



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

Expresión y caracterización bioquímica de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. Daniel Juárez López

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROMINA MARÍA DE LA PAZ RODRIGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. PATRICIA GOROCICA ROSETE
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

Expresión y caracterización bioquímica de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. Daniel Juárez López

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROMINA MARÍA DE LA PAZ RODRIGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. PATRICIA GOROCICA ROSETE
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de junio del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **DANIEL JUÁREZ LÓPEZ** con número de cuenta **513023802** con la tesis titulada **"Expresión y caracterización bioquímica de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris*"** realizada bajo la dirección de la **DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ**:

Presidente: Dra. Yolanda López Vidal
Vocal: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete
Secretaria: Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
Suplente: Dr. José Federico del Río Portilla
Suplente: Dr. Octavio Loera Corral

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de septiembre del 2015.

M. del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

🔗 *Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México*

🔗 *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. de becario 288329, Proyectos de CONACyT 220795, 178528, 181895. Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-208415; IN-209113, IN-210013. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-036 (a cargo de la Dra. Valdez Cruz), así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán) del Departamento de Biotecnología y Biología Molecular. Particularmente, recibí apoyo del proyecto DAGAPA-IN208415, contribuyendo en la clonación y expresión de antígenos recombinantes, y para la participación en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, así como también fui acreedor de la beca Valdez-Trujillo como apoyo en la finalización y escritura de este proyecto.*

🔗 *A mi tutora:*

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz

Por la asesoría, consejos y tiempo otorgados durante la realización de mi proyecto de tesis

🔗 *A los miembros del Comité Tutorial:*

Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja

y

Dra. Patricia Gorocica Rosete

Por las valiosas aportaciones, consejos y enseñanzas que fueron brindadas en todo momento. Los cuales fueron de gran importancia para la culminación de éste proyecto.

Agradecimientos Personales

- 🔗 Al Dr. Alejandro Alagón (IBT-UNAM) por facilitarme su laboratorio y equipo para la realización de éste proyecto.*
- 🔗 Al M. en C. Alejandro Olvera (IBT-UNAM) por la ayuda técnica en el desarrollo de éste proyecto.*
- 🔗 A la Dra. Clarita Olvera (IBT-UNAM), por el apoyo en las clonaciones realizadas y el tiempo dedicado al proyecto.*
- 🔗 Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB-UAEM), por la donación de las cepas utilizadas en éste proyecto.*
- 🔗 Al Ing. Abel Blancas (IIB-UNAM) por la ayuda técnica en la realización de las cinéticas de cultivo en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.*

A mi Papá, a mi Mamá, al Juan y a la Mariah!

A todos mis compañeros de laboratorio, por que son los mejores que he tenido. Gracias!!!

Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán, por permitirme trabajar en su laboratorio y en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Por todos esos consejos de bioingeniería, los ratos de aprendizaje y de risas. Gracias Mau!

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, por la dirección de éste trabajo, por brindarme un espacio en su laboratorio y dejarme ser parte de su equipo de investigación, por todo el apoyo que me ofrece, por que sigo aprendiendo de ella, y la considero más que una Tutora; una Amiga y Colega. Gracias Adri!

Ésta Tesis se la dedico a la Cony...
...quien sigue estando a mi lado en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | i |
| RESUMEN | iv |
| ABSTRACT | v |
| 1. INTRODUCCIÓN | 01 |
| 1.1. La tuberculosis pulmonar; problema mundial | 01 |
| 1.2. Etapas de infección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 03 |
| 1.3. Antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 05 |
| 2. ANTECEDENTES | 08 |
| 2.1. Antígeno inmunodominante AI; actividad antigénica/inmunogénica | 09 |
| 2.2. Sistemas de expresión: <i>Pichia pastoris</i> como herramienta para expresar el antígeno recombinante (AR) glicosilado | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. HIPÓTESIS | 21 |
| 5. OBJETIVOS | 21 |
| 5.1. General | 21 |
| 5.2. Específicos | 21 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 6.1. Secuencia del antígeno inmunodominante | 22 |
| 6.2. Material biológico | 22 |
| 6.3. Construcción de pAJVT y transformación de <i>E. coli</i> | 23 |
| 6.4. Transformación de <i>P. pastoris</i> con el plásmido pAJVT | 24 |
| 6.5. Cinética de crecimiento e inducción de <i>P. pastoris</i> -AJVT | 25 |
| 6.6. Electroforesis en gel desnaturalizante y Western Blot | 26 |
| 6.7. Purificación del AR en columna de Concanavalina-A y HPLC | 27 |
| 6.8. SDS-PAGE bidimensional y Western Blot del AR purificado | 28 |
| 6.9. Espectrometría de masas del AR | 28 |
| 7. RESULTADOS | 30 |
| 7.1. Diseño de AJVT | 30 |
| 7.2. Diseño de la construcción del plásmido pPICZB α con la secuencia AJVT | 31 |
| 7.3. Construcción del plásmido pAJVT y transformación de <i>E. coli</i> | 32 |
| 7.4. Transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con el plásmido pAJVT | 34 |
| 7.5. Crecimiento de <i>P. pastoris</i> C6 y C12, e inducción para la producción del AR | 36 |
| 7.6. Electroforesis en gel desnaturalizante y Western Blot del AR | 39 |
| 7.7. Purificación del AR en columna de Concanavalina-A | 42 |
| 7.8. Purificación del AR por HPLC-fase reversa | 43 |
| 7.9. SDS-PAGE bidimensional del AR purificado | 44 |
| 7.10. Espectrometría de masas del AR | 45 |

| | |
|-------------------------|----|
| 8. DISCUSIÓN | 49 |
| 9. CONCLUSIONES | 57 |
| 10. PERSPECTIVAS | 59 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| 12. ANEXOS | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Imagen de microscopio electrónico del bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , agente causante de la tuberculosis a nivel mundial. | 01 |
| Figura 2. Forma de transmisión del bacilo <i>M. tuberculosis</i> de un paciente enfermo a uno sano vía aérea | 01 |
| Figura 3. Incidencia de la Tb pulmonar a nivel mundial..... | 02 |
| Figura 4. Reconocimiento y fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> | 03 |
| Figura 5. Progresión de la infección por <i>M. tuberculosis</i> en los pulmones, en la formación de tubérculos..... | 04 |
| Figura 6. El sitio consenso de O-glicosilación generado a partir de glicoproteínas presentes en <i>M. tuberculosis</i> resaltan la presencia de residuos hidrofóbicos como prolinas y alaninas, con algunos residuos hidrofílicos alrededor del residuo glicosilado treonina o serina (Carril 16). Asimismo, la presencia de O-glicosilaciones se favorece en la región carboxilo terminal como se indica con cuadros negros..... | 06 |
| Figura 7. Comparación de la habilidad de AIs nativos y recombinantes para estimular la proliferación de linfocitos T <i>in vitro</i> provenientes de cobayos inmunizados con BCG. Cultivo filtrado de <i>M. tuberculosis</i> (●). AI purificado de <i>M. tuberculosis</i> (▽). <i>M. bovis</i> (△) o BCG (◇). AI expresado en <i>M. smegmatis</i> (□) o en <i>E. coli</i> (○)..... | 10 |
| Figura 8. Porcentaje de proliferación de linfocitos totales inducido por el AI de <i>M. tuberculosis</i> y el AI producido en <i>S. lividans</i> y <i>E. coli</i> . La concentración de AI utilizado fue 0, 1, 10 y 25 µg..... | 12 |
| Figura 9. Morfología micelial de <i>S. lividans</i> en cultivo de matraz agitado vista bajo el microscopio a 10X..... | 13 |
| Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de la levadura <i>P. pastoris</i> | 14 |
| Figura 11. Representación ilustrativa de la O-glicosilación en <i>P. pastoris</i> . El diagrama representa los eventos de la O-glicosilación que se llevan a cabo en la ruta secretoria de <i>P. pastoris</i> . Posterior a la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico, un residuo de manosa se transfiere a una serina o treonina por el donador Dol-P-Man a través de una manosiltransferasa (PMT). Subsecuentemente, en el aparato de Golgi, prosigue la elongación de éstas manosas por una combinación de α-, β- o fosfo-manosiltransferasas. Las manosas están representadas por círculos verdes..... | 17 |
| Figura 12. Mapa AJVT de 891 pb optimizado y sitios de restricción diseñado en el programa de edición de secuencias Gene Designer 2.0 y SnapGene 2.7.2..... | 30 |
| Figura 13. Mapa del plásmido pAJVT (4427 pb), generado a partir del plásmido pPICZBα inducible por metanol (AOX1), resistencia a Zeocina (BleoR) y el péptido señal de secreción factor-α. La secuencia AJVT se muestra en rojo. Los oligos utilizados en éste trabajo 5' AOX, 3'AOX, y 3'AR se muestran en rosa | 31 |

Figura 14. Digestión de plásmidos pPICZBα y pUC57-AJVT. Carril 1: Marcador de 1 kb (Life Technologies). Carril 2: pPICZBα digerido con Pst I. Carril 3: pPICZBα digerido con KpnI. Carril 5: pUC57-AJVT digerido con Pst I. Carriles 7,8 y 9: pUC57-AJVT digerido con Kpn I. Carril 10: Control sin DNA..... 32

Figura 15. Amplicones provenientes de colonias transformantes de *E. coli* One Shot® Top10 con pAJVT usando los oligos 5 y 3' AOX. Carril 1: Marcador de 1 kb (Life Technologies). Carril 2, 3, 4, 5, y 6: Amplicón de las colonias 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. Carril 7: Control plásmido pPICZBα. 33

Figura 16. Colonias de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pAJVT en medio selectivo YPDS/Zeocina (200 µg/mL), a 30 °C, después de 10 días 34

Figura 17. Amplicones de 2 colonias de *P. pastoris* transformadas con el plásmido pAJVT. Carril 1 y 2: amplicones obtenidos usando los oligos 5 y 3' AOX de 1423 pb de dos colonias transformantes (denominadas C6 y C12) obtenidas en medio YPDS/Zeocina. Carril 3: Control utilizando como templado plásmido pAJVT. Carril 4: Control sin DNA 34

Figura 18. Curvas de crecimiento de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar. a) Curva de crecimiento a escala lineal y b) Curva de crecimiento a escala logarítmica. La cepa ST se utilizó como control..... 36

Figura 19. Curvas de crecimiento de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar. La adición de metanol 1% se realizó a las 0, 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h. a) Curva de crecimiento a escala lineal. b) Curva de crecimiento a escala logarítmica. La cepa ST se utilizó como control..... 37

Figura 20. Acumulación de biomasa determinada en peso seco de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆) durante 66 h de cultivo en medio BMMY. Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar..... 38

Figura 21. Acumulación de proteína total producida en sobrenadante BMMY de las colonias C6 (■), C12 (▲) y ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar. 38

Figura 22. SDS-PAGE de proteína de los sobrenadante colectados en diferentes tiempos de las cinéticas de la segunda etapa de cultivo de las colonias C6 (a), C12 (b), y sin transformar ST (c). En cada gel se cargó el mismo volumen colectado de cada cinética realizadas en medio BMMY con metanol al 1%. La toma de muestra se realizó a las 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h de cultivo como se indica en cada carril. d) Acumulación de proteína de sobrenadante a las 24 h de cultivo en medio BMGY (sin inducir) con glicerol, carril 1-2 colonia C6, carril 3-4 colonia C12, carril 5-6 colonia ST. Como control se utilizó 1 µg de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*. Flecha: proteína de interés. 39

Figura 23. Inmunodetección Western Blot de acumulación de proteína de sobrenadante durante la cinética de cultivo de la colonia *P. pastoris* C6 con el anticuerpo monoclonal Mab 6A3. En el ensayo se utilizó el mismo volumen. La toma de muestra se realizó a las 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h de cultivo como se indica en cada carril con 83 µL de sobrenadante. Como control se utilizó 8 µg de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*..... 41

Figura 24. a) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunodetección (b) de las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad Con-A/Sefarosa. Carriles 1 y 2: Primer y décimo lavado respectivamente. Carril 3: Primera fracción eluida con 10 µg de proteína recombinante. Carriles 4 y 5: Segunda y tercera fracción del AR eluida de la columna de afinidad Con-A/Sefarosa. Carril 6: Proteína de sobrenadante no unida a Con-A. Como control se utilizó 1 µg de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*..... 42

Figura 25. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa del sobrenadante de medio de cultivo BMMY de la colonia C6 inducido con metanol y colectado a las 66 h. Se usó una columna C18 High Bar de 250 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm. El componente de importancia (marcado con una flecha) presentó un tiempo de retención de 59 min eluyendo con 49% de acetonitrilo (línea negra). Línea rosa absorbancia a 220 nm. Línea azul absorbancia a 280 nm 43

Figura 26. Electroforesis bidimensional IEF/2D del AR purificado por HPLC en fase reversa. a) El AR fue separado de acuerdo a su punto isoeléctrico en tiras de IPG (Bio-Rad) pH 4-7 (10 cm) y posteriormente en una segunda dimensión de acuerdo a su peso molecular en un gel SDS-PAGE al 12%. b) Western blot del antígeno recombinante utilizando el Mab 6A3 44

Figura 27. Espectro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH) en la región correspondiente a las unidades de masa atómica del péptido P8 que corresponde a la región C-terminal del AR. El P8 se conforma por 48 aa con un peso teórico calculado de 4,622.497 Da 46

Figura 28. Espectro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH y Applied Biosystems) del AR digerido con Lys-C. a) Péptido P1 de 107 aa, b) Péptido P2 de 28 aa. c) Péptido P3 de 11 aa. d) Péptido P4 de 43 aa, péptido P5+P6 de 49 aa y péptido P6 de 40 aa. e) Péptido P7+P8 de 52 aa 47

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Producción de proteínas recombinantes utilizando <i>P. pastoris</i> y rendimientos | 15 |
| Tabla 2. Etapas de la fermentación de <i>P. pastoris</i> para la producción de proteínas recombinantes | 15 |
| Tabla 3. Comparación de la concentración de biomasa máxima alcanzada y velocidad específica de crecimiento de las cepas de <i>P. pastoris</i> cultivadas en dos medios con diferente fuente de carbono..... | 37 |
| Tabla 4. Rendimientos obtenidos y productividad volumétrica de AR en <i>P. pastoris</i> | 40 |
| Tabla 5. Péptidos teóricos de la digestión del antígeno recombinante con Lys-C..... | 45 |
| Tabla 6. Péptidos identificados y secuenciados en análisis de espectrometría de masas del AR..... | 48 |
| Tabla 7. Manosilaciones del antígeno producido en diferentes hospederos | 54 |
| Tabla 8. Antígenos expresados en <i>Pichia pastoris</i> | 56 |

ABREVIATURAS

| | | |
|--------------------|-------|--|
| α | | Alfa |
| β | | Beta |
| $^{\circ}\text{C}$ | | Grados centígrados |
| μ | | Velocidad específica de crecimiento |
| μg | | Microgramos |
| μL | | Microlitro |
| μm | | Micrómetro |
| aa | | Aminoácido |
| AOX | | Alcohol Oxidasa |
| AI | | Antígeno inmunodominante |
| AR | | Antígeno recombinante |
| a.u | | Unidades de absorbancia |
| BCG | | Bacillus Calmette-Guerin |
| BMGY | | Medio con glicerol |
| BMMY | | Medio con metanol |
| ^{13}C | | Carbono 13 |
| ^{14}C | | Carbono 14 |
| C6 | | Colonia 6 |
| C12 | | Colonia 12 |
| CHAPS | | 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato |
| CID | | Collision-induced dissociation |
| col | | Colaboradores |
| Con-A | | Concanavalina A |
| C-terminal | | Carboxilo terminal |
| Da | | Daltones |
| DTT | | Ditiotreitol |
| DNA | | Ácido desoxirribonucleico |
| D.O | | Densidad óptica |
| DTH | | Delayed Type Hypersensitibity |
| ELISA | | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| <i>et al.</i> | | et alii (y otros) |
| ETD | | Electron-Transfer Dissociation |
| FDA | | Food and Drug Administration |
| g | | Gramos |
| h | | Hora/Horas |
| H ₂ O | | Agua |
| HCD | | Higher-energy collisional dissociation |
| HCl | | Ácido clorhídrico |
| HPAEC | | High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled |
| HPLC | | High Performance Liquid Chromatography |
| HRP | | Horseradish Peroxidase |
| Hz | | Hertz |
| IEF | | Isoelectroenfoque |
| IFN- γ | | Interferon gamma |
| IgG | | Inmunoglobulina G |
| IL-2 | | Interleucina 2 |
| kb | | Kilobases |
| kDa | | Kilo-daltones |
| L | | Litro |
| LB | | Luria Bertani |
| Lys-C | | Proteasa Lisina C |
| M | | Molar |
| Mab | | Anticuerpo Monoclonal |
| MALDI-TOF | | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight |

| | |
|---------------|---|
| Man | Manosa |
| mg | Miligramo |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| m/z | masa/carga |
| nm | Nanómetros |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| No | Número |
| N-terminal | Amino terminal |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAGE | Poliacrylamide Gel Electrophoresis |
| PPD | Prueba de la tuberculina |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la Polimerasa |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PI | Punto isoeléctrico |
| PM | Peso molecular |
| PT | Proteína total |
| PVDF | Fluoruro de polivinilideno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Sodio Duodecil Sulfato |
| Seg | Segundos |
| SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| spp | Especies |
| SSA | Secretaría de Salud |
| St | Sin transformar |
| TAE | Buffer Tris Acetatos |
| Tb | Tuberculosis |
| TBS | Buffer Tris Salino |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alpha |
| tRNA | Ácido ribonucleico de transferencia |
| UA | Unidades de absorbancia |
| UDP-N | Uridin difosfato N-acetilglucosamina |
| UFC | Unidad formadora de colonia |
| u.m.a | Unidades de masa atómica |
| V | Voltios |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| V/V | Volumen/Volumen |
| WHO | World Health Organization |
| W/V | Peso/Volumen |
| Xaa | Cualquier aminoácido |
| YPDS | Medio levadura, peptona, dextrosa y sorbitol |

Aminoácidos

| | |
|-----------------------|---|
| Alanina | A |
| Arginina | R |
| Asparagina | N |
| Acido Aspártico | D |
| Cisteina | C |
| Glutamina | Q |
| Acido Glutámico | E |
| Glicina | G |
| Histidina..... | H |
| Isoleucina | I |
| Leucina | L |
| Lisina | K |
| Metionina | M |
| Fenilalanina | F |
| Prolina | P |
| Serina | S |
| Treonina | T |
| Triptófano | W |
| Tirosina..... | Y |
| Valina | V |

Bases (DNA)

| | |
|---------------|---|
| Adenina..... | A |
| Guanina | G |
| Citosina..... | C |
| Timina | T |

RESUMEN

La Tuberculosis pulmonar es una epidemia global causada por el agente patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Un tercio de la población mundial está infectado por ésta bacteria; sin embargo, no todos desarrollan la enfermedad activa. Usualmente, la progresión de la enfermedad activa está correlacionada a padecimientos, tal como la diabetes, desnutrición, VIH, alcoholismo, etc. En el 2012 se registraron a nivel mundial 9 millones de nuevas infecciones y 1.4 millones de muertes por complicaciones de la enfermedad. La vacuna actual BCG protege contra la infección de un 0 a 80% de los casos, asimismo, la prueba de la tuberculina o PPD para diagnosticar pacientes con tuberculosis genera falsos positivos y/o negativos debido a la presencia de otras micobacterias inocuas del ambiente. La utilización de antígenos producidos por *M. tuberculosis* capaces de elicitar una respuesta inmune ofrece la opción de desarrollar nuevos métodos de prevención y diagnóstico oportuno. En éste trabajo, se llevó a cabo la producción de un antígeno glicosilado e inmunodominante secretado por *M. tuberculosis* en la levadura de expresión *P. pastoris*. La incorporación del gen del antígeno en la levadura se realizó mediante un vector inducible por metanol generando el plásmido pAJVT. La producción del antígeno se llevó a cabo en medio BMMY cuya inducción se realizó con metanol. El antígeno fue separado por cromatografía en gel del sobrenadante y detectado mediante inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal. Posteriormente, el antígeno recombinante (AR) se purificó a partir del sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa y fue identificado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los análisis de densitometría en SDS-PAGE de proteína del sobrenadante mostraron que el AR representa aproximadamente 44% del total, con una producción de $\sim 177 \text{ mgL}^{-1}$ del antígeno recombinante. Adicionalmente, el análisis por MALDI-TOF mostró que la proteína recombinante se encuentra modificada en el N-terminal con 2, 11, 12, 13 y 14 manosas, mientras el C-terminal se encontró con 0 y hasta con 10 residuos de manosas. El uso del sistema de expresión en la levadura *P. pastoris* permitió la producción de un antígeno inmunodominante glicosilado de *M. tuberculosis*, mostrando la utilidad de éste sistema para producir antígenos similares.

ABSTRACT

Pulmonary tuberculosis is a global health concern caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. About one third of the global population is infected with this bacterium, although the disease progression to the active phase is influenced by factors such as diabetes, malnutrition, HIV, alcoholism, among others. In 2012, 9 million new infections were reported globally and 1.5 deceased due to complications. Actual vaccine BCG confers protection against the initial pulmonary infection with effectiveness from 0 to 80%, in the same way, tuberculin diagnosis or PPD commonly used to diagnose patients, generates false positive/negative, this caused in some part by other non-infective mycobacteria in the environment, resulting in inespecific reactivity. The utilization of antigens produced by *M. tuberculosis* with the capacity to elicit an immune response offers alternatives to develop new technologies implicated in prevention methods as well as opportune diagnosis. In this work, the production and expression of an immunodominant glycosylated antigen secreted by *M. tuberculosis* was accomplished in the yeast expression system *P. pastoris*. Incorporation of the codifying sequence into a methanol induced vector generated the plasmid pAJVT. The antigen production was assayed in culture media BMMY using transformant colonies of *P. pastoris* with pAJVT and induced with methanol. The antigen was separated by gel chromatography, immunodetected using a monoclonal antibody and by mass spectrometry (MALDI-TOF) of purified recombinant antigen by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). Densitometric analysis performed on SDS-PAGE showed that production of protein corresponds to approximately 44% of the total protein secreted, and a production of recombinant antigen of $\sim 177 \text{ mgL}^{-1}$. The analysis performed of the recombinant antigen in MALDI-TOF showed modification in the N-terminal with 2, 11, 12, 13, and 14 possible manoses, likewise, in the C-terminal from 0 and up 10 manoses. The utilization of the yeast *P. pastoris* to produce, express and glycosylate the immunodominant antigen from *M. tuberculosis* denoted the usefulness of this system to produce this type of antigens in a recombinant way.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La tuberculosis pulmonar; problema mundial

La Tuberculosis pulmonar (Tb) es una enfermedad infecciosa sistémica causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1) que afecta al sistema respiratorio.



Figura 1. Imagen de microscopio electrónico del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, agente causante de la tuberculosis a nivel mundial. Tomado de: Centers for Disease Control and Prevention CDC Atlanta GA. www.cdc.gov.

Ésta enfermedad se transmite solamente por vía aérea de un paciente enfermo con Tb pulmonar o laríngea que lo propaga en partículas o pequeñas gotas aéreas que se secretan al toser, estornudar o hablar (www.cdc.gov). Las partículas o gotas pueden permanecer suspendidas en el aire durante horas y la transmisión ocurre cuando otra persona inhala estas gotas conteniendo el bacilo, a través de la boca o fosas nasales hasta alcanzar el tracto respiratorio, bronquios, y finalmente, los alveolos de los pulmones (Figura 2).

