *cassettes* d'expressió.
- v. El canvi d'escala del bioprocés utilitzant la soca transformada amb el plasmidi pET28a-SAG2 en el bioreactor de 2 L augmenta significativament la productivitat volumètrica. Presumiblement, es podran optimitzar els cultius de la resta de soques, tant transformades amb plasmidi com editades genèticament, per incrementar les seves productivitats volumètriques.
- vi. Les proteïnes recombinants produïdes en *E. coli*, SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2, són útils per la detecció d'anticossos anti-*Toxoplasma* presents en el sèrum de persones exposades al paràsit.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Abdelbaset, A. E., Alhasan, H., Salman, D., Karram, M. H., Ellah Rushdi, M. A., Xuenan, X., i Igarashi, M. (2017). Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. *Experimental parasitology*, 172, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.11.003>

Adikusuma, F., Piltz, S., Corbett, M. A., Turvey, M., McColl, S. R., Helbig, K. J., Beard, M. R., Hughes, J., Pomerantz, R. T., i Thomas, P. Q. (2018). Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 560(7717), E8–E9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0380-z>

Anderson P. (1969). Sensitivity and Resistance to Spectinomycin in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 100(2), 939–947. <https://doi.org/10.1128/JB.100.2.939-947.1969>

Ao, X., Yao, Y., Li, T., Yang, T. T., Dong, X., Zheng, Z. T., Chen, G. Q., Wu, Q., i Guo, Y. (2018). A Multiplex Genome Editing Method for Escherichia coli Based on CRISPR-Cas12a. *Frontiers in microbiology*, 9, 2307. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02307>

Baquero-Artigao, F., del Castillo Martín, F., Fuentes Corripio, I., Goncé Mellgren, A., Fortuny Guasch, C., de la Calle Fernández-Miranda, M., ... Ramos Amador, J. T. (2013). Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. *Anales de Pediatría*, 79(2), 116.e1-116.e16. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.12.001>

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., i Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against

viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>

Bassalo, M. C., Garst, A. D., Halweg-Edwards, A. L., Grau, W. C., Domaille, D. W., Mutalik, V. K., Arkin, A. P., i Gill, R. T. (2016). Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. *ACS synthetic biology*, 5(7), 561–568. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00187>

Bourdin, C., Busse, A., Kouamou, E., Touafek, F., Bodaghi, B., Le Hoang, P., Mazier, D., Paris, L., i Fekkar, A. (2014). PCR-based detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood and ocular samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 52(11), 3987–3991. <https://doi.org/10.1128/JCM.01793-14>

Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H., Isaac-Renton, J. L., Bell, A., Eng, S. B., i Marion, S. A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet*, 350(9072), 173–177. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)11105-3)

Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J., Projan, S., Thomas, C. M., Tomasz, A., ... Zgurskaya, H. I. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 9(12), 894–896. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>

Carrió, M. M., i Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of biotechnology*, 96(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00032-9)

Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T. N., Frodin, M., i Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature methods*, 8(9), 753–755. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1653>

Ching, X. T., Lau, Y. L., i Fong, M. Y. (2015). Heterologous Expression of Toxoplasma Gondii Dense Granule Protein 2 and 5. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 46(3), 375–387.

Ching, X. T., Lau, Y. L., Fong, M. Y., i Nissapatorn, V. (2013). Evaluation of Toxoplasma gondii-recombinant dense granular protein (GRA2) for serodiagnosis by western blot. *Parasitology research*, 112(3), 1229–1236. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3255-5>

Ching, X. T., Lau, Y. L., Fong, M. Y., Nissapatorn, V., i Andiappan, H. (2014). Recombinant dense granular protein (GRA5) for detection of human toxoplasmosis by Western blot. *BioMed research international*, 2014, 690529. <https://doi.org/10.1155/2014/690529>

Cho, S., Shin, J., i Cho, B. K. (2018). Applications of CRISPR/Cas System to Bacterial Metabolic Engineering. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1089. <https://doi.org/10.3390/ijms19041089>

Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., i Casal, M. (2013). Batch production of a silk-elastin-like protein in E. coli BL21(DE3): key parameters for optimisation. *Microbial cell factories*, 12, 21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-21>

Costa, J. G., Peretti, L. E., García, V. S., Peverengo, L., González, V. D., Gugliotta, L. M., Dalla Fontana, M. L., Lagier, C. M., i Marcipar, I. S. (2017). P35 and P22 Toxoplasma gondii antigens abbreviate regions to diagnose acquired toxoplasmosis during pregnancy: toward single-sample assays. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 55(4), 595–604. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0331>

Costantino, N., i Court, D. L. (2003). Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 100(26), 15748–15753.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2434959100>

Dati, F., i Hansson L. O. (2020). Protein Learning Guide Series. Recuperat de
[https://corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/ADD-00061642 Protein Learning Guide.pdf](https://corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/ADD-00061642%20Protein%20Learning%20Guide.pdf)

Doran, P. M. (2013). Mass transfer. *A Bioprocess Engineering Principles* (379-444). Academic Press.

Dubey, J. P. (2016). *Toxoplasmosis of Animals and Humans, Second Edition* (2nd ed.). Amsterdam, Netherlands: Amsterdam University Press.

Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C., i Jones, J. L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, 139(11), 1375–1424.
<https://doi.org/10.1017/s0031182012000765>

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., i Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 267–299.

Englaender, J. A., Jones, J. A., Cress, B. F., Kuhlman, T. E., Linhardt, R. J., i Koffas, M. (2017). Effect of Genomic Integration Location on Heterologous Protein Expression and Metabolic Engineering in *E. coli*. *ACS synthetic biology*, 6(4), 710–720. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00350>

Ferra, B. T., Holec-Gąsior, L., Gatkowska, J., Dziadek, B., Dzitko, K., Grąźlewska, W., i Lautenbach, D. (2019). The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in

mouse and human sera. *PloS one*, 14(6), e0217866.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217866>

Flori, P., Bellete, B., Crampe, C., Maudry, A., Patural, H., Chauleur, C., Hafid, J., Raberin, H., i Tran Manh Sung, R. (2008). A technique for dating toxoplasmosis in pregnancy and comparison with the Vidas anti-toxoplasma IgG avidity test. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(3), 242–249.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01905.x>

Font, J., i Mackay, J. P. (2010). Beyond DNA: zinc finger domains as RNA-binding modules. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 649, 479–491.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-753-2_29

Ganusov, V. V., i Brilkov, A. V. (2002). Estimating the instability parameters of plasmid-bearing cells. I. Chemostat culture. *Journal of theoretical biology*, 219(2), 193–205. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.3101>

Gilbert, R., Gras, L., i European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (2003). Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 110(2), 112–120. [https://doi.org/10.1016/s1470-0328\(02\)02325-x](https://doi.org/10.1016/s1470-0328(02)02325-x)

Guerina, N. G. (1994). Congenital infection with *Toxoplasma gondii*. *Pediatric Annals*, 23(3), 138–151. <https://doi.org/10.3928/0090-4481-19940301-07>

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., i Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, 177(14), 4121–4130.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>

Hansen, G. A., J. Lyng, i E. Petersen. 1994. Calibration of a replacement preparation for the second international standard for anti-Toxoplasma serum, Human. W.H.O. Expert Committee on Biological Standardization BS/94.1761. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Hayat, S., Farahani, N., Golichenari, B., i Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E. coli): What We Need to Know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>

Heidelberger, M., i Kendall, F. E. (1935). A Quantitative Theory of the Precipitin Reaction: III. The Reaction Between Crystalline Egg Albumin and its Homologous Antibody. *The Journal of experimental medicine*, 62(5), 697–720. <https://doi.org/10.1084/jem.62.5.697>

Henriquez, S. A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J., i Roberts, C. W. (2009). Neuropsychiatric disease and Toxoplasma gondii infection. *Neuroimmunomodulation*, 16(2), 122–133. <https://doi.org/10.1159/000180267>

Hiszczynska-Sawicka, E., Kur, J., Pietkiewicz, H., Holec, L., Gasior, A., i Myjak, P. (2005). Efficient production of the Toxoplasma gondii GRA6, P35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitologica*. 50, 249-254.

Holec-Gasior L. (2013). Toxoplasma gondii recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20(9), 1343–1351. <https://doi.org/10.1128/CVI.00117->

Holec-Gasior, L., Kur, J., i Hiszczyńska-Sawicka, E. (2009). GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 16(4), 510–514. <https://doi.org/10.1128/CVI.00341-08>

Howe, D. K., i Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of infectious diseases*, 172(6), 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., i Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>

Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., i Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and environmental microbiology*, 81(7), 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>

Johanson, U., i Hughes, D. (1995). A new mutation in 16S rRNA of *Escherichia coli* conferring spectinomycin resistance. *Nucleic acids research*, 23(3), 464–466. <https://doi.org/10.1093/nar/23.3.464>

Joiner, K. A., i Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *The Journal of cell biology*, 157(4), 557–563. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112144>

Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Elder, S., Rivera, H. N., Press, C., Montoya, J. G., i McQuillan, G. M. (2018). *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 2011-2014. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *98*(2), 551–557. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0677>

Jones, J., Lopez, A., i Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *American family physician*, *67*(10), 2131–2138.

Khan, A. H., Tye, G. J., i Noordin, R. (2020). CRISPR-Cas9 Genome Editing Tool for the Production of Industrial Biopharmaceuticals. *Molecular biotechnology*, *62*(9), 401–411. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00265-9>

Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *16*, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.027>

Lee, H., i Kim, J. Unexpected CRISPR on-target effects. *Nature Biotechnology* *36*, 703–704 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4207>

Lekutis, C., Ferguson, D. J., Grigg, M. E., Camps, M., i Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International journal for parasitology*, *31*(12), 1285–1292. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00261-2)

Li, Y., Lin, Z., Huang, C., Zhang, Y., Wang, Z., Tang, Y. J., Chen, T., i Zhao, X. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metabolic engineering*, *31*, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.06.006>

Li, J. R., Walker, S., Nie, J. B., i Zhang, X. Q. (2019). Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical failings and the urgent need for better

governance. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(1), 32–38.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1800624>

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., i Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>

Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., i Zhu, X. Q. (2015). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & vectors*, 8, 292.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>

Losen, M., Frölich, B., Pohl, M., i Büchs, J. (2004). Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnology progress*, 20(4), 1062–1068. <https://doi.org/10.1021/bp034282t>

Mairhofer, J., Scharl, T., Marisch, K., Cserjan-Puschmann, M., i Striedner, G. (2013). Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. *Applied and environmental microbiology*, 79(12), 3802–3812. <https://doi.org/10.1128/AEM.00365-13>

Malary, M., Hamzehgardeshi, Z., Moosazadeh, M., Afshari, M., Ahmadi, I., Moghaddasifar, I., i Kheradmand, M. (2018). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among Iranian pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 24(5), 488–496.
<https://doi.org/10.26719/2018.24.5.488>

Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X., i Jin, S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in plant science*, 24(12), 1102–1125. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.006>

Mark, L. G., Sigmund, C. D., i Morgan, E. A. (1983). Spectinomycin resistance due to a mutation in an rRNA operon of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 155(3), 989–994. <https://doi.org/10.1128/JB.155.3.989-994.1983>

Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., i Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Molecular biology of the cell*, 13(7), 2397–2409. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0021>

Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., i van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6299), aad5147. <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>

Mombrò, M., Perathoner, C., Leone, A., Buttafuoco, V., Zotti, C., Lievre, M. A., i Fabris, C. (2003). Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. *European Journal of Pediatrics*, 162(10), 703–706. <https://doi.org/10.1007/s00431-003-1248-1>

Mombrò, M., Perathoner, C., Leone, A., Nicocia, M., Moiraghi Ruggenini, A., Zotti, C., ... Fabris, C. (1995). Congenital toxoplasmosis: 10-year follow up. *European Journal of Pediatrics*, 154(8), 635–639. <https://doi.org/10.1007/bf02079067>

Montoya, J., i Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16412-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16412-x)

Montoya J. G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*, 185 Suppl 1, S73–S82. <https://doi.org/10.1086/338827>

Muñoz Batet, C., Guardiola Llobet, C., Juncosa Morros, T., Viñas Domenech, L., Sierra Soler, M., Sanfeliu Sala, I., Bosch Mestres, J., Dopico Ponte, E., Lite Lite, J.,

Matas Andreu, L., Juste Sánchez, C., i Barranco Romeu, M. (2004). Toxoplasmosis y embarazo. Estudio multicéntrico realizado en 16.362 gestantes de Barcelona [Toxoplasmosis and pregnancy. Multicenter study of 16,362 pregnant women in Barcelona]. *Medicina clinica*, 123(1), 12–16. [https://doi.org/10.1016/s0025-7753\(04\)74396-1](https://doi.org/10.1016/s0025-7753(04)74396-1)

Ng I. S., Hung, Y. H., Kao, P. H., Zhou, Y., i Zhang, X. (2016). CRISPR/Cas9 nuclease cleavage enables marker-free genome editing in *Escherichia coli*: a sequential study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 68, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.08.015>

Ory-Manchón, F. de. (2009). Encuestas seroepidemiológicas en enfermedades no inmunoprevenibles y su interés en salud pública. *Revista Española de Salud Pública*, 83(5), 645-657.

Pereira-Chioccola, V. L., Vidal, J. E., i Su, C. (2009). *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology*, 4(10), 1363–1379. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.89>

Peretti, L. E., Gonzalez, V. D. G., Costa, J. G., Marcipar, I. S., i Gugliotta, L. M. (2016). Synthesis and characterization of latex-protein complexes from different antigens of *Toxoplasma gondii* for immunoagglutination assays. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(18), 938-946. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1180611>

Pickar-Oliver, A., i Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>

Pyne, M. E., Moo-Young, M., Chung, D. A., i Chou, C. P. (2015). Coupling the CRISPR/Cas9 System with Lambda Red Recombineering Enables Simplified

Chromosomal Gene Replacement in Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 81(15), 5103–5114. <https://doi.org/10.1128/AEM.01248-15>

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., i Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Remington, J. S., McLeod, R., Wilson, C. B., i Desmonts, G. (2011). Toxoplasmosis. *A Infectious Diseases of the Fetus and Newborn* (918–1041). W. B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00031-6>

Remington, J. S., Thulliez, P., i Montoya, J. G. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 941–945. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.941-945.2004>

Robert-Gangneux, F., i Darde, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/cmr.05013-11>

Roux, A., Beloin, C., i Ghigo, J. M. (2005). Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new Escherichia coli adhesins. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1001–1013. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1001-1013.2005>

Sabin, A. B., i Feldman, H. A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (Toxoplasma). *Science*, 108(2815), 660–663. <https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., i Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the

infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10), 476–481.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>

Sander, J. D., i Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347–355.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2842>

San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., i Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2(1), 89.
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>

Sauer, C., Syvertsson, S., Bohorquez, L. C., Cruz, R., Harwood, C. R., van Rij, T., i Hamoen, L. W. (2016). Effect of Genome Position on Heterologous Gene Expression in *Bacillus subtilis*: An Unbiased Analysis. *ACS synthetic biology*, 5(9), 942–947. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00065>

Seo, J.H., Baek, S.W., Lee, J. i Park, J.B. (2017). Engineering *Escherichia coli* BL21 genome to improve the heptanoic acid tolerance by using CRISPR-Cas9 system. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22, 231–238.
<https://doi.org/10.1007/s12257-017-0158-4>

Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J., i Muniesa, M. (2006). Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC molecular biology*, 7, 31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>

Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G., i Court, D. L. (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature protocols*, 4(2), 206–223.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.227>

Sun, D., Wang, L., Mao, X., Fei, M., Chen, Y., Shen, M., i Qiu, J. (2019). Chemical transformation mediated CRISPR/Cas9 genome editing in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 41(2), 293–303. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02639-1>

Tan, W., Carlson, D. F., Lancto, C. A., Garbe, J. R., Webster, D. A., Hackett, P. B., i Fahrenkrug, S. C. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), 16526–16531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310478110>

Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., i Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7)

Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J., i Six, S. (1995). O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Archives of microbiology*, 164(2), 81–90.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

Villard, O., Breit, L., Cimon, B., Franck, J., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., Candolfi, E., i French National Reference Center for Toxoplasmosis Network (2013). Comparison of four commercially available avidity tests for *Toxoplasma gondii*-specific IgG antibodies. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20(2), 197–204. <https://doi.org/10.1128/CVI.00356-12>

Wang, J., Niyompanich, S., Tai, Y. S., Wang, J., Bai, W., Mahida, P., Gao, T., i Zhang, K. (2016). Engineering of a Highly Efficient Escherichia coli Strain for Mevalonate Fermentation through Chromosomal Integration. *Applied and environmental microbiology*, 82(24), 7176–7184. <https://doi.org/10.1128/AEM.02178-16>

Waugh D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology*, 23(6), 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>

Wu, G., Yan, Q., Jones, J. A., Tang, Y. J., Fong, S. S., i Koffas, M. (2016). Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends in biotechnology*, 34(8), 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.010>

Ybañez, R., Ybañez, A. P., i Nishikawa, Y. (2020). Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 204. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00204>

Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., i Court, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5978–5983. <https://doi.org/10.1073/pnas.100127597>

Zerbini, F., Zanella, I., Fraccascia, D., König, E., Irene, C., Frattini, L. F., Tomasi, M., Fantappiè, L., Ganfini, L., Caproni, E., Parri, M., Grandi, A., i Grandi, G. (2017). Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in Escherichia coli. *Microbial cell factories*, 16(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0681-1>

ÍNDIX D'ABREVIATURES

aa	Aminoàcid/s
Abs	Absorbància/es
Amp	Ampicil·lina
bp	<i>Base pair</i> , parell de bases
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> , àcid desoxiribonucleic
g	Gram/s
h	Hora/es
IgG	Immunoglobulines classe G
IgM	Immunoglobulines classe M
Kan	Kanamicina
kb	<i>Kilo base pair</i> , parell de quilobases
L	Litre/s
mA	Mil·liampere/s
mAbs	Mil·liabsorbància/es
mg	Mil·ligram/s
min	Minut/s
mL	Mil·lilitre/s
mM	Mil·limolar
M	Molar
µg	Microgram/s
µL	Microlitre/s
µm	Micròmetre/s
µM	Micromolar
ng	Nanogram/s

nt	Nucleòtid/s
O/N	<i>Overnight</i> , durant la nit
pBAD	Promotor araBAD
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa
rpm	Revolucions per minut
s	Segon/s
Sm	Espectinomicina
ufc/ μ g	Unitats formadores de colònies per microgram
V	Volt/s
vvm	Volum d'aire per volum de cultiu per minut

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. El cicle vital de <i>T. gondii</i>	15
Figura 2. Elements de l'aglutinació en làtex.....	20
Figura 3. Esquema dels passos de l'ELISA indirecte.	20
Figura 4. Processos de reparació del DSB <i>non-homologous end-joining</i> i <i>homology directed repair</i>	25
Figura 5. Sistema II de CRISPR-Cas9.	28
Figura 6. Sistema de dos plasmidis per editar el genoma d' <i>E. coli</i>	31
Figura 7. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de les seqüències codificants pels antígens SAG2 i GRA2.	60
Figura 8. Estratègia de clonació dels plasmidis pET28a-SAG2 i pET28a-GRA2. ...	62
Figura 9. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pET28a-SAG2 i pET28a-GRA2.	63
Figura 10. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació i la digestió enzimàtica de la seqüència codificant per l'antigen quimèric SAG2-GRA2.	64
Figura 11. Estratègia de clonació del plasmidi pET28a-SAG2-GRA2.	65
Figura 12. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica del plasmidi pET28a-SAG2-GRA2.	66
Figura 13. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció i solubilitat dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.	68
Figura 14. Anàlisi en SDS-PAGE de la diàlisi de l'antigen SAG2-GRA2.....	69
Figura 15. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions natives de SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.	70
Figura 16. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions desnaturalitzants (urea 8 M) de SAG2-GRA2.	72

Figura 17. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions desnaturalitzants (GuHCl 6 M) de SAG2-GRA2.	73
Figura 18. Esquema dels passos seguits en la purificació de SAG2-GRA2.	74
Figura 19. Creixement pre-IPTG de les soques transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2 amb medis LB, SOB i SOC.	76
Figura 20. Creixement post-IPTG de la soca transformada amb pET28a-SAG2-GRA2 a 25 °C, 30 °C i 37 °C.....	77
Figura 21. Anàlisi en SDS-PAGE amb les noves condicions de producció dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.	78
Figura 22. Anàlisi per Western blot dels antígens SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.	79
Figura 23. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació en condicions natives de SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2.	80
Figura 24. Creixement de la soca transformada amb pET28a-SAG2 en un cultiu batch del bioreactor de 2 L.....	81
Figura 25. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció i de la purificació de l'antigen SAG2 en el bioreactor de 2 L.....	82
Figura 26. Esquema resum de la PCR inversa en la generació dels pTarget.....	85
Figura 27. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels plasmidis pTarget-cadA, pTarget-fecA, pTarget-lacZ, pTarget-ompA i pTarget-ybbD per PCR inversa.	86
Figura 28. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels braços d'homologia de <i>cadA</i> , <i>fecA</i> , <i>lacZ</i> , <i>ompA</i> i <i>ybbD</i>	87
Figura 29. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels braços d'homologia restants de <i>lacZ</i> i <i>ybbD</i>	88
Figura 30. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels <i>cassettes</i> SAG2 i GRA2 amb les dianes de restricció per la lligació amb els braços d'homologia.	89
Figura 31. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador SAG2 Δ lacZ.	90

Figura 32. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador GRA2ΔcadA.	91
Figura 33. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pBluescript-SAG2ΔlacZ i pBluescript-GRA2ΔcadA.....	92
Figura 34. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació del DNA donador SAG2-GRA2ΔlacZ per <i>overlap</i> PCR.....	93
Figura 35. Resum de les estratègies de generació dels DNA donadors.	94
Figura 36. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2ΔlacZ per <i>colony</i> PCR.	100
Figura 37. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2ΔlacZ per <i>colony</i> PCR (2).....	98
Figura 38. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació i seqüenciació de l'edició SAG2ΔlacZ.....	99
Figura 39. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔcadA per <i>colony</i> PCR.	100
Figura 40. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔfecA per <i>colony</i> PCR.	100
Figura 41. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔompA per <i>colony</i> PCR.	101
Figura 42. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2ΔlacZ per <i>colony</i> PCR.....	103
Figura 43. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació d'una colònia blanca editada (SAG2ΔlacZ) i una colònia blava no-editada per <i>colony</i> PCR.	104
Figura 44. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2ΔlacZ per <i>colony</i> PCR (2).....	105
Figura 45. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2ΔybbD per <i>colony</i> PCR.....	106

Figura 46. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2ΔlacZ en cèl·lules GRA2ΔcadA per <i>colony</i> PCR.....	107
Figura 47. Eficiència de transformació d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pCas amb diferents concentracions de CaCl ₂ en el protocol de cèl·lules competents.	109
Figura 48. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació dels <i>cassettes</i> SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 amb seqüències de solapament amb <i>panD</i> , i dels braços d'homologia per <i>panD</i>	110
Figura 49. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició SAG2-GRA2ΔpanD per <i>colony</i> PCR.	111
Figura 50. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'edició GRA2ΔpanD en una soca editada amb SAG2ΔlacZ per <i>colony</i> PCR.	112
Figura 51. Anàlisi en gel d'agarosa de la digestió enzimàtica dels plasmidis pTarget-lacZ i pTarget-Ø.	114
Figura 52. Anàlisi en gel d'agarosa de l'amplificació de l'estabilitat de l'edició SAG2-GRA2ΔpanD per <i>colony</i> PCR.	115
Figura 53. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció de l'antigen SAG2 a la soca <i>E. coli</i> BL21 (DE3) SAG2ΔlacZ.	116
Figura 54. Anàlisi en SDS-PAGE de la producció de l'antigen SAG2 a les soques <i>E. coli</i> BL21 (DE3) SAG2ΔlacZ i <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a-SAG2.	117
Figura 55. Anàlisi en SDS-PAGE de la purificació de les proteïnes SAG2, GRA2 i SAG2-GRA2 a partir de les soques editades amb SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA, GRA2ΔfecA, SAG2-GRA2ΔpanD i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD.	119
Figura 56. Anàlisi per Western blot dels antígens produïts per les soques SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA i SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD.	121
Figura 57. Anàlisi per Western blot dels antígens purs produïts per les soques SAG2ΔlacZ, GRA2ΔcadA, GRA2ΔfecA, SAG2ΔlacZ – GRA2ΔpanD i SAG2-GRA2ΔpanD.	121

Figura 58. Corba de la reacció d'immunoprecipitació descrita per Heidelberg i Kendall.	124
Figura 59. Esquema de l'assaig immunoturbidimètric automatitzat de làtex. ..	125
Figura 60. Test ELISA de la funcionalitat dels antígens SAG2, GRA2, SAG2 + GRA2 i SAG2-GRA2.	128

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Comparació d'assaigs de diagnòstic de la toxoplasmosi.	19
Taula 2. Llista d'equips i aparells.	36
Taula 3. Llista de tot el programari utilitzat.	38
Taula 4. Llista de reactius químics.	38
Taula 5. Llista de medis, solucions i tampons.	39
Taula 6. Llista de kits i enzims.	41
Taula 7. Llista de plasmidis.	42
Taula 8. Llista de línies cel·lulars.	42
Taula 9. Volums d'una amplificació estàndard per PCR.	45
Taula 10. Condicions d'amplificació estàndards.	45
Taula 11. Exemple de digestió enzimàtica.	46
Taula 12. Exemple de lligació enzimàtica.	47
Taula 13. Exemple de reacció amb la polimerasa Klenow DNA.	47
Taula 14. Preparació de DNA i sals per la transformació bacteriana.	48
Taula 15. Preparació de DNA i sals per l'edició genètica.	54
Taula 16. Composició dels tres medis LB, SOB i SOC.	75
Taula 17. Productivitats volumètriques de les soques transformades amb pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 i pET28a-SAG2-GRA2.	83
Taula 18. Gens diana, guies RNA i llocs de tall per l'edició genètica d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3). *Les seqüències PAM es mostren en cursiva.	85
Taula 19. Resum de les edicions generades a la soca <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	113
Taula 20. Dades d'Abs ₆₀₀ , pes humit cel·lular i pes sec cel·lular a les 4 h i a les 16 h de cultiu de la soca transformada amb pET28a-SAG2 i de la soca editada SAG2ΔlacZ.	118

Taula 21. Productivitats volumètriques de les soques editades amb SAG2 Δ lacZ, GRA2 Δ cadA, GRA2 Δ fecA, SAG2-GRA2 Δ panD i la doble editada amb SAG2 Δ lacZ – GRA2 Δ panD.	120
Taula 22. Resultats de l'assaig immunoturbidimètric de làtex amb protocol d'adsorció passiva.	126
Taula 23. Resultats de l'assaig immunoturbidimètric de làtex amb protocol d'unió covalent.	126

ANNEX

PRIMERS

Taula S1. Llista de primers.

sag2_FW	aaataataggatccaccaccgagacgccca
sag2_RV	aaataatagaattcttacttgcccgtgagaga
gra2_FW	aaataatagaattcttactgcgaaaagtctgg
gra2_RV	aaataataggatccggaaaaggtgaacatacaccac
sag2_fusion_FW	tgggtcgcggatccaccac
sag2_fusion_RV	tgggtgatgttcaccttttccttgcccgtgagagacacagg
gra2_fusion_FW	cctgtgtctctcacgggcaagggaaaaggtgaacatacacca
gra2_fusion_RV	cggccgcaagcttcgaattc
T7_promoter_FW	taatacgactcactataggg
T7_promoter_RV	cctatagtgagtcgtatta
pTargetF_cadA_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGCAGGTAAGCGTCTGATCAAgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_fecA_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGTGGGCGGCACAGCGGACAAgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_lacZ_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGGTGAAACGCAGGTCGCCAGgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_ompA_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGACAACGGCATGCTGAGCCTgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_ybbD_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTTCCTAACAAATGATGATGGgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_RV	actagtattatacctagg
L4440	agcgagtcagtgagcgag
cadA_FW_300	acactggatgtgaaatccatccac
cadA_Sbfl	AATAAATACCTGCAGGatcagacgcttacctgattgcc
cadA_PACI	AATAAATATTAATTAACAacggttctattgaacgtgcatc
cadA_RV_300	ttcgtcgaggtatttcgccac

fecA_FW_300	cccgtccccttcgccccttac
fecA_Sbfl	AATAAATACCTGCAGGtccgctgtgccgccaccatca
fecA_PACI	AATAAATATTAATTAACaacggttttggcaccgcgctg
fecA_RV_300	ctggaactggtagcccaggctcg
lacZ_FW_300	ggagaaaaccgcctcgcggtg
lacZ_Sbfl	AATAAATACCTGCAGGgacgacctgctttcaccctg
lacZ_PACI	AATAAATATTAATTAACagcggcaccgcgctttcg
lacZ_RV_300	atgctcgtgacggttaacgcc
ompA_FW_300	cgtatgccgtacaaaggcagcg
ompA_Sbfl	AATAAATACCTGCAGGctcagcatgccgttgcggac
ompA_PACI	AATAAATATTAATTAACctgggtgttctaccgtttc
ompA_RV_300	agactgagcacggcgtcggacag
ybbD_FW_300	atgctggctatctcaagtaac
ybbD_Sbfl	AATAAATACCTGCAGGtcatcattgttagggaaaataag
ybbD_PACI	AATAAATATTAATTAATggggtaggtttaagaaaacattg
ybbD_RV_300	ttactctgcacaagcatcagg
pET28_cassette_FW	aataaatcctgcaggCGATCCCGCGAAATTAATAC
pET28_cassette_RV	aataaatattaattaaCCATTCGCCAATCCGGATAT
cadA_FW_300_xmal	AATAAATACCCGGGacactggatgtgaaatccatccac
cadA_RV_300_speI	AATAAATAACTAGTttcgtcaggtatttcgccac
lacZ_FW_300_xmal	AATAAATACCCGGGggagaaaaccgcctcgcggtg
lacZ_RV_300_speI	AATAAATAACTAGTatgctcgtgacggttaacgcc
P1_cadA	ggcaatgcaggttaagcgtctgatCGATCCCGCGAAATTAATAC
P2_cadA	GTATTAATTTTCGCGGGATCGatcagacgcttacctgcattgcc
P3_cadA	ATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggttctattgaactgcgatc
P4_cadA	gatcgcacgttcaatagaaccgttgCCATTCGCCAATCCGGATAT
P1_fecA	gatggtggcgggcacagcggaCGATCCCGCGAAATTAATAC

