



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la proteína recombinante O-manosilada de *Mycobacterium tuberculosis*, PstS-1, producida en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) como una herramienta para el estudio de la infección de tuberculosis.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

CARLOS GIROSHI BANDO CAMPOS

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Marzo, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Caracterización de la proteína recombinante O-manosilada de *Mycobacterium tuberculosis*, PstS-1, producida en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) como una herramienta para el estudio de la infección de tuberculosis.”

que presenté para obtener el grado de **Doctorado** es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Carlos Giroshi Bando Campos

No. de cuenta: 30007668-6

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María,
mamá, papá, Dulce, Hiromi
herman@s, Karen,
familia y amig@s.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el laboratorio C-036, a cargo de la Dra. Adriana Valdez, así como en la Unidad de Bioprocesos, durante la jefatura del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.

La realización de este proyecto se contó con los apoyos económicos de los proyectos PAPIIT-UNAM IN210822, IN210419, IN209116, IN208415, CF-2023-I-1549 otorgados a la Dra. Valdez. También se contó con el apoyo del Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas.

Se agradece al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (PMDCBQ) de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional otorgada con número de CVU: 366135.

Se agradece el apoyo al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento para la asistencia a Congresos durante la realización de mis estudios de Doctorado.

Se agradece el apoyo del Dr. Fernando Zamudio Zuñiga del grupo del Dr. Lourival Possani del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el Dr. Sergio Román González del Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros del Instituto de Química de la UNAM en el desarrollo de los análisis por espectrometría de masas.

Se agradece a la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal y la Dra. Yolanda López Vidal por su trabajo y colaboración en el desarrollo de los experimentos de serorreactividad. A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo y a la Dra. Adela Rodríguez Romero del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo en el desarrollo de los experimentos de dicroísmo circular.

Durante el desarrollo del proyecto se contó con el soporte de la Dra. Angélica Vargas y Diego Rosiles. Se agradece al Dr. Trujillo su apoyo en el desarrollo de cultivos.

Se reconoce el trabajo de los miembros del comité tutor, la Dra. Clarita Olvera y la Dra. Clara Espitia, por su tiempo y valiosas contribuciones para el desarrollo del proyecto.

Se agradece al apoyo a Fabiola Munive, Rogelio Rodríguez, Saúl Guevara y Erick Sabido de Sartorius México por el apoyo en el préstamo y capacitación del uso del sistema de filtración tangencial para la realización de los experimentos.

Se agradece a la Dra. Valdez por su apoyo en la planeación, desarrollo y financiamiento de todos los experimentos, así como su apoyo en la escritura de esta tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE FIGURAS.....	1
ÍNDICE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS	4
TABLA DE AMINOÁCIDOS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. Tuberculosis.....	9
ANTECEDENTES.....	12
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e inmunidad	12
2. Antígenos de <i>Mtb</i> y el efecto de sus glicosilaciones en el estudio de la patogenia de Tb	14
3. PstS-1 y su papel en desarrollo de respuestas inmunes adaptativas a innatas.....	16
4 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes	
O-manosiladas	20
4.1. <i>Pichia pastoris</i> y su capacidad de producir glicoproteínas recombinantes	20
4.2. Proteínas recombinantes de <i>Mtb</i> expresadas en <i>Pichia pastoris</i> como candidatos para	
el desarrollo de vacunas y/o el análisis de la modulación de la respuesta inmune	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Reactivos y cepas.....	28