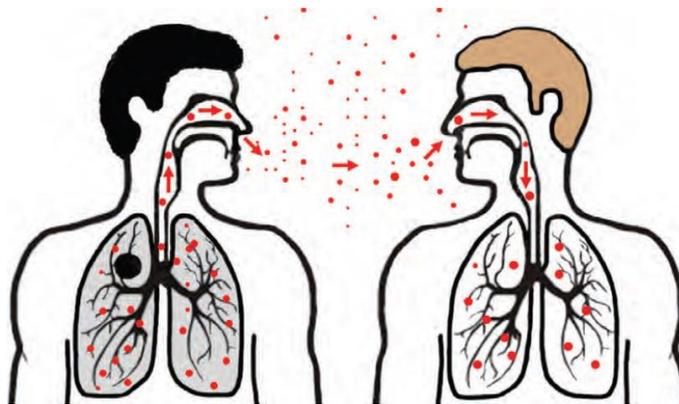


Figura 2. Forma de transmisión del bacilo *M. tuberculosis* de un paciente enfermo a uno sano vía aérea.

La tuberculosis, aún, es problema de salud a nivel mundial (Da silva y Palomino, 2011), ya que afecta principalmente a adultos jóvenes en edad productiva. Se estima que el 95% de los casos de Tb se presentan en países en vías de desarrollo y es la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso después del SIDA (WHO 2008, 2012).

La Organización Mundial de la Salud reporta que 8.8 millones de personas enfermaron de Tb en el 2011, y 1.4 millones fallecieron a consecuencia de la enfermedad (OMS, 2012). La distribución de la Tb pulmonar es global, siendo los países con más incidencia los del África Subsahariana, en donde se estiman más de 270 personas infectadas por cada 100 mil habitantes (Figura 3). En México, se estima alrededor de 14 personas infectadas con Tb por cada 100 mil habitantes. Frecuentemente la Tb se asocia a otros factores, siendo la Diabetes *mellitus*, la desnutrición, el alcoholismo, y el VIH/SIDA los principales agravantes de la enfermedad (SSA, 2009).

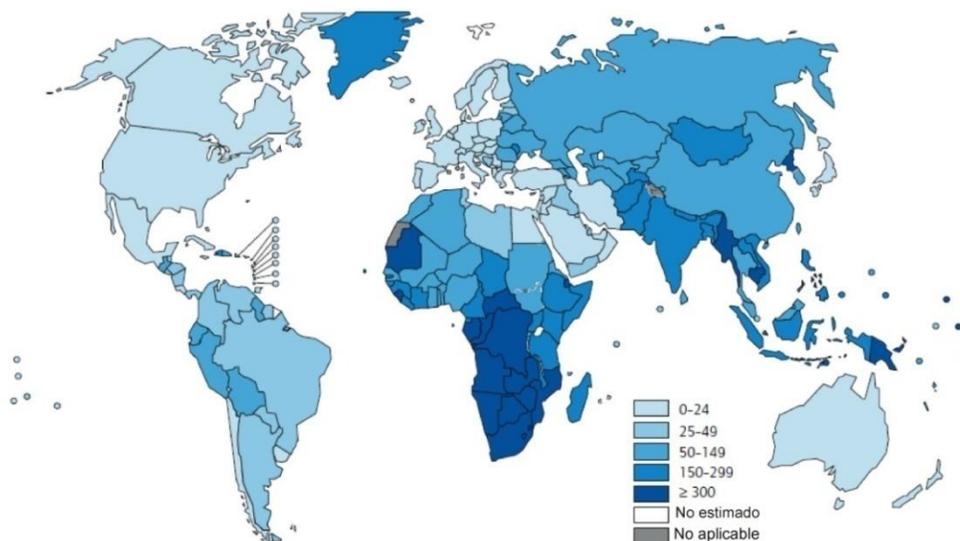


Figura 3. Incidencia de la Tb pulmonar a nivel mundial. Tomado de: WHO Global Tuberculosis Report 2012.

La bacteria *M. tuberculosis* es aerobia de forma bacilar, perteneciente al orden de los Actinomycetales, y puede permanecer en estado latente en el organismo por tiempo indefinido (van Crevel *et al.*, 2002). Este bacilo presenta resistencia a antibióticos por mecanismos intrínsecos tal como la baja permeabilidad de la pared celular, debido a

que está constituido principalmente por ácidos micólicos hidrofóbicos que llega a conformar ~50% de su peso seco (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, Gorocica *et al.*, 2005). Por otra parte, la transferencia horizontal mediante plásmidos, transposones o integrones, conlleva a la aparición de nuevas cepas multirresistentes a antibióticos clave en el tratamiento contra infecciones como la rifampicina y la isoniazida (Da Silva y Palomino, 2011, OMS, 2012), por lo que el desarrollo de nuevos métodos para controlar, identificar y disminuir esta afección es de interés mundial (Gatfield y PierTERS, 2003).

1.2. Etapas de infección de *Mycobacterium tuberculosis*

Se han descrito 4 etapas de infección de *M. tuberculosis*, donde el principal blanco del bacilo son los macrófagos alveolares. Durante la primera etapa sucede el reconocimiento bacilar por parte de las células del hospedero. El reconocimiento e interacción bacilo-macrófono se da inicialmente entre componentes de la pared celular (Figura 4), mediante receptores tipo Toll, NOD, y lectinas tipo C (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, Ragas *et al.*, 2007). Después de este reconocimiento, ocurre la fagocitosis del bacilo y la formación de fagosomas encargados de eliminar la bacteria y presentar los antígenos para activar linfocitos T (van Crevel *et al.*, 2002).

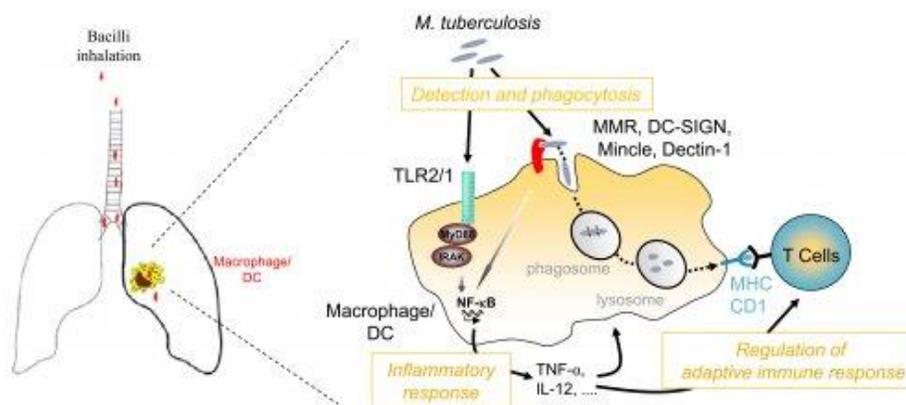


Figura 4. Reconocimiento y fagocitosis de *M. tuberculosis*.

Los macrófagos eliminan a *M. tuberculosis* utilizando diferentes mecanismos como la activación de linfocitos T, producción de oxígeno reactivo y especies de nitrógeno, acidificación del fagosoma y fusión del fagosoma con lisosomas (Kleinnijenhuis *et al.*,

2011). Sin embargo, una vez que *M. tuberculosis* ha sido fagocitado por los macrófagos, este puede evadir su destrucción mediante mecanismos fisiológicos como la presencia de una pared celular gruesa de ácidos micólicos, lipomanosas, lipoarabinomanosas y mano-glicoproteínas, que le dan resistencia contra enzimas lisosomales. Lo anterior puede llevarse a cabo en un lapso de entre 4 y 6 semanas de la primera exposición al bacilo (Centers for Disease Control and Prevention, cdc.gov). Después, *M. tuberculosis* empieza a replicarse, lo que ocasiona que los macrófagos mueran (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 2001, Lurie 1964).

La segunda etapa consiste en la acumulación de monocitos y las células inflamatorias a los pulmones. Los monocitos se diferencian en macrófagos que vuelven a fagocitar a los bacilos, pero sin destruirlos y *M. tuberculosis* empieza a replicarse de forma logarítmica. Los macrófagos se empiezan a acumular formando tubérculos (Figura 5). Existe poco daño tisular y la inmunidad mediada por los linfocitos T se activa para tratar de eliminar a las micobacterias (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, van Crevel *et al.*, 2002, Lurie 1964).

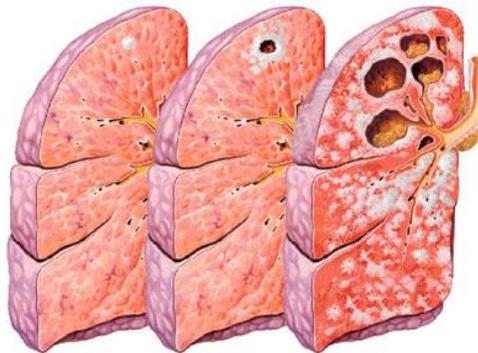


Figura 5. Progresión de la infección por *M. tuberculosis* en los pulmones, en la formación de tubérculos. Tomado de: humanorgans.org/tuberculosis.

La tercera etapa conlleva un cese del crecimiento logarítmico y ocurre una necrosis central sólida en las lesiones primarias, lo que impide que el bacilo se multiplique de forma extracelular. La infección se puede volver latente o progresar de forma lenta durante los siguientes meses o años después de la primera etapa (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, van Crevel *et al.*, 2002, Lurie 1964).

La formación de cavidades en forma de tuberculos, como se observa en la Figura 5, puede llevar a la ruptura de bronquios cercanos, permitiendo la dispersión de bacilos a través del sistema respiratorio, a otras partes de los pulmones, y hacia el medio ambiente. La cuarta etapa final de la infección depende del balance entre el crecimiento y la inhibición del bacilo por defensas del hospedero, así como la extensión de la necrosis tisular, fibrosis, la regeneración de tejido, y la condición del sistema inmune del paciente afectado (van Crevel *et al.*, 2002). Lo anterior se ve reflejado en una serie de síntomas en el paciente como tos persistente por más de tres semanas, sangre y flema en el esputo, fatiga, debilidad, pérdida de peso, fiebre, escalofríos, sudoraciones nocturnas, entre otros. El tratamiento contra la tuberculosis incluye la administración de isoniazida, rifampicina, ethambutol y pyrazinamida, que en ocasiones resulta ineficiente por la aparición de cepas multirresistentes (Centers for Disease Control and Prevention, cdc.gov).

1.3. Antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*

Los antígenos son proteínas, polisacáridos o alguna molécula que puede formar parte de un organismo, que tiene la capacidad de desencadenar una reacción antigénica o inmune en otro organismo. Algunos antígenos descritos para *M. tuberculosis* son 85A, 85B, 85C (Ronning *et al.*, 2004), ESAT-6, CFP-10 (Hemmati *et al.*, 2011), PirG, PE-PGRS, PTRP, MtrA (Singh *et al.*, 2001), EspB, LprG, PstS1, MPT83, CFP21 entre otros (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010, Romain *et al.*, 1993a).

Se han realizado estudios dinámicos utilizando microarreglos con 4099 sondas proteicas de *M. tuberculosis*, donde se analizó el suero de 561 pacientes, 254 con Tb activa y 307 con enfermedad no tuberculosa para evaluar la respuesta de unión de anticuerpos del suero al proteoma de la bacteria. Los resultados mostraron que el 0.5% del proteoma de *M. tuberculosis* se compone de antígenos que son reconocidos con una alta frecuencia durante la infección activa de la Tb. Entre estos antígenos se ubican glicoproteínas, lipoproteínas y proteínas secretadas de diferentes pesos moleculares (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010).

Se han identificado 13 glicoproteínas producidas y secretadas por *M. tuberculosis* mediante técnicas combinadas de espectrometría de masas (Smith *et al.*, 2014), entre ellas CID (collision induced dissociation), HCD (high energy collision dissociation) y ETD (electron transfer dissociation) con el fin de identificar los residuos glicosilados y validarlo mediante diferentes técnicas.

Se generó un motivo o “motif” para predecir la O-glicosilación a partir del consenso de las 13 glicoproteínas identificadas secretadas por *M. tuberculosis*. En este se destaca la presencia de residuos hidrofóbicos como la prolina y la alanina alrededor de los residuos manosilados, los cuales se presenta mayoritariamente en treoninas con un 60% y serinas con un 40%. (Smith *et al.*, 2014).



Figura 6. El sitio consenso de O-glicosilación generado a partir de glicoproteínas presentes en *M. tuberculosis* resaltan la presencia de residuos hidrofóbicos como prolinas y alaninas, con algunos residuos hidrofílicos alrededor del residuo glicosilado treonina o serina (Carril 16). Asimismo, la presencia de O-glicosilaciones se favorece en la región carboxilo terminal como se indica con cuadros negros. Tomado de: Smith *et al.*, 2014.

Entre las 13 glicoproteínas analizadas por Smith y col. (2014) se identificó a un antígeno inmunodominante (AI). Éste mismo antígeno AI, fue identificado previamente en el sobrenadante de medio de cultivo Sauton de *Mycobacterium bovis* BCG por Romain y col. (1993a). El procedimiento de purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico y fase reversa, posteriormente, se realizaron geles de electroforesis en 2 dimensiones e inmunoensayos. Para cada purificación, se realizaron pruebas inmunogénicas, encontrando así una fracción que solo interaccionaba con los anticuerpos obtenidos del

suero de cobayos inmunizados previamente con micobacterias vivas, mas no así con micobacterias muertas. De acuerdo a ensayos de ELISA, se reportó una concentración de moléculas reaccionantes de aproximadamente 2% en extracto crudo de BCG vivo, y menos del 0.001% con micobacterias muertas (Romain *et al.*, 1993a).

Romain y col. (1993b) reportaron la respuesta a la hipersensibilidad retardada (DTH) utilizando el antígeno inmunodominante purificado del medio de cultivo de BCG en dos poblaciones de cobayos, una población previamente inmunizada con BCG vivos y la otra población inmunizada con BCG muertos. La respuesta DTH se genera como respuesta a diversos antígenos cuando el organismo es nuevamente expuesto al mismo antígeno, desarrollando una lesión visible por la infiltración de linfocitos T CD8⁺, CD4⁺ y macrófagos, y que aparece cuando los antígenos entran en contacto con la dermis. El resultado es una marca visible en la epidermis, y se determina midiendo el diámetro de la lesión en milímetros. En este mismo estudio, los cobayos inmunizados con BCG vivas presentaron una reacción DTH (15 mm de diámetro) con 0.2 µg de antígeno inmunodominante purificado, mientras que los cobayos inmunizados con BCG muertos requieren hasta 2 µg (diez veces mas) de antígeno inmunodominante para igualar la reacción DTH de 15 mm. Lo anterior indica que el antígeno inmunodominante se encuentra mayoritariamente en BCG vivos, y no en BCG muertos (Romain *et al.*, 1993b).

En los ensayos de Romain y col. (1993 a,b), se pudo observar que otros antígenos presentes en el medio de cultivo de BCG son capaces de interaccionar con anticuerpos en el suero de pacientes con Tb y con otras enfermedades. Sin embargo, el antígeno AI no presenta este tipo de interacción cruzada y solo reacciona con el suero de aquellos pacientes con Tb. Cabe destacar que el AI es producido por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y el BCG (Nandakumar *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

El AI es una adhesina de superficie y secreción de *M. tuberculosis*. Tiene un punto isoeléctrico de 4.5, y un peso molecular de 28 kDa aunque migra de manera aberrante debido a la alta cantidad de prolinas, localizándose entre 45-47 kDa en geles SDS-PAGE. Este AI participa en el reconocimiento por lectinas de tipo C de los macrófagos y se ha reportado que puede actuar como un mediador para la colonización de células como parte de la primera etapa de reconocimiento en la infección. Incluso, se ha propuesto que además, el AI secretado puede interactuar como un accesorio tipo carnada para inactivar aquellos receptores reconocedores de patógenos involucrados en la captura de patógenos invasores (Ragas *et al.*, 2007). Por otra parte, también estimula la proliferación de linfocitos T, por lo que se presume tiene la potencialidad para ser usado en el mejoramiento de vacunas contra la Tb existentes o para el desarrollo de pruebas de diagnóstico (Kumar *et al.*, 2003).

Con la finalidad de secuenciar, clonar y expresar heterológamente al AI, se han llevado a cabo experimentos desde 1995. Por ejemplo Laqueyrie y col. (1995) observaron que los anticuerpos producidos por Romain y col. (1993 a, b) reconocían los antígenos presentes en el medio de cultivo de *M. tuberculosis*, por lo que decidieron expresar los complejos inmunodominantes en *Mycobacterium smegmatis* mediante cósmidos generando una genoteca. Las clonas de *M. smegmatis* que resultaron productoras del AI fueron identificados por ELISA y posteriormente estos cósmidos se subclonaron en cepas de *E. coli* NM554 para aislar la secuencia nucleotídica del AI (Laqueyrie *et al.*, 1995).

La producción del AI se encontró en el medio de cultivo de *M. smegmatis* similar al producido por BCG. Mientras que en *E. coli* solo se encontró de forma intracelular. La secuencia del antígeno indicó que una parte de la secuencia consiste en un péptido señal de 39 aminoácidos solamente reconocido por las micobacterias y que además este antígeno está compuesto con un alto porcentaje de prolinas (21.7%) y alaninas (18.5%) con un peso molecular de 28 kDa. Sin embargo, por la alta cantidad de

prolinas, el antígeno inmunodominante migra de forma irregular en un par de bandas localizadas alrededor de 45-47 kDa en geles SDS-PAGE (Laqueyrie *et al.*, 1995).

Se determinó así, que el AI está conformado por 325 aminoácidos (UniProtKB/Swiss), y es considerada una de las moléculas de *M. tuberculosis* con mayor actividad antigénica (Horn *et al.*, 1999). La primera evidencia de glicosilación del AI se obtuvo por Dobos y col. (1995) y, posteriormente, se reportó una definición completa de los aminoácidos que se encontraban glicosilados (Dobos *et al.*, 1996). Los ensayos con glucosa marcada radiactivamente (^{14}C) e hidrólisis de los azúcares del AI demostraron la presencia de manosas (Dobos *et al.*, 1995).

En el mismo sentido, el tratamiento con manosidasas del AI y la digestión con subtilisina o tripsina y posteriormente analizados mediante espectrometría de masas, mostró residuos modificados en las treoninas 10, 18 y 27 en el N-terminal, con dos manosas adheridas en cada residuo, y en la treonina 277 del C-terminal con 1, 2 ó 3 manosas covalentemente unidas mediante enlaces α -1,2 (Dobos *et al.*, 1996).

2.1. Antígeno inmunodominante AI; actividad antigénica/inmunogénica

Una de las características más importantes del antígeno AI cuando está glicosilado, es la capacidad de activar una respuesta antigénica en cobayos y en humanos (Romain *et al.*, 1993a, 1993b, 1999). Además, se evaluó el reconocimiento de la Inmunoglobulina G (IgG) del AI en ensayos de inmunoblot utilizando el suero de pacientes diagnosticados como positivos y/o negativos en el test de la PPD (Diagbouga *et al.*, 1997). Para determinar la interacción del antígeno con el suero de los pacientes se inmovilizó 0.25 μg del antígeno en membranas de nitrocelulosa y se incubó con el suero diluido 1:200 en TBS, y se detectó con un anticuerpo anti-Human IgG (Diagbouga *et al.*, 1997). La especificidad reportada fue del 98% para diferenciar pacientes sanos o previamente infectados contra pacientes con infección activa utilizando el suero, aunque también reportan una sensibilidad del 40% (Diagbouga *et al.*, 1997), por lo que se sugiere utilizarla junto con otras proteínas antigénicas de *M.*

tuberculosis para aumentar la sensibilidad en este tipo de pruebas (Diagbouga *et al.*, 1997, Sable *et al.*, 2011).

El grado de O-manosilación del AI se ha relacionado con la capacidad de inducir respuesta antigénica *in vivo* o *in vitro*, pues al tratar al antígeno con manosidasas y ver la reacción DTH en la epidermis de cobayos y la proliferación de linfocitos T *in vitro* se pudo observar que el AI desglucosilado tiene una eficacia de 30 a 50 veces menor que el AI glicosilado (Romain *et al.*, 1999). Por otra parte, los cambios en el patrón de manosilación también influyen en la respuesta inmune, por ejemplo, se demostró que el AI expresado en *E. coli* (no glicosilado) provoca la disminución de la proliferación de linfocitos T provenientes de cobayos vacunados previamente (28 días) con BCG en alrededor del 90%, comparado con el efecto del AI nativo de *M. tuberculosis* (Figura 7). El AI expresado en *M. smegmatis* que se encuentra O-glicosilado, diferencialmente con respecto al control, disminuyó alrededor de 60% en comparación con la respuesta de proliferación causada por AI de *M. tuberculosis* (Horn *et al.*, 1999).

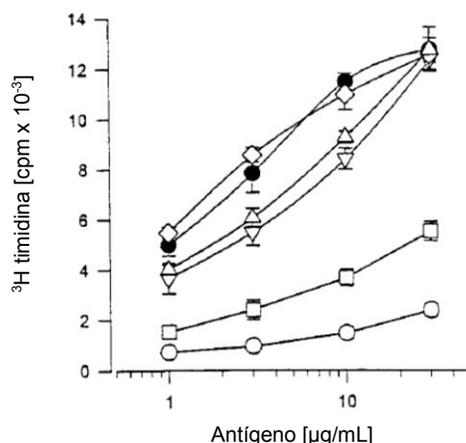


Figura 7. Comparación de la habilidad de AI's nativos y recombinantes para estimular la proliferación de linfocitos T *in vitro* provenientes de cobayos inmunizados con BCG. Cultivo filtrado de *M. tuberculosis* (●). AI purificado de *M. tuberculosis* (▽). *M. bovis* (△) o BCG (◇). AI expresado en *M. smegmatis* (□) o en *E. coli* (○). Tomado de: Horn *et al.*, 1999.

La Figura 7 indica que los cambios en la O-manosilación, así como probablemente el sitio de la modificación y el número de manosas, podrían afectar la respuesta de proliferación de linfocitos T y por lo tanto es un factor determinante en las propiedades de los antígenos (Nandakumar *et al.*, 2013, Horn *et al.*, 1999.).

Recientemente se reportó que la O-manosilación del AI es crucial para su antigenicidad, ya que mediante citometría de flujo se determinó *in vitro* el aumento de la proliferación de linfocitos T utilizando el AI nativo glicosilado (de *M. tuberculosis*) contra el AR sin glicosilar producido en *E. coli*, utilizando células mononucleares de sangre periférica proveniente de 24 pacientes sanos vacunados con BCG y no vacunados (Nandakumar *et al.*, 2013). La proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ de estos 24 individuos vacunados previamente con BCG, se observó mayoritariamente con el AI nativo en un 70.8% de los casos, mientras que solo se observó 12.5% de proliferación con el AI expresado en *E. coli* (Nandakumar *et al.*, 2013). Posteriormente, realizaron inmunoensayos en ratones previamente infectados con *M. tuberculosis* y BCG para medir la estimulación en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ provenientes de pulmón, bazo y nódulos linfáticos, encontrando así que el AI nativo induce hasta 8.6 veces más la producción de linfocitos T CD4⁺ comparada con el AI expresado en *E. coli* sin glicosilar, demostrando una vez más que la proteína glicosilada es un antígeno reconocido por receptores de linfocitos T CD4⁺ (Nandakumar *et al.*, 2013).

Otro modelo utilizado para la expresión, secreción y glicosilación del AI fue *Streptomyces lividans*, organismo procariótico Gram-positivo, de crecimiento micelial no patógeno (Lara *et al.*, 2004). Esta bacteria tiene la habilidad de O-manosilar proteínas homólogas (Kluepfel *et al.*, 1990) y heterólogas (McLeod *et al.*, 1992) además de pertenecer al orden de los Actinomycetales al igual que las micobacterias, lo cual lo hace un hospedero ideal para expresar y secretar este tipo de proteínas.

Datos no publicados (Martínez-Sotelo, 2012, Tesis de Maestría de C. Bioquímicas, UNAM) demostraron el aumento en la proliferación de linfocitos T de hasta un 50% mayor usando el AI producido en *S. lividans* y comparado contra el AI nativo usando una concentración de 25 µg de proteína (Figura 8). Por lo que se vuelve interesante comparar otros sistemas de producción del AI para evaluar la proliferación de linfocitos T y la respuesta inmune en cobayos.