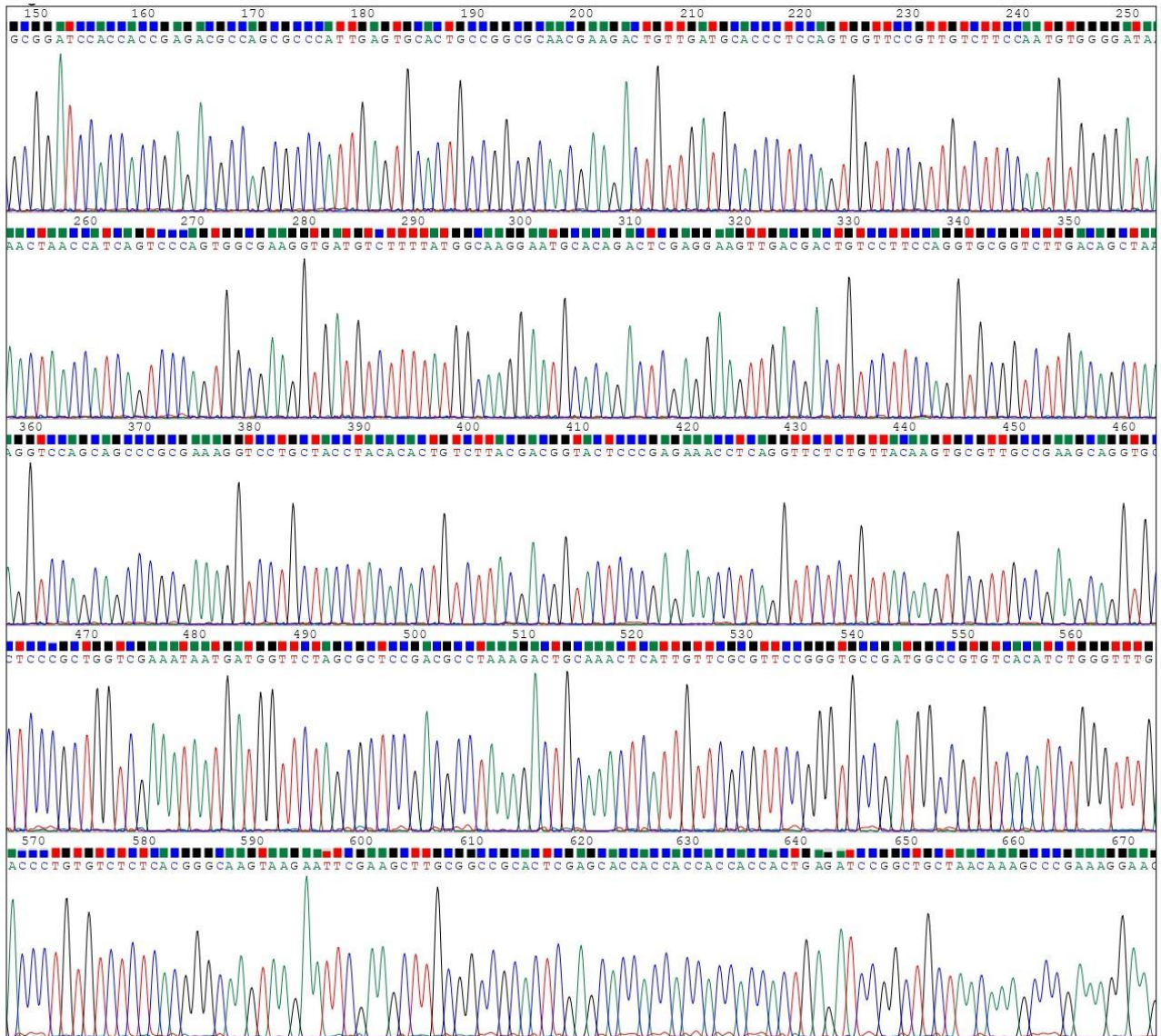
P2_fecA	GTATTAATTTTCGCGGGATCGtccgctgtgcccccaccatc
P3_fecA	CTATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggttttggcaccgctg
P4_fecA	cagcgcggtgccaaaaccgttGCCATTCGCCAATCCGGATATAG
P1_lacZ	acctacgggtaacagtttctCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_lacZ	GTATTAATTTTCGCGGGATCGagaaactgttaccgtaggt
P3_lacZ	ATATCCGGATTGGCGAATGGcagcggcaccgctcttcg
P4_lacZ	cgaagcgctggtgccgctgCCATTCGCCAATCCGGATAT
P1_ompA	ccggacaacggcatgctgagCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_ompA	GTATTAATTTTCGCGGGATCGctcagcatgccgttgcgg
P3_ompA	CTATATCCGGATTGGCGAATGGcctgggttttctaccgttctg
P4_ompA	cgaaacggtaggaaacacccaggCCATTCGCCAATCCGGATATAG
P1_ybbD	cttattttcctaacaatgatgaCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_ybbD	GTATTAATTTTCGCGGGATCGtcatcattgttagggaaaaataag
P3_ybbD	ATATCCGGATTGGCGAATGGtggggtaggttaagaaaacattg
P4_ybbD	caatgttttctaaacctacccccaCCATTCGCCAATCCGGATAT
colonyPCR_cadA	gctgtaattaccaactctacctat
colonyPCR_fecA	ggcatccggggcctgaaccg
colonyPCR_lacZ	ggttacggccaggacagtcgt
colonyPCR_ompA	tttggtggttaccaggttaacc
colonyPCR_ybbD	tccatcaacaacagattgct
ampFW	aataaattCTCGAGttcaaatatgtatccgctc
ampRV	cggggtctgacgctcagtg
lacZ_FW_a	gacgggttgttactcgctca
lacZ_RV_a	cgcaggcttctgcttcaatc
lacZ_FW_b	aactggcagatgcacggtta
lacZ_RV_b	ctcgaatcagcaacggcttg
lacZ_FW_c	aactggcagatgcacggtta

lacZ_RV_c	tggcggtattcgcaaaggat
lacZ_FW_d	atgttgatgaaagctggcta
lacZ_RV_d	gctatgacggaacaggtatt
lacZ_FW_e	cccaggctttacactttat
lacZ_RV_e	aaagaccagaccgttcatac
cadA_FW_1000	atcaagcagaccactgacga
cadA_RV_1000	ggctgtgagggtgttttcat
colonyPCR1000_cadA	taaccacaccgctctaacg
fecA_FW_1000	gacgttcccgtgaaaaata
fecA_RV_1000	gttggtctggttgagtcgt
colonyPCR1000_fecA	agcaactggaagatggctcc
lacZ_FW_1000	gcttgctgcaactctctcag
lacZ_RV_1000	cggataaacggaactggaaa
colonyPCR1000_lacZ	tgtctctgaccagacacca
ompA_FW_1000	atgchgcaaatgaaggtaac
ompA_RV_1000	ttcactggcctaaaaagctga
colonyPCR1000_ompA	atttgcgaggctctttccga
ybbD_FW_1000	cttatgaagttgchggtggt
ybbD_RV_1000	atactgccaatcccgtcatc
colonyPCR1000_ybbD	gctccctcaacaaccaact
pTargetF_panD_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGATATCTGGAATGTCACCAAgtttagagctagaaatagcaag
panD_FW_1000	cgatgttgcattgcttc
P1_panD	agccattgatattggaatgtcacCGATCCCGCAAATTAATAC
P2_panD	GTATTAATTTGCGGGATCGgtgacattccagatatcaatggct
P3_panD	ATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggcaagcgtttctccact
P4_panD	agtgagaaacgcttgccgttgCCATTCGCCAATCCGGATAT
panD_RV_1000	tatatcagcgactggatgc

colonyPCR_panD	ttaccccacgtcatctgtca
T7_terminal_RV	gctagttattgctcagcgg

RESULTATS DE SEQÜENCIACIÓ

Totes les seqüenciacions de Sanger d'aquesta tesi es van dur a terme al servei extern Eurofins Genomics.



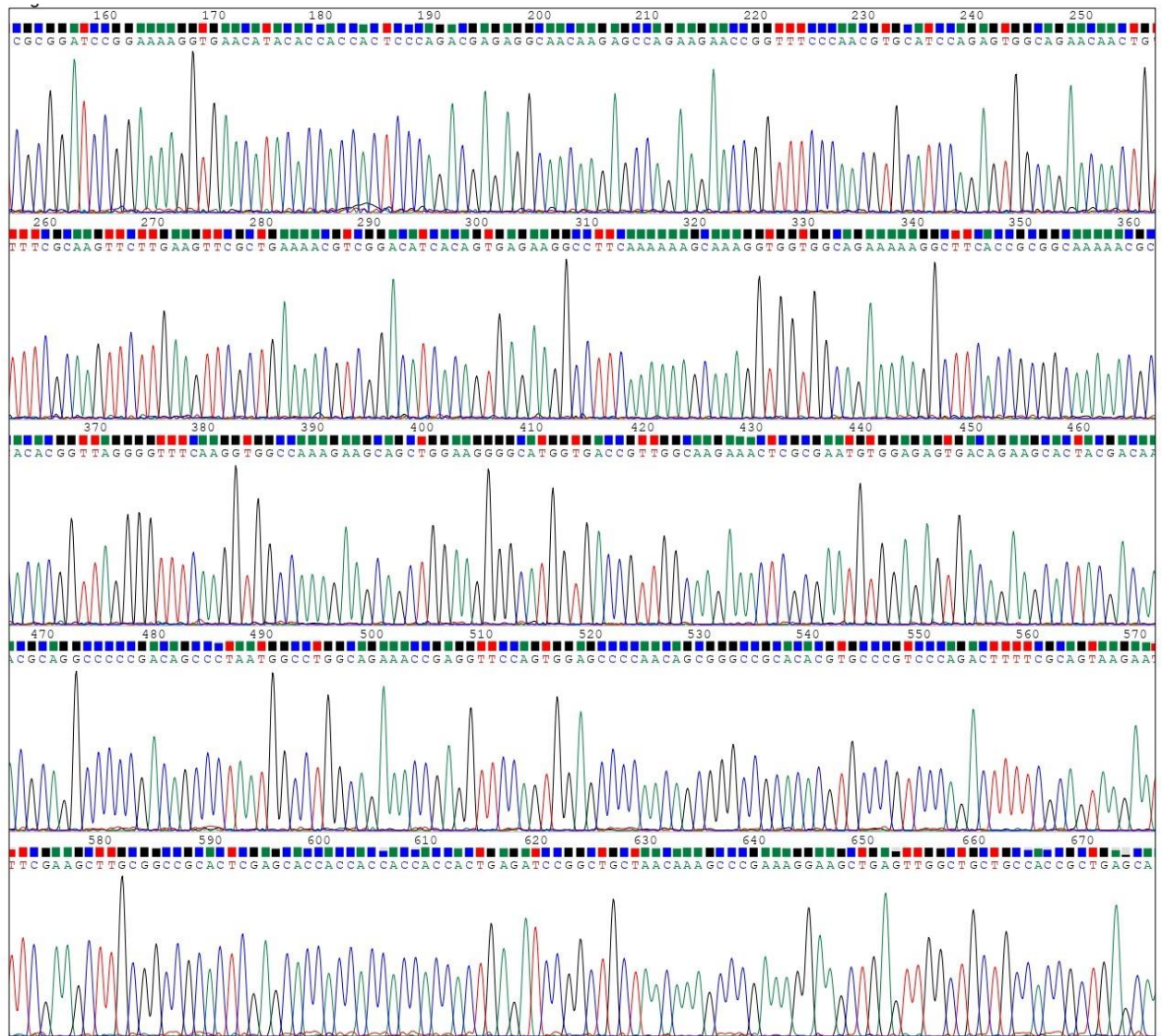
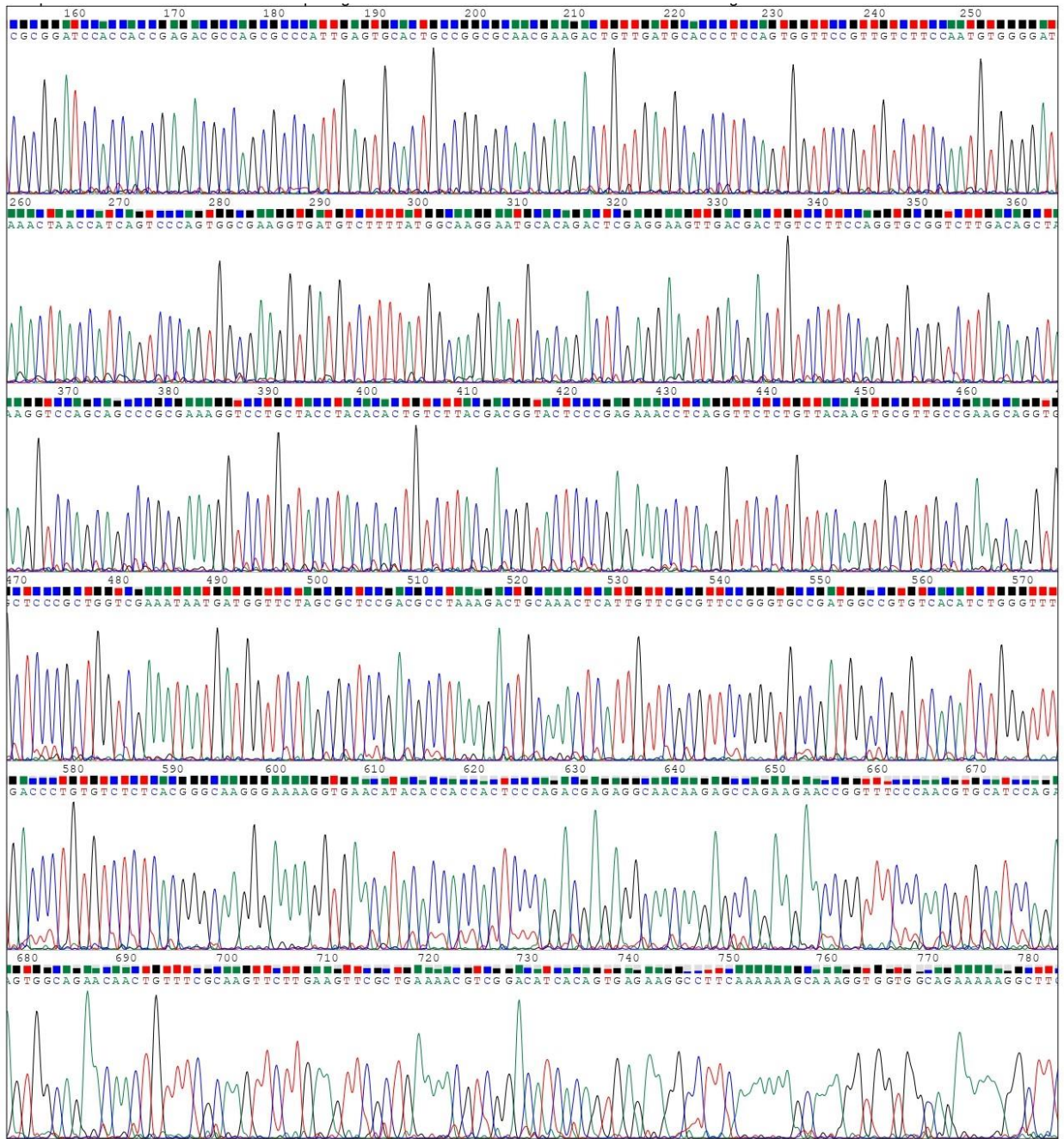


Figura S1. Cromatogrames de seqüenciació dels plasmidis pET28a-SAG2 (primera imatge) i pET28a-GR2 (segona imatge). Primer T7_promoter_FW.