Construcción del vector pPICZ α B-PstS1 y transformación de <i>Pichia pastoris</i> X-33	28
Métodos analíticos	29
Producción en matraz agitado y biorreactor de rPstS-1 en <i>Pichia pastoris</i>	29
Producción de rPstS-1 de <i>E. coli</i> en biorreactores.....	30
Cuantificación de proteína total, SDS-PAGE y Western blot	30
Purificación de rPstS-1.....	32
Espectroscopía de dicroísmo circular	33
Análisis de espectrometría de masas	33
Ensayos de serorreactividad por ELISA.....	35
Análisis estadísticos.....	36
RESULTADOS	37
Construcción de plásmido para la producción de rPstS-1 de <i>Mtb</i> en <i>P. pastoris</i>	37
Transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con plásmido pPICZ α B-PstS1	38
Selección de clona X33::pPIC-PstS1 productora de rPstS-1.....	39
Identificación de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> por espectrometría de masas	41
Caracterización cinética de crecimiento de X33::pPIC-PstS1 y clonas control en medio BMGY y BMMY y perfil de proteínas en matraces agitados con baffles.....	41
Caracterización del cultivo de X33::pPIC-PstS1 para la producción de rPstS-1 en matraz agitado con baffles y biorreactor	47
Determinación de la producción de rPstS-1 en X33::pPIC-PstS1	49
Purificación de rPstS-1 producida en X33::pPIC-PstS1	51
Producción y purificación de rPstS-1 en <i>E. coli</i>	57
Determinación de estructura secundaria de los rPstS-1	63
Análisis por espectrometría de masas de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> y los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina	65
Serorreactividad a rPstS-1 con muestras de suero de pacientes con Tb activa	68
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
ANEXOS.....	83

Anexo 1. Análisis por MALDI-TOF de los péptidos obtenidos de la digestión rPstS-1 para la determinación la adición de manosas.....	83
Anexo 2. Solicitud de patente MX/a/2020/000538	89
SEGUIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	90
REFERENCIAS	92
ARTÍCULO COMO PRIMER AUTOR	109

ÍNDICE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2019.	9
Figura 2. Tasa estimada de incidencia de Tb por país en el año 2021.	10
Figura 3. Infección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	13
Figura 4. Estructura de PstS-1 recombinante producida en <i>E. coli</i> .	17
Figura 5. Respuesta asociada al reconocimiento de PstS-1 por el TLR4 y TLR2 en monocitos.	19
Figura 6. O-glicosilación de tipo silvestre en <i>S. cerevisiae</i> y <i>P. pastoris</i> .	22
Figura 7. Diagrama del plásmido pPICZ α B-PstS1.	38
Figura 8. Transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 con plásmidos pPICZ α B-PstS1 y pPICZ α B.	39
Figura 9. Electroforesis de proteínas del sobrenadante de las diferentes clonas de X33::pPIC-PstS1 productoras de rPstS-1 y análisis densitométrico de la banda de ~38 kDa.	40
Figura 10. Cinética de crecimiento de clonas X33::pPIC-PstS1, X33::pPICZB α y X33 s/t en medio BMGY.	43
Figura 11. Cinética de crecimiento de X33::pPIC-PstS1, X33::pPICZB α y X33 s/t en medio BMMY.	44
Figura 12. Gráfica de cinética de peso seco de las diferentes cepas de <i>P. pastoris</i> , clona productora de rPstS-1 y las clonas control en medio BMMY.	45
Figura 13. Proteína total del sobrenadante en las cinéticas de las diferentes cepas de <i>P. pastoris</i> X-33.	45
Figura 14. Crecimiento cinético de la cepa recombinante <i>P. pastoris</i> productora de rPstS-1 en dos métodos diferentes de cultivo y a dos escalas diferentes.	48
Figura 15. Análisis de proteínas totales del sobrenadante del cultivo.	50
Figura 16. Diagrama del proceso “downstream” para la purificación de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> de un cultivo en biorreactor.	51
Figura 17. Diagrama del procesamiento de cultivo de <i>P. pastoris</i> por filtración tangencial para la purificación de rPstS-1.	52
Figura 18. Purificación de rPstS-1 por ultrafiltración y análisis de banda separada por SDS-PAGE en RP-HPLC.	54
Figura 19. Cromatografía semipreparativa de RP-HPLC para la purificación de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> .	55
Figura 20. Análisis de pureza final de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> por cromatografía analítica de RP-HPLC.	56
Figura 21. Purificación de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> .	57