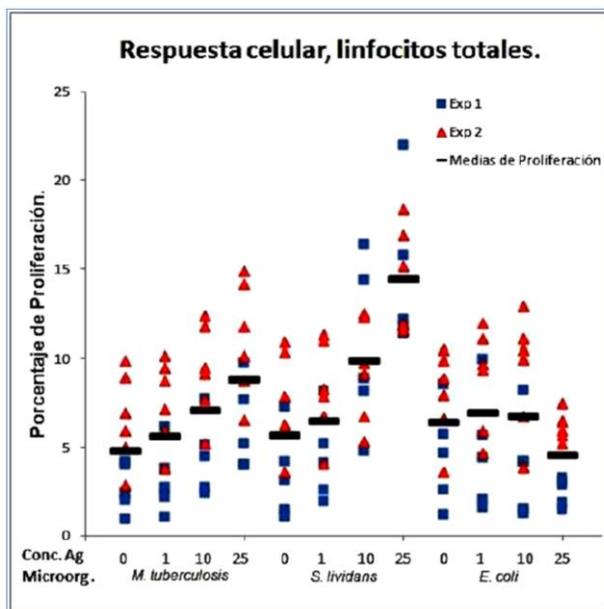


Figura 8. Porcentaje de proliferación de linfocitos totales inducido por el AI nativo de *M. tuberculosis* y el AI producido en *S. lividans* y *E. coli*. La concentración de AI utilizado fue 0, 1, 10 y 25 µg. Tomado de: Tesis Martínez-Sotelo, 2012.

2.2. Sistemas de expresión: *Pichia pastoris* como herramienta para expresar el antígeno recombinante (AR) glicosilado

La producción y purificación de antígenos en *M. tuberculosis* es compleja pues las muestras procesadas así como los subproductos de la misma deben ser manejados en laboratorios de bioseguridad nivel 3 con personal altamente capacitado. El personal encargado de procesar cultivos de *M. tuberculosis* tiene hasta 3 veces más probabilidad de infectarse, pues los aerosoles producidos durante los cultivos son altamente infecciosos (Center for Disease Control and Prevention, cdc.gov). Además, los cultivos de micobacterias duran alrededor de 30 días y utilizan medios complejos.

Se ha reportado que, al igual que *Mycobacterium* spp, las bacterias como *S. lividans* pueden O-glicosilar proteínas (Dobos *et al.*, 1996; Lara *et al* 2004; Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011). Sin embargo, la producción del antígeno en *S. lividans* presenta desventajas como la variabilidad en el inóculo para iniciar su producción, ya que se requieren de esporas transformadas que tienen que ser preparadas lote a lote. Esto causa variabilidad al inicio de los cultivos. Además, el microorganismo tiene tiempos de duplicación lentos (~6 h), alta producción de proteasas y su crecimiento filamentoso representa un problema de difusión tanto de nutrientes como del oxígeno al interior de los agregados que se forman como se observa en la Figura 9 (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).

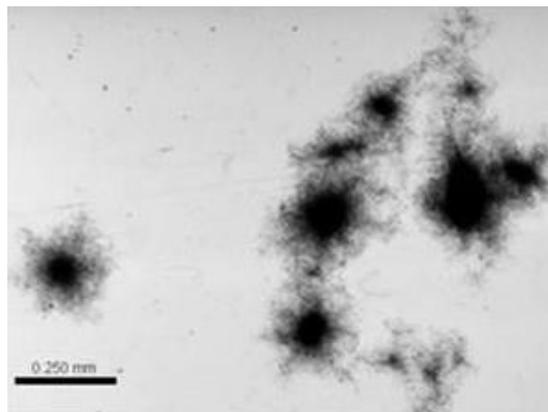


Figura 9. Morfología micelial de *S. lividans* en cultivo de matraz agitado vista bajo el microscopio a 10X. Tomado de: Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011.

Particularmente, en este sistema bacteriano la producción de proteínas recombinantes secretada es menor al 10% de proteína total del sobrenadante, comparada con sistemas como el de levaduras en el que se han obtenido hasta el 30% de proteínas recombinantes de proteína total del sobrenadante (Tschopp *et al.*, 1987, Koutz *et al.*, 1989, Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Las levaduras son capaces de producir y modificar proteínas recombinantes heterológicamente bajo un esquema eucariótico y mediante procesos que usan medios de cultivos sencillos. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Figura 10) ha sido utilizada para la producción de proteínas recombinantes, debido a que puede ser manipulada fácilmente. Crece en medios de cultivos sencillos y económicos tal como en medio basal de sales, realiza modificaciones postraduccionales y algunas construcciones presentan una alta producción de proteína recombinante de hasta 12 gL⁻¹ (Lin-Cereghino *et al.*, 2008, Clare *et al.*, 1991).

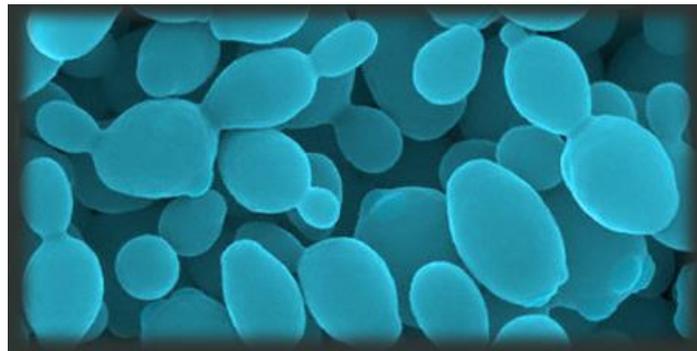


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de la levadura *P. pastoris*. Tomado de: Pichia.com.

Hasta ahora, existen más de 600 productos reportados en donde se ha utilizado el promotor inducible por metanol AOX1 (Tschopp *et al.*, 1987, Zhang *et al.*, 2009). Los bioprocesos además tienen la ventaja de que pueden llegar a alcanzar cultivos de alta densidad de hasta ~50 D.O._{600 nm} en cultivo de matraz agitado (Villatte *et al.*, 2001) y de ~320 D.O._{600 nm} en biorreactor de lote alimentado (Lei *et al.*, 2012). En cuanto a la productividad, se han reportado valores de proteína recombinante en *P. pastoris* usando diferentes estrategias de cultivo como se compara en la Tabla 1.

Tabla 1. Producción de proteínas recombinantes utilizando *P. pastoris* y rendimientos.

| Proteína | Bioproceso | PV (g/Lh) | Referencia |
|--|-----------------|-----------|------------------------------------|
| Pertactin (P69) | Lote alimentado | 0.06 | Romanos <i>et al.</i> , 1991 |
| IgG1 | Lote alimentado | 0.008 | Potgieter 2010 |
| Phytasa AppA | Lote alimentado | 0.03 | Chen <i>et al.</i> , 2004 |
| Aqualisina I | / | 0.02 | Oledzka <i>et al.</i> , 2003 |
| Lipasa B (CALB²) | Lote alimentado | 0.007 | Jahic <i>et al.</i> , 2003 |
| Lipasa/Acetiltransferasa 3.1.1.3 | Lote alimentado | 0.05 | Brunel <i>et al.</i> , 2004 |
| GSP | Lote continuo | 0.008 | Yan <i>et al.</i> , 2003 |
| Xylanase XynA | Lote alimentado | 0.04 | Fan <i>et al.</i> , 2012 |
| rhIL-2-HAS | Lote alimentado | 0.004 | Lei <i>et al.</i> , 2012 |
| TrCBH2 | | 0.07 | |
| TrbMan | Lote alimentado | 0.01 | Mellitzer <i>et al.</i> , 2012 |
| TIXynA | | 0.01 | |
| α-amilase | Lote alimentado | 0.02 | Paifer <i>et al.</i> , 1994 |
| Antigen Bm95 | Lote alimentado | 0.03 | Garcia-Garcia <i>et al.</i> , 2000 |
| Human bikunin | Lote alimentado | 0.004 | Gou <i>et al.</i> , 2012 |
| Staphylococcal protein A (SPA) | / | 0.12 | Hao <i>et al.</i> , 2013 |
| B-Defensina 2 (porcina) | Lote alimentado | 0.03 | Peng <i>et al.</i> , 2013 |
| AfCel2A Endoglucanasa | Lote alimentado | 0.05 | Várnai <i>et al.</i> , 2014 |
| Cadena α1(III) Colágeno | Lote alimentado | 0.1 | Li <i>et al.</i> , 2015 |

PV: Productividad volumétrica

El tipo de fermentación más utilizado y reportado para este hospedero es el de lote alimentado y usualmente se rige por 4 fases o etapas fermentativas anotadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Etapas de la fermentación de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes. Adaptado de: Zhang *et al.*, 2000.

| Fase/etapa | Descripción |
|------------|---|
| 1 | Crecimiento en medio definido utilizando glicerol como fuente única de carbono. |
| 2 | Incremento de biomasa alimentando glicerol. |
| 3 | Adaptación del cultivo con baja concentración de metanol. |
| 4 | Inducción de expresión de proteína incrementando la cantidad de metanol alimentado. |

La levadura *P. pastoris* es un organismo eucariótico capaz de realizar modificaciones en proteínas homólogas y heterólogas tal como la *N*-glicosilación del grupo amino del residuo asparagina cuando se encuentra dentro del consenso N-Xaa-T/S y la O-

glicosilación del grupo hidroxilo del residuo treonina y/o serina sin necesidad de un sitio consenso como tal. Aunque se ha observado que la presencia de una prolina en la posición -1 del sitio de glicosilación influye fuertemente para ser O-glicosilada (Bretthauer y Castellino, 1999, Gemmil y Trimble, 1999).

En *Sacharomyces cerevisiae* se han reportado 7 genes (Pmt 1-7) que codifican para las O-manosiltransferasas, que aunque son redundantes, se sugiere que estos poseen diferentes sustratos proteicos específicos. Además, la delección de alguno de estos genes en mutantes reduce el número de cadenas de oligosacáridos unidos a la proteína, mas no así la longitud de las mismas (Girrbach y Strahl 2003). En *P. pastoris*, al igual que en *C. albicans*, se han reportado 5 genes que codifican para manosiltransferasas: Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 y Pmt6 homólogos a los de *S. cerevisiae*. Las enzimas Pmt1 y Pmt2, se han propuesto como las responsables por la O-glicosilación, a partir de experimentos con *P. pastoris* donde se deletaron los genes codificantes para las mismas (Prill *et al.*, 2005, Nett *et al.*, 2013).

La vía de O-glicosilación varía en levaduras y mamíferos. En levaduras, la O-manosilación se inicia en el retículo endoplásmico utilizando la Manosil-P-Dolicol como el donador de los glicanos, mientras que en mamíferos se inicia en el aparato de Golgi utilizando UDP-N acetil galactosamina como el donador de glicanos (Gemmill y Trimble 1999). Por lo general, las levaduras no agregan ácidos siálicos terminales a los glicanos; sin embargo, usan el fosfato, ácido glucorónico o el piruvato para impartir cargas negativas (Jigami y Odani, 1998), o acidificar la proteína, aunque la función de estas cargas no está del todo elucidada (Fukazawa *et al.*, 1995).

Se ha observado que en las levaduras se adhieren solamente manosas o galactosas a proteínas nacientes, y estas manosas contienen fosfatos diesterificados unidos por el carbón-1 de una manosa a otra manosa en la cadena lateral del oligosacárido, con algunas excepciones (Jigami y Odani, 1998). Otra de las características importantes es que *P. pastoris* no posee manosiltransferasas que realicen enlaces α -1,3, lo cual es muy deseable pues se ha demostrado que este tipo de enlaces son alergénicos en

humanos (Bretahuer y Castellino 2009). En *P. pastoris* se agregan manosas que se unen con enlaces α -1,2, los cuales pueden o no estar modificados con fosfomanosas terminales, como se observa en la Figura 11 (Hamilton *et al.*, 2013, Nett *et al.*, 2013).

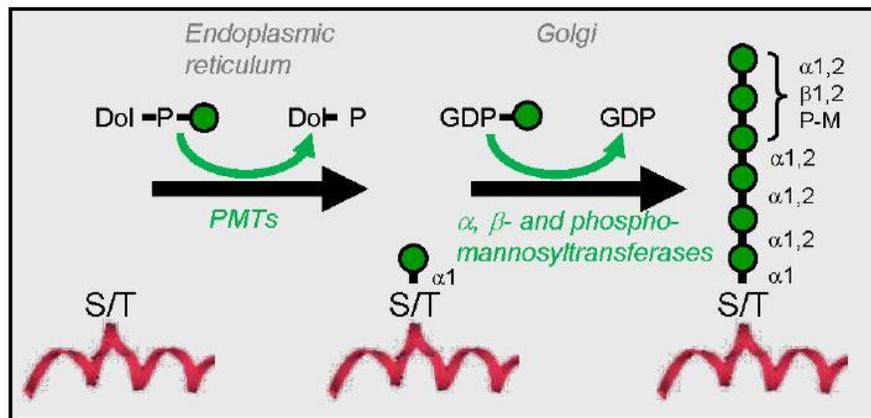


Figura 11. Representación ilustrativa de la O-glicosilación en *P. pastoris*. El diagrama representa los eventos de la O-glicosilación que se llevan a cabo en la ruta secretoria de *P. pastoris*. Posterior a la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico, un residuo de manosa se transfiere a una serina o treonina por el donador Dol-P-Man a través de una manosiltransferasa (PMT). Subsecuentemente, en el aparato de Golgi, prosigue la elongación de estas manosas por una combinación de α -, β - o fosfo-manosiltransferasas. Las manosas están representadas por círculos verdes. Tomado de: Nett *et al.*, 2013.

Usualmente, la longitud de manosas adheridas a las glicoproteínas expresadas en *P. pastoris* no exceden de 6 residuos de glicanos, siendo la mayoría di- ó tri-manosas como lo sugieren Lommel y Strahl (2009). Por ejemplo, se expresó heterológamente la proteína plasminógeno humana en *P. pastoris* y ésta demostró estar O-glicosilada por cadenas cortas de hasta 5 residuos de manosas cuando se ensayó mediante β -eliminación alcalina e hidrazinolisis y analizada por cromatografía de intercambio aniónico (Duman *et al.*, 1998). Interesantemente, Duman y col. (1998) determinaron el tipo de enlaces entre los residuos de manosas utilizando α -1,2 y α -1,3 manosidasas y concluyeron que los enlaces entre manosas se componen de enlaces α -1,2 pues no se detectaron glicanos libres cuando se ensayó con α -1,3 manosidasas (Duman *et al.*, 1998). En el mismo sentido se reportó la ausencia de enlaces α -1,3 en *P. pastoris* (Trimble *et al.*, 1991), así como la ausencia de actividad manosiltransferasa α -1,3 en ensayos con membrana de organelos en la misma levadura (Verostek y Trimble 1995).

Los datos reportados sugieren que la levadura *P. pastoris* puede producir proteínas heterólogas de *M. tuberculosis* usando un esquema genético optimizado y modificado. Las proteínas heterólogas producidas contendrán modificaciones postraduccionales como la O-manosilación con sacáridos de cadena corta unidos por enlaces α -1,2 y con lo que es posible que presenten actividad antigénica e inmunogénica en ensayos de proliferación con linfocitos T de forma similar a los producidos por *M. tuberculosis*.

3. JUSTIFICACIÓN

La Tuberculosis es un problema de salud de carácter mundial por lo que urgen nuevas formas de diagnóstico y tratamiento (WHO 2012).

Entre los antígenos producidos por *M. tuberculosis* se encuentra AI glicosilado, que induce una respuesta inmune vía Linfocitos T y DTH en cobayos (Romain *et al.*, 1993). El antígeno AI posee 4 glicosilaciones de tipo manosa en residuos de treonina, 3 en el N-terminal y 1 en el C-terminal, y se sugiere que son determinantes en su antigenicidad (Romain *et al.*, 1999). Además, tiene la potencialidad de utilizarse en el diseño de una prueba diagnóstico como el de la PPD, en la fabricación de una vacuna o en el mejoramiento de vacunas existentes.

Dicho antígeno producido en diferentes organismos como *E. coli*, *S. lividans*, *M. bovis*, BCG y *M. smegmatis*, estimulan diferencialmente la proliferación *in vitro* de linfocitos T comparado con el AI nativo de *M. tuberculosis*, según el número o patrón de manosas que contengan (Martinez-Sotelo 2012, Lara *et al.*, 2004, Horn *et al.*, 1999). Aunado a que el tratamiento con manosidasas del AI nativo, inhibe su capacidad linfoproliferativa *in vitro* e *in vivo* (Horn *et al.*, 1999). Lo que sugiere que el patrón de glicosilación y la cepa de expresión determinan la actividad del AI.

La producción y purificación del AI en *M. tuberculosis* para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas no es un proceso ventajoso debido a que su crecimiento es lento y debe ser realizado en laboratorios de bioseguridad nivel III. Se ha optado por la producción del AI de forma recombinante en otras cepas tal como en *S. lividans* y *E. coli*, pero, los bioprocesos enfrentan problemas de productividad y actividad del AI recombinante. En *S. lividans* la producción es compleja por la variabilidad de los inóculos que contienen esporas que deben prepararse lote a lote, y se reporta una productividad de 5 mg/L del antígeno recombinante después de 36 h de inducción. Por otro lado, la producción en *E. coli* es inconveniente ya que esta bacteria no realiza las modificaciones

postraduccionales necesarias para obtener este antígeno de forma similar al AI nativo de *M. tuberculosis*.

Por lo anterior, se plantea la necesidad de producir el AI recombinante biotecnológicamente viable en un sistema eucariótico de fácil manejo y crecimiento, por lo que se propuso utilizar *P. pastoris* que es un sistema de expresión de proteínas recombinantes ampliamente utilizado, donde se han alcanzado productividades de hasta 12 gL⁻¹ de proteína recombinante secretada, realiza O-manosilaciones mediante enlaces α -1,2, presenta baja producción y/o secreción de proteasas, e inducible por metanol (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Las glicofomas del AI recombinante producidas se utilizarán para continuar ensayos inmunológicos con aplicaciones biomédicas.

4. HIPÓTESIS

La cepa de expresión *Pichia pastoris* produce el antígeno inmunodominante (AI) de forma recombinante, con O-manosilaciones en la región C-terminal, similar al AI nativo de *Mycobacterium tuberculosis*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Expresar y caracterizar al antígeno inmunodominante (AI) de *M. tuberculosis* en la levadura *Pichia pastoris*.

5.2. Específicos

1. Obtener clonas de *P. pastoris* productoras del AI recombinante
2. Expresar y purificar el AI recombinante del sobrenadante de medio de cultivo de las clonas *P. pastoris*-AJVT.
3. Identificar las O-manosilaciones del C-terminal del AI recombinante.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Secuencia del antígeno inmunodominante AI

La secuencia del gen que codifica para el AI se obtuvo de la base de datos Gene Bank (ID 885896). Las subsecuentes modificaciones se implementaron utilizando el software Gene Designer 2.0. Se agregaron los sitios de restricción Mly I y Pst I en el extremo 5' y los sitios Kpn I, Sac II y Nae I en el extremo 3' precedido por dos codones de paro.

Se simuló el corte e inserción de la secuencia optimizada dentro del vector pPICZB α (Invitrogen™, donado por la Dra. Clarita Olvera) utilizando los programas de edición de secuencias Gene Designer 2.0 y SnapGene® 2.7.1 para corroborar que el marco de lectura se mantuviera abierto.

La construcción nucleotídica AJVT, que contiene la secuencia optimizada del AI (denominada ahora como antígeno recombinante o AR) se obtuvo por síntesis química en la empresa GenScript USA Inc. (NJ, Piscataway) inserta en el plásmido de propagación pUC57 con resistencia a ampicilina.

6.2. Material Biológico

Se utilizó la cepa quimiocompetente *E. coli* One Shot® Top10 Invitrogen™, para la transformación, propagación y purificación de los plásmidos pPICZB α (Invitrogen™), pUC57-AJVT (GenScript USA Inc.) y pAJVT (este trabajo), así como la cepa de expresión *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen™, donada por el Dr. Jorge Folch) para las transformaciones con el vector codificante pAJVT.

Las transformaciones de *E. coli* One Shot® Top10 se realizaron por choque térmico de acuerdo al protocolo de Invitrogen. De las transformantes resultantes, se obtuvieron colonias aisladas en medio LB sólido con antibiótico (Ampicilina para pUC57-AJVT o

Zeocina para pPICZB α y pAJVT y se corroboró la presencia de los plásmidos por PCR para cada caso.

Los bancos de trabajo se prepararon para cada cepa transformada de *E. coli* o *P. pastoris*. Primero se dejó crecer una colonia transformante en matraz con medio LB o YPD respectivamente adicionado con el antibiótico correspondiente. Se incubó *E. coli* a 37 °C y *P. pastoris* a 30 °C, ambos con 200 rpm toda la noche (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Posteriormente, se prepararon crioviales con 800 μ L del cultivo y 200 μ L de glicerol al 80% estéril y se congelaron a -80 °C. En todos los casos se confirmó viabilidad de las células al mes de haberse almacenado.

6.3. Construcción de pAJVT y transformación de *E. coli*

Se transformó *E. coli* One Shot[®] Top10 con los plásmidos pPICZB α y pUC57-AJVT y se purificaron utilizando el kit Zyppy[™] Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Posteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción Pst I y Kpn I (Jena Bioscience). Una vez realizada la doble digestión, pPICZB α se incubó con fosfatasa alcalina FastAP (Thermo Scientific) y los productos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a 100 V. Posteriormente, las bandas se visualizaron con bromuro de etidio (Sigma Aldrich) en un fotodocumentador Gel Doc[™] EZ Imager (Bio-Rad). La banda correspondiente al fragmento AJVT se escindió y se purificó con el kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc.).

Para la reacción de ligación y construcción de pAJVT, se utilizó el plásmido pPICZB α doblemente digerido y desfosfatado, el inserto AJVT purificado del gel y la ligasa T4 DNA (Thermo Scientific). La reacción se incubó toda la noche a 4 °C. La ligación se confirmó mediante PCR en un termociclador (Gene Mate[®]) utilizando los oligonucleótidos 5' AOX (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) y 3' AOX (GCAAATGGCAT TCTGACATCC) y luego se procedió a transformar *E. coli* One Shot[®] Top10 con la reacción de ligación.

Se obtuvieron 15 colonias positivas y estas se inocularon en medio líquido y sólido LB/Zeocina (25 µg/mL). Se realizó una PCR de 5 de las colonias aisladas con los oligonucleótidos 5' AOX y otro oligonucleótido que se diseñó e hibrida dentro de la secuencia del inserto, denominada 3'AR (GCGCTATTCAGATCCTCTTCT). Se optó por purificar el amplicón de la colonia 3 del gel y este se secuenció para confirmar el inserto dentro del marco de lectura abierto.

Las condiciones de PCR utilizadas en las amplificaciones fueron:

| | |
|-----------|----------------|
| 1 ciclo | 95 °C X 5 min |
| 30 ciclos | 95 °C X 30 seg |
| | 62 °C X 45 seg |
| | 72 °C X 90 seg |
| 1 ciclo | 72 °C X 10 min |

6.4. Transformación de *P. pastoris* con el plásmido pAJVT

Se aisló el plásmido de *E. coli*-pAJVT mediante el kit comercial Zyppy Plasmid Miniprep™ y posteriormente este se linearizó con la enzima de restricción Sac I (Thermo Scientific) por 3 h a 37 °C. La transformación se realizó mediante electroporación con la cepa de expresión *P. pastoris* X-33 suspendida en 1 M de sorbitol y el plásmido linearizado. Se dio un pulso de 1.5 kVolts e inmediatamente se le agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío a la cubeta y se dejó reposar por 1 h. La transformación se inoculó en cajas Petri con YPDS/Zeocina (150 µg/mL) y a partir de 10 días se obtuvieron 12 colonias productoras del antígeno recombinante (AR), de la cual, se seleccionaron 2 colonias a las cuales se les denominó como C6 y C12. La cepa silvestre sin transformar que se utilizó como control se le denominó ST.