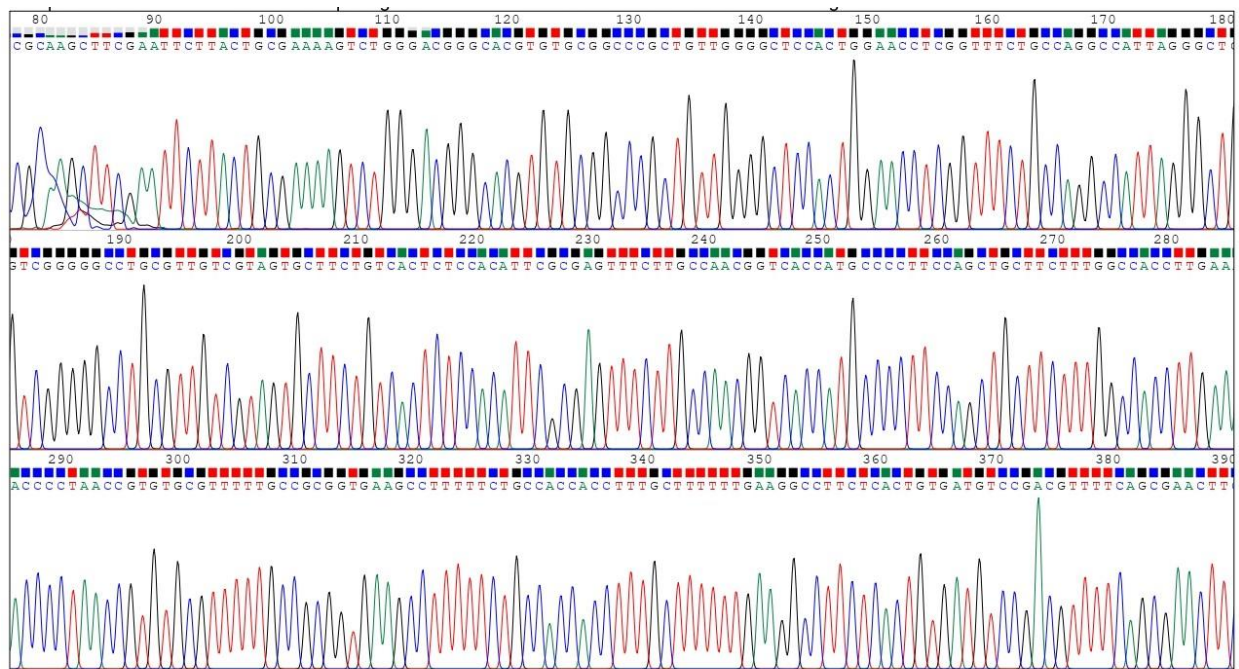


Figura S2. Cromatograma de seqüenciació del plasmidi pET28a-SAG2-GRA2 amb *primer sense* (primera imatge) i *primer antisense* (segona imatge). *Primer sense* T7_promoter_FW i *primer antisense* T7_terminal_RV.

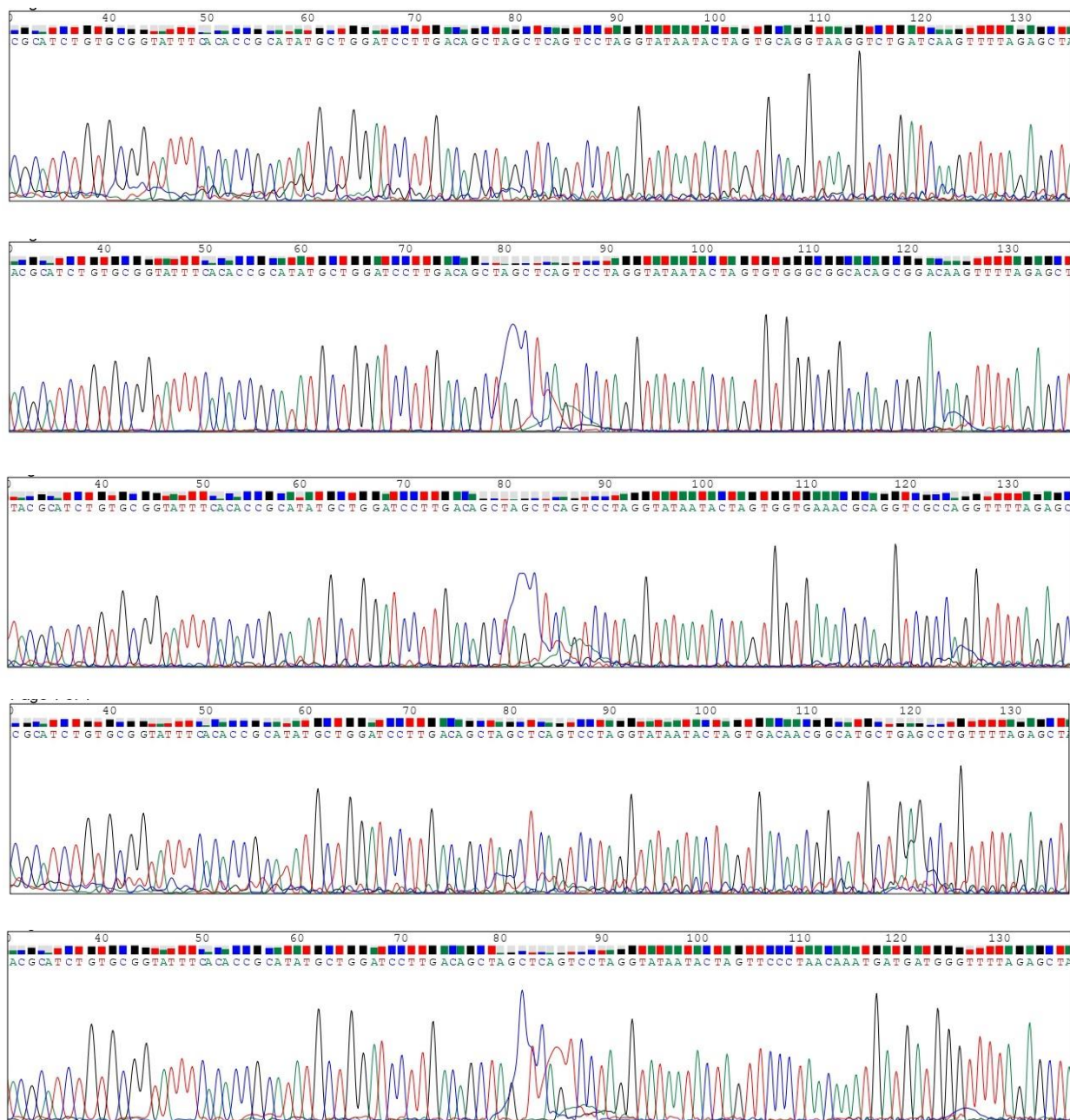
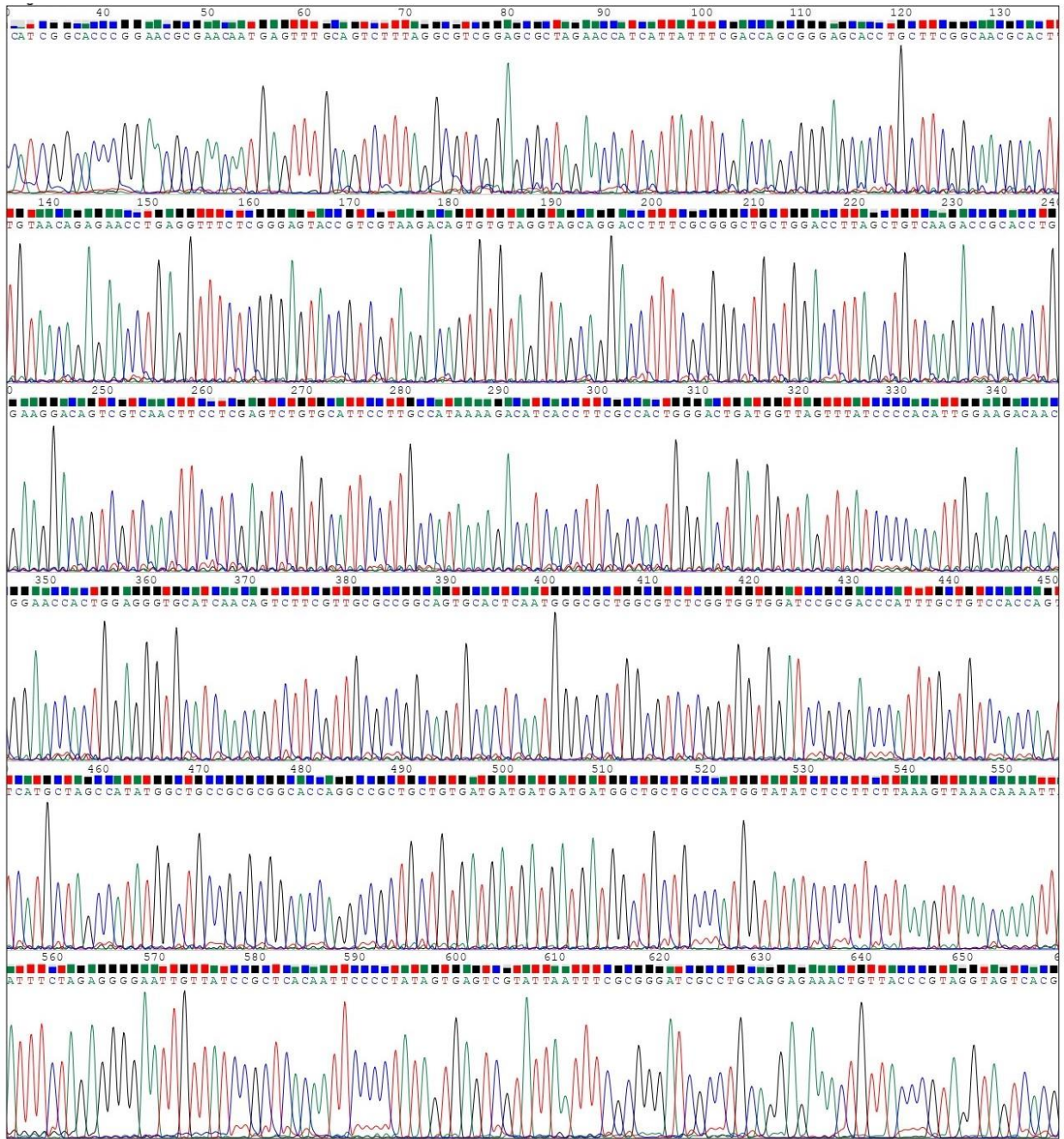


Figura S3. Cromatogrames de seqüenciació dels plasmidis pTarget-cadA, pTarget-fecA, pTarget-lacZ, pTarget-ompA i pTarget-ybbD (de dalt a baix). Primer L4440.



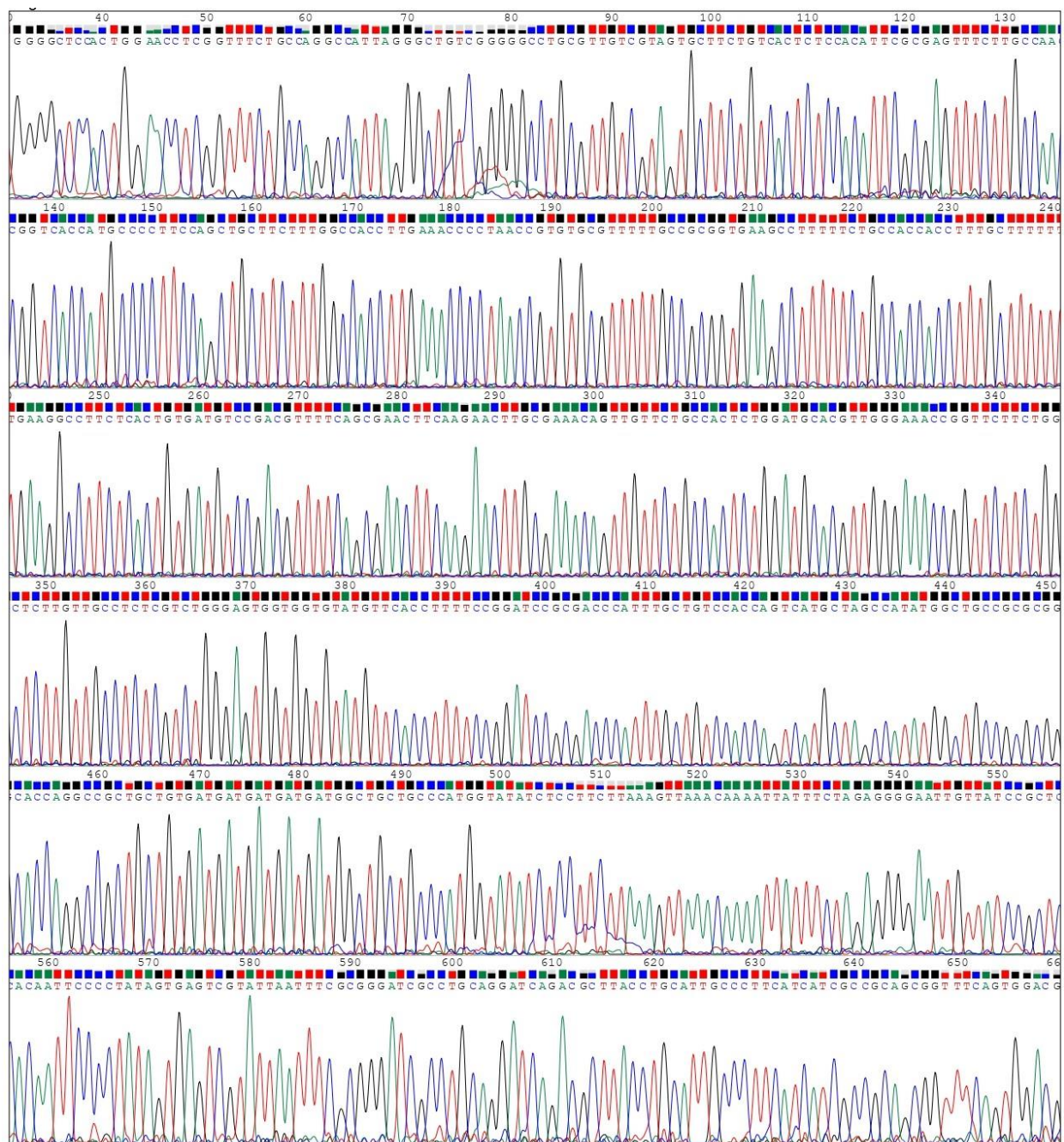


Figura S4. Cromatogrames de seqüenciació dels plasmidis pBluescript-SAG2 Δ lacZ (primera imatge) i pBluescript-GRA2 Δ cadA (segona imatge). Primer *sag2_RV* i primer *gra2_RV*.

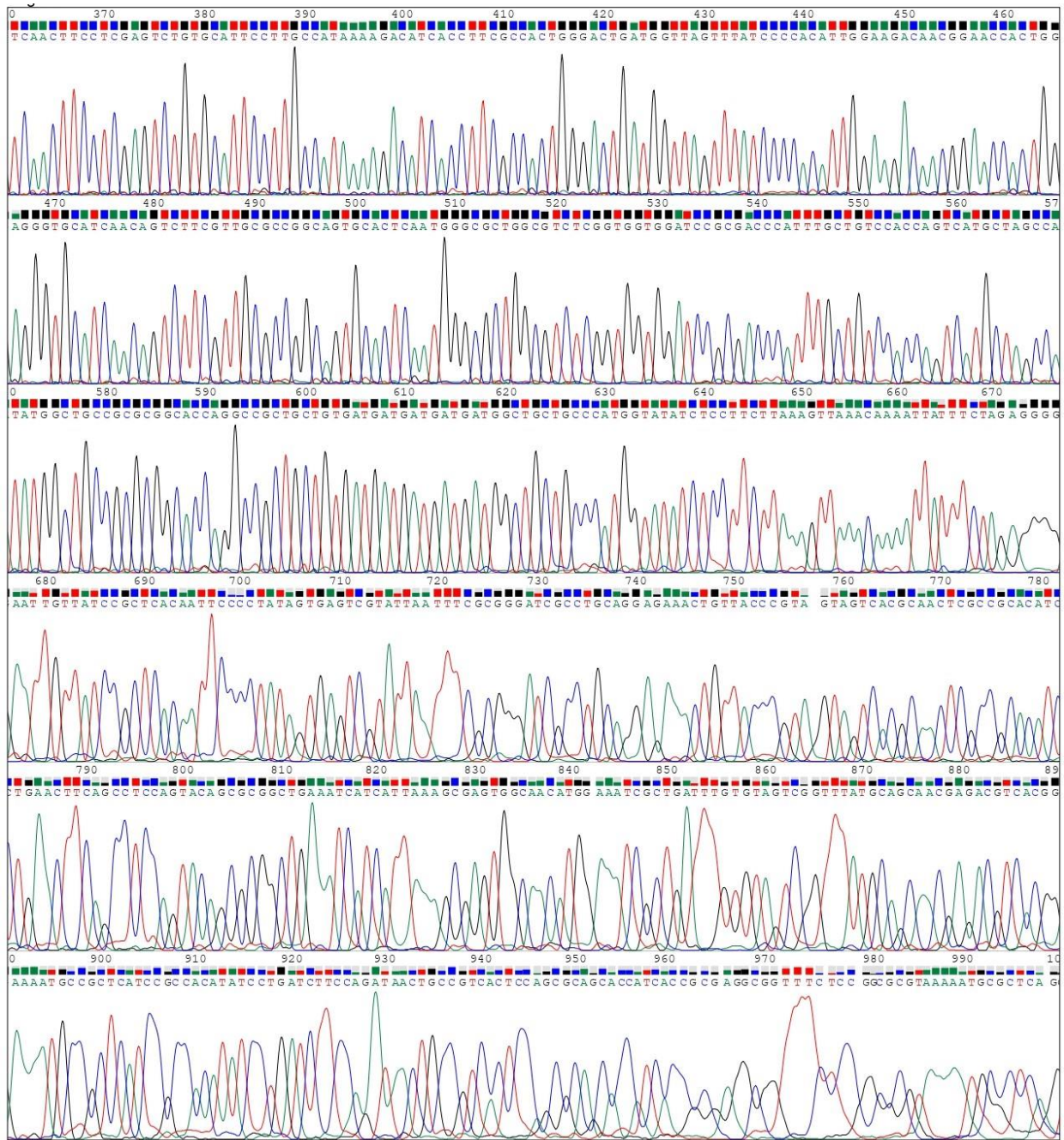


Figura S5. Cromatograma de seqüenciació de l'edició SAG2ΔlacZ. Primer T7_terminal_RV.