Figura 22.	Cinética de crecimiento de la cepa DE3::rPstS1 en medio LB.	58
Figura 23.	Diagrama del proceso “downstream” para la purificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> de un cultivo en biorreactor.	59
Figura 24.	Identificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> DE3.	60
Figura 25.	Cromatografía preparativa por IMAC en sistema FPLC para la purificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> DE3.	61
Figura 26.	Cromatografía semipreparativa por RP-HPLC para la purificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> DE3.	62
Figura 27.	Purificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> DE3.	62
Figura 28.	Espectros de dicroísmo circular del análisis estructural de rPstS-1 producidas en <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .	64
Figura 29.	Espectro de MALDI-TOF de masa intacta de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> .	66
Figura 30.	Cromatogramas de la digestión de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .	66
Figura 31.	Péptidos de rPstS-1 determinados por análisis por MALDI-TOF y análisis sus MPt.	67
Figura 32.	Análisis del diagrama de cajas de la reactividad de los anticuerpos a los antígenos recombinantes rPstS-1.	70
Figura 33.	Ensayos de avidez para las rPstS-1 con anticuerpo policlonal y suero de paciente con tuberculosis activa.	71
Figura 34.	Diagrama de proceso de producción de rPstS-1 en <i>P. pastoris</i> .	74

ÍNDICE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Proteínas recombinantes basadas en antígenos de <i>Mtb</i> expresadas en <i>P. pastoris</i> .	23
Tabla 2.	Análisis de crecimiento y productividad final de rPstS-1 en las clonas seleccionadas de X33::pPIC-PstS1.	39
Tabla 3.	Identificación de péptidos de rPstS-1 por MALDI TOF/TOF MS/MS.	41
Tabla 4.	Parámetros estequiométricos y cinéticos del crecimiento del cultivo de <i>P. pastoris</i> y la producción de rPstS-1 en matraz agitado con bafles de 0.25 L y en biorreactores de 1 L.	49
Tabla 5.	Resumen de purificación de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> .	53
Tabla 6.	Resumen de purificación de His-rPstS1 producida en <i>E. coli</i> DE3.	61
Tabla 7.	Estructura secundaria de rPstS-1 de <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> .	64
Tabla 8.	Análisis de los espectros obtenidos de las digestiones de rPstS-1 producida en <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> por MALDI/TOF (matriz de ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico).	68

ABREVIATURAS

Acn	Acetonitrilo
Ab	Anticuerpo
APA	Proteína rica en alaninas y prolinas
CI	Cuerpos de inclusión
ConA	Concanavalina A
D.O.	Densidad óptica
Da	Daltons
DC	Dicroísmo circular
DOT	Tensión de oxígeno disuelto (<i>Dissolved Oxygen Tension</i>)
DTH	Prueba de hipersensibilidad de tipo tardía (<i>Delayed-type hypersensitivity</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (<i>Fast protein Liquid Chromatography</i>)
His-tag	Etiqueta de histidinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IFN-γ	Interferón gamma
IgG2	Inmunoglobulina G2
IgM	Inmunoglobulina M
IGRA	Ensayo de la liberación de interferón- γ (<i>Interferon Gamma Relay Assay</i>)
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
μ	Velocidad específica de crecimiento
MAB	Matraz agitado con baffles
MALDI-TOF	Analizador de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistido por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)

MPt	Modificaciones postraduccionales
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ND	No hay datos
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pAOX1	Promotor del alcohol oxidasa 1
PBS	Amortiguador de fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
Pi	Fosfato inorgánico
PID	Proporcional integral derivada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPD	Derivado proteico purificado
PSC	Peso seco celular
PTS	Postraduccionales
RP-HPLC	Cromatografía de fase reversa en sistema HPLC
rPstS-1	PstS-1 recombinante
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMPt	Sin modificaciones postraduccionales
T.A.	Temperatura ambiente
Tb	Tuberculosis
Tb-DR	Tuberculosis resistente a los medicamentos
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR	Receptor tipo Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TST	Prueba cutánea de tuberculina (<i>Tuberculin skin test</i>)
U.A.	Unidades de absorbancia
UUf	Unidad de ultrafiltración
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

TABLA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos con cadenas laterales con carga

Positivos

R	Arg	Arginina
H	His	Hisitidina
K	Lys	Lisina

Negativos

D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico

Aminoácidos con cadenas lateras polares sin carga

S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
N	Asn	Asparagina
Q	Gln	Glutamina

Casos especiales

C	Cys	Cisteína
G	Gly	Glicina
P	Pro	Prolina

Aminoácidos con cadenas lateral hidrofóbicas

A	Ala	Alanina
V	Val	Valina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
Y	Tyr	Tirosina
W	Trp	Triptófano