Se realizó una PCR de la colonia C6 crecida en medio selectivo con Zeocina utilizando los oligonucleótidos 5' AOX y 3'AR y el amplicón se visualizó en un gel de agarosa observándose un fragmento de 1291 pb.

Las condiciones de PCR utilizadas en las amplificaciones fueron:

| | |
|-----------|----------------|
| 1 ciclo | 95 °C X 5 min |
| 30 ciclos | 95 °C X 30 seg |
| | 62 °C X 45 seg |
| | 72 °C X 90 seg |
| 1 ciclo | 72 °C X 10 min |

Dicha banda, se cortó y se purificó del gel con el kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc.) y se secuenció en el Instituto de Biotecnología (UNAM). Una vez corroborada la secuencia del inserto en la colonia analizada, se preservó en un banco conservado en glicerol al 80% a -80 °C.

6.5. Cinética de crecimiento e inducción de *P. pastoris*-AJVT

El crecimiento de las clonas C6, C12 y ST se llevó a cabo en dos medios de cultivo. Primeramente en medio de crecimiento con glicerol como fuente de carbono BMGY/Zeocina (200 µg/mL) (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1% glicerol) y posteriormente en medio BMMY con metanol como fuente de carbono e inductor (1% extracto de levadura, 2% peptona, 0.5% metanol).

Inicialmente se dejaron crecer las clonas en matraz bafleado de 250 mL conteniendo 50 mL de medio BMGY durante 36 h, a 30 °C y agitación orbital de 150 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Se tomó un 1 mL de muestra a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h, para determinar el crecimiento mediante densidad óptica (D.O._{600 nm}) en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (Genesys™ 5).

Posteriormente, se centrifugaron las células a 6300 g (Centrifuge 5804R, Eppendorf) por 15 minutos a 4 °C y se inocularon en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio BMMY a una D.O._{600nm} de 1.0 ± 0.2 U.A. Los matraces se mantuvieron a 30 °C y con agitación orbital de 150 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) durante 54 h. La toma de muestra se realizó a las 0, 6, 18, 24, 30, 42, 48 y 54 h con 1

mL para determinar densidad óptica, biomasa, y cuantificar proteína total de sobrenadante en cada punto. La biomasa se calculó por triplicado en peso seco con el precipitado obtenido de 1 mL de muestra y secado a 60 °C durante 24 h. Como control se utilizó *P. pastoris* ST en todos los casos.

6.6. Electroforesis en gel desnaturizante y Western Blot

Se cuantificó proteína total en microensayos con placas de 96 pozos por el método de Bradford (Bio-Rad) tomando 10 µL de sobrenadante. Adicionalmente los sobrenadantes obtenidos de cada punto (500 µL) se precipitaron con 30% de ácido tricloroacético (TCA) en acetona fría (-4°C) en volúmenes iguales a -20 °C durante toda la noche. Las soluciones se centrifugaron por 25 min a 20 000 g a 4 °C, el precipitado se lavó dos veces con acetona al 80% a 4 °C y un lavado final con etanol al 70% a 4 °C, el pellet resultante se suspendió en 30 µL de H₂O Milli Q[®]. Se cargaron 5 µL de la muestra resuspendida en H₂O Milli Q[®] para visualizar la producción en geles SDS-PAGE al 12%, 5 µL de la muestra de medio sin inducción y 5 µL del control sin transformar. El gel se resolvió a 80 V durante 3 h y las bandas se visualizaron con azul de Coomassie R250 en un fotodocumentador Gel Doc[™] EZ Imager (Bio-Rad).

Para los ensayos de Western Blot, las proteínas del gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon[™] (Millipore) utilizando una solución de transferencia (Tris-glicina-metanol 20%) a 20 V durante 1 h. Después se procedió a realizar el bloqueo de la membrana con leche al 5% durante 30 min, los lavados se realizaron en TBS-Tween 20 durante 10 min, y la incubación con el anticuerpo monoclonal primario Mab 6A3 1:500 (donado por la Dra. Clara Espitia) o lectina Con-A/HRP 1:1000 (Sigma Aldrich) se realizó durante 2 h. Para finalizar, la membrana se volvió a lavar 2 veces con TBS-Tween 20 y una última vez con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse/HRP (Sigma-Aldrich) durante 3 h. Después, se lavó 2 veces con TBS-Tween 20 durante 15 min y una última vez con TBS durante 5 min. El revelado de las membrana se realizó con SuperSignal[®]

West Pico (Thermo Scientific) y se visualizó en un revelador digital de escáner C-Digital (LI-COR).

6.7. Purificación del AR en columna de Concanavalina-A y HPLC

El sobrenadante previamente filtrado con membrana Millipore de 0.22 μm se suplementó con 0.5 M de NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4. La muestra se incubó con 2 mL de la resina Concanavalina-A acoplada a sefarosa (Sigma Aldrich) previamente tratada con 5 volúmenes de solución de equilibrio (acetato de sodio 0.1 M, cloruro de manganeso 5 mM, cloruro de sodio 1 M, cloruro de magnesio 5 mM y cloruro de calcio 5 mM, pH 7.4) durante 2 h a 4 °C en agitación suave. La resina se recuperó en una columna cromatográfica (Bio-Rad), y después de 5 volúmenes de lavado con solución de unión (Tris 20 mM y cloruro de sodio 0.5 M pH 7.4), las fracciones unidas se recuperaron con una solución de elución (acetato de sodio 0.1 M, cloruro de manganeso 5 mM, cloruro de sodio 1 M, cloruro de magnesio 5 mM y cloruro de calcio 5 mM, 0.2 M de α -D-glucopiranosido, pH 7.4). Las fracciones eluidas fueron dializadas, liofilizadas y suspendidas en PBS o IEF, visualizadas en geles SDS-PAGE 12% y transferidas a membranas PVDF para inmunodetección.

La purificación del antígeno recombinante (AR) se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con un equipo HPLC Shimadzu (facilitado por el Dr. Roberto Arreguín) usando una columna C18 High Bar de 250 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . Las soluciones de trabajo fueron: (a) 0.1 % de TFA en H_2O y (b) 0.1 % TFA en acetonitrilo. La corrida cromatográfica se comenzó con 0% de la solución b en flujo constante de 1 mL/min durante 5 min. De 5 a 85 min se aplicó un gradiente de 0% a 80% de la solución b. La absorbancia se registró a 220 y 280 nm. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el programa EZChrom Elite™ Chromatography Data System. Las fracciones obtenidas se dializaron y se concentraron en H_2O para su análisis en gel SDS-PAGE 12% y Western Blot utilizando el anticuerpo Mab 6A3 y Lectina Con-A como fue descrito.

6.8. SDS-PAGE bidimensional y Western Blot del AR purificado

Usando 10 µg de AR purificado por HPLC en fase reversa, se llevó a un volumen final de 125 µL con buffer de isoelectroenfoque IEF (Urea 8M, tiourea 2M, triton X-100 2% v/v, DTT 50 mM, CHAPS 4% w/v, 0.1% de anfotericina de pH 3-10 GE Healthcare), con esta mezcla, se hidrataron tiras de gradiente de pH inmovilizado IPG (Bio-Rad), de intervalo de pH lineal de 4-7 (10 cm), durante 90 min a temperatura ambiente en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare). Después de la rehidratación pasiva, las tiras se cubrieron con aceite mineral, la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque (PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad) y se rehidrataron de manera activa con las siguientes condiciones; 12 h a 20 °C a 50 V seguido por tres pasos de focalización; 500 V por 30 min (rápida), 1000 V por 1 h (gradiente).

Tras el proceso de isoelectroenfoque, las tiras de IPG se removieron de la bandeja, se eliminó el aceite mineral y se incubaron en un amortiguador de equilibrio SDS (Tris 1.5 M pH 8.8 con HCL, urea 6 M, 30% glicerol (V/V) y 5% SDS (W/V)). El equilibrio se realizó en dos pasos empleando en cada uno 1 mL de la solución de equilibrio por tira; en el primero, la solución de equilibrio se le añadió DTT 1% para mantener el estado reducido de la proteína por 15 min a temperatura ambiente y en agitación constante. A continuación se eliminó el amortiguador, e inmediatamente se realizó el segundo paso en donde el amortiguador de equilibrio se le añadió 2.5% de iodoacetamida (W/V) para alquilar los átomos de azufre y evitar la renaturalización. Después de la segunda incubación y tras un breve lavado de amortiguador de corrida SDS, las tiras quedaron listas para efectuar la electroforesis de segunda dimensión en un gel SDS-PAGE 12%.

6.9. Espectrometría de masas del AR

Se realizaron digestiones enzimáticas del AR purificado por HPLC en fase reversa utilizando la enzima Lys-C (Roche) como se describe a continuación.

1. Se suspendieron 20 µg del AR purificado por HPLC en fase reversa en amortiguador de digestión (25 mM Tris HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA) en un volumen de 30 µL.
2. La solución se ensayó con Lys-C a una proporción 1:100 de enzima-sustrato, y la proteólisis se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C.

Para la determinación de los péptidos de la digestión del AR, se recurrió a la espectrometría de masas por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) con un detector de iones acoplado al equipo (Time of Flight). La proteína digerida se analizó en un equipo Bruker Microflex del Instituto de Química de la UNAM, (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) equipado con un láser de nitrógeno de 20 Hz a $\lambda = 337$ nm. El espectro fue detectado en modo lineal positivo para el rango de masas entre 1000 a 13000 Da. 1.0 µL de solución de la proteína obtenida en cada digestión, se mezcló con 5 µL de acetonitrilo al 30% y TFA 0,1%, y se saturó con ácido sinapínico o con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Posteriormente, 1.0 µL de esta solución se depositó en la placa de MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior lectura.

Adicionalmente, el antígeno digerido se analizó en un equipo MALDI TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) del Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN) para determinar y secuenciar los péptidos resultantes de la digestión. Para esto, la muestra se concentró y se dializó utilizando una columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α -ciano-4-hidroxicinámico. Los espectros MS/MS obtenidos se analizaron con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66% y el algoritmo de búsqueda Mowse Scoring de Mascot, con un límite en el error de masa de 0.5 Da. Los resultados fueron procesados en el Software Scaffold con los mismos criterios dados para Mascot realizando una nueva búsqueda confirmatoria con el algoritmo de Mascot y el de Xtandem para buscar falsos positivos y confirmar los péptidos encontrados.

7. RESULTADOS

7.1. Diseño de AJVT

Con la secuencia proteica original del antígeno inmunodominante de *M. tuberculosis* (UniProtKB/Swiss-Prot: P9WIR7.1) se diseñó la secuencia nucleotídica optimizada para *P. pastoris* utilizando el programa de edición de secuencias Gene Designer 2.0 y SnapGene 2.7.2. Se eliminó además, un péptido señal de 39 aminoácidos presente en la secuencia nativa, así como sitios posibles de *N*-glicosilación.

Los aminoácidos susceptibles a *N*-glicosilación fueron sustituidos por glutamina, con base a lo reportado en la expresión de la enzima activadora del plasminógeno humano tipo urocinasa en *P. pastoris* (Tsujikawa *et al.*, 1996). La secuencia diseñada (Figura 12b) fue sintetizada químicamente por la empresa GenScript USA Inc. (NJ, Piscataway).



Figura 12. Mapa AJVT de 891 pb optimizado y sitios de restricción diseñado en el programa de edición de secuencias Gene Designer 2.0 y SnapGene 2.7.2.

7.2. Diseño de la construcción del plásmido pPICZB α con la secuencia AJVT

Se realizó una ligación *in-silico* de la secuencia codificante AJVT del AR con el plásmido pPICZB α utilizando los programas de edición de secuencias Gene Designer 2.0 y SnapGene 2.7.2 para confirmar la secuencia en fase con el factor de secreción α (alfa). Se comprobó que utilizando las enzimas de restricción seleccionadas Pst I y Kpn I se obtiene la secuencia en fase. El plásmido construido *in-silico* se le denominó como pAJVT y se muestra en la Figura 13.

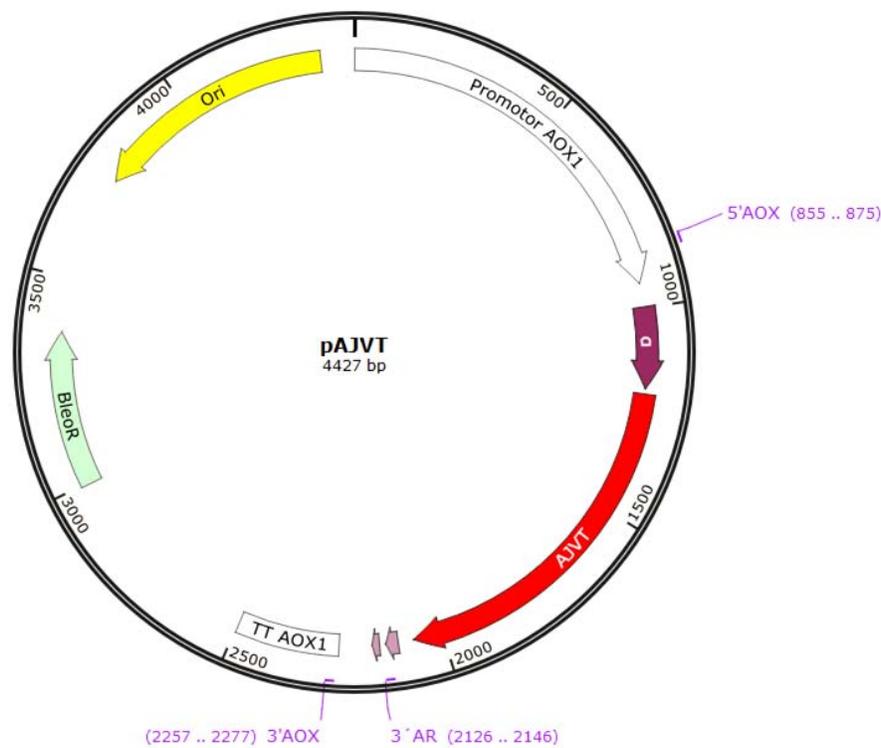


Figura 13. Mapa del plásmido pAJVT (4427 pb), generado a partir del plásmido pPICZB α inducible por metanol (AOX1), resistencia a Zeocina (BleoR) y el péptido señal de secreción factor- α . La secuencia AJVT se muestra en rojo. Los oligos utilizados en este trabajo 5'AOX, 3'AOX, y 3'AR se muestran en rosa.

7.3. Construcción del plásmido pAJVT y transformación de *E. coli*

La digestión de los plásmidos pPICZB α (3597 pb) y pUC57-AJVT (3607 pb) se realizó con las enzimas de restricción Pst I y Kpn I. En la Figura 14 se muestra un gel de agarosa 1% en donde se observa en los carriles 2 y 3 una banda correspondiente al plásmido pPICZB α con la enzima de digestión Pst I y Kpn I respectivamente. El carril 5 corresponde a la digestión con Pst I del plásmido pUC57-AJVT. Asimismo, los carriles 7-9 muestran la segunda digestión con Kpn I del mismo plásmido (Figura 14)

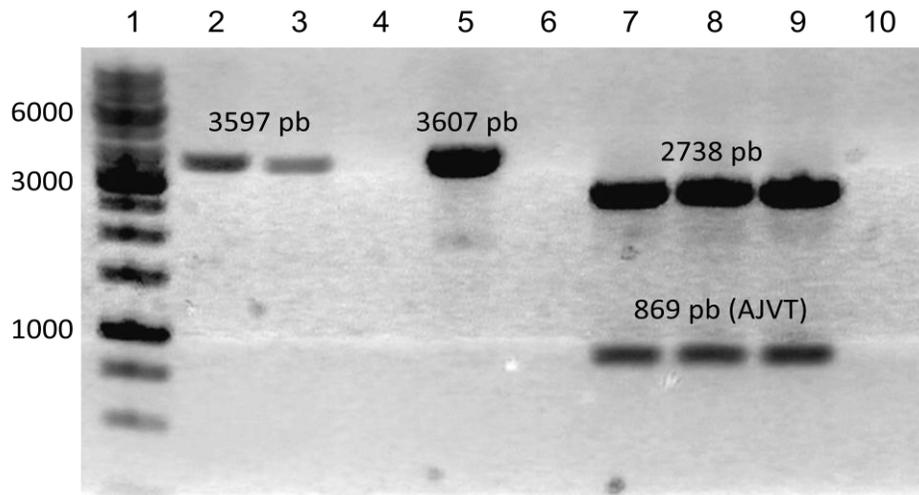


Figura 14. Digestión de plásmidos pPICZB α y pUC57-AJVT. Carril 1: Marcador de 1 kb (Life Technologies). Carril 2: pPICZB α digerido con Pst I. Carril 3: pPICZB α digerido con Kpn I. Carril 5: pUC57-AJVT digerido con Pst I. Carriles 7,8 y 9: pUC57-AJVT digerido con Kpn I. Carril 10: Control sin DNA.

En los carriles 7, 8 y 9 se observaron 2 bandas, una de 2.7 kb correspondiente al plásmido pUC57 sin inserto y otra de 869 pb correspondiente al fragmento AJVT. Los fragmentos AJVT se purificaron utilizando el kit EZ-10 “Spin Column DNA Gel Extraction Kit” (Bio Basic Inc) y el producto se utilizó en la reacción de ligación de AJVT en el plásmido pPICZB α doblemente digerido.

A partir de la ligación se procedió a realizar la transformación de *E. coli* One Shot[®] Top10 por el método de choque térmico. Las células transformadas se inocularon en medio agar LB/Zeocina (25 μ g/mL) durante toda la noche a 37 °C, obteniéndose 15 colonias transformantes.

A partir de 5 transformantes seleccionadas al azar se realizó una PCR con los oligonucleótidos 5' y 3' AOX que amplifican un fragmento de 593 pb del vector vacío. En la Figura 15 se observan las bandas de 1423 pb en los carriles 2, 4, 5 y 6 lo cual corresponde al inserto de 869 pb más el fragmento del vector de 593 pb, lo que indica que estas colonias fueron transformadas con el plásmido pAJVT.

En el carril 3 no se observó amplificación, probablemente porque no se recuperó DNA de la colonia transformante. En el carril 7 se muestra como control la amplificación con 5' y 3'AOX usando de templado el plásmido pPICZB α sin inserto.

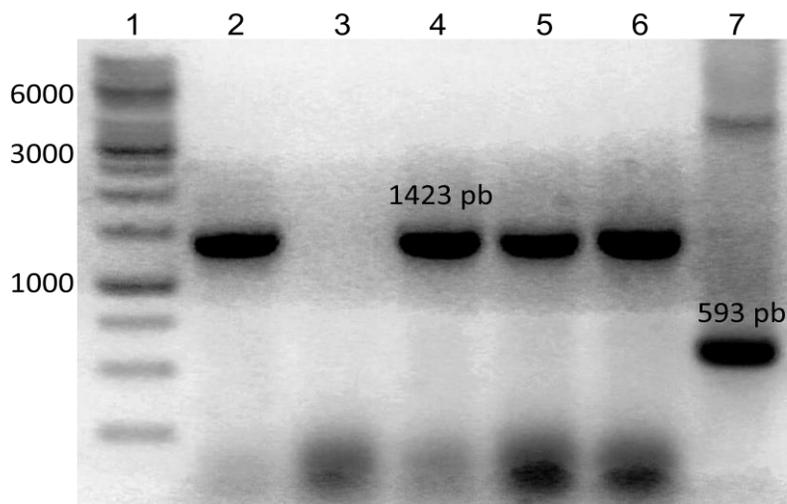


Figura 15. Amplicones provenientes de colonias transformantes de *E. coli* One Shot[®] Top10 con pAJVT usando los oligos 5' y 3'AOX. Carril 1: Marcador 1 kb (Life Technologies). Carril 2, 3, 4, 5, y 6: Amplicón de las colonias 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. Carril 7: Control plásmido pPICZB α .

7.4. Transformación de *P. pastoris* X-33 con el plásmido pAJVT

Se realizó la electroporación de *P. pastoris* X-33 con el plásmido pAJVT linearizado con Sac I. A los 10 días del procedimiento de transformación e inoculación en medio selectivo YPDS/Zeocina (200 µg/mL) se obtuvieron colonias que se pueden observar en la Figura 16.

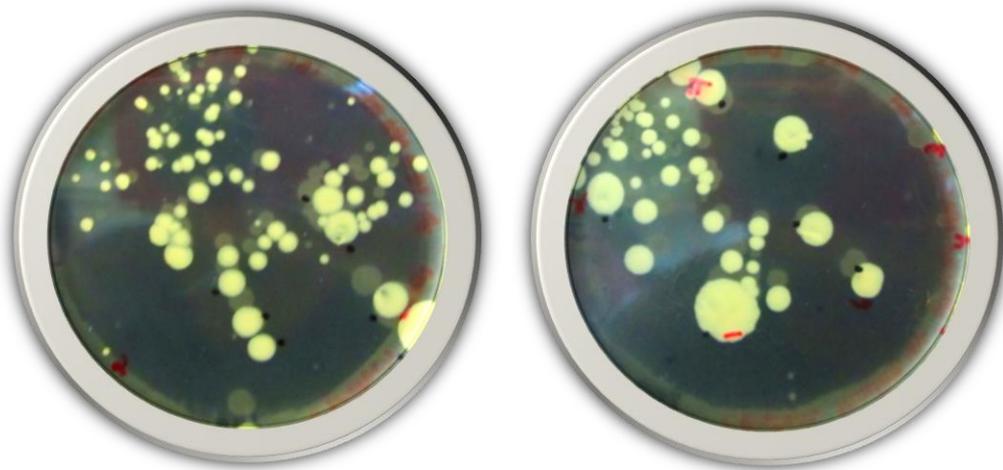


Figura 16. Colonias de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pAJVT en medio selectivo YPDS/Zeocina (200 µg/mL), a 30 °C, después de 10 días.

Se realizó una PCR a partir de 2 colonias de *P. pastoris* transformadas con el plásmido pAJVT utilizando los oligos 5' y 3' AOX. El producto de PCR o amplicón se visualizó en un gel de agarosa y se observó un fragmento de 1423 pb como se muestra en la Figura 17.

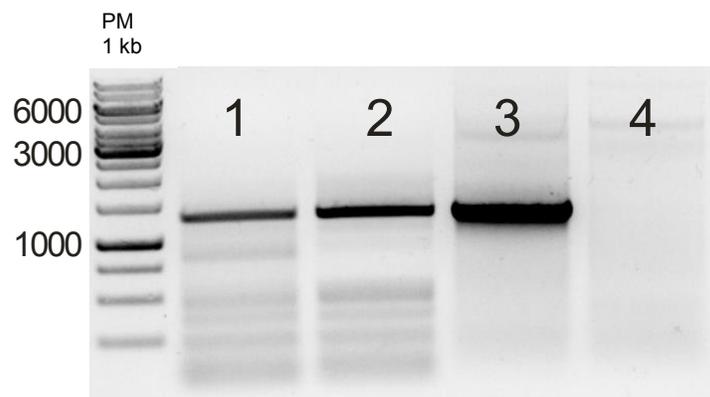


Figura 17. Amplicones de 2 colonias de *P. pastoris* transformadas con el plásmido pAJVT. Carril 1 y 2: Amplicones obtenidos usando los oligos 5' y 3' AOX de 1423 pb de dos colonias transformantes (denominadas C6 y C12) obtenidas en medio YPDS/Zeocina. Carril 3: Control utilizando como templado plásmido pAJVT. Carril 4: Control negativo sin DNA.

La extracción y purificación de los amplicones se realizó con el kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc.) y se obtuvo la secuenciación nucleotídica del fragmento amplificado en el Instituto de Biotecnología (UNAM). La secuencia traducida a aminoácidos se confirmó contra la secuencia original de *M. tuberculosis* mediante un alineamiento comparándola en un Blast con la base de datos NCBI, encontrándose 100% de homología.