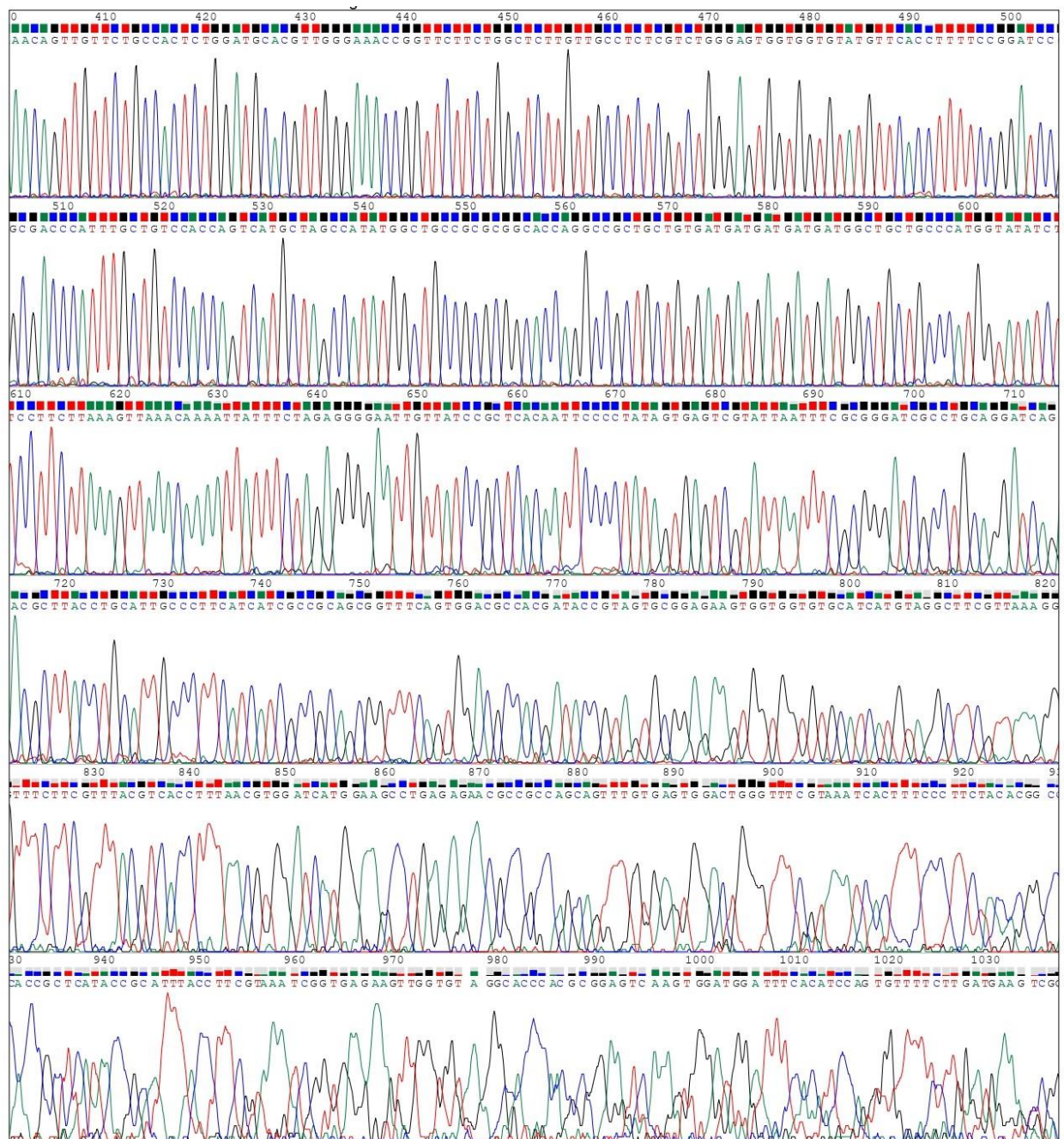


Figura S6. Cromatograma de seqüenciació de l'edició GRA2ΔcadA. Primer T7_terminal_RV.

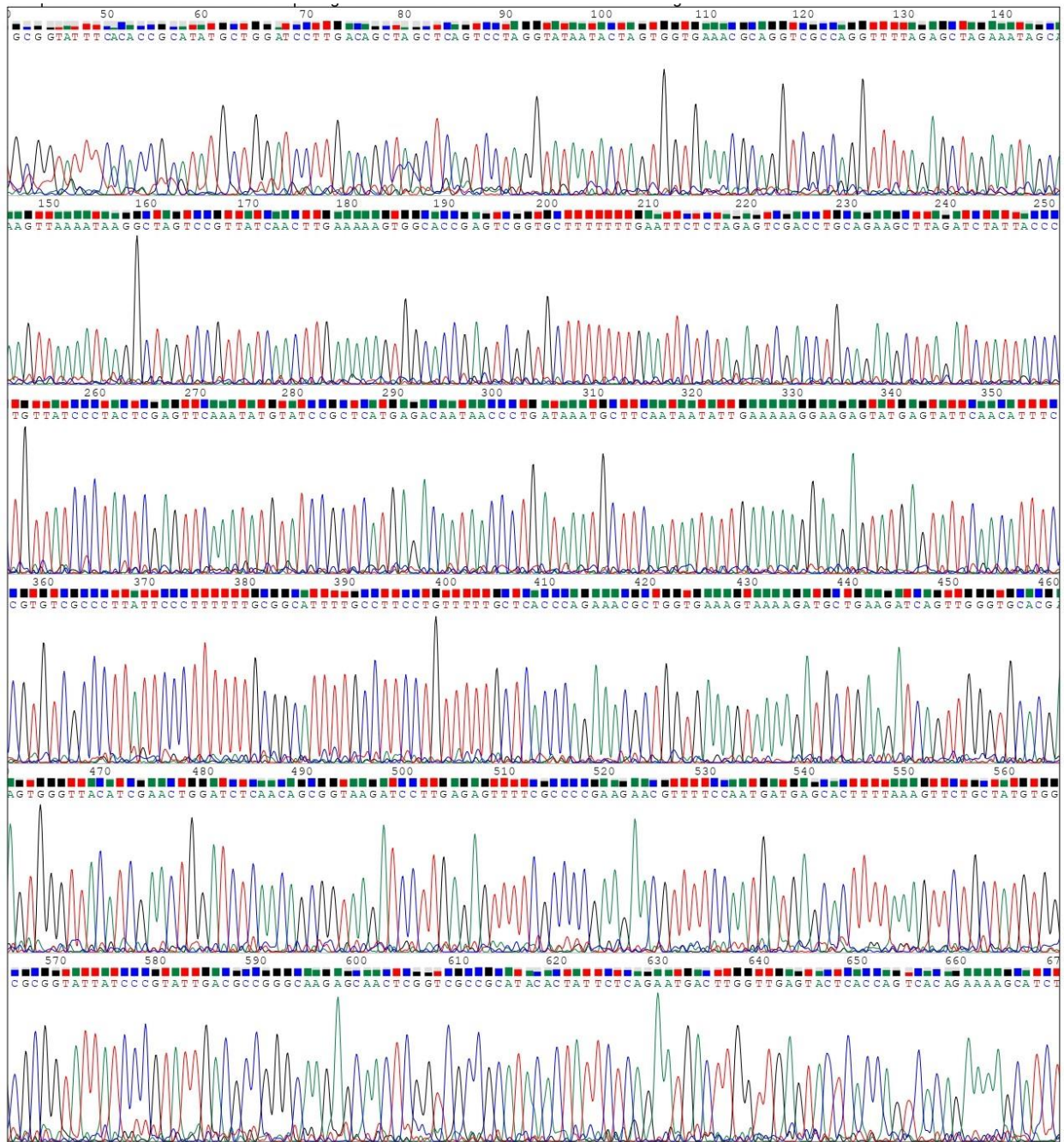


Figura S8. Cromatograma de seqüenciació del plasmidi pTarget-lacZ amb ampil·lina. Primer L4440.

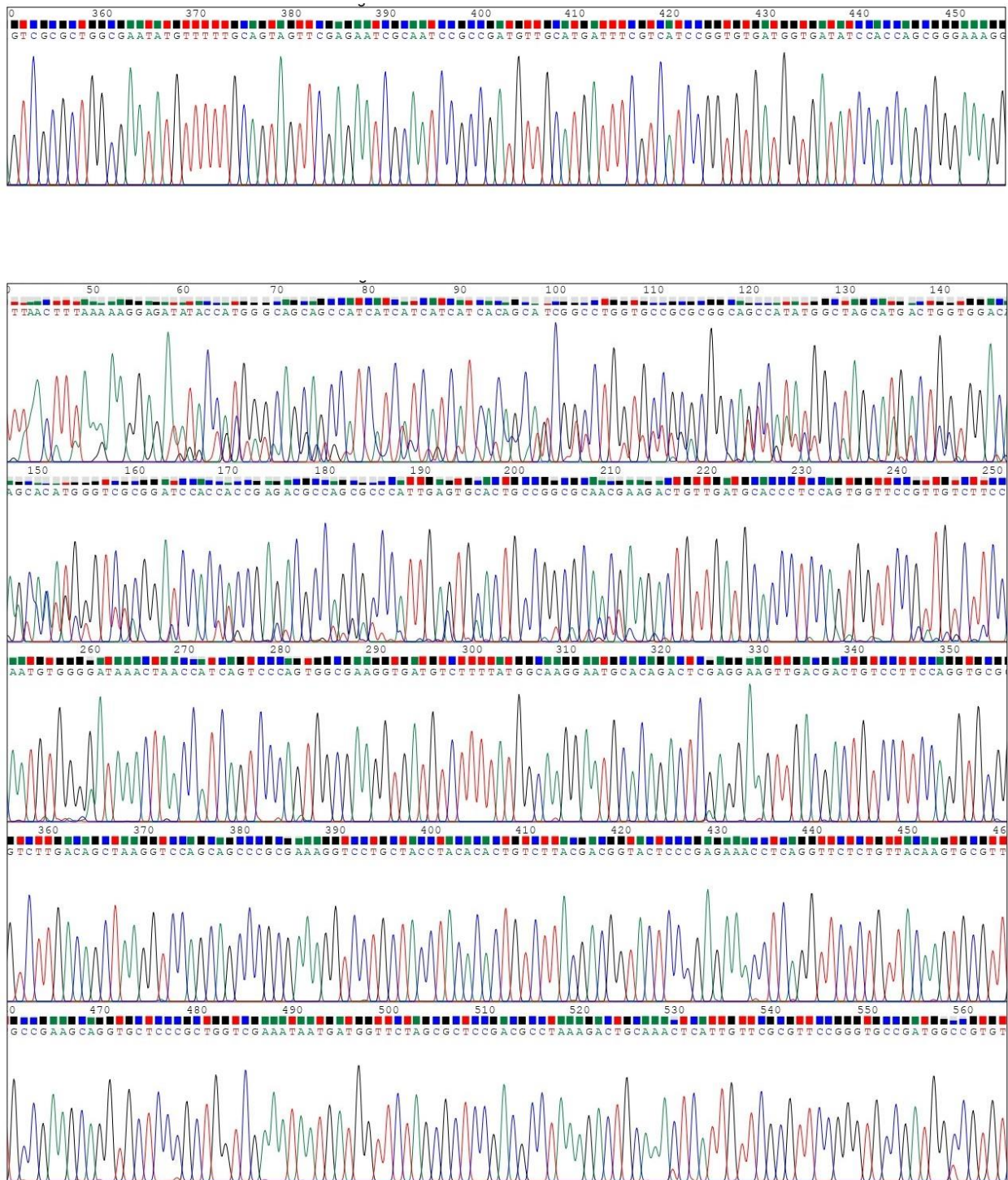


Figura S9. Cromatograma de seqüenciació de l'edició SAG2-GRA2 Δ panD. Primer colonyPCR_panD (imatge superior) i primer T7_promoter_FW (imatge inferior).

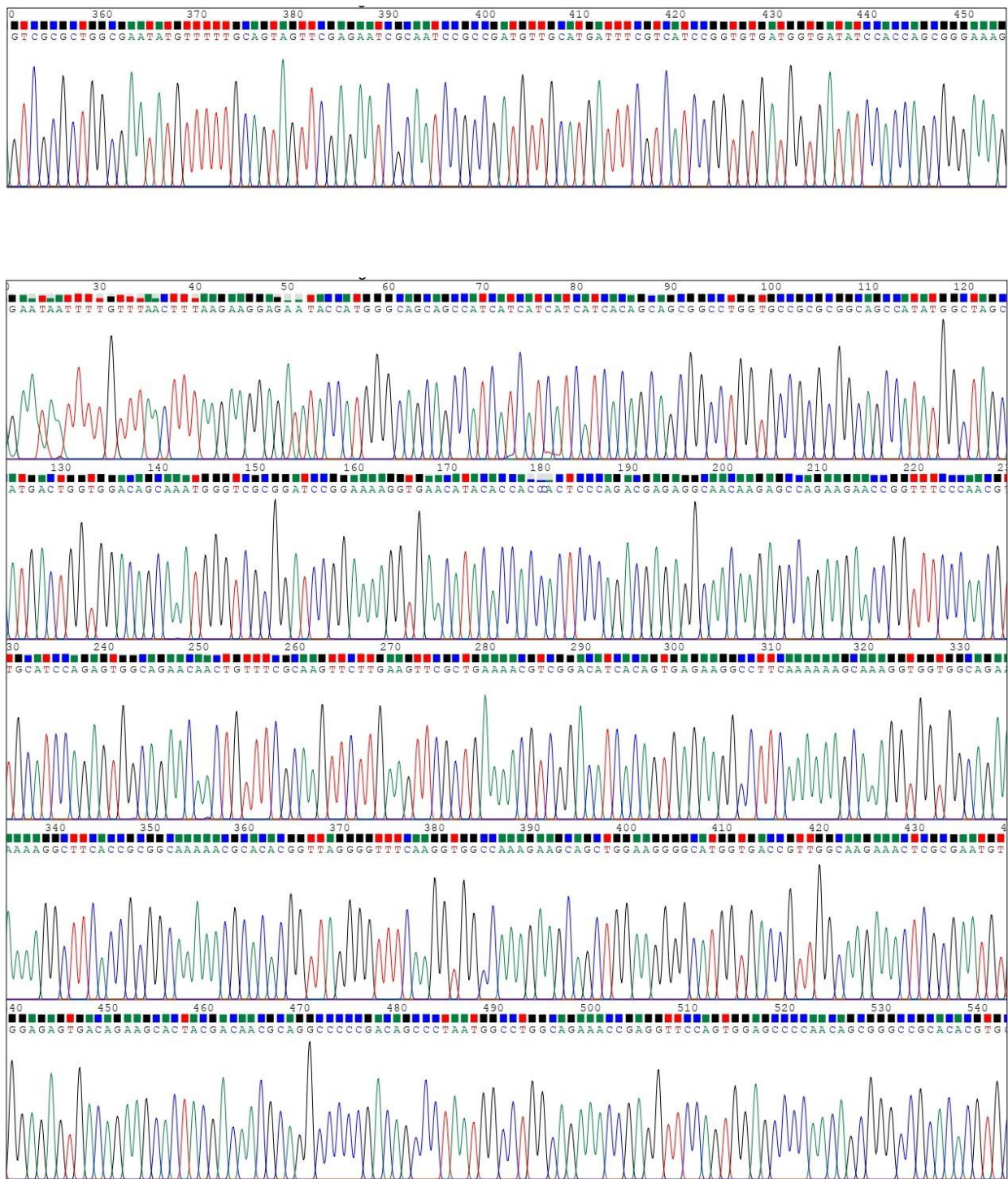


Figura S10. Cromatograma de seqüenciació de l'edició GRA2ΔpanD en una soca editada amb SAG2ΔlacZ. Primer colonyPCR_panD (imatge superior) i primer T7_promoter_FW (imatge inferior).