RESUMEN

La tuberculosis es un problema de salud pública ya que es una de las principales causas de muerte asociada a un agente infeccioso, solo por debajo de la enfermedad COVID-19. La investigación relacionada con el desarrollo de vacunas y herramientas diagnósticas a partir de proteínas recombinantes es una prioridad para mejorar la prevención de esta enfermedad. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (sin. *Komagataella phaffii*) es uno de los sistemas de expresión eucarióticos más utilizados para la producción de glicoproteínas heterólogas, pudiendo realizar tanto N- como O-manosilación de una forma similar a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Este proyecto de doctorado consistió en la expresión de una versión recombinante O-manosilada de la glicolipoproteína PstS-1 de 38 kDa de *Mtb* en *P. pastoris* con características similares en estructura primaria a la proteína secretada nativa y su comparación con la misma proteína recombinante expresada en *Escherichia coli*, la cual carece de modificaciones postraduccionales (MPt) como glicosilaciones y presenta una etiqueta de His-Tag. PstS-1 recombinante (rPstS-1) expresada en *P. pastoris* se produjo bajo el control del promotor pAOX1 sin la señal de lipidación nativa o alguna etiqueta. La producción de rPstS-1 en matraces agitados con baffles (MAB) y biorreactores controlados fue de ~46 mg/L para ambos métodos. La proteína recombinante se recuperó del sobrenadante y se purificó en tres pasos, logrando una pureza por criterios de electroforesis del 98%. Se caracterizó la estructura primaria y su patrón de O-manosilación por espectrometría de masas mediante un análisis independiente de los péptidos purificados, resultado de una proteólisis con tripsina. Además, con la intención de determinar la similitud de la proteína recombinante producida en *P. pastoris* y la nativa se realizó un análisis de reactividad cruzada utilizando anticuerpos séricos de pacientes con tuberculosis activa resultando en un mayor reconocimiento de la glicoproteína recombinante expresada en *P. pastoris*, en comparación con la expresada en *E. coli*, indicando indirectamente la similitud entre la rPstS-1 producida en la levadura y la proteína nativa de *Mtb*. En general, tanto el análisis de la estructura secundaria por dicroísmo circular y el ensayo de reactividad cruzada, fueron significativamente diferentes entre la proteína producida en *E. coli* y la producida en *P. pastoris*. El uso de esta levadura para la producción de rPstS-1 demuestra que podría ser sistema de expresión útil para producir otros antígenos de *Mtb* glicosilados. La rPstS-1 podría utilizarse como herramienta para estudiar el papel de esta molécula durante la infección por *Mtb*, y para desarrollar y mejorar vacunas o sistemas de detección basados en la proteína recombinante para el serodiagnóstico.

SUMMARY

Tuberculosis is still a public health problem since it is one of the main causes of death associated with an infectious agent, second only to the COVID-19 disease. Research related to the development of vaccines and diagnostic tools from recombinant proteins continues to be a priority to improve the prevention of this disease. *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (syn. *Komagataella phaffii*) is one of the most used eukaryotic expression systems to produce heterologous glycoproteins, being able to perform both N- and O-mannosylation like *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). This doctoral project consisted of the expression of a recombinant O-mannosylated version of the 38 kDa glycolipoprotein PstS-1 of *Mtb* in *P. pastoris* with characteristics similar in primary structure to the native secreted protein and its comparison with the same expressed recombinant protein in *Escherichia coli*, which lacks post-translational modifications (MPt) such as glycosylations and presents a His-Tag tag. Recombinant PstS-1 (rPstS-1) expressed in *P. pastoris* was produced under the control of the pAOX1 promoter without the native lipidation signal or any tag. The production of rPstS-1 in baffled shake flasks (MAB) and controlled bioreactors was ~46 mg/L for both methods. The recombinant protein was recovered from the supernatant and purified in three steps, achieving a purity of 98% by electrophoresis criteria. The primary structure and its O-mannosylation pattern was characterized by mass spectrometry through an independent analysis of the purified peptides, the result of proteolysis with trypsin. Furthermore, with the intention of determining the similarity of the recombinant protein produced in *P. pastoris* and the native one, a cross-reactivity analysis was carried out using serum antibodies from patients with active tuberculosis, resulting in greater recognition of the recombinant glycoprotein expressed in *P. pastoris*, compared to the expressed in *E. coli*, indirectly indicating the similarity between rPstS-1 produced in yeast and the native *Mtb* protein. In general, both the secondary structure analysis by circular dichroism and the cross-reactivity assay were significantly different between the protein produced in *E. coli* and that produced in *P. pastoris*. The use of this yeast to produce rPstS-1 demonstrates that could be a useful expression system for producing of other glycosylated *Mtb* antigens. Also, rPstS-1 could be used as a tool to study the role of this molecule during *Mtb* infection, and to develop and improve vaccines or detection systems based on the recombinant protein for serodiagnosis.