7.5. Crecimiento de *P. pastoris* C6 y C12, e inducción para la producción del AR

Las colonias 6 y 12 (denominadas como C6 y C12) de *P. pastoris* transformadas con pAJVT fueron crecidas en dos medios de cultivo. Durante la primera etapa de crecimiento se utilizó el medio BMGY para obtener biomasa durante 24 h (Figura 18) y en la segunda etapa se usó el medio BMMY con metanol para inducir la producción de proteína recombinante durante 66 h (Figura 19). Ambas colonias fueron cultivadas en matraz bafleado de 250 mL con un volumen de llenado de 50 mL a 30 °C y ambas fueron comparadas con la cepa X-33 sin transformar (ST).

En la Figura 18a se muestra la curva de crecimiento de las colonias C6, C12 y ST en medio BMGY donde se puede observar que la colonia C6 y ST alcanzan la mayor densidad óptica a las 24 h con una D.O._{600 nm} de 20.7 ± 0.6 U.A. y 21.6 ± 0.7 U.A. respectivamente, comparada con la C12 que fue de 17.2 ± 0.5 U.A.

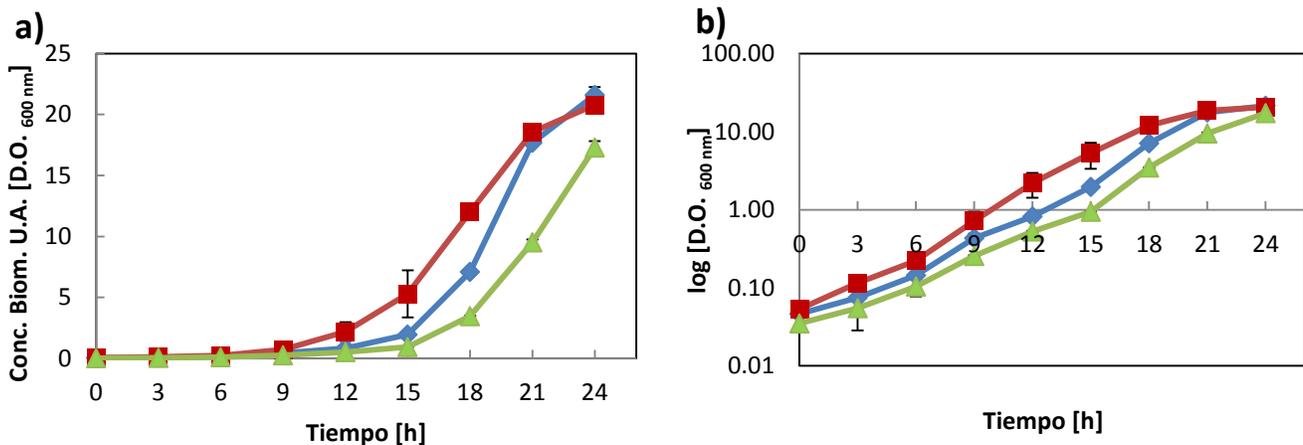


Figura 18. Curvas de crecimiento de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar. a) Curva de crecimiento a escala lineal y b) Curva de crecimiento a escala logarítmica. La cepa ST se utilizó como control.

Las células provenientes de la primera etapa fueron centrifugadas, y concentradas. Posteriormente las células sin medio se colocaron en medio nuevo de la etapa dos BMMY. El inóculo inicial de los tres cultivos se ajustó a una D.O._{600 nm} de 1.0 U.A. Se adicionó metanol al 1% al medio BMMY para inducir la producción del AR en la

segunda etapa de la cinética de crecimiento. La cinética se llevó a cabo durante 66 h (Figura 19). En la Figura 19a se observa que la colonia C6 alcanzó una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 36.9 ± 2.2 U.A., mientras la ST y C12 alcanzaron 32.3 ± 1.1 U.A. y 31.8 ± 1.3 U.A., respectivamente.

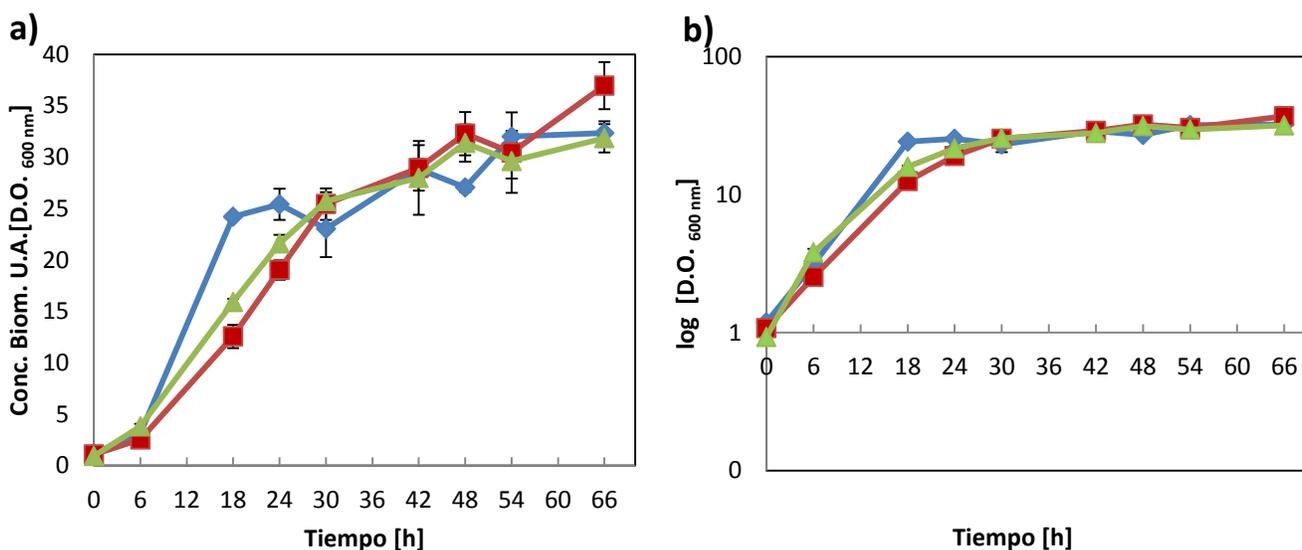


Figura 19. Curvas de crecimiento de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar. La adición de metanol 1% se realizó a las 0, 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h. a) Curva de crecimiento a escala lineal. b) Curva de crecimiento a escala logarítmica. La cepa ST se utilizó como control.

La velocidad específica de crecimiento (μ) en ambas etapas (medio BMGY y BMMY) se determinó con la pendiente de la fase exponencial de la cinética de crecimiento en escala logarítmica (Figuras 18 y 19b) y se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la concentración de biomasa máxima alcanzada y velocidad específica de crecimiento de las cepas de *P. pastoris* cultivadas en dos medios con diferente fuente de carbono.

| Cepa | $DO_{600\text{nm}}$ BMGY* (UA) | $DO_{600\text{nm}}$ BMMY** (UA) | μ BMGY (h^{-1}) | μ BMMY (h^{-1}) | μ Biomasa (h^{-1}) |
|------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| ST | 21.5 ± 0.7 | 32.3 ± 1.1 | 0.37 ± 0.00 | 0.17 ± 0.00 | 0.15 ± 0.00 |
| C6 | 20.7 ± 0.6 | 36.9 ± 2.2 | 0.38 ± 0.03 | 0.14 ± 0.00 | 0.13 ± 0.00 |
| C12 | 17.2 ± 0.5 | 31.8 ± 1.3 | 0.38 ± 0.00 | 0.15 ± 0.00 | 0.15 ± 0.00 |

* Concentración de biomasa medida a las 24 h de cultivo.

** Concentración de biomasa medida a las 66 h de cultivo.

La acumulación de biomasa se calculó por peso seco a lo largo de la cinética de crecimiento en cultivo BMMY (Figura 20). En la gráfica de la Figura 20, se observa que a las 66 h de cultivo se alcanzó una biomasa de $18.08 \pm 1.97 \text{ gL}^{-1}$, $13.80 \pm 1.16 \text{ gL}^{-1}$ y $13.80 \pm 0.27 \text{ gL}^{-1}$ para las colonias C6, C12 y ST respectivamente.

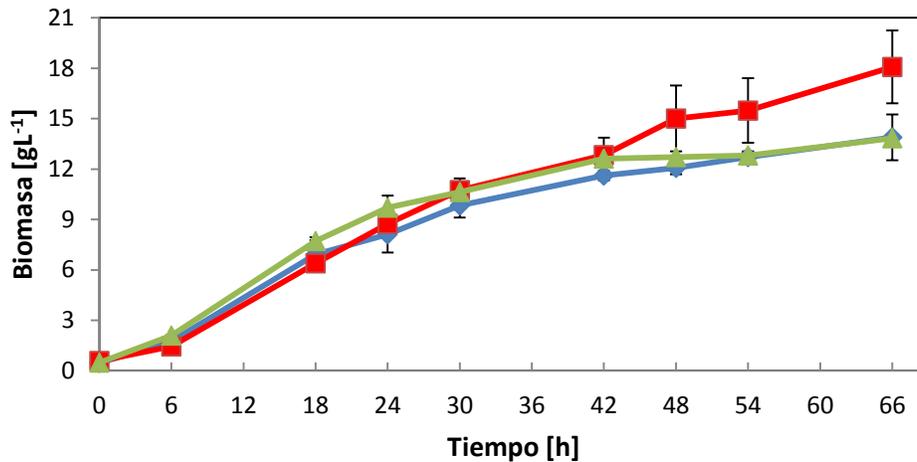


Figura 20. Acumulación de biomasa determinada en peso seco de *P. pastoris* C6 (■), C12 (▲) y sin transformar ST (◆) durante 66 h de cultivo en medio BMMY. Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar.

Posteriormente, se identificó la acumulación de proteína total en el sobrenadante a lo largo de la cinética de cultivo en medio BMMY. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 21.

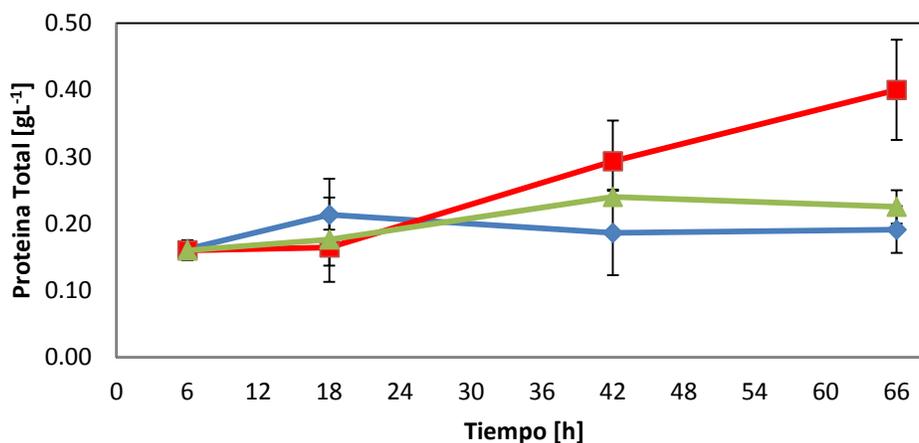


Figura 21. Acumulación de proteína total producida en sobrenadante BMMY de las colonias C6 (■), C12 (▲) y ST (◆). Los experimentos fueron realizados por triplicado y cada punto representa la desviación estándar.

Las colonias C6 y C12 alcanzaron una acumulación máxima de proteína en sobrenadante a las 66 h de $0.400 \pm 0.075 \text{ gL}^{-1}$ y $0.225 \pm 0.025 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente (calculado por el método de Bradford). La cepa ST solo alcanzó los $0.191 \pm 0.035 \text{ gL}^{-1}$ a las 66 h.

7.6. Electroforesis en gel desnaturalizante y Western Blot del AR

A partir de los sobrenadantes de los cultivos de las colonias C6 y C12 colectados en diferentes tiempos de la etapa con inducción, se visualizó la acumulación de AR en el sobrenadante mediante SDS-PAGE al 12% (Figura 22).

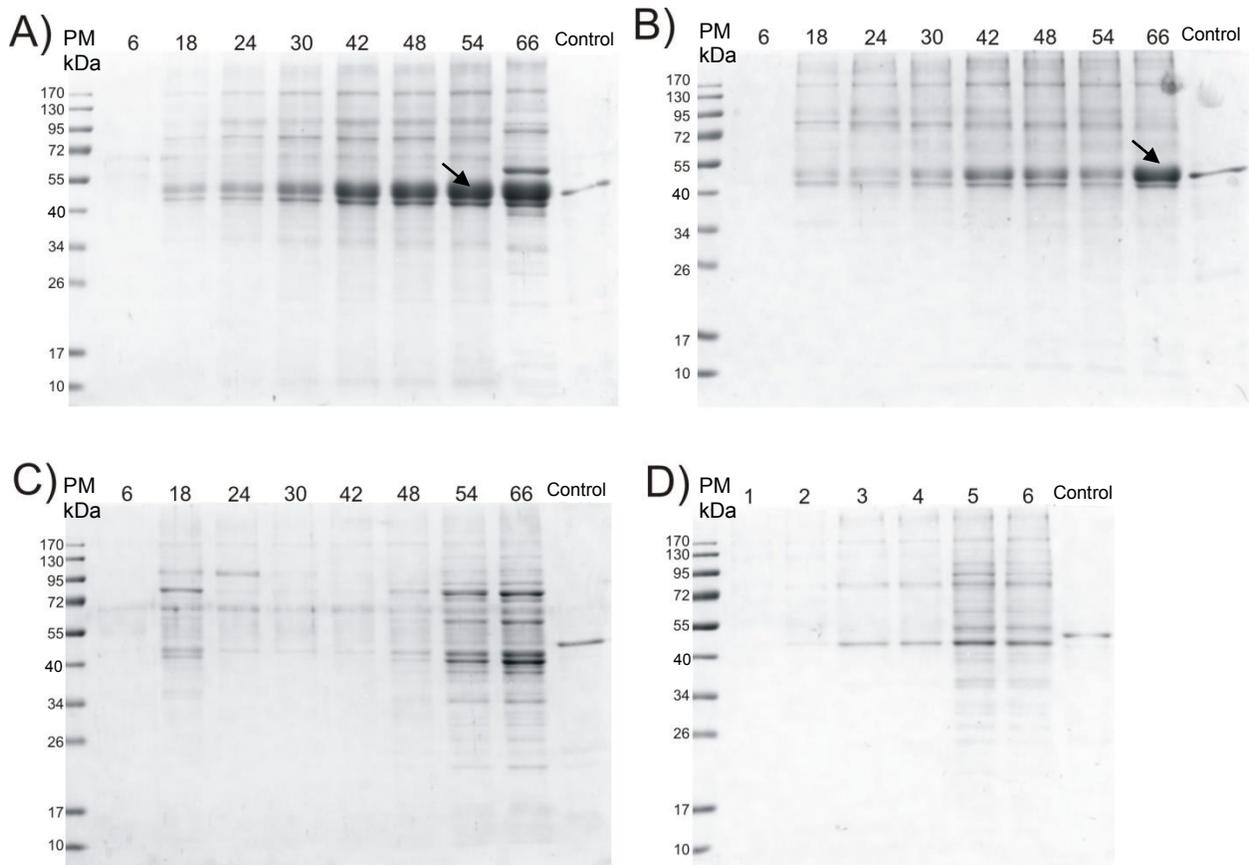


Figura 22. SDS-PAGE de proteína de los sobrenadante colectados en diferentes tiempos de las cinéticas de la segunda etapa de cultivo de las colonias C6 (a), C12 (b), y sin transformar ST (c). En cada gel se cargó el mismo volumen colectado de cada cinética realizadas en medio BMMY con metanol al 1%. La toma de muestra se realizó a las 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h de cultivo como se indica en cada carril. d) Acumulación de proteína de sobrenadante a las 24 h de cultivo en medio BMGY (sin inducir) con glicerol, carril 1-2 colonia C6, carril 3-4 colonia C12, carril 5-6 colonia ST. Como control se utilizó 1 μg de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*. Flecha: proteína de interés.

Las Figuras 22a y 22b muestran la acumulación de proteína total de sobrenadante de las colonias C6 y C12, respectivamente a lo largo del tiempo indicado en los carriles (6, 18, 24, 30, 42, 48, 54, y 66 h). Se observa en la electroforesis de la Figura 22a y 22b una proteína de interés (indicada con flecha) la cual fue posteriormente identificada como el AR en ensayo de Western Blot, mostrando un tamaño similar al de la proteína control. Se observa que el AR se acumula en el sobrenadante durante la cinética.

Para determinar el porcentaje del AR, se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa Image Lab® 3.0 (Bio-Rad) de los geles SDS-PAGE de las colonias C6 (Figura 22a) y C12 (Figura 22b). El resultado indicó que durante el cultivo de la colonia C6 a partir de las 42 h en medio BMMY llega a acumular hasta el 44.40 ± 3.91 % del antígeno recombinante (AR) con respecto a la proteína total, mientras la colonia C12 acumuló el 34.37 ± 3.19 %. Siendo así para la colonia C6 la cantidad de 0.177 ± 0.033 gL⁻¹ y para la C12 la cantidad de 0.077 ± 0.009 gL⁻¹ a las 66 h. Aplicando una prueba estadística T de Student con un $P < 0.05$, se encuentra que hay diferencias significativas entre las colonias C6 y C12 en cuanto a la cantidad de AR en sobrenadante.

A partir de la densitometría obtenida de la acumulación de proteína durante la cinética de crecimiento de las colonias C6 y C12 y de la cuantificación de proteína total a las 66 h (Figura 21) se determinó el rendimiento del AR con respecto a biomasa de ambas colonias (Tabla 4). La colonia C6 tuvo un rendimiento de 0.011 ± 0.002 gAR/gBiomasa y la colonia C12 de 0.006 ± 0.001 gAR/gBiomasa. También se calculó la productividad volumétrica, la cual fue superior en la colonia C6 con 0.003 ± 0.000 gAR/Lh, comparada con la colonia 12 con 0.001 ± 0.000 gAR/Lh (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimientos obtenidos y productividad volumétrica de AR en *P. pastoris*.

| Cepa | Biom. (gL ⁻¹)* | PT (gL ⁻¹) | $Y_{gprot/gbiom}$ | AR (gL ⁻¹) | $Y_{gAR/gBiom}$ | P. Vol. (gAR/Lh) |
|------|----------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| ST | 13.89 ± 1.36 | 0.191 ± 0.035 | 0.013 ± 0.002 | / | / | / |
| C6 | 18.08 ± 2.16 | 0.400 ± 0.075 | 0.024 ± 0.004 | 0.177 ± 0.033 | 0.011 ± 0.002 | 0.003 ± 0.000 |
| C12 | 13.83 ± 0.22 | 0.225 ± 0.025 | 0.016 ± 0.077 | 0.077 ± 0.009 | 0.006 ± 0.001 | 0.001 ± 0.000 |

* Medio de cultivo BMMY, a 30 °C, 66 h en matraz bafleado y 200 rpm. PT, proteína total, AR, antígeno recombinante.

La electroforesis SDS-PAGE de la cepa sin transformar ST (Figura 22c) se utilizó como control. Además, se realizó otra electroforesis en gel SDS-PAGE de las tres cepas en medio sin inducir BMGY (Figura 22d). En la Figura 22d no se observó ninguna banda de tamaño similar a la del antígeno recombinante observado en la Figura 22a o 22b. Lo que sugiere que el promotor inducible por metanol AOX se mantuvo reprimido en el medio con glicerol BMGY.

Las proteínas obtenidas de la cinética de la colonia C6 fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno PVDF (Immobilon-P Millipore™). Con la membrana se realizó una inmunodetección mediante Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal Mab 6A3 y un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa Anti-Mouse/HRP (Sigma-Aldrich®) (Figura 23).

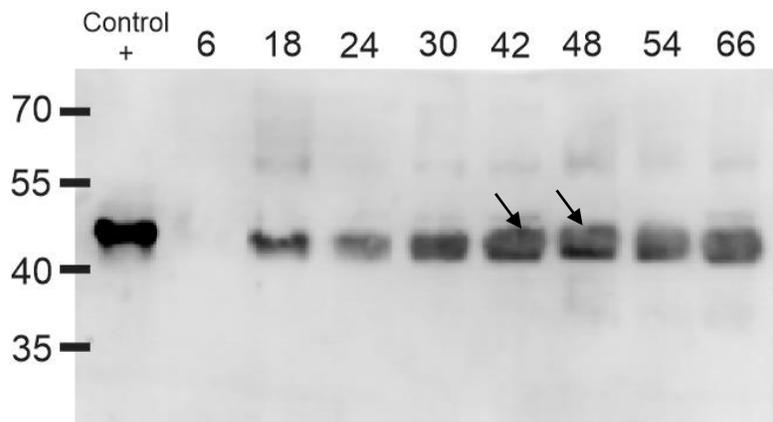


Figura 23. Inmunodetección Western Blot de acumulación de proteína de sobrenadante durante la cinética de cultivo de la colonia *P. pastoris* C6 con el anticuerpo monoclonal Mab 6A3. La toma de muestra se realizó a las 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h de cultivo como se indica en cada carril con 83 μ L de sobrenadante. Como control se utilizó 8 μ g de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*.

Se confirmó la producción del AR (indicado con flechas) de la colonia C6 cultivada en BMMY e inducida con metanol. La inmunodetección mostró una banda de peso molecular similar al peso molecular del control. No se detectó AR en los inmunoensayos de la cepa ST en medio BMMY, ni en los provenientes de medio BMGY (Anexo A).

7.7. Purificación del AR en columna de Concanavalina-A

El sobrenadante del cultivo BMMY inducido con metanol de la colonia C6 se purificó en columna de afinidad de Concanavalina-A (Con-A) acoplada a sefarosa (Sigma-Aldrich®), cuya lectina presenta alta afinidad por manosas. Las fracciones obtenidas en cada elución se analizaron en SDS-PAGE. Las proteínas de cada fracción fueron transferidas a membranas de PVDF y se realizó un inmunoensayo utilizando el Mab 6A3 (Figura 24).

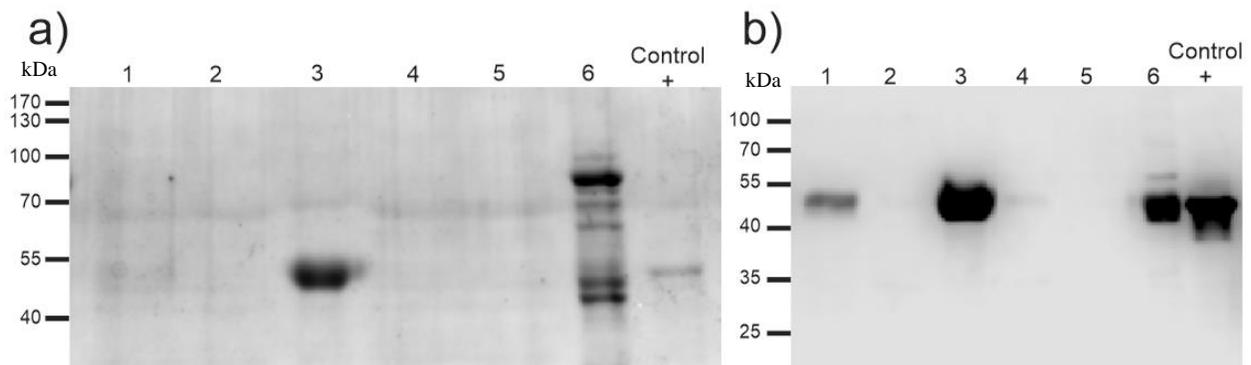


Figura 24. a) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunodetección (b) de las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad Con-A/Sefarosa. Carriles 1 y 2: Primer y décimo lavado respectivamente. Carril 3: Primera fracción eluída con 10 µg de proteína recombinante. Carriles 4 y 5: Segunda y tercera fracción del AR eluida de la columna de afinidad Con-A/Sefarosa. Carril 6: Proteína de sobrenadante no unida a Con-A. Como control se utilizó 1 µg de AI (con etiqueta de 6 His) purificado a partir de *E. coli*.