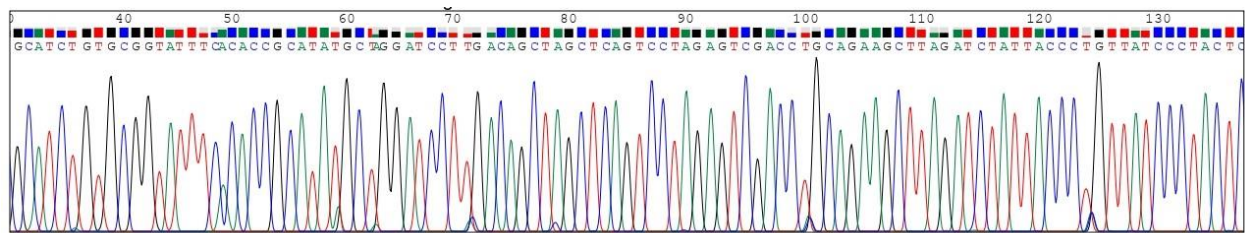


Figura S11. Cromatograma de seqüenciació del plasmidi pTarget-Ø. Primer L4440.

PUBLICACIÓ INDEXADA VINCULADA A LA TESI (EN PREMSA)

Els resultats presentats en aquesta tesi doctoral formen part d'una publicació científica acceptada per la revista *Applied Biochemistry and Microbiology*.

1 **PRODUCTION OF *Toxoplasma gondii* RECOMBINANT ANTIGENS IN**
2 **GENOME-EDITED *Escherichia coli***

3 **A. Redondo^{a,b}, D. Wood^a, S. Amaral^a, J. Ferré^a, D. Goti^b, and J. Bertran^{a,*}**

4 ^a*Faculty of Sciences and Technology, University of Vic-Central University of*
5 *Catalonia, Vic 08500, Spain*

6 ^b*Department of Research and Development, Spinreact S.A.U.-Toyobo Group,*
7 *Sant Esteve d'en Bas 17176, Spain*

8 e-mail: joan.bertran@uvic.cat

9 Toxoplasmosis is a widespread zoonosis with an impact on immunocompromised
10 people and critical in pregnant women because of its transmission to the fetus.
11 Recombinant *Toxoplasma gondii* antigens produced in *Escherichia coli* are useful
12 for antibody detection in patient's blood. The aim of the study was to evaluate the
13 feasibility of deriving chromosome-edited *E. coli* clones producing *T. gondii*
14 antigens. Here, we present the CRISPR-Cas9 facilitated editing of the *E. coli*
15 genome to produce SAG2 and GRA2 *T. gondii* antigens. Moreover, we have
16 derived a clone that produces both proteins and an additional clone producing a
17 novel fusion protein, SAG2-GRA2. These proteins, bearing His-tag, can be easily
18 purified and are useful to detect anti-*Toxoplasma* antibodies in human blood. We
19 conclude that it is feasible to edit the *E. coli* chromosome to produce *T. gondii*
20 antigens that are bound by antibodies present in people affected by toxoplasmosis.

21 **Keywords:** *Toxoplasma gondii*, CRISPR-Cas9, genome editing, recombinant
22 protein, *Escherichia coli*

23
24
25
26

27 Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease caused by *Toxoplasma*
28 *gondii* infection which affects almost all warm-blooded animals, including
29 humans. *T. gondii* is a protozoan parasite that belongs to the phylum *Apicomplexa*
30 [1]. This parasitic disease is generally asymptomatic in immunocompetent adults,
31 but it is relevant since the transmission from pregnant women to fetuses may cause
32 premature birth, blindness, neonatal malformations or abortion. Infection in adult
33 immunocompromised patients may result in pneumonia, fatal encephalitis or even
34 some neuropsychiatric diseases, such as bipolar disorder or depression [2 - 4].

35 In pregnant women, early diagnosis of toxoplasmosis is performed through
36 serological methods, which are the most suitable for mass screening. The most
37 commonly used tests are based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
38 and latex agglutination test (LAT) [5]. Most of these commercially available tests
39 use *Toxoplasma* lysate antigens (TLA) to detect antibodies in test sera, such as
40 Toxo-Latex (Spinreact-Toyobo Group, Spain) or Toxocheck-MT (Eiken Chemical,
41 Japan). TLA consist of a whole-cell soluble extract containing antigens of the
42 tachyzoite grown in mice or tissue culture and subsequently lysed. However, TLA
43 preparation is expensive, laborious and hard to standardize, leading to test
44 variability.

45 During the last decades, several research groups have described the
46 production and development of recombinant *T. gondii* antigens-based tests [6 - 11].
47 Among these antigens, the surface antigen 2 (SAG2) and the granule dense antigen
48 2 (GRA2) have been proposed as candidate markers for serodiagnosis of
49 toxoplasmosis [12, 13]. SAG2 has a role as an attachment ligand, interacting with
50 host-cell surface molecules [14, 15] and GRA2 is involved in forming connections
51 with impact on the parasite-host relation and affects the survival and virulence of
52 the parasite [16]. It has also been described that the combination of two or more *T.*
53 *gondii* antigens may improve the diagnostic utility of the test due to an increase in
54 sensitivity [13, 16, 17]. Pietkiewicz et al. [17] showed that the sensitivity of
55 recombinant GRA7 in a separate IgG ELISA was 68.9% and 95.9%, for chronic

56 sera and acute-phase sera, respectively, meanwhile the combination of GRA7 with
57 SAG1 and GRA1 increased the sensitivity to 91.1% for chronic sera and 100% for
58 acute-phase sera. In addition, the use of fusion proteins bearing epitopes from
59 different *T. gondii* antigens has also been explored to facilitate standardization and
60 reduce the costs of the test. In this sense, several different chimeras have been
61 produced and tested [8, 18 - 24]. Holec-Gąsior et al. [21] showed that the
62 sensitivity of recombinant MAG1 in an IgG ELISA was 97.3% and 7.5%, for
63 chronic sera and acute-phase sera, respectively, whereas the chimeric protein
64 MIC1-MAG1 showed a sensitivity of 100% for chronic sera and 85.1% for acute-
65 phase sera.

66 Although some authors have relied on baculoviruses and insect cells [15] or
67 yeast cells [18, 25] to produce *Toxoplasma* proteins, many of the studies conducted
68 up to date have used *Escherichia coli* as the host cell. Besides the use of plasmid
69 vectors to transform bacteria cells into protein factories, the permanent
70 modification of the *E. coli* chromosome is regarded as a putative advantage to
71 increase yield and reduce costs. With the breakthrough of the CRISPR-Cas9
72 methodology, the selection of cells bearing a tailored chromosome by λ phage
73 Exo-Beta-Gam mediated homologous recombination has been enormously
74 facilitated [26, 27]. Such cells offer a selection marker-free alternative to the
75 plasmid-based system, eliminating the need for antibiotics or other selection
76 strategies. Moreover, chromosomal/genomic integration of exogenous DNA allows
77 a stable expression and reduces the metabolic burden in the cells, which may lead
78 to levels of recombinant protein expression comparable with plasmid-based
79 systems [28 - 30]. It is also worth noting that strains producing more than one
80 antigen may be derived through gene integration at multiple loci.

81 The aim of the present study was to evaluate the feasibility of producing *T.*
82 *gondii* proteins in genome-edited *E. coli* cells.

83 MATERIALS AND METHODS

84 **Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** *E. coli* strain Top10
85 (Invitrogen, USA) was used as the host strain for plasmid construction, and *E. coli*
86 strain BL21 (DE3) (New England Biolabs, Great Britain) was used as target for
87 genome editing and protein expression. The plasmid pET-28a (+) was obtained
88 from Novagen (USA) and plasmids pCas (Addgene plasmid 62225) and pTargetF
89 (Addgene plasmid 62226) were provided by Addgene (USA) as a gift from Sheng
90 Yang [27]. Antibiotics, L-arabinose and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
91 (IPTG) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). *E. coli* was grown in LB
92 medium (g/L): yeast extract – 5.0, tryptone – 10.0 and NaCl – 10.0 or on LB-agar
93 plates supplemented with appropriate antibiotic: ampicillin (100 μ g/mL) or
94 kanamycin (50 μ g/mL) at 37°C or 30°C when necessary.

95 **Recombinant plasmid construction.** All the primers used in this study are
96 listed in Table 1. The DNA sequences encoding *T. gondii* antigens SAG2 (residues
97 from 28 to 172; 100% of the mature protein) and GRA2 (residues from 51 to 185;
98 85% of the mature protein) were obtained from the GenBank database (accession
99 no. AF249698.1 and L01753.1, respectively), and they were amplified from *T.*
100 *gondii* genomic DNA, strain RH (ATCC 50174D), by PCR following a standard
101 amplification protocol using KOD Hot Start DNA Polymerase (Toyobo, Japan).
102 Primer design considered the His tail reading frame in the pET-28a (+) plasmid,
103 and BamHI – HindIII restriction sites were included in 5' extensions to facilitate
104 cloning. The resulting pET-28a-SAG2 and pET-28a-GRA2 were used as templates
105 to amplify the chimeric antigen SAG2-GRA2 by overlap PCR. *E. coli* clones
106 generated with the constructed pET28a-SAG2, pET28a-GRA2 and pET28a-SAG2-
107 GRA2 were also used in recombinant protein production processes.

108 **Design of pTarget and donor DNA series.** The genomic sequence of *E. coli*
109 BL21 (DE3) (GenBank accession no. CP010816.1) was used as a template to
110 design sgRNAs and donor DNA homology arms. Guide RNA sequences were
111 designed using the online software CRISPOR (<http://crispor.org>). As described by
112 Sun et al. [31], the pTarget series were obtained by inverse PCR with the 20-
113 nucleotide-specific sequence included in a 5' overhang of the sense primer along

114 with a SpeI restriction site. The sequence for the sense primers was: 5'-
115 GTCCTAGGTATAATACTAGT-N₂₀-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'.
116 The antisense primer had the following sequence: 5'-
117 ACTAGTATTATACCTAGG-3'. The PCR product was ligated using T4 DNA
118 Ligase (New England Biolabs, Great Britain) after enzymatic digestion with SpeI.
119 We initially replaced the spectinomycin-resistance cassette on the original
120 pTargetF [27] by the ampicillin-resistance cassette since we experienced
121 difficulties in distinguishing plasmid transformed cells from cells that acquired
122 spontaneous spectinomycin resistance. This difficulty disappeared when the
123 antibiotic-resistance cassette was replaced.

124 To construct the donor DNA, genomic DNA of *E. coli* BL21 (DE3) was
125 prepared from a 3 mL overnight culture in LB medium and 300 bp-length or 1 kb-
126 length homologous arms were amplified by standard PCR (Tables 1 and 2). Then,
127 the two homology regions and the expression cassette for the *T. gondii* antigen
128 sequence were assembled by overlap PCR. Donor DNA templates were obtained
129 by PCR, purified with the Qiaquick kit (Qiagen, USA), precipitated and
130 resuspended in water at about 1 mg/mL prior to transformation. DNA fragments to
131 be used for editing were sequenced by Sanger sequencing.

132 **Genome editing and plasmid curing.** *E. coli* BL21 (DE3) strain transformed
133 with pCas was grown overnight in 5 mL LB culture supplemented with kanamycin
134 (50 µg/mL) at 30°C in order to prepare competent cells. Briefly, the overnight
135 culture was diluted 100-fold and grown at 30°C and 200 rpm. When the OD₆₀₀
136 reached 0.2, the λ-Red system (Exo, Beta, Gam proteins) was induced by adding
137 L-arabinose (15 mM final concentration) and the culture was allowed to grow till
138 the OD₆₀₀ reached 0.4. Then, cells were harvested by centrifugation at 1600xg and
139 4°C for 5 min, washed 3 times with ice-cold 150 mM CaCl₂ and concentrated 200-
140 fold with ice-cold 15% glycerol in 150 mM CaCl₂. For transformation, 100 µL of
141 competent cells were mixed with 100 µL of a mixture containing 100 – 1000 ng of
142 pTarget series, 400 – 1300 ng of donor DNA (containing the *T. gondii* antigen

143 sequence flanked by 0.3 – 1 kb homology arms), 27 μ L of 10% polyethylene
144 glycol 8000, 10 μ L of KCM (1 M KCl, 0.3 M CaCl₂, 0.5 M MgCl₂) and H₂O up to
145 a final volume of 100 μ L. Cell-DNA mixtures were incubated for 30 min at 4°C,
146 heated at 42°C for 60 sec and returned to ice. Next, 800 μ L of LB medium was
147 added and cells were grown at 30°C and 200 rpm for 1 to 4 h prior to spreading
148 them onto LB agar plates with appropriate antibiotics. Plates were incubated at
149 30°C for 24 – 40 h. Clones were analyzed by colony PCR, or by blue-white
150 screening, in the case of the lacZ locus editing (using plates containing X-Gal and
151 IPTG), followed by colony PCR for the white colonies. All positive results were
152 confirmed by sequencing PCR products using a forward primer annealing beyond
153 the homology arm in the target locus and a reverse primer binding the inserted
154 cassette beyond the stop codon.

155 To perform the second editing in a strain, edited cells were grown overnight in
156 IPTG in order to cure the pTarget-Amp plasmid. The two-plasmid system
157 employed contains an IPTG-inducible guide RNA in the pCas plasmid that targets
158 the origin of replication in the pTarget-Amp plasmid, pMB1 [27]. Moreover,
159 curing of the pCas plasmid itself is achieved by growth at 37°C, since the
160 replication of the plasmid depends on the temperature-sensitive RepA101-Ts
161 protein that is inactive at 37°C.

162 **Expression and purification of recombinant proteins.** Both pET-28a
163 transformed *E. coli* and edited strains were incubated in 5 mL of LB, with
164 antibiotics when necessary, at 37°C and 200 rpm overnight as a pre-culture to
165 reach stationary phase. The following morning, bacteria were diluted 10-fold using
166 250 mL shake flasks and cultured until the OD₆₀₀ was 0.6 (reaching the mid-
167 exponential phase) before inducing recombinant protein production by addition of
168 1 mM IPTG. Cells were further cultured overnight at 37°C and harvested by
169 centrifugation at 3000xg for 5 min. Pellets were resuspended in 10% of the original
170 volume with 20 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 0.5 M
171 NaCl, protease inhibitors cocktail (Complete Mini, Roche Holding AG,

172 Switzerland) and 0.8 g/L lysozyme (lysis buffer) and disrupted by sonication at
173 80% amplitude switching ON and OFF every 2 sec for a total time of 8 min using
174 Sonic Dismembrator FB120 (Thermo Fisher Scientific, USA). In order to purify
175 His-tagged recombinant proteins a Ni-NTA resin (Qiagen, USA) was used
176 following the manufacturer's instructions. All protein samples were analyzed by
177 SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Protein concentration was measured
178 using a protein assay (BioRad, USA) and BSA as a standard.