INTRODUCCIÓN

1. Tuberculosis

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad transmisible causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y se mantiene como un serio problema de salud y una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Fig. 1). Antes de la pandemia del coronavirus, SARS-CoV-2, la Tb era la principal causa de muerte provocada por un solo agente infeccioso, clasificada por encima del VIH/SIDA (Fig.1) (World Health Organization, 2022).

Principales causas de muerte a nivel mundial en el 2019^{a,b}

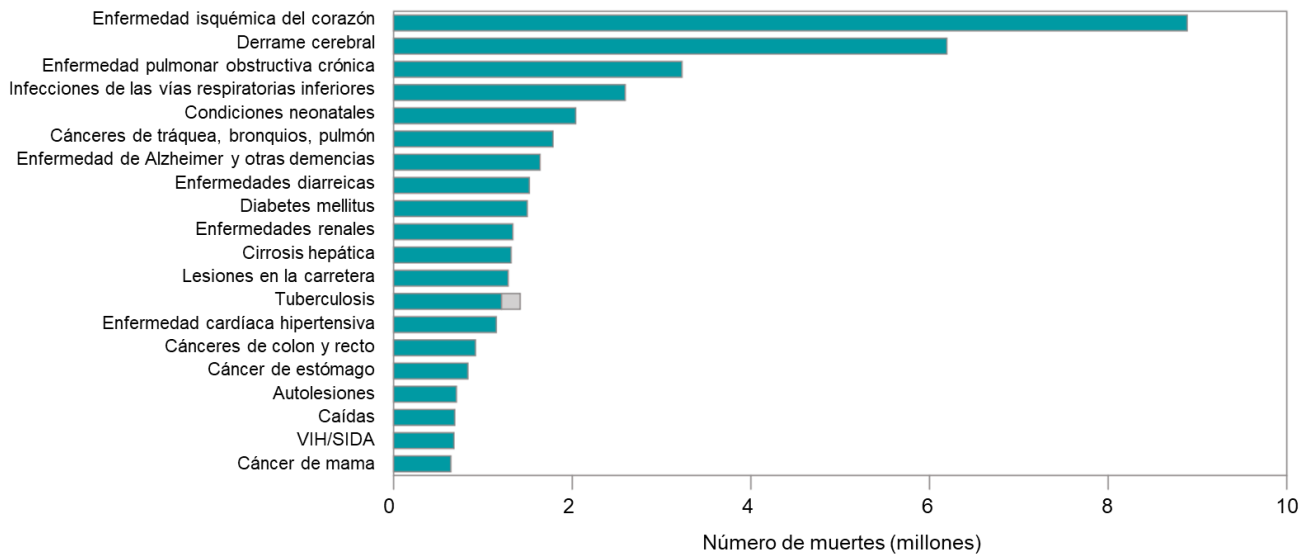


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2019. Figura obtenida del “Global Tuberculosis Report 2022” (World Health Organization, 2022). En gris se muestran las muertes por tuberculosis entre personas VIH positivas que están oficialmente clasificadas como muertes causadas por el VIH/SIDA en la Clasificación Internacional de Enfermedades. ^a Este es el último año en el que se dispone de estimaciones para todas las causas. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. ^b Las muertes por tuberculosis entre personas VIH positivas se clasifican oficialmente como muertes causadas por el VIH/SIDA en la Clasificación Internacional de Enfermedades.