En el Western blot de la Figura 24b se pudo detectar el AR en el carril 3, correspondiente a la primera elución de la resina de afinidad Con-A/Sefarosa, que corresponde al AR manosilado. Asimismo, se detectó AR en el primer lavado (Carril 1) que podría corresponder al AR con baja afinidad por la Con-A. En el carril 6 de la Figura 24a, se detectaron las proteínas no unidas a la resina, además del AR. Lo que podría sugerir que una fracción del AR producido no está glicosilado o que los sitios de afinidad Con-A a las manosas del antígeno están saturados.

7.8. Purificación del AR por HPLC-fase reversa

La purificación del AR del medio de cultivo BMMY inducido se llevó a cabo en cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa utilizando una columna C18 High Bar de 250 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . Los componentes del sobrenadante de cultivo centrifugado se muestran en el cromatograma de la Figura 25. El tiempo de retención del componente mayoritario fue de 59 min eluyendo al 49% de acetonitrilo.

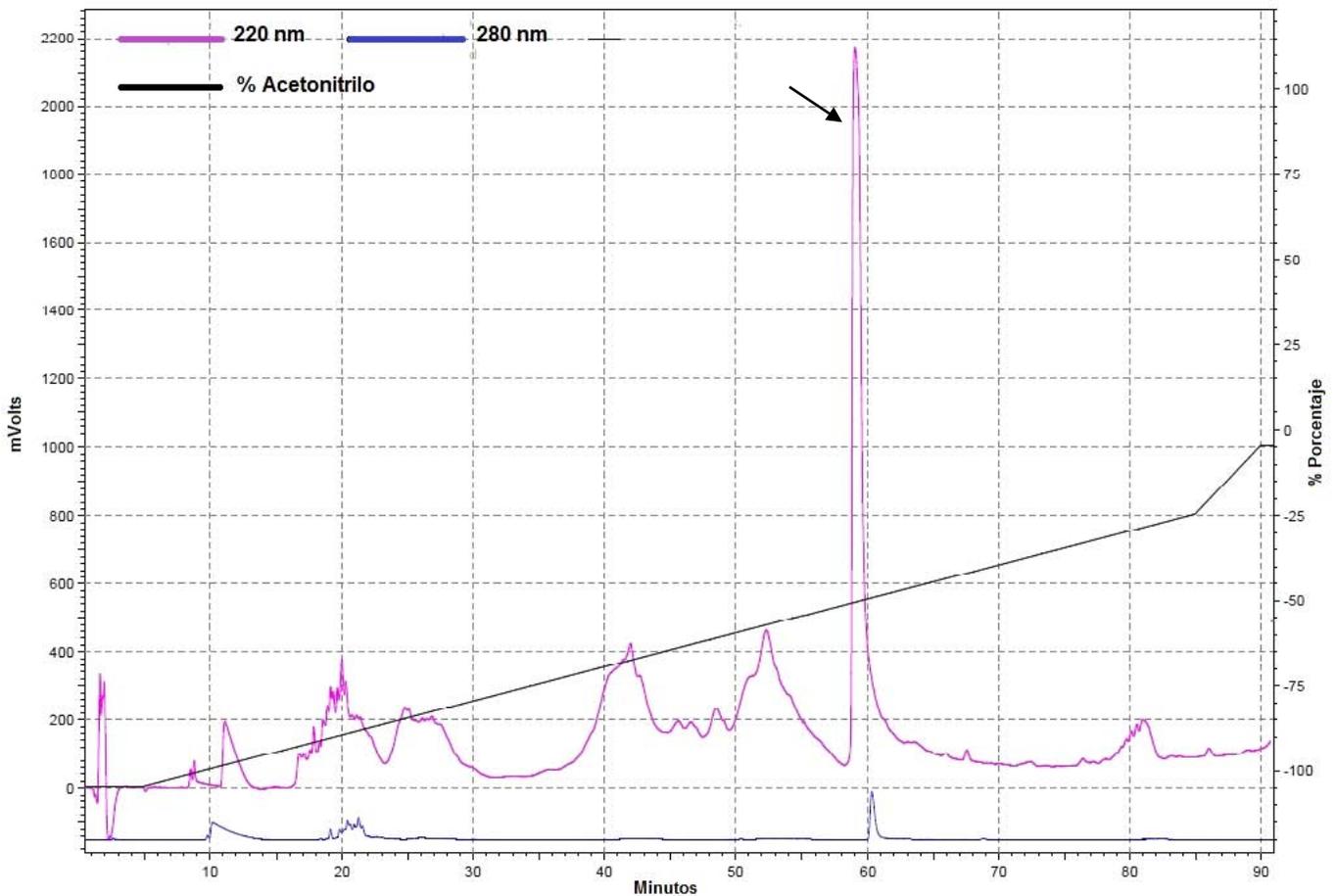


Figura 25. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa del sobrenadante de medio de cultivo BMMY de la colonia C6 inducido con metanol y colectado a las 66 h. Se usó una columna C18 High Bar de 250 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . El componente de importancia (marcado con una flecha) presentó un tiempo de retención de 59 min eluyendo con 49% de acetonitrilo (línea negra). Línea rosa absorbancia a 220 nm. Línea azul absorbancia a 280 nm.

Para detectar las manosilaciones de la fracción del AR purificado se realizó un ensayo de Western Blot utilizando la lectina de unión a manosas Con-A acoplado a peroxidasa (Anexo B). El AR purificado además fue confirmado mediante espectrometría de masas.

7.9. SDS-PAGE bidimensional del AR purificado

Para determinar el punto isoeléctrico (PI) del AR y corroborarlo con el PI del antígeno nativo teórico (4.52, PeptideMass ExPASy), se llevó a cabo una electroforesis bidimensional con 10 µg del AR purificado por HPLC en fase reversa. La primera dimensión se realizó mediante iso-electroenfoque en tiras de gradiente inmovilizado IPG (Bio-Rad) con un intervalo de pH lineal de 4-7 (10 cm). Posteriormente se analizó en segunda dimensión SDS-PAGE al 12 % (Figura 26a).

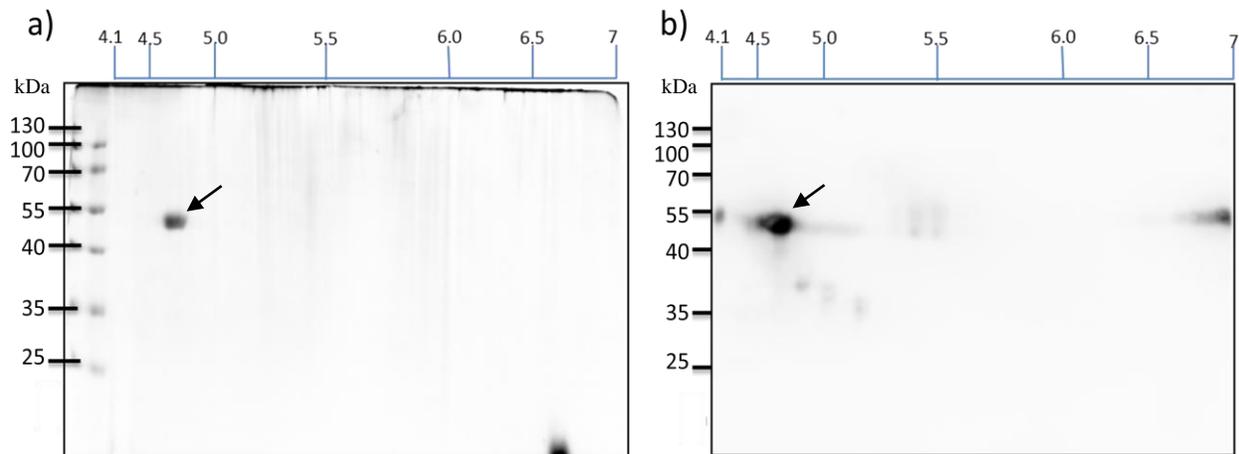


Figura 26. Electroforesis bidimensional IEF/2D de AR purificado por HPLC en fase reversa. a) El AR (flecha) fue separado de acuerdo a su punto isoeléctrico en tiras de IPG (Bio-Rad) pH 4-7 (10 cm) y posteriormente en una segunda dimensión de acuerdo a su peso molecular en un gel SDS-PAGE al 12%. b) Western blot del antígeno recombinante utilizando el Mab 6A3.

En la Figura 26a (SDS-PAGE teñido con azul de coomassie) se observó una mancha prominente (marcado con flecha) similar a lo observado en geles de una dimensión (Figura 22a y 22b). El punto isoeléctrico (PI) del AR fue de aproximadamente 4.5-4.7. La otra mancha prominente que se observa en el gel de la figura 22a (parte inferior izquierda) corresponde a una sección del gel roto. Una vez terminada la electroforesis

en 2D, ésta se transfirió a membrana de PVDF y se realizó una inmunodetección con el anticuerpo primario Mab 6A3, y posteriormente se reveló con el anticuerpo secundario Anti-Mouse/HRP (Figura 26b). Similarmente la mancha observada en la Figura 26a fue reconocida por el Mab 6A3, con un PI de 4.5-4.7 en el ensayo de inmunodetección de la Figura 26b (Flecha), y aunque aparecen otras manchas reconocidas por el anticuerpo, éstas podrían ser a consecuencia de impurezas, efecto del buffer IEF, deficiencia del isoelectroenfoque, o degradación del AR.

7.10. Espectrometría de masas del AR

Con el objetivo de comprobar la existencia del antígeno y poder determinar si el AR se encontraba modificado postraduccionalmente, el AR fue digerido con la proteasa Lys-C (Roche). La digestión fue analizada mediante MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) y un detector de iones acoplado al equipo (Time of Flight) como fue previamente descrito por Gamboa-Suasnavart y col. (2011). La digestión de AR con Lys-C da como resultado 8 fragmentos o péptidos teóricos (Tabla 5).

Tabla 5. Péptidos teóricos de la digestión del antígeno recombinante con Lys-C. PeptideMass ExPASy

| Péptido | Posición de corte | No. De residuos | Da |
|---------|-------------------|-----------------|----------|
| P1 | 107 | 107 | 10376.17 |
| P2 | 135 | 28 | 3000.59 |
| P3 | 146 | 11 | 1155.55 |
| P4 | 189 | 43 | 4602.15 |
| P5 | 195 | 6 | 680.32 |
| P6 | 235 | 40 | 4198.12 |
| P7 | 239 | 4 | 346.20 |
| P8 | / | 48 | 4622.49 |

La muestra digerida fue analizada en dos equipos, una en el equipo del Instituto de Química de la UNAM (Bruker Daltonics GmbH) y la otra en el equipo MALDI-TOF/TOF 3800 (Applied Biosystems) del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Se obtuvo la gráfica del espectro de masa completo y se compararon los péptidos detectados. En particular el péptido P8 (el cual se encuentra glicosilado en la proteína

nativa) fue detectado con un peso experimental de 4,627.304 Da. Además, en la región del espectro mostrado en la Figura 27 se señalan los componentes detectados correspondientes a la masa mencionada con la adición de 162 Da hasta la incorporación de 10 veces éste valor.

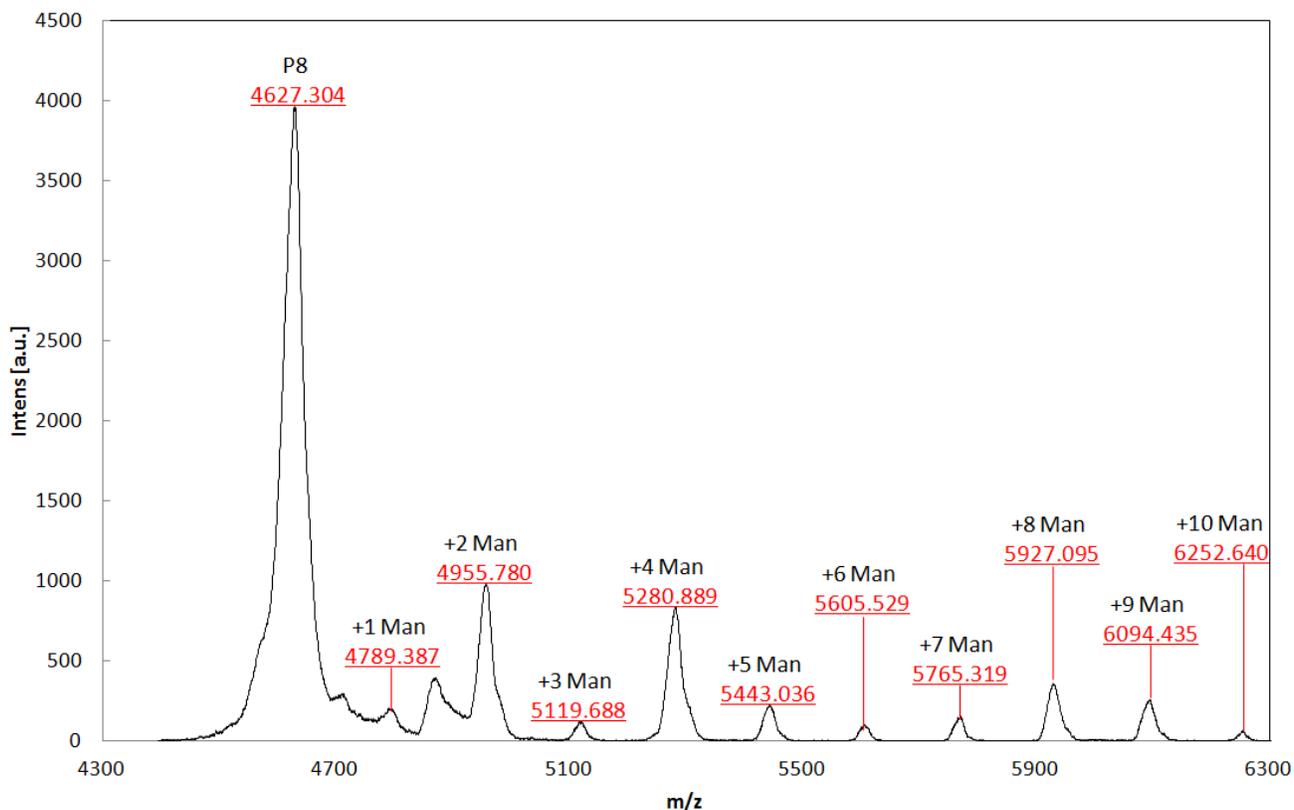


Figura 27. Espectro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH) en la región correspondiente a las unidades de masa atómica del péptido P8 que corresponde a la región C-terminal del AR. El P8 se conforma por 48 aa con un peso teórico calculado de 4,622.497 Da.

En éstos ensayos además se identificaron los péptidos restantes (Figura 28). El péptido P1 (que se encuentra glicosilado en su forma nativa) se observó en el espectro de masas en su forma modificada. No se detectó el peso teórico de 10,376.174 Da. Sin embargo, se encontraron formas que se observan con diferentes incorporaciones de 162 Da (Figura 28a) que van de 2, 11, 12, 13 hasta 14 veces. Asimismo, se identificaron los péptidos P2 con peso experimental de 3,004.799 Da (Figura 28b), P3 de 1,115.62 Da (Figura 28c), P4 de 4,608.321 Da (Figura 28d) y P6 de 4,203.817 Da (Figura 28d).

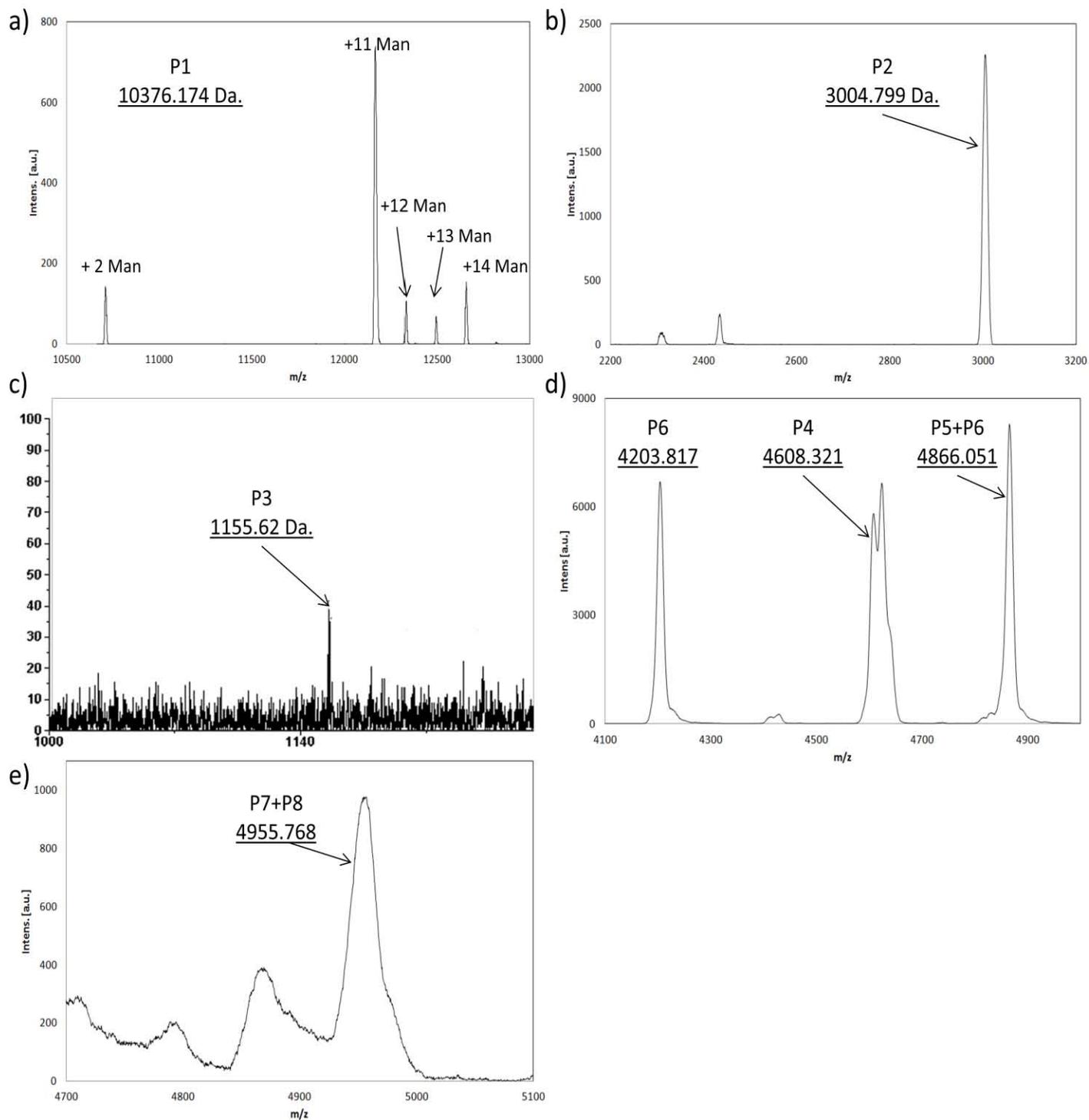


Figura 28. Espectro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH y Applied Biosystems) del AR digerido con Lys-C. a) Péptido P1 de 107 aa, b) Péptido P2 de 28 aa. c) Péptido P3 de 11 aa. d) Péptido P4 de 43 aa, péptido P5+P6 de 49 aa y péptido P6 de 40 aa. e) Péptido P7+P8 de 52 aa.

Los péptidos P5 y P7 no se detectaron en el espectro de masas; sin embargo, los datos de un análisis de proteólisis *in-silico* en el programa PeptideMass de ExPASy del AR con un número máximo de 5 cortes inespecíficos por Lys-C, muestra formas combinatorias de estos péptidos que se detectaron en MALDI-TOF. El péptido P5 se encontró junto con el péptido P6, con un peso experimental de 4,860.422 Da (Figura 28d). De igual manera, el péptido P7 se detectó junto con la forma no modificada del péptido P8, con un peso experimental de 4,955.768 Da (Figura 28e).

Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF, se identificaron los péptidos P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8, cubriendo el 100% de identificación del AR expresado en *P. pastoris*. Asimismo, se obtuvo la secuencia peptídica en los ensayos de MALDI-TOF/TOF (Tabla 6) de los péptidos P2, P3 y P5 y la secuencia peptídica parcial de los péptidos P1, P4, y P6, cubriendo un 40% del total del antígeno recombinante AR.

Tabla 6. Péptidos identificados y secuenciados en análisis de espectrometría de masas del AR.

| Péptido | Peso Teórico (Da) ExPASy | Peso Experimental (Da) MALDI-TOF | Descripción |
|---------|--------------------------|----------------------------------|--|
| P1 | 10376.174 | Modificado | 2,11-14 Man=12655.617 Parcialmente Secuenciado MALDI-TOF/TOF |
| P2 | 3000.590 | 3004.799 | Secuenciado y validado MALDI-TOF/TOF |
| P3 | 1155.552 | 1155.620 | Secuenciado y validado MALDI-TOF/TOF |
| P4 | 4602.155 | 4608.321 | Parcialmente secuenciado |
| P5 | 680.325 | Modificado | P5+P6 4860.433 Secuenciado MALDI-TOF/TOF |
| P6 | 4198.125 | 4203.817 | Parcialmente secuenciado MALDI-TOF/TOF |
| P7 | 346.208 | Modificado | P7+P8 4955.768 |
| P8 | 4622.497 | 4622.497 | Hasta 10 Man = 6576.592. MALDI-TOF |

8. DISCUSIÓN

A la fecha, existen en el mercado productos biofarmacéuticos aprobados para su uso en humanos que son producidos en un muy limitado número de sistemas de expresión tal como *E. coli*, *S. cerevisiae* y Chinese Hamster Ovary cells (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Aunque recientemente se han desarrollado nuevos sistemas de expresión no muy convencionales y con buenos resultados (Corchero *et al.*, 2013). En el caso de levaduras, hasta el 2009 todas las proteínas de uso terapéutico aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) eran expresadas en *S. cerevisiae*. Recientemente, 2 levaduras se han posicionado como buenos candidatos para la producción de proteínas recombinantes: la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (Corchero *et al.*, 2013).

Al momento de seleccionar el sistema de expresión se debe tener en cuenta tanto las características del producto, como la complejidad y conformación del mismo. Por lo que se deberá considerar aquellas modificaciones postraduccionales de las proteínas, tal como: glicosilaciones, fosforilaciones, enlaces disulfuro, metilaciones, acetilaciones, lipidaciones, procesamiento proteolítico, entre otros. Dichas modificaciones pueden actuar directamente en el desempeño, actividad y eficiencia biológica de la proteína.

P. pastoris es una levadura con potencial para producir algunas proteínas de uso terapéutico, pues presenta varias ventajas: es inócua, su manejo y cultivo son relativamente parecidos a los de bacterias, realiza modificaciones postraduccionales, no es pirogénica, se puede cultivar a nivel industrial con medios de cultivo sencillos y la inducción de proteína recombinante se puede realizar con metanol (Hamilton *et al.*, 2013, Walsh, 2010). Al 2010, se han reportado más de 600 genes que han sido clonados y expresados en *P. pastoris* (Zhang *et al.*, 2009).

La producción de proteínas postraduccionalmente modificadas, con *N*- y *O*-glicosilaciones tiene importancia a nivel terapéutico. Ya que los glicanos adheridos a los péptidos le confieren la capacidad de poder ser reconocidos por receptores en células humanas, mejorar sus capacidades antigénicas e inmunogénicas, aumentar su

vida media al darle resistencia o bloquear el acceso a proteasas y mejorar su solubilidad (Oh-eda *et al.*, 1990, Carter *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, se utilizó la plataforma *P. pastoris* como modelo experimental para producir un antígeno de interés médico-farmacéutico identificado previamente de *M. tuberculosis*.