179 **Western blot analysis.** After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF
180 membranes. Membranes were then blocked with 5% fat-free powdered milk in Tris
181 buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room
182 temperature and incubated with the primary antibody anti-His (polyclonal rabbit
183 anti-His G18; Santa Cruz Biotechnology, USA) at a 1:500 dilution overnight. After
184 washing for 30 min with several buffer changes, antigen-antibody complexes were
185 detected with an HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody (Agilent Technologies,
186 USA) at a 1:2000 dilution. Peroxidase activity was detected by chemiluminescence
187 method using Clarity Western reagents (BioRad, USA) and the Versadoc MP 4000
188 system to get an electronic image.

189 **ELISA.** Polystyrene 96 well plates were coated overnight at 4°C with 100 µL
190 of protein solution (2.5 µg/mL in 0.1 M bicarbonate-carbonate buffer, pH 9.6).
191 Plates were washed and blocked with 0.5% Tween 20 and 0.5% BSA in phosphate
192 buffer saline (PBS-Tween20-BSA) for 1 h at 37°C. After blocking, 100 µL of a
193 sera pool, diluted 1:25 in blocking buffer, coming either from 10 individuals that
194 had tested positive for anti-*Toxoplasma* antibodies or from 10 individuals that
195 tested negative, were added to wells and incubated for 30 min – 1 h at 37°C with
196 gentle shaking. These sera were obtained from Cerba Specimen Services (France)
197 and were classified as carriers, or not, of anti-*Toxoplasma* antibodies using the
198 toxoplasmosis diagnosis kit Toxo-Latex (Spinreact-Toyobo Group, Spain). After
199 the antibody binding step, plates were washed once with blocking buffer and
200 incubated with horseradish peroxidase-conjugated protein A (Sigma-Aldrich,
201 USA), diluted at 1:1000 – 1:25000 in PBS-Tween20-BSA, at 37°C for 20 min with

202 gentle shaking. After washing 6 times with blocking buffer, 100 μ L of substrate
203 solution tetramethyl benzidine (Sigma-Aldrich, USA) was added to each well and
204 plates were incubated for 15 min – 1 h at 37°C. The reaction was stopped with 100
205 μ L 1 M H₂SO₄ and the OD₄₅₀ was measured using an ELISA reader (Multiskan
206 EX, Thermo Fisher Scientific, USA). Results were determined for each sample by
207 calculating the mean absorbance reading of duplicate wells. A TLA preparation,
208 provided by Spinreact-Toyobo Group, was used as a positive control for the
209 recombinant proteins. Serum from a goat previously characterized with the Toxo-
210 Latex kit (Spinreact-Toyobo Group, Spain) was used as a positive control for the
211 immunoassay.

212 RESULTS

213 **Generation of genome-edited *E. coli* strains.** To generate expression cassettes
214 for SAG2 and GRA2, part of their coding sequences was amplified by PCR using
215 genomic DNA as a template (see Materials and Methods) and cloned into the pET-
216 28a plasmid vector in frame with an N-terminal His-tag present in the vector. An
217 additional construct encoding a fusion of both proteins was prepared by overlap
218 PCR. To direct integration of the generated expression cassettes in the *E. coli*
219 chromosome, we added locus-specific sequences at both ends to target homologous
220 recombination. Different sequences were used to create a small collection of site-
221 directed donor DNAs for specific integration at non-essential loci (Table 2).

222 To derive genome-edited *E. coli* clones, cells were first transformed with the
223 pCas plasmid to introduce the Cas9 protein and the λ -Red based recombineering
224 system (Fig. 1) followed by co-transformation with the pTarget-Amp plasmids and
225 their paired donor DNAs. Fig. 2 summarizes the steps in the process. The
226 efficiency of selection by Cas9 was high, since cells transformed with an empty
227 pTarget-Amp, i.e. without any target sequence, yielded about 3-log more colonies
228 than cells transformed with a functional pTarget-Amp plasmid, targeting a locus.
229 The addition of the appropriate donor DNA to the transformation did not
230 significantly increase the number of transformants in our experiments but resulted

231 in the identification of edited clones with efficiencies that varied between 0 and
232 57%.

233 To verify predicted chromosome editings, single colonies from each co-
234 transformation were picked and analyzed by colony PCR. Fig. 3 shows
235 representative analyses for two edited colonies corresponding to SAG2 integration
236 into the *lacZ* locus (SAG2 Δ *lacZ*). PCR products containing chromosome-donor
237 DNA junctions (lanes c in Fig. 3) were completely sequenced using Sanger's
238 method and found to be correct. Using the above-mentioned approach, we were
239 successful at modifying the *lacZ*, *cadA*, *fecA* and *panD* loci by the introduction of
240 expression cassettes for SAG2 (SAG2 Δ *lacZ*), GRA2 (GRA2 Δ *cadA*, GRA2 Δ *fecA*)
241 and the fusion protein SAG2-GRA2 (SAG2-GRA2 Δ *panD*) (Table 2). Moreover,
242 we succeeded at doing double editing in a strain at loci *lacZ* for SAG2 and *panD*
243 for GRA2 (SAG2 Δ *lacZ* GRA2 Δ *panD*).

244 To verify that the chromosomal modifications were stable in time, an edited
245 clone was grown in 3 subsequent overnight cultures at 37°C in the absence of
246 antibiotic and then plated on agar to grow colonies. Ten colonies were picked and
247 analyzed by colony PCR to confirm the presence of the editing in their
248 chromosome (Fig. 4). In this case, a fragment of 2.5 kb encompassing a large part
249 of the expression cassette and sequences non-included in the donor DNA was
250 amplified. As expected, a colony picked from a control plate, containing non-
251 edited cells, did not yield the specific band.

252 **Production and functionality of *T. gondii* proteins.** Next, we tested
253 whether the genome-edited strains are able to produce the desired recombinant
254 proteins from the inserted expression cassettes. We grew the different strains in
255 IPTG-containing medium and purified the recombinant proteins by nickel affinity
256 chromatography. As shown in Fig. 5, the five tested clones were producing the
257 predicted proteins; at this stage we were not concerned about the purity of the
258 expressed proteins, so we identified the proteins by Western blot analysis instead
259 of Coomassie staining to gain sensitivity. Under the growth conditions of the

260 present study, the yield of the recombinant proteins was much higher using
261 transformation of the same expression cassettes in the context of the pET-28a
262 plasmid. In this sense, the yield of recombinant protein/L of culture using the pET
263 system varied between 0.6 and 2 mg/L depending on the protein and the
264 preparation. On the other hand, the edited strains yielded between 0.125 and 0.3
265 mg/L under the same conditions, regardless of the protein or integration site.

266 Finally, we wanted to ascertain whether the produced recombinant proteins
267 are useful to detect antibodies generated in people exposed to *T. gondii*. To this
268 end, we ran several ELISA tests immobilizing the recombinant antigens in 96 well
269 plates. As a positive control for these assays, the commonly used TLA was run in
270 parallel. Data presented in Fig. 6 indicate that the three proteins, SAG2, GRA2 and
271 the fusion SAG2-GRA2, produced in our strains, are specifically reactive with
272 anti-*Toxoplasma* positive sera. We conclude that these proteins may be used in the
273 generation of the toxoplasmosis serological assays.

274 DISCUSSION

275 We have succeeded at deriving several *E. coli* cells with tailored
276 chromosomes to produce different *T. gondii* proteins. In our experience during
277 using BL21 (DE3) cells, the process is inefficient when introducing exogenous
278 DNA fragments of around 1 kb flanked by homology arms between 300 and 1000
279 bp. The CRISPR-Cas9 system functioned with high efficiency, attending the
280 number of viable cells after transformation with an empty pTarget-Amp plasmid
281 compared with any of our pTarget series. We usually got a 3-log reduction in
282 number of viable cells when the Cas9 protein was directed to any of the targeted
283 chromosomal locations. These results were expected since NHEJ is very inefficient
284 or absent as a DNA damage repair mechanism in *E. coli* [34]. Moreover, the
285 growth of escapers has also been described [26]. Therefore, the inefficiency that
286 we observe at getting genome-edited cells might be due to either poor activity of
287 the λ phage Red-based recombineering system or other particularities of the BL21
288 (DE3) strain.

289 The growth conditions used in our study yielded relatively low amounts of
290 recombinant proteins as compared to previous reports [16, 17, 20, 21, 23]. In this
291 sense, several studies in *E. coli* and other organisms have demonstrated that gene
292 expression after chromosome integration is dependent on the location of the genes
293 [29, 34 - 35]. Englaender et al. [29] integrated the mCherry coding sequences in 4
294 different loci on the *E. coli* genome and obtained expression levels that ranged
295 from 25 to 500% of that obtained with a high copy number plasmid. Despite
296 having introduced the expression cassettes in different loci, our production yields
297 were always significantly below the yield obtained using the same cassettes in the
298 pET-28a plasmid and we did not observe any obvious difference, in terms of
299 expression level, when changing locus or protein. Using the plasmid approach,
300 despite the metabolic burden that it supposes, we consistently produced about 10-
301 fold more specific protein than using the edited strains. In our setting, the gene
302 copy number may be responsible for the observations made in the shake-flask
303 cultures. Nevertheless, protein production using genome-edited strains is still
304 promising since it is associated with faster bacterial growth and higher biomass
305 levels reached than those obtained with plasmid bearing cells. These differences in
306 growth can be attributed to a lower metabolic burden, imposed by the need to
307 replicate extrachromosomal DNA and metabolize antibiotics in the latter case.
308 Another putative advantage associated with genome-edited strains lays in the
309 possibility to co-purify several antigens produced in a single culture vessel and
310 purified in a single Ni-NTA batch. We hypothesize that the production yield using
311 our edited cells may be improved by optimizing the culture conditions and by the
312 use of bioreactors. These actions are planned for future developments of the
313 project.

314 Regarding the functionality of the chosen antigens, others have previously
315 described that there are antibodies against both SAG2 and GRA2 in sera from
316 individuals exposed to the parasite. These studies have shown that these proteins
317 produced in bacteria are promising candidates for serodiagnosis of toxoplasmosis

318 [12 - 14]. Data presented in this study corroborate that specific antibodies to SAG2
319 and GRA2 are present in serum samples from *Toxoplasma*-exposed individuals
320 (Fig. 6). These data confirm the utility of *E. coli* produced recombinant antigens as
321 tools for toxoplasmosis diagnostic immunoassays.

322 In summary, we have generated strains by the integration of SAG2, GRA2,
323 and SAG2-GRA2 coding sequences into the *E. coli* BL21 (DE3) genome. These
324 strains, after culture optimization, may have advantages in protein production as
325 compared to plasmid-based transformed strains through multiple recombinant
326 protein expression in a single vessel and avoiding the need for selection antibiotics.

327 ACKNOWLEDGMENTS

328 This work was funded by a grant from Generalitat de Catalunya (2017 DI 0008).

329 DECLARATIONS

330 **Conflicts of interest:** A.R. and D.G. are staff members of Spinreact-Toyobo
331 Group.

332 **Ethics approval:** This work was performed following the ethical guidelines of the
333 University of Vic-Central University of Catalonia. No Committee approval was
334 required.

335 **Author's contributions:** D.G., A.R. and J.B conceptualized the study, designed
336 the experiments, and wrote the manuscript. A.R. and J.F. designed, established and
337 analyzed the ELISA tests. A.R., D.W. and S.A. collected and analyzed the data

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

REFERENCES

- 348 1. Tenter, A.M., Heckerth, A.R., and Weiss, L.M., *Int. J. Parasitol.*, 2000, vol.
349 30, no. 12-13, pp. 1217-1258.
- 350 2. Jones, J., Lopez, A., and Wilson, M., *Am. Fam. Physician*, 2003, vol. 67, no. 10,
351 pp. 2131-2138.
- 352 3. Gilbert, R. and Gras, L., *BJOG*, 2003, vol. 110, no. 2, pp. 112-120.
- 353 4. Henriquez, S.A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J., and Roberts,
354 C.W., *Neuroimmunomodulation*, 2009, vol. 16, no. 2, pp. 122-133.
- 355 5. Liu, Q., Wang, Z.D., Huang, S.Y., and Zhu X.Q., *Parasit. Vectors*, 2015, vol. 8,
356 p. 292.
- 357 6. Aubert, D., Maine, G.T., Villena, I., Hunt, J.C., Howard, L., Sheu, M., et al., *J.*
358 *Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 3, pp. 1144-1150.
- 359 7. Li, S., Galvan, G., Araujo, F.G., Suzuki, Y., Remington, J.S., and Parmley,
360 S., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 5, pp. 781-787.
- 361 8. Beghetto, E., Buffolano, W., Spadoni, A., Del Pezzo, M., Di Cristina, M.,
362 Minenkova, O., et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 12, pp. 5414-5418.
- 363 9. Remington, J.S., Thulliez, P., and Montoya, J.G., *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol.
364 42, no. 3, pp. 941-945.
- 365 10. Buffolano, W., Beghetto, E., Del Pezzo, M., Spadoni, A., Di Cristina, M.,
366 Petersen, E., and Gargano, N., *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 12, pp.
367 5916-5924.
- 368 11. Holec-Gąsior, L., *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, vol. 20, no. 9, pp. 1343-1351.
- 369 12. Ching, X.T., Lau, Y.L., Fong, M.Y., and Nissapatorn V., *Parasitol. Res.*, 2013,
370 vol. 112, no.3, pp. 1229-1236.
- 371 13. Costa, J.G., Peretti, L.E., García, V.S., Peverengo, L., González, V.D.,
372 Gugliotta, L.M., et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2017, vol. 55, no. 4, pp. 595-604.

- 373 14. Parmley, S.F., Sgarlato, G.D., Mark, J., Prince, J.B., and Remington, J.S., *J.*
374 *Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, no. 5, pp. 1127-1133.
- 375 15. Huang, X., Xuan, X., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., et
376 al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002, vol. 9, no. 6, pp. 1343-1347.
- 377 16. Holec-Gąsior, L., Kur, J., and Hiszczyńska-Sawicka, E., *Clin. Vaccine*
378 *Immunol.*, 2009, vol. 16, no. 4, pp. 510-514.
- 379 17. Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H.V.,
380 Stankiewicz, M., et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 4, pp. 1779-1781.
- 381 18. Lau, Y.L., Thiruvengadam, G., Lee, W.W., and Fong, M.Y., *Parasitol. Res.*,
382 2011, vol. 109, no. 3, pp. 871-878.
- 383 19. Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L., Gong, R., and Si, J., *Clin. Vaccine*
384 *Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 3, pp. 338-342.
- 385 20. Holec-Gąsior, L., Ferra, B., and Drapała, D., *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012,
386 vol. 19, no. 12, pp. 1977-1979.
- 387 21. Holec-Gąsior, L., Ferra, B., Drapała, D., Lautenbach, D., and Kur, J., *Clin.*
388 *Vaccine Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 1, pp. 57-63.
- 389 22. Dai, J.F., Jiang, M., Qu, L.L., Sun, L., Wang, Y.Y., Gong, L.L., et al., *Exp.*
390 *Parasitol.*, 2013, vol. 133, no. 1, pp. 95-100.
- 391 23. Ferra, B., Holec-Gąsior, L., and Kur, J., *Parasitol. Res.*, 2015, vol. 114, 9, pp.
392 3291-3299.
- 393 24. Ferra, B.T., Holec-Gąsior, L., Gatkowska, J., Dziadek, B., Dzitko, K.,
394 Grąźlewska, W., and Lautenbach, D., *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 6, e0217866.
- 395 25. Lau, Y.L. and Fong, M.Y., *Exp. Parasitol.*, 2008, vol. 119, no. 3, pp. 373-378.
- 396 26. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L.A., *Nat.*
397 *Biotechnol.*, 2013, vol. 31, no. 3, pp. 233-239.