Se estima que un cuarto de la población mundial es sospechoso de haber sido infectada con *Mtb* en una forma clínicamente latente. Como se menciona en el último “Reporte global de Tuberculosis” publicado en 2022, aproximadamente 10.6 millones de personas (95% IU: 9,9–11 millones) enfermaron de Tb en 2021, un aumento del 4.5% con respecto a los 10.1 millones

(95% IU: 9,5–10,7 millones) en 2020. La tasa de incidencia de Tb (nuevos casos por 100,000 habitantes por año) aumentó un 3.6% entre 2020 y 2021, revirtiendo las caídas de alrededor del 2% por año durante la mayor parte de las 2 décadas anteriores. También se estima que la carga de Tb resistente a los medicamentos (Tb-DR) aumentó entre 2020 y 2021, con 450 000 (95 % UI: 399 000–501 000) nuevos casos de Tb resistente a la rifampicina (Tb-RR) en 2021 (World Health Organization, 2022). En este mismo reporte, se menciona que la posible causa de este fenómeno obedece a factores como un aumento en el número de diagnósticos realizados debido a que sintomatología de los pacientes con COVID-19 está relacionada con el afectación de las vías aéreas inferiores; y por otro lado, se menciona que el aislamiento derivado de esta pandemia pudo haber tenido implicaciones en el contagio de personas que compartían espacios domésticos con pacientes con Tb activa (World Health Organization, 2022).

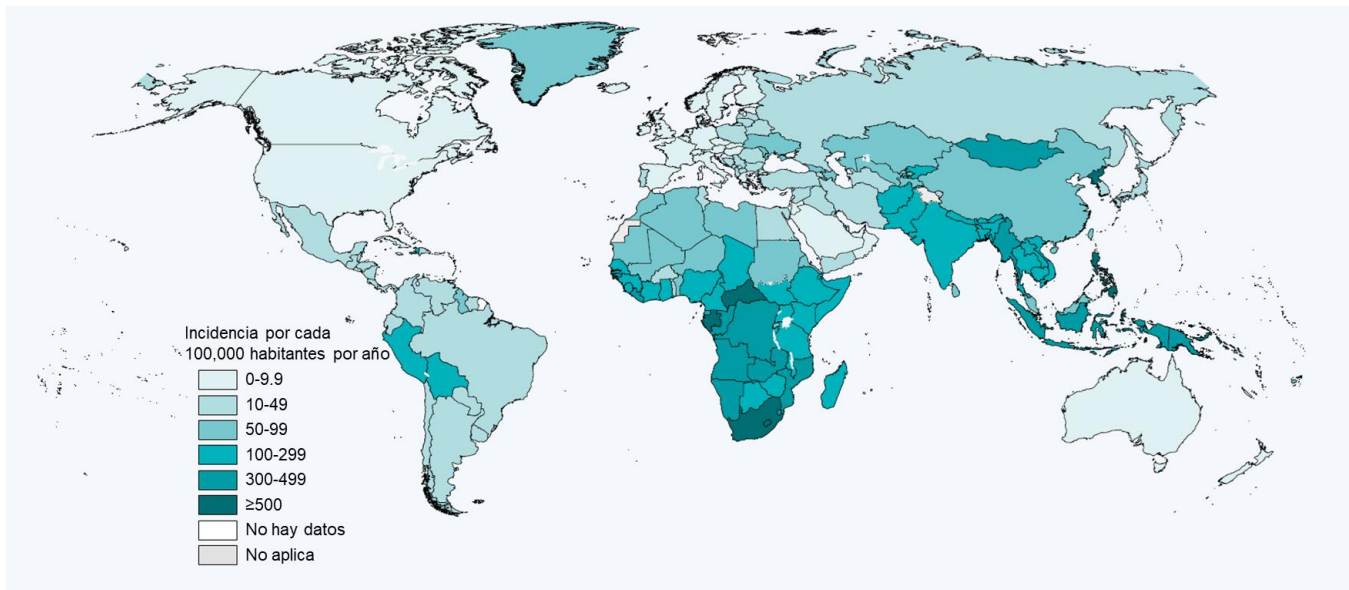


Figura 2. Tasa estimada de incidencia de Tb por país en el año 2021. Figura obtenida del “Global Tuberculosis Report 2022” (World Health Organization, 2022).