La utilización de técnicas, como mejorar la información genética transferida al sistema y la mutación de sitios indeseables de glicosilación influye fuertemente en la expresión del mismo (Yadava y Ockenhouse, 2003). La secuencia peptídica del antígeno recombinante (AR), se analizó en el servidor en línea NetNGlyc 1.0 para reconocer los posibles sitios consenso de *N*-glicosilación (N-Xaa-S/T). Esto con el fin de evitar glicosilaciones no deseadas, por lo que se decidió mutar puntualmente el aminoácido Asn 161 (N) por el de Gln (Q) como lo sugieren Tsujikawa y col. (1996) y Yadava y Ockenhouse (2003).

Referente a la sustitución de asparagina por glutamina para evitar la *N*-glicosilación, se han reportado mutaciones puntuales en otras proteínas como la de una urocinasa, en donde se pudo observar que la actividad enzimática se mantenía similar a la enzima nativa cuando se le hizo el cambio de Asn por Gln, lo que sugiere que la mutación de éste aminoácido no afecta el correcto plegamiento y/o actividad de la enzima (Tsujikawa *et al.*, 1996). Esto debido a que éstos dos aminoácidos contienen cadenas laterales muy similares polares y sin carga, y estructuralmente, la glutamina posee un grupo $-CH_2$ más que la asparagina.

Respecto al crecimiento de *P. pastoris* en medio con glicerol se ha reportado anteriormente por Chiruvolu y col. (1998) una velocidad específica de crecimiento de 0.26 h^{-1} en matraz agitado con medio basal de sales. Aunque en éste proyecto realizado obtuvimos velocidades específicas de crecimiento mayores ($0.37\text{-}0.38 \text{ h}^{-1}$), cabe destacar que en éste trabajo se utilizó el medio rico BMGY con glicerol como fuente de carbono y matraz bafleado, el cual incrementa la transferencia de oxígeno en el medio.

Durante el crecimiento e inducción en medio BMMY con metanol se observó una velocidad específica (μ) de crecimiento de entre 0.14-0.17 h⁻¹ muy similar a lo reportado por Brierley y col. (1990) de 0.14 h⁻¹ así como Maccani y col (2014) de 0.15 h⁻¹.

La producción de proteína recombinante en el medio es afectada por la concentración de metanol. De acuerdo a Ling y col. (2010) y Lei y col. (2012) la producción de proteína recombinante disminuye en medios de cultivo que contienen más del 2% de metanol o menos del 0.5%. En nuestros resultados se observa un aumento gradual de la concentración de proteína en el medio de cultivo similarmente a lo reportado (Tsujikawa *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2012, Lei *et al.*, 2012).

Se reportó que la concentración óptima de metanol en la producción de la enzima xylanasa de *Aspergillus niger*, correspondía al 0.8% y que fuera de éstos valores disminuía su actividad (Li *et al* 2012). En nuestros medios de cultivo se desconoce la concentración de metanol alcanzada en los últimos puntos de la cinética, por lo que se sugiere medir éstos parámetros e indagar el efecto de metanol en el crecimiento y producción de proteína. Asimismo en futuros ensayos se pretende disminuir la cantidad de metanol suministrado, bajo un esquema controlado, para comparar la producción de proteína heteróloga en nuestro sistema.

Se ha reportado que *P. pastoris* secreta una baja concentración de proteínas nativas al medio de cultivo, comparado con *S. lividans*, lo que facilita la purificación de la proteína recombinante (Maccani *et al.*, 2014, Cregg *et al.*, 2009). Aunado a la poca secreción de proteasas de *P. pastoris*, las glicosilaciones de una proteína pueden brindar más resistencia a la degradación por proteasas al ocultar transitoriamente los sitios de reconocimiento por las manosas como lo sugieren Carter y col. (2004). Al comparar la proteína G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) glicosilada contra la misma proteína de forma no glicosilada, ellos encontraron que la no glicosilada es 95% más susceptible de ser degradada por elastasas a las 2 h. En nuestros ensayos de inmunodetección con el anticuerpo Mab 6A3 se logró identificar al AR. Así como

también se demostró la manosilación mediante la purificación del AR en columna Con-A/Sefarosa y de Western Blot con Con-A/HRP.

Se logró confirmar el AR producido en medio BMMY (con metanol) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF. La identificación se obtuvo en un 100% y la secuenciación se obtuvo parcialmente abarcando el 40% de los residuos totales. De igual manera se detectó la mutación puntual de Asn por Gln. Para obtener una cobertura total se sugiere utilizar otros ensayos de proteólisis y técnicas combinadas de espectrometría de masas como CID, HCD y ETD que nos permita identificar y secuenciar los péptidos restantes o utilizar la técnica de secuenciación mediante degradación de Edman.

En *S. lividans* el rendimiento de proteína purificada de un cultivo en matraz agitado fue de 5 mgL⁻¹ después de 36 h de inducción (Lara *et al.*, 2004). La purificación subsecuente con Con-A/Sefarosa demostró estar glicosilada y además esta fracción fue reconocida en ensayos ELISA con suero de individuos infectados con Tb. El AI producido en *S. lividans*, al ser tratado con α -D-manosidasas, disminuye la interacción con anticuerpos de suero de pacientes con Tb hasta en un 60%, similar a los ensayos realizados por Romain y col (1999) y Horn y col. (1999). El mapeo peptídico por MALDI-TOF reveló que las manosas adheridas al C-terminal variaban de 0 hasta 4 manosas, contribuyendo a los indicios de que el patrón de manosilación influye en la actividad antigénica (Lara *et al.*, 2004).

En trabajos previos realizados por Gamboa-Suasnavart y col. (2011) se ensayaron digestiones del AI de *S. lividans*, y analizadas por MALDI-TOF (Anexo C). En ese trabajo se reporta la identificación del péptido P8 con un peso de ~4,600 Da, y detecciones subsecuentes con aumentos 162 Da, lo que indicó la adición de 1 hasta 5 manosas dependiendo del tipo de matraz utilizado para el cultivo. Sin embargo, en éstos mismos ensayos no se pudo detectar el péptido P1.

En nuestros análisis se identificaron 2 péptidos con posibles modificaciones postraduccionales. El péptido P1, originalmente con un peso molecular teórico de

10,376.174 Da (Figura 28a) y el péptido P8 con un peso molecular teórico de 4,622.497 Da (Figura 27). La detección de péptidos de 10 709 Da, 12 169 Da, 12 332 Da, 12 494 Da y 12 665 Da sugiere la presencia del péptido P1 con 2, 11, 12, 13 y 14 posibles manosilaciones respectivamente. Por otra parte, la detección del péptido P8 sin modificaciones y subsecuentes modificaciones adicionales, sugiriendo desde 0 hasta 10 manosas adheridas.

Originalmente, en el antígeno nativo de *M. tuberculosis* se reportaron manosilaciones en la treonina 10, 18 y 27 con 2 residuos de manosa en cada una y en la treonina 277 de 1 hasta 3 residuos de manosas de acuerdo a Dobos y col. (1996) y Smith y col. (2014). Sin embargo; los sitios de manosilación en el AR producido en *P. pastoris* deben ser determinados; pues tanto, en el péptido P1 como en el péptido P8 existen otros sitios posibles de O-glicosilación (treoninas 11, 39, 275, 278, 280, 285; y serinas 14, 17 y 244) además de los ya reportados por Dobos y col. (1995 y 1996), aunque como se ha podido observar *in vitro*, la treonina generalmente es mejor aceptor que la serina (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999-1991, Bause *et al.*, 1979).

A pesar de que en el péptido P8 se detectaron posibles manosilaciones que van desde 0 hasta 10 residuos mediante espectrometría de masas y el péptido P1 con 2, 11, 12, 13 y 14 posibles manosas, éste ensayo no nos permite determinar los residuos glicosilados y/o la longitud de las manosilaciones.

La presencia de péptidos unidos como el P5 y P6, así como la del péptido P7 y P8 como se observan en la Figura 28d y 28e es probablemente debido a deficiencias en la actividad de la proteasa Lys-C, que puede no estar reconociendo sitios de proteólisis por la presencia de modificaciones postraduccionales.

Aunque el objetivo final de éste proyecto es sólo determinar el número de posibles manosas adheridas al péptido P8, se pretende a futuro determinar los sitios de glicosilación, así como la longitud de las cadenas de oligosacáridos siguiendo los mismos protocolos realizados previamente por Dobos y col. (1995 y 1996), Lara y col.

(2004) y Smith y col. (2014). De igual manera, es necesario determinar el tipo de enlace presentes en los glicanos, los cuales se puede argumentar que están unidos por enlaces α -1,2, ya que en la secuenciación del genoma de *P. pastoris* reportada por Schutter y col. (2009) no se encontraron genes ortólogos, ni homólogos que realicen enlaces α -1,3 que resultan alergénicos en el humano.

El patrón de glicosilación tanto del AI nativo como el AR, influye importantemente en la proliferación de linfocitos T *in vitro* e *in vivo*. En la tabla 7 se resume la presencia de manosas de los antígenos producidos en diferentes sistemas reportados previamente y la de este trabajo.

Tabla 7. Manosilaciones del antígeno producido en diferentes hospederos.

| Cepa | # Man N-Terminal | # Man C-Terminal | Referencia |
|------------------------|------------------|------------------|--|
| <i>M. tuberculosis</i> | 6 | 1-3 | Dobos <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>S. lividans</i> | 0-9 | 0-4 | Lara <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>S. lividans</i> | N/D | 0-5 | Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>E. coli</i> | 0 | 0 | Horn <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>P. pastoris</i> | 2, 11-14 | 0-10 | Este trabajo |

Respecto a la importancia de las glicosilaciones, Haurum y col. (1994) y Dasgupta y col. (2007) destacan el papel que juegan los carbohidratos adheridos a los péptidos durante el reconocimiento de linfocitos T por sus receptores, los cuales se correlacionan con la estructura y número de los glicanos presentes, así como de la posición en el péptido. De ahí que será importante estudiar la actividad del AR sobre la proliferación de linfocitos T, lo que nos permitirá conocer si el patrón de glicosilación del AR producido modifica la activación en la proliferación comparado con otros antígenos ya evaluados.

En un estudio realizado por Benabdeselem y col. (2006) en el que expresan y purifican el antígeno CFP32 de *M. tuberculosis* en *P. pastoris*, el antígeno presentó reactividad del 100% en ensayos de ELISA con el suero de 7 pacientes con Tb. Además de haber sido comparado con el antígeno producido en *E. coli* el cual solo

demostró un 30% de reactividad. Probablemente, las diferencias biológicas se debieron a los patrones de glicosilación como lo sugieren Benabdeselem y col. (2007).

En la espectrometría de masas de nuestros ensayos se pudo observar desde 0 y hasta 10 manosas adheridas al péptido P8 del C-terminal, un patrón que abre la posibilidad de un cambio significativo en la eficiencia y actividad del antígeno. Por lo tanto, *P. pastoris* demuestra ser una opción para expresar otras proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* como los reportados por Kunnath-Velayudhan y col. (2010) para utilizarse en vacunas o serodiagnosís en pacientes. Pues como ya se ha reportado, la vacuna BCG que se comenzó a administrar como método preventivo desde 1921 ha arrojado resultados variables que van desde 0 a 80% de protección para Tb pulmonar (Bloom & Fine, 1994), aunque también se ha observado que sigue siendo eficiente contra otras formas de la infección como la Tb meníngea y la diseminada (Rodríguez *et al.*, 1993).

El cultivo en biorreactor de cepas recombinantes de *P. pastoris* así como la bioingeniería ha permitido aumentar los rendimientos en producción de proteína recombinante a tal grado que se vuelven comercialmente atractivos para empresas biofarmacéuticas que buscan bajar los costos de producción y por lo tanto los precios en el mercado. El primer medicamento aprobado por la FDA producido en *P. pastoris* fue Kalbitor® (Ecallantide) en el 2009, utilizada para tratar angiodema hereditario (Craig *et al.*, 2014), y Jetrea® (Ocriplasmin) para tratar la adhesión vitreomacular sintomática en el 2012. Otros antígenos expresados en *P. pastoris* de interés farmacéutico y/o veterinario, algunos ya en ensayos clínicos o disponibles en el mercado se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Antígenos expresados en *Pichia pastoris*.

| Nombre | Descripción | Organismo | Concentración | Referencia |
|-------------|--|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Mb86 | Antígeno de garrapata de ganado | <i>Boophilus microplus</i> | 1.5-2 gL ⁻¹ | Rodriguez <i>et al.</i> , 1994 |
| Bm95 | Antígeno de garrapata de ganado | <i>Boophilus microplus</i> | 0.55 gL ⁻¹ | Boué <i>et al.</i> , 2004 |
| Fragmento C | Toxina de tetanos | <i>Costridium tetani</i> | 12 gL ⁻¹ | Clare <i>et al.</i> , 1991 |
| P69 | Proteína de membrana inmunogénica | <i>Bordetella pertussis</i> | 3 gL ⁻¹ | Romanos <i>et al.</i> , 1991 |
| gD | Glicoproteína secretoria del virus del herpes bovino | <i>Bovine herpesvirs 1</i> | 10-20 mgL ⁻¹ | Zhu <i>et al.</i> , 1997 |
| rBoNTA(Hc) | Neurotoxina botulínica | <i>Clostridium botulinum</i> | - | Bouvier <i>et al.</i> , 2003 |
| 6L1 | Proteína del virus de papiloma humano | <i>Human papillomavirus</i> | 125 µgL ⁻¹ | Li <i>et al.</i> , 2003 |
| gD | Proteína del virus de papiloma equino | <i>Equine herpesvirus 1</i> | 50-100 mgL ⁻¹ | Ruitenbergh <i>et al.</i> , 2001 |
| E4rec | Glicoproteína de envoltura del virus del dengue tipo 4 | <i>Dengue virus 4</i> | - | Muné <i>et al.</i> 2003 |
| HBsAg* | Antígeno de Hepatitis B | <i>Hepatitis B Virus</i> | - | Leptic <i>et al.</i> , 1996 |
| ORF2 | Antígeno de Hepatitis E | <i>Orthohepevirus A</i> | - | Tong <i>et al.</i> , 2002 |
| PfCP-2.9 | Antígeno contra la malaria | <i>Plasmodium falciparum</i> | 2.6 gL ⁻¹ | Pan <i>et al.</i> , 2004 |
| Pfs25 | Antígeno contra la malaria | <i>Plasmodium falciparum</i> | 19 mgL ⁻¹ | Zou <i>et al.</i> , 2003 |
| AMA1 | Antígeno contra la malaria | <i>Plasmodium falciparum</i> | 28.3-50 mgL ⁻¹ | Kennedy <i>et al.</i> , 2002 |
| P30P2MSP1 | Antígeno contra la malaria | <i>Plasmodium falciparum</i> | 0.5 gL ⁻¹ | Brady <i>et al.</i> , 2001 |
| P1-2A | Antígeno precursor de cápside | <i>Foot-and-mouth disease virus</i> | 120-150 mgL ⁻¹ | Balamurugan <i>et al.</i> , 2003 |
| AR | Antígeno de <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. tuberculosis</i> | 177 mgL ⁻¹ | Éste trabajo |

La producción alcanzada del AR en nuestros ensayos fue de $\sim 0.177 \pm 0.033 \text{ gL}^{-1}$ ($\sim 177 \text{ mgL}^{-1}$) y una productividad volumétrica de $\sim 0.003 \pm 0.000 \text{ gAR/Lh}$ en matraz y con medio no optimizado, lo cual es una producción comparable a los antígenos expresados en el mismo sistema y que se muestran en la tabla 8. Sin embargo aún existe la posibilidad de diseñar un bioproceso donde se pueda alcanzar alta concentración de biomasa y aumentar el rendimiento de proteína.

La producción del AR en *P. pastoris* en éste trabajo nos ofrece una nueva línea de investigación en la producción de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*. Dicho AR, junto con otros antígenos que aún se encuentran en fase de diseño y producción en nuestro equipo de investigación, se pueden utilizar para el mejoramiento de vacunas existentes, fabricación de vacunas multicomponentes o la elaboración de una prueba diagnóstico.

9. CONCLUSIONES

Se logró mediante el diseño y construcción propuestos, la producción de un antígeno glicosilado de *Mycobacterium tuberculosis* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* con la finalidad de utilizarse en procesos biomédicos.

La estrategia empleada para el diseño y construcción del plásmido pAJVT codificante para el antígeno recombinante fue exitosa y se obtuvieron clonas de *P. pastoris* productoras del AR.

Se obtuvo un bioproceso de producción del AR en el que se produce hasta 44.4% del total de proteína en sobrenadante, correspondiendo a una productividad volumétrica de 0.003 ± 0.000 gAR/Lh acumulando hasta ~ 177 mgL⁻¹ a las 66 h.

El bioproceso en matraces de *P. pastoris* C6 permitió purificar del sobrenadante el AR mediante HPLC fase reversa, siendo el componente mayoritario. Además el AR presentó un punto isoeléctrico, similar al reportado para el antígeno nativo de *M. tuberculosis*. También se demostró la huella digital al 100% del AR mediante espectrometría de masas. En el mismo sentido, se determinó el 40% de la estructura primaria del AR, pues se detectaron e identificaron los aminoácidos que componen a los péptidos denominados P2, P3, P5 obtenidos de la digestión con Lys-C. La presencia de los péptidos P1, P4 y P6, fue deducida a partir de la detección de fragmentos parcialmente digeridos del espectro de masas.

A partir de las condiciones poco controladas como las que suceden en matraces, se obtuvo el AR en su forma glicosilada, comprobado por afinidad a la lectina Con-A y por espectrometría de masas. Particularmente, se detectó el P8 del extremo C-terminal con 0 y hasta 10 manosas adheridas. Con lo que se demostró que en el bioproceso presentado se obtienen 7 manosas más, comparadas con las obtenidas en *M. tuberculosis*, en el que se han obtenido hasta 3 manosas en el C-terminal y cinco manosas más, comparada a las obtenidas en *S. lividans*. También se demostró la presencia de modificaciones en el extremo N-terminal liberado de la misma digestión proteolítica con 1, 11, 12, 13 y 14 posibles manosas.

Los resultados obtenidos evidencian la posibilidad de usar el sistema de expresión *P. pastoris* en bioprocesos de alta producción de antígenos recombinantes modificados postraduccionalmente. La información presentada también muestra que aún es necesario desarrollar estrategias para mejorar la productividad y estudiar la relación de condiciones controladas en el efecto de las modificaciones postraduccionales.

*La metodología presentada en este proyecto, desde el diseño del gen y construcciones de los vectores, hasta la expresión y purificación en *P. pastoris*, sirvió también para evaluar la producción de un antígeno recombinante de 38 kDa de *M. tuberculosis* como parte de una tesis doctoral. Los resultados están en proceso de discusión y evaluación.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar los residuos glicosilados del AR y la estructura de los glicanos.
- Demostrar la actividad biológica del AR estimulando la proliferación de Linfocitos T *in vitro* e *in vivo*.
- Aumentar la productividad volumétrica de AR mediante el diseño de un bioproceso de alta densidad.
- Estudiar el efecto de las condiciones de cultivo sobre las glicosilaciones que realiza *Pichia pastoris* durante la producción del AR.

11. BIBLIOGRAFÍA

Bai J., Swartz D., Protasevich I., Brouillette C., Harrell P., Hildebrandt E., Gasser B., Mattanovich D., Ward A., Chang G., Urbatsch I. (2011) A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* 6(8) e22577.

Balamurugan V., Renji R., Saha S.N., Reddy G.R., Gopalakrishna S., Suryanarayana V.V.S. (2003) Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in *Pichia pastoris*. *Virus Research*. 92:141-149.

Benabdesselem C., Fathallah D.M., Huard R.C., Zhu H., Jarboui M.A., Dellagi K., Ho J.L., Barbouche R.M. (2006) Enhanced patient serum immunoreactivity to recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP32 produced in the yeast *Pichia pastoris* compared to *Escherichia coli* and its potential for serodiagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:9 3086-3093.

Bloom B.R., Fine P.E.M. (1994) The BCG Experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. 531-557.

Böer E., Steinborn G., Kunze G., Gellissen G. (2007) Yeast expression platforms. *Applied Microbiology Biotechnology*. 77:513-523.

Boué O., Farnós O., González A., Fernández R., Acosta J.A., Valdés R., González L.J., Guanche Y., Izquierdo G., Suárez M., Domínguez I., Machado H., Rodríguez M., Leonart R. (2002) Production and biochemical characterization of the recombinant *Boophilus microplus* Bm95 antigen from *Pichia pastoris*. *Experimental and Applied Acarology*. 32:119-128.

Bouvier A., Chapline J., Boerner R., Jeyarajah S., Cook S., Acharya P.S., Henderson I., Schrimsher J.L., Shepard S.R. (2003) Identifying and modulating disulfide formation in the biopharmaceutical production of a recombinant protein vaccine candidate. *Journal of Biotechnology*. 103:257-271.

Brady C.P., Shimp R.L., Miles A.P., Whitmore M., Stowers A.W. (2001) High-level production and purification of P30P2MSP119 an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 23:468-475.

Bretthauer R.K., Castellino F.J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:193-200.

Brierley R.A., Bussineau C., Kosson R., Melton A., Siegel R.R. (1990) Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: Bovine lysozyme. *Ann NY Acad Sci*. 589:350-362.

Brunel L., Neugnot V., Landucci L., Boze H., Moulin G., Bigey F., Dubreucq E. (2004) High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 111:41-50.

Carter C.R.D., Whitmore K.M., Thorpe R. (2004) The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSF's to human neutrophil elastase degradation. *Journal of Leukocyte Biology* 75:515-522.

Chen C., Wu P., Huang C., Cheng K. (2004) A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme and Microbial Technology*. 35:315-320.

Chen M.T., Lin S., Shandil I., Andrews D., Stadheim T.A., Choi. B.K. (2012) Generation of diploid *Pichia pastoris* strains by mating and their application for recombinant protein production. *Microb Cell Fact*. 11:91. doi:10.1186/1475-2859-11-91.

Chiruvolu V., Eskridge K., Cregg J., Meagher M. (1998) Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 75:163-173.

Corchero J.L., Gasser B., Resina D., Smith W. (2013) Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high quality protein therapeutics. *Biotechnol Adv*. 31:140-153.

Craig T., Li H.H., Riedl M., Bernstein J.A., Lumry W.R., MacGinnitie A.J., Stolz L.E., Biedenkapp J., Chyung Y. (2014) Characterization of anaphylaxis after Ecallantide treatment of hereditary angioedema attacks. *J. Allergy CLin Immunol Pract*. 3(2):206-212.

Da Silva P., Palomino J. (2011) Molecular basis and mechanisms of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66:1417-1430.

Damasceno L.M., Anderson K.A., Ritter G., Cregg J.M., Old L.J., Batt C.A. (2007) Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74:381-389.

Daly R., Hearn M. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. 18:119-138.

Dasgupta S., Navarrete A.M., Bayry J., Delignat S., Wootla B., André S., Christophe O., Nascimbeni M., Jacquemin M., Martinez-Pomares L., Geijtenbeek T.B.H., Moris A., Saint-Remy J.M., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V., Laroix-Desmazes S. (2007) A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *PNAS*. 104(21):8965-8970.

Diagbouga S., Fumox F., Zoubga A., Sanou P.T., Marchal G. (1997) Immunoblot analysis of serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-Kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4(3):334-338.

Dobos K., widerek K., Khoo K., Brennan P., Belisle J. (1995) Evidence for glycosylation sites on the 45-Kilodalton Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 63(8):2846.

Dobos K., Khoo K., Swiderek K., Brennan P., Belisle J. (1996) Definition of the full extent of glycosylation of the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 178(9):2498-2506.

Duman J.G., Miele R.G., Liang H., Grella D.K., Sim K.L., Castellino F.J., Bretthauer R.K. (1998) O-mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 28:39-45.

Espitia C., Espinosa R., Saavedra R., Mancilla R., Romain F., Laqueyrie A., Moreno C. (1995) Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens. *Infect Immun*. 63:580-584.