- 398 27. Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., and Yang, S., *Appl. Environ.*
399 *Microbiol.*, 2015, vol. 81, no. 7, pp. 2506-2514.
- 400 28. Tyo, K.E., Ajikumar, P.K., and Stephanopoulos, G., *Nat. Biotechnol.*, 2009,
401 vol. 27, no. 8, pp. 760-765.
- 402 29. Englaender, J.A., Jones, J.A., Cress, B.F., Kuhlman, T.E., Linhardt, R.J., and
403 Koffas, M., *ACS Synth. Biol.*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 710-720.
- 404 30. Ao, X., Yao, Y., Li, T., Yang, T.T., Dong, X., Zheng, Z.T., et al., *Front.*
405 *Microbiol.*, 2018, vol. 9, p. 2307.
- 406 31. Sun, D., Wang, L., Mao, X., Fei, M., Chen, Y., Shen, M., and Qiu,
407 J., *Biotechnol. Lett.*, 2019, vol. 41, no. 2, pp. 293-303.
- 408 32. Dillingham, M.S. and Kowalczykowski, S.C., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008,
409 vol. 72, no. 4, pp. 642-671.
- 410 33. Wang, J., Niyompanich, S., Tai, Y.S., Wang, J., Bai, W., Mahida, P., et
411 al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, vol. 82, no. 24, pp. 7176-7184.
- 412 34. Fu, J., Wenzel, S.C., Perlova, O., Wang, J., Gross, F., Tang, Z., et al., *Nucleic*
413 *Acids Res.*, 2008, vol. 36, no. 17, e113.
- 414 35. Sauer, C., Syvertsson, S., Bohorquez, L.C., Cruz, R., Harwood, C.R., van Rij,
415 T., and Hamoen, L.W., *ACS Synth. Biol.*, 2016, vol. 5, no. 9, pp. 942-947.

416
417
418
419
420
421
422
423
424

425 Table 1. Primers used in the study.

pET28_cassette_FW	aataatacctgcaggCGATCCC CGAAATTAATAC
pET28_cassette_RV	aataaatattaattaaCCATTCGCCAATCCGGATAT
sag2_FW	aaataataggatccaccaccgagaccca
sag2_RV	aaataatagaattcttacttgcccgtgagaga
gra2_FW	aaataatagaattcttactgcgaaaagtctgg
gra2_RV	aaataataggatccgaaaaggtgaacatacaccac
sag2_fusion_FW	tgggtcgcggatccaccac
sag2_fusion_RV	tgggtatgtttcacctttccctgcccgtgagagacacagg
gra2_fusion_FW	cctgtgtctctcacgggcaagggaaggtgaacatacacca
gra2_fusion_RV	cggccgcaagctcgaattc
pTargetF_lacZ_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGGTGAACGCAGGTCGCCAGgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_cadA_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGCAGGTAAGCGTCTGATCAAgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_fecA_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGTGGCGGCACAGCGGACAAgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_panD_FW	GTCCTAGGTATAAATACTAGTGATATCTGGAATGTCACCAAgttttagagctagaaatagcaag
pTargetF_RV	actagtattatacctagg
L4440	agcgagtcagtgagcgag
ampFW	aataaattCTCGAGttcaaatatgtatccgctc
ampRV	cggggtctgacgctcagtg
lacZ_FW_300	ggagaaaaccgctcgggtg

P1_lacZ	acctacgggtaacagtttctCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_lacZ	GTATTAATTT CGCGGGATCGagaaactgttaccgtaggt
P3_lacZ	ATATCCGGATTGGCGAATGGcagcggcaccgcctttcg
P4_lacZ	cgaaaggcgggtgccgctgCCATTGCGCAATCCGGATAT
lacZ_RV_300	atgctcgtgacggttaacgcc
cadA_FW_300	acactggatgtgaaatccatccac
P1_cadA	ggcaatgcaggttaagctctgatCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_cadA	GTATTAATTT CGCGGGATCGatcagacgcttacctgattgcc
P3_cadA	ATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggttctattgaacgtgcatc
P4_cadA	gatcgcacgttcaatagaaccgttGCCATTGCGCAATCCGGATAT
cadA_RV_300	ttcgtcaggatatttccac
fecA_FW_300	cccgccccttcgccccttac
P1_fecA	gatggtggcgccacagcgggaCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_fecA	GTATTAATTT CGCGGGATCGtccgctgtgccgcccaccatc
P3_fecA	CTATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggtttggcaccgcgctg
P4_fecA	cagcgggtgccaaccgttGCCATTGCGCAATCCGGATATAG
fecA_RV_300	ctggaactggttagcccaggctcg
panD_FW_1000	cgatgttcatgatttcgctc
P1_panD	agccattgatattcggatgtcacCGATCCC GCGAAATTAATAC
P2_panD	GTATTAATTT CGCGGGATCGgtgacattccagatatcaatggct

P3_panD	ATATCCGGATTGGCGAATGGcaacggcaagcgtttctccact
P4_panD	agtgagaaacgcttgcggttgCCATTGCCAATCCGGATAT
panD_RV_1000	tatatcagcgactggatgc
colonyPCR_lacZ	ggttacggccaggacagctgt
colonyPCR_cadA	gctgtaattaccaactctacctat
colonyPCR_fecA	ggcatccggggcctgaacccg
colonyPCR_panD	ttccccacgtcatctgtca
T7_terminal_RV	gctagtattgctcagcgg

426

427

428 Table 2. Loci used for genome editing with the selected *T. gondii* antigen, sgRNA
429 specific sequences, homology arm's length and the coordinates in the *E. coli* BL21
430 (DE3) genome (CP010816.1, GenBank).

<i>E. coli</i> target gene	<i>T. gondii</i> antigen	sgRNA (N ₃₀) + PAM*	Genome coordinates of break point	Homology arm's length
<i>lacZ</i>	SAG2	5'-GGTGAACGCAGGTCGCCAG <i>CGG</i> -3'	335032	300 bp
<i>cadA</i>	GRA2	5'-GCAGGTAAGCGTCTGATCAA <i>CGG</i> -3'	4233591	300 bp
<i>fecA</i>	GRA2	5'-GTGGGCGGCACAGCGACAA <i>CGG</i> -3'	4398374	300 bp
<i>panD</i>	SAG2-GRA2	5'-GATATCTGGAATGTCACCAA <i>CGG</i> -3'	149347	1000 bp
<i>panD</i> ^a	GRA2	5'-GATATCTGGAATGTCACCAA <i>CGG</i> -3'	149347	1000 bp

431 ^a: GRA2ΔpanD was performed in the SAG2ΔlacZ – edited *E. coli* BL21 (DE3) strain.

432 *Sequences in italics indicate PAM sites.

433

18

434 **Legends to figures to the paper of Redondo et al.**

435 **Fig. 1.** Elements used for genome editing. (a) - Plasmids containing the CRISPR-
436 Cas9 tools. pTarget-Amp is a modified version of the pTargetF described by Jiang
437 et al. [28]. (b) - Diagram showing the general structure for donor DNAs and the
438 target chromosome with the expected recombination regions.

439 **Fig. 2.** Genome editing flow chart. Diagram showing the sequential steps for the
440 isolation of stable genome-edited *E. coli* clones. See Results for details.

441 **Fig. 3.** Genome editing analysis. M: molecular weight markers; a: control
442 amplification of a non-edited chromosome fragment (primers fecA_FW_300,
443 fecA_RV_300); b: control amplification of a fragment of the donor DNA (primers
444 sag2_FW, sag2_RV); c: amplification of an editing-specific DNA fragment using a
445 primer that anneals to the expression cassette (pET28_cassette_RV) and a second
446 primer that anneals beyond the homology arm in the chromosome
447 (colonyPCR_lacZ).

448 **Fig. 4.** Stability of the edited clones. SAG2-GRA2 Δ panD edited BL21 (DE3) cells
449 were grown in three subsequent overnight cultures in the absence of any selection
450 and then plated in agar plates. Ten individual colonies (1-10) were analyzed by
451 colony PCR. M: molecular weight markers. NC: non-edited BL21 (DE3) colony
452 used as a negative control. Primer pair: colonyPCR_panD, T7_terminal_RV.

453 **Fig. 5.** Recombinant *T. gondii* protein production. Bacteria transformed with pET-
454 28a encoding the different *Toxoplasma* proteins (lanes 1-4) or edited strains
455 bearing the corresponding expression cassettes in their chromosome (lanes 5-9)
456 were lysed, the corresponding recombinant proteins purified by chromatography,
457 separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using an anti-His antibody.
458 Lanes 1 and 5 correspond to SAG2 (5 integrated in *lacZ*); lanes 2, 6 and 7
459 correspond to GRA2 (6 integrated in *cadA* and 7 integrated in *fecA*); 3 and 8
460 correspond to a mix of 1+2 for lane 3 and extract from a double edited strain that

461 produces both SAG2 (in *lacZ*) and GRA2 (in *panD*) for lane 8; lanes 4 and 9
462 contain the fusion protein SAG2-GRA2, in lane 9 produced from the locus *panD*.

463 **Fig. 6.** Functionality of the produced recombinant proteins. ELISA test. Data were
464 normalized to either glutathione S-transferase produced and purified from *E. coli*
465 or BSA and correspond to mean \pm standard deviations. 1- goat; 2 – pool+; 3 –
466 pool-.

467

468

469

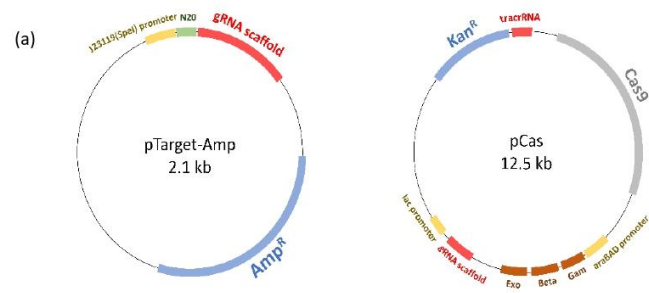
470

471

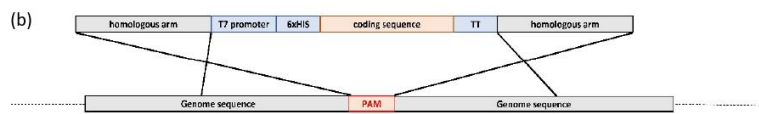
472

473

474



475



476

477 **Fig. 1.**

478

479

480

481

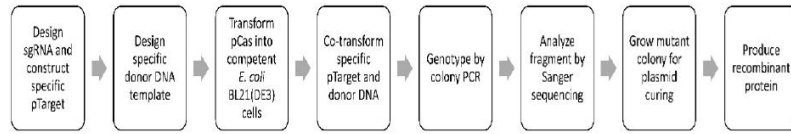
482

483

484

485

486



487

488 **Fig. 2.**

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

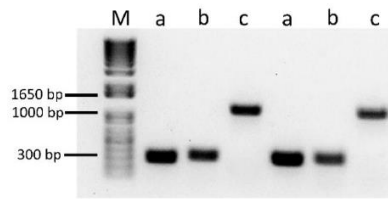
499

500

501

502

503



504

505 **Fig. 3.**

506

507

508

509

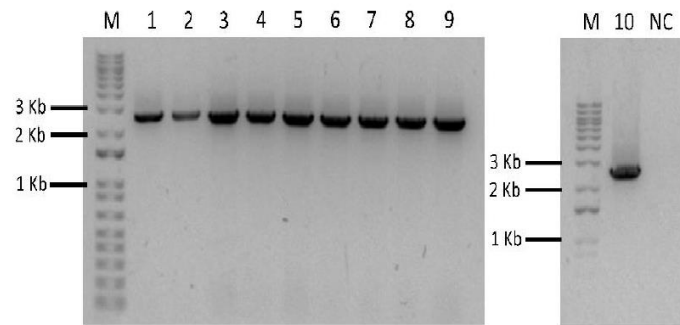
510

511

512

513

514



515

516 **Fig. 4.**

517

518

519

520

521

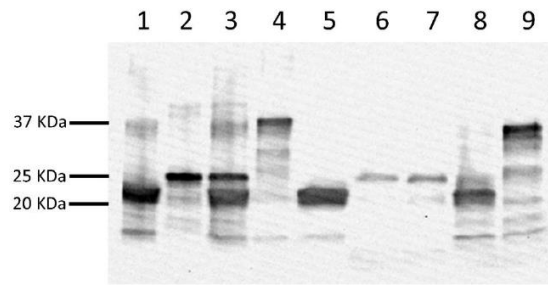
522

523

524

525

526



527

528

529 **Fig. 5.**

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

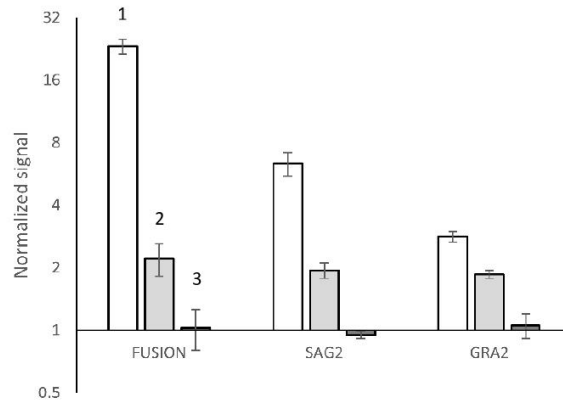
551

552

553

554

555 **Fig. 6.**



AGRAÏMENTS

Primer de tot, m'agradaria agrair a en Dani Goti, a en Joan Bertran i a l'Elisabet Marti per donar-me l'oportunitat de treballar en aquest projecte de Doctorat Industrial entre l'empresa Spinreact i la Universitat de Vic – Universitat Central de Catalunya.

Vull agrair especialment la tasca del meu director de tesi, Joan Bertran, per la seva dedicació i aportació científica al llarg d'aquest treball. Sempre disponible i aportant idees per que aquest projecte sortís endavant, gràcies Joan.

Vull agrair també a en Dani Goti, cap del departament de Recerca i Desenvolupament de Spinreact durant els anys de realització d'aquest Doctorat Industrial. Gràcies per ser tan proper, per la teva confiança i per haver-me guiat durant aquests anys, sense la teva ajuda no hauria estat possible aquesta tesi.

Gràcies als treballadors del departament de Recerca i Desenvolupament de Spinreact, Vanessa, Bet, Albert i Ana, pel vostre suport constant, la vostra alegria i el bon rotllo que han estat tan necessaris.

També m'agradaria donar les gràcies a tots els que han treballat com a tècnics de laboratori de la Facultat de Ciències i Tecnologia durant aquests anys. Especialment a la Montse, com a responsable de laboratoris, a la Cristina i a la Serena, pel vostre tracte proper sempre que he necessitat ajuda i per assegurar-vos que tots els equips i tot el material estiguessin a punt.

Agrair també als estudiants de doctorat del Centre BETA la vostra ajuda, els consells i les recomanacions sobre el doctorat.

Un agraïment molt especial per en Dan Wood i la Sofia Amaral. Les vostres estades en el laboratori no només han ajudat a tirar molts dels experiments endavant sinó

que també heu aportat humor, amabilitat i intel·ligència al dia a dia. Espero haver-vos ajudat en la vostra formació tant com vosaltres ho heu fet en la meua. La nostra amistat a dins i a fora del laboratori ha estat una de les coses més positives d'aquests tres anys.

I per últim, però no menys important, gràcies a la meua família i als meus amics. La vostra confiança en mi m'ha fet donar el millor de mi mateix durant tots els meus estudis. Un agraïment molt especial per la Cristina, per haver suportat el meu caràcter en moments de nervis durant aquesta tesi i per fer-me feliç sempre que ha pogut. Sé que no hauria estat el mateix sense tu.