- Ferrer-Miralles N., Domingo-Espin J., Corchero J.L., Vazquez E., Villaverde A.** (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* 8:7.
- Fan G., Katrolia P., Jia H., Yang S., Yan Q., Jiang Z.** (2012) High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 34:2043-2048.
- Fukazawa Y., Kagaya K., Shinoda T.** (1995) Cell wall polysaccharides of pathogenic yeasts. *Curr Top Med Mycol.* 6:189-219.
- Gatfield J., Pierters J.** (2003) Molecular mechanisms of host pathogen interaction: entry and survival of mycobacteria in macrophages. *Advanced Immunology.* 81:45-96.
- Gamboa-Suasnavart R., Valdez-Cruz N., Cordova-Davalos L., Martinez-Sotelo J., Servin-Gonzalez L., Espitia C., Trujillo-Roldan M.** (2011) The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories.* 10:110.
- Garcia-Garcia J.C., Montero C., Redondo M., Vargas M., Canales M., Boue O., Rodriguez M., Joglar M., Machado H., Gonzalez I.L., Valdes M., Mendez L., de la Fuente J.** (2000) Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 18:2275-2287.
- Gemmil T.R., Trimble R.B.** (1995) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1426:227-237.
- Girrbach V., Strahl S.** (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(14):12554-12562.
- Gou X-H., Liu Y-Y., Chen Q-L., Tang J-J., Liu D-Y., Zou L., Wu X-Y., Wang W.** (2012) High level expression of bikunin in *Pichia pastoris* by fusion of human serum albumin. *AMB Express.* 2:14.
- Gorocica P., Jimenez-Martinez M.C., Garfias Y., Sada I., Lascurain R.** (2005) Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 18(2):142-153.
- Hao J., Xu L., He H., Du X., Jia L.** (2013) High-level expression of *Staphylococcal* Protein A in *Pichia pastoris* and purification and characterization of the recombinant protein. *Prot. Expr. And Purif.* 90:178-185.
- Haurum J., Gemma A., Annemarie C., LeUouch S., Wong Y.C., Raymond A., Andrew J., Mc Michael, Elliott T.** (1994) Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex Class 1-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T Lymphocytes. *J Exp Med.* 180:739-744.
- Hamilton S.R., Cook W.J., Gomathinayagam S., Burnina I., Bukowski J., Hopkins D., Schwartz S., Du M., Sharkey N.J., Bobrowicz P., Wildt S., Li H., Stadheim T.A., Nett J.H.** (2013) Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology.* Doi:10.1093/glycob/cwt056.

- Hemmati M., Seghatoleslam A., Rasti M., Ebadat S., Mosavari N., Habibagahi M., Taheri M., Sardarian AR., Mostafavi-Pour Z.** (2011) Expression and purification of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (TB) antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT-6/CFP-10 and their diagnosis potential for detection of TB patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 13(8):556-563.
- Horn C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O., Marchal G.** (1999) Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T Lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(45):32023-32030.
- Jahic M., Gustavsson M., Jansen A., Martinelle M., Enfors S.** (2003) Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*. 102:45-53.
- Jigami Y., Odani T.** (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426:335-345.
- Kennedy M.C., Wang J., Zhang Y., Miles A.P., Chitsaz F., Saul A., Long C.A., Miller L.H., Stowers A.W.** (2002) In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infection and Immunity*. 70(12):6948-6960.
- Kleinnijenhuis J., Oosting M., Joosten L., Netea M., Van Crevel R.** (2011) Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and developmental immunology*. 11.
- Kluepfel D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F., Morosoli R.** (1990) Purification and characterization of a new Xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J*. 267:45-50.
- Koutz P.J., Davis G.R., Stillman C., Barringer K., Cregg J.M., Thill G.** (1989) Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. *Yeast*. 5:167-177.
- Kumar P., Amara R., Challu V., Chadda V., Satchidanandam V.** (2003) The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infection and Immunity*. 71(4):1929-1937.
- Kunnath-Velayudhana S., Salamonb H., Wanga H, Davidowc A.L., Molinad D.M., Huynhd V.T., Cirilloe D.M., Michelf G., Talbotf E.A., Perkinsf M.D., Felgnerd P.L., Liangd X., Gennaro M.L.** (2010) Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *PNAS*. 107(33):14703-14708.
- Lara M., Servin L., Singh M., Moreno C., Cohen I., Nimt M., Espitia C.** (2004) Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2):679-685.
- Laqueyrie A., Militzer P., Romain F., Eiglmeier K., Cole S., Marchal G.** (1995) Cloning, sequencing and expression of the Apa gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. *Infection and Immunity*. 63(10):4003-4010.

- Lei J., Guan B., Li B., Duan Z., Chen T., Li H., Jin J.** (2012) Expression, purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin (rhIL-2-HSA) fusion protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 84:154-160.
- Leptic A., Seigelchifer M., Arduino R.C., Lazovski J., Nacinovich F.** (1996) Novel recombinant HB vaccine produced by a high level expression of *Hansenula polymorpha* yeast system. *Clin Infect Dis.* 23:276.
- Li F., Yang S., Zhao L., Li Q., Pei J.** (2012) Synonymous codon usage bias and overexpression of a synthetic *xynB* gene from *Aspergillus niger* NL-1 in *Pichia pastoris*. *BioResources.* 7(2):2330-2343.
- Li L., Fan D., Ma X., Deng J., He J.** (2015) High-level expression and purification of unhydroxylated human collagen α 1 (III) chain in *Pichia pastoris* GS115. *Biotechnol appl Biochem.* doi: 10.1002/bab.1297.
- Li P.C., Zhang X.G., Zhou L., Zeng Y.** (2003) Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 17(4):310-4.
- Lin-Cereghino J., Hashimoto M.D., Castelo J., Orazem C.C., Kuo P., Xiong S., Ghandi V., Hatae C.T., Chan A., Lin-Cereghino G.P.** (2008) Direct selection of *Pichia pastoris* expression strain using new G418 resistance vector. *Yeast.* 25:293-299.
- Lommel M., Strahl S.** (2009) Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology.* 19(8):816-828.
- Lurie M.B.** (1964) Resistance to tuberculosis: experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. *Harvard University Press, Cambridge, Mass.*
- Macauley-Patrick S., Fazenda M., McNeil B., Harvey L.** (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 22:249-270.
- MacLeod A.M., Gilkes N.R., Escote-Carlson L., Warren R.A., Kilburn D.G., Miller R.C.J.** (1992) *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucase (Cex) from *Cellulomonas fimi*. *Gene* 121(1):143-147.
- Martinez-Sotelo J.** (2012) Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en ratones, inducida por la proteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis* y sus formas recombinantes. Tesis de Maestría Posgrado en ciencias Bioquímicas.
- Mellitzer A., Weis R., Glieder A., Flicker K.** (2012) Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories.* 11:61.
- Muné M., Rodríguez R., Ramírez R., Soto Y., Sierra B., Rodríguez R., Marque G., Garcia J., Guillén G., Guzmán M.G.** (2003) Carboxy-terminally truncated Dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induced neutralizing antibodies and resistance to Dengue 4 virus challenge in mice. *Archives of Virology.* 148:2267-2273.

Nandakumar S., Kannanganat S., Dobos K.M., Lucas M., Spencer J.S., Fang S., McDonald M.A., Pohl J., Birkness K., Chamcha V., Ramirez M.V., Plikaytis B.B., Posey J.E., Amara R.R., Sable S.B. (2013) O-mannosylation of the *Mycobacterium tuberculosis* adhesin APA is crucial for T-cell antigenicity during infection but is expendable for protection. *PLoS Pathogen*. 9(10): e1003705.

Nett J.H., Cook W.J., Chen M.T., Davidson R.C., Bobrowicz P., Kett W., Brevnova E., Potgieter T.I., Mellon M.T., Prinz B., Choi B.K., Zha D., Burnina I., Bukowski J.T., Du M., Wildt S., Hamilton S.R. (2013) Characterization of the *Pichia pastoris* protein O-mannosyltransferase gene family. *Plos One*. 8 (7):e68325.

Oh-eda M., Hasegawa M., Hattori K., Kuboniwa H., Kojima T., Orita T., Tomonou K., Yamazaki T., Ochi, N. (1990) O-linked sugar chain of human colony stimulating factor protects it against polymerization and determination allowing it to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.* 265:11432–11435.

Oledzka G., Dabrowski S., Kur J. (2003) High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 29:223-229.

OMS. (2012) Tuberculosis. Nota descriptiva No. 104.

Paifer E., Margolles E., Cremata J., Montesino R., Herrera L., Delgado J.M. (1994) Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*. 10:1415-1419.

Pan W., Huang D., Zhang Q., Qu L., Zhang D., Zhang X., Xue X., Qian F. (2004) Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *J Immunol*. 172:6167-6174.

Pen Z., Want A., Feng Q., Wang Z., Vitanova I., He X., Zhang B., Song W. (2013) High-level expression, purification and characterization of porcine β -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 98:5487-5497.

Potgieter T.I., Kersey S.D., Mallem M.R., Nylen A.C., d'Anjou M. (2010) Anti-body expression kinetics in glycol-engineered *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 106:918–27.

Prill S.K.H., Klinkert B., Timpel C., Gale C.A., Schröppel K., Ernst J.F. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Molecular Microbiology*. 55(2):546-560.

Ragas A., Roussel L., Puzo G., Riviere M. (2007) The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein Apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary c-type lectin surfactant protein A. *Journal of biological chemistry*. 282(8):5133-5142.

Rodríguez L.C., Diwan V.K., Wheeler J.G. (1993) Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 22(6):1154-1158.

Rodríguez M., Rubiera R., Penichet M., Montesinos R., Cremata J., Falcon V., Sanchez G., Bringas R., Cordovés C., Valdés M., Leonart R., Herrera L., de la Fuente J. (1994) High level expression of the *B. microplus* BM86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*. 33:135-146.

Ronning D., Vissa V., Besra G., Belisle J., Sacchettini J. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(35):36771-36777.

Romain F., Laqueyrie A., Militzer P., Pescher P., Chavarot P., Lagranderie M., Auregan G., Gheorghiu M., Marchal G. (1993a) Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47- Kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infection and Immunity* 61(2):742-750.

Romain F., Augier J., Pescher P., Marchal G. (1993b) Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5322-5326.

Romain F., Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., Barzu O., Machal G. (1999) Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses. *Infection and Immunity* 67(11):5567-5572.

Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., Rayment F.B., Ballantine S.P., Makoff A.J., Dougan G., Fairweather N.F., Charles I.G. (1991) Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: High-level production and immunological properties. *Vaccine*. 9:901-906.

Ruitenber K.M., Glikerson J.R., Wellington J.E., Love D.N., Whalley J.M. (2001) Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. *Virus Research*. 79:125-135.

Sable S., Cheruvu M., Nandakumar S., Sharma S., Bandyopadhyay K., Kellar K., Posey E., Plikaytis B., Amara R., Shinnick T. (2011) Cellular Immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination. *PLoS ONE* 6(7):e22718.

Schutter K.D., Lin Y.C., Tiels P., Van Hecke A., Glinka S., Weber-Lehmann J., Ruzé P., Van de Peer Y., Callewaert N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. 27(6):561-566.

Singh K., Zhang X., Patibandla A., Chien P., Laal S. (2001) Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infection and Immunity*. 69(6):4185-4191.

Smith G.T., Sweredoski M.J., Hess S. (2014) O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *J Proteomics*. 97:296-306.

Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kropp K.E., Blankenship D.T., Tsay J.T., Smith P.L., Wierschke J.D., Subramaniam A., Birkenberger L.A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 190 55-62.

SSA (2009) Estándares para la atención de la Tuberculosis en México. ISBN 978-607-460-087-2.

Tong Y.P., Bi S.L., Lu J., Jiang Y.Z., Zhan M.Y. (2003) Antigenicity identification of recombinant hepatitis E virus ORF2 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*. 17(3):258-61.

Trimble R.B., Atkinson P.H., Tschopp J.F., Townsend R.R., Maley F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry*. 34:22807-22817.

Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., Grinna L. (1987) High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5, 1305-1308.

Tsujikawa M., Okabayashi K., Morita M., Tanabe T. (1996) Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an *N*-glycosylation site in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and characterization of the secreted product. *Yeast*. 12:541-553.

Várnai A., Tang C., Bengtsson O., Atterton A., Mathiesen G., Eijsink V.G.H. (2014) Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. *Microbial Cell Factories* 13:57.

Van Crevel R., Ottenhoff T., van der Meer J. (2002) Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2):294-309.

Verostek M.F., Trimble R.B. (1995) Mannosyltransferase activities in membranes from various yeast strains. *Glycobiology*. 5:671-681.

Villatte F., Hussein A.S., Bachmann T.T., Schmid R.D., Bachmann T. (2001) Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(4):463-465.

Walsh G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol*. 28(9): 917-924.

WHO. (2012). Global Tuberculosis Report. WHO/HTM/TB/2012.6.

WHO. (2008) Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report. WHO/HTM/TB/2008.394.

Yadava A., Ockenhouse F. (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infection and Immunity*. 71(9):4961-4969.

Yan Y., Chen J., Li J. (2003) Overexpression of a small medicinal peptide from ginseng in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 29:161-166.

Zhang W., Inan M., Meagher M.M. (2000) Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 5:275-287.

Zhang A.L., Luo J.X., Zhang T.Y., Tan Y.H., Fu C.Y., Tu F.Z. (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*. 36(6):1611-1619.

Zhu X., Wu S., Letchworth G.J. (1997) Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. *Vaccine*. 15(6):679-688.

Zou L., Miles A.P., Wang J., Stowers A.W. (2003) Expression of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25 in *Pichia pastoris* for use in human clinical trials. *Vaccine*. 21:1650-1657.

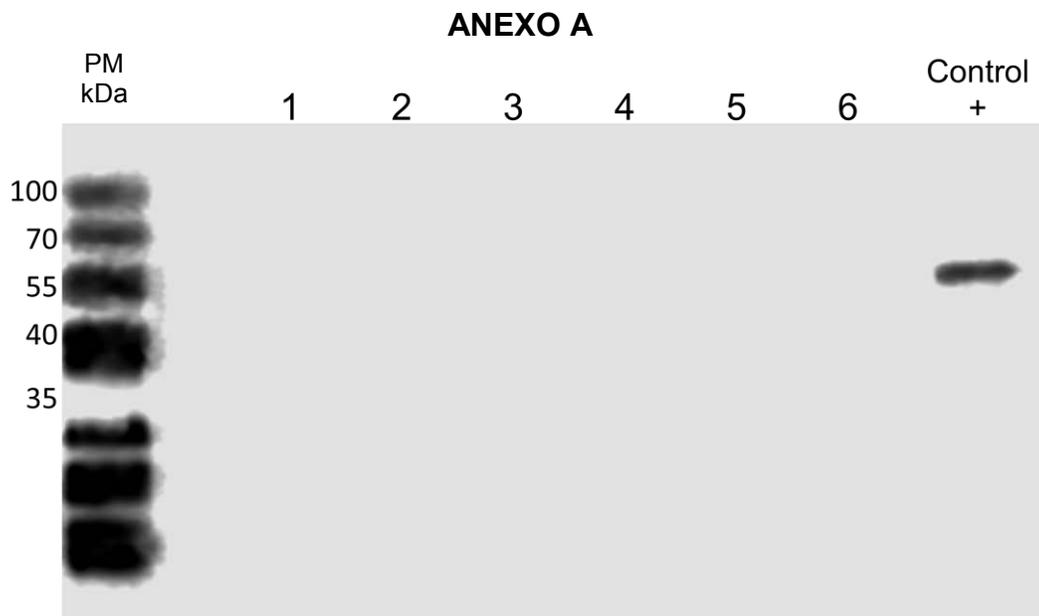


Figura Anexo A1. Inmunodetección Western Blot de acumulación de proteína de sobrenadante a las 24 h de cultivo en medio BMGY con glicerol. Se utilizó el anticuerpo monoclonal Mab 6A3. El ensayo se realizó por volumen. Carril 1 y 2: Colonia C6. Carril 3 y 4: Colonia C12. Carril 5 y 6: *P. pastoris* sin transformar ST. Como control se utilizó AI recombinante purificado a partir de *E. coli*.

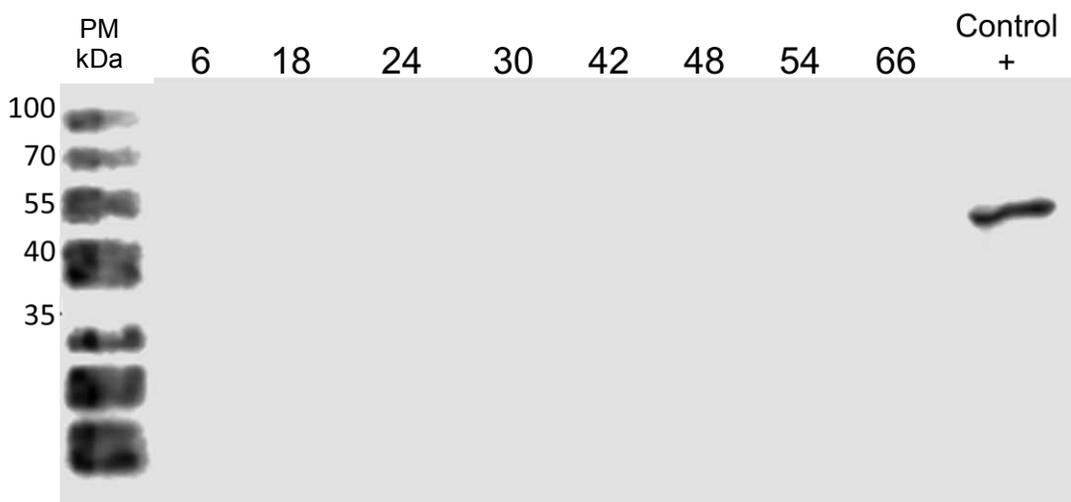


Figura Anexo A2. Inmunodetección Western Blot de acumulación proteína de sobrenadante durante la cinética de cultivo de *P. pastoris* sin transformar ST en la etapa dos en medio BMMY con metanol. Se utilizó el anticuerpo monoclonal Mab 6A3. El ensayo se realizó por volumen. La toma de muestra se realizó a las 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54 y 66 h de cultivo como se indica en cada carril. Como control se utilizó AI recombinante purificado a partir de *E. coli*.

ANEXO B

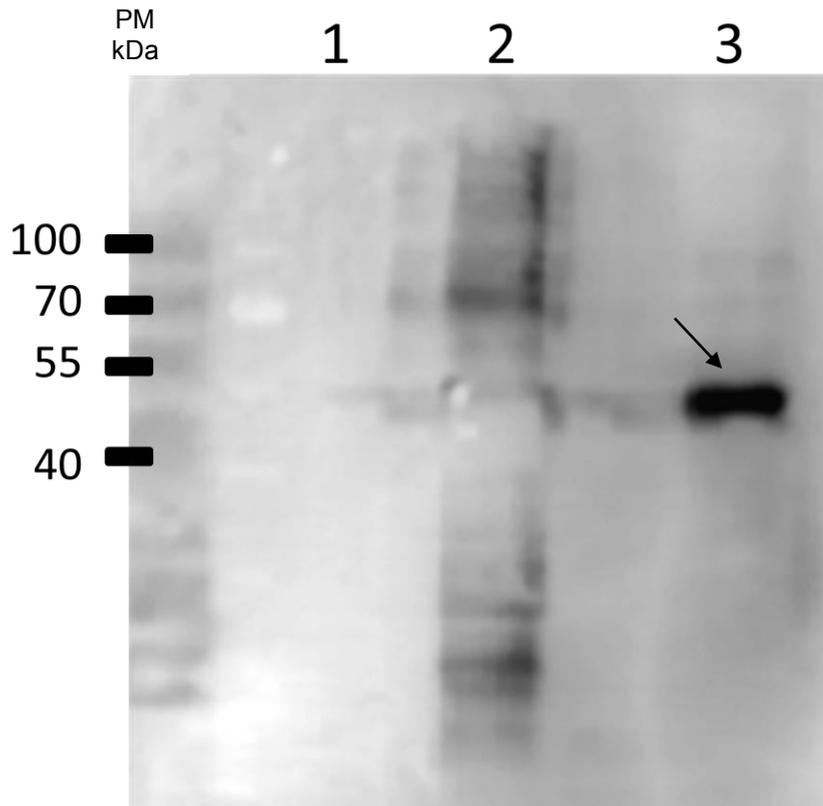


Figura Anexo B. Western Blot utilizando Con-A/HRP de la fracción obtenida del AR purificado por HPLC en fase reversa. Carril 1: AR purificado a partir de *E. coli*. Carril 2: Proteína de sobrenadante total de la colonia C6 de *P. pastoris*. Carril 3: AR de la colonia C6 de *P. pastoris* (flecha) purificado por HPLC en fase reversa reconocido por Con-A/HRP.

ANEXO C

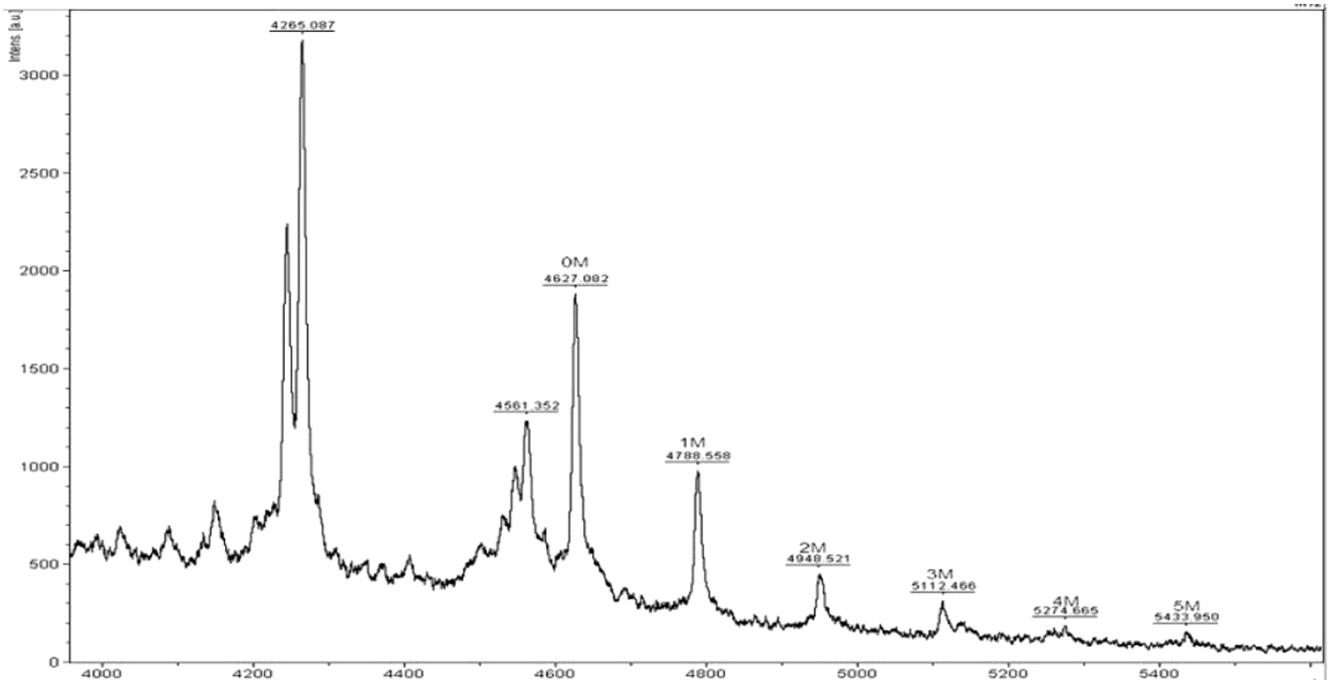


Figura Anexo C. Análisis MALDI-TOF del péptido P8 del C-terminal del antígeno inmunodominante (AI) producido en *S. lividans*, generado por la digestión con Lys-C. La presencia de 0 hasta 5 manosas se observa con aumentos graduales de 162 Da. Tomado de: Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011.