A nivel mundial, el número anual estimado de muertes por Tb disminuyó entre 2005 y 2019, pero las estimaciones para 2020 y 2021 sugieren que esta tendencia se ha revertido. En el año 2021 se estimaron 1.4 millones de muertes por Tb (personas VIH negativas) y sumado a esto, 187,000 muertes por Tb entre personas VIH positivas, por un total combinado de 1.6 millones de personas fallecidas; esto representa el nivel de muertes por Tb que se observaron en el año 2017 (World Health Organization, 2022), sugiriendo que la tendencia observada en los años anteriores se vio invertida. En caso de México, la Tb en estos últimos años continúa siendo considerado un problema de salud pública. En el año 2021, la Organización Mundial de la Salud

(OMS) clasificó a México entre los países con tasas de morbilidad intermedia de entre 10-49 casos por cada 100,000 habitantes (Fig. 2) (World Health Organization, 2022). Es por esta razón, que tanto en México como en varios países a nivel mundial es indispensable continuar con los esfuerzos para disminuir el número de pacientes que desarrollan Tb. Estos datos continúan reflejando una necesidad de comprender la patogenia de *Mtb*, así como el desarrollo de métodos diagnósticos más efectivos, así como alternativas terapéuticas para el tratamiento y prevención de la Tb.

ANTECEDENTES

1. *Mycobacterium tuberculosis* e inmunidad

Las interacciones del bacilo con el hospedero han sido extensamente estudiadas, con un enfoque importante en los factores de virulencia, como los antígenos (Bekmurzayeva et al., 2013; López-Vidal et al., 2004; Polanco et al., 2015; Pukazhvanthen et al., 2014; Serra-Vidal et al., 2014; Tiwari et al., 2014; Y. B. Young et al., 2004). El desarrollo de la tuberculosis depende de varios factores del huésped que afectan las respuestas inmunes para eliminar o contener al bacilo, incluyendo, malnutrición y coinfección con VIH (Kirschner et al., 2010; Lin et al., 2010). De esta forma, los individuos sanos e inmunológicamente competentes son capaces de combatir la infección montando respuestas inmunes efectivas (Huynh et al., 2011).

Las interacciones de *Mtb* con el hospedero y su patogenia es compleja ya que esta depende de una serie de respuestas coordinadas entre la inmunidad innata y adaptativa. La protección inmunitaria hacia *Mtb* requiere de una interacción entre las respuestas de inmunidad innata y las respuestas de inmunidad celular dependientes de Th1, las cuales son responsables de la inmunidad mediada por células y las respuestas protectoras dependientes de fagocitos, las cuales cooperativamente contribuyen con la eliminación de *Mtb* (Zuñiga et al., 2012). La ruta de entrada de *Mtb* es por vía del tracto respiratorio. Seguido por la inhalación, se transloca al tracto respiratorio inferior, donde interacciona con los macrófagos alveolares que son el tipo celular que predominantemente infecta mediante la internalización de la bacteria por fagocitosis (Pai et al., 2016; M. Woo et al., 2018). Si esta primera línea de defensa no logra eliminar la bacteria, el *Mtb* invade el tejido intersticial del pulmón, ya sea porque las bacterias infectan directamente el epitelio alveolar o porque los macrófagos alveolares infectados migran al parénquima pulmonar. Posteriormente, las células dendríticas, o los monocitos inflamatorios, transportan a *Mtb* a los ganglios linfáticos pulmonares para la presentación a los linfocitos T (Marino et al., 2004). Este evento conduce al reclutamiento de células inmunes, incluidas los linfocitos T y B, en el parénquima pulmonar para formar un granuloma. Las bacterias se replican dentro del granuloma en crecimiento. Si la carga bacteriana se vuelve demasiado grande, el granuloma no podrá contener la infección (Lin et al., 2014; Pai et al., 2016) y las bacterias eventualmente se diseminarán a otros órganos, incluido el cerebro. En esta fase, las bacterias pueden ingresar al torrente sanguíneo o volver a ingresar al tracto respiratorio para ser liberadas; el hospedero

infectado ahora es infeccioso, sintomático y se dice que tiene la enfermedad de tuberculosis activa (Fig. 3) (Pai et al., 2016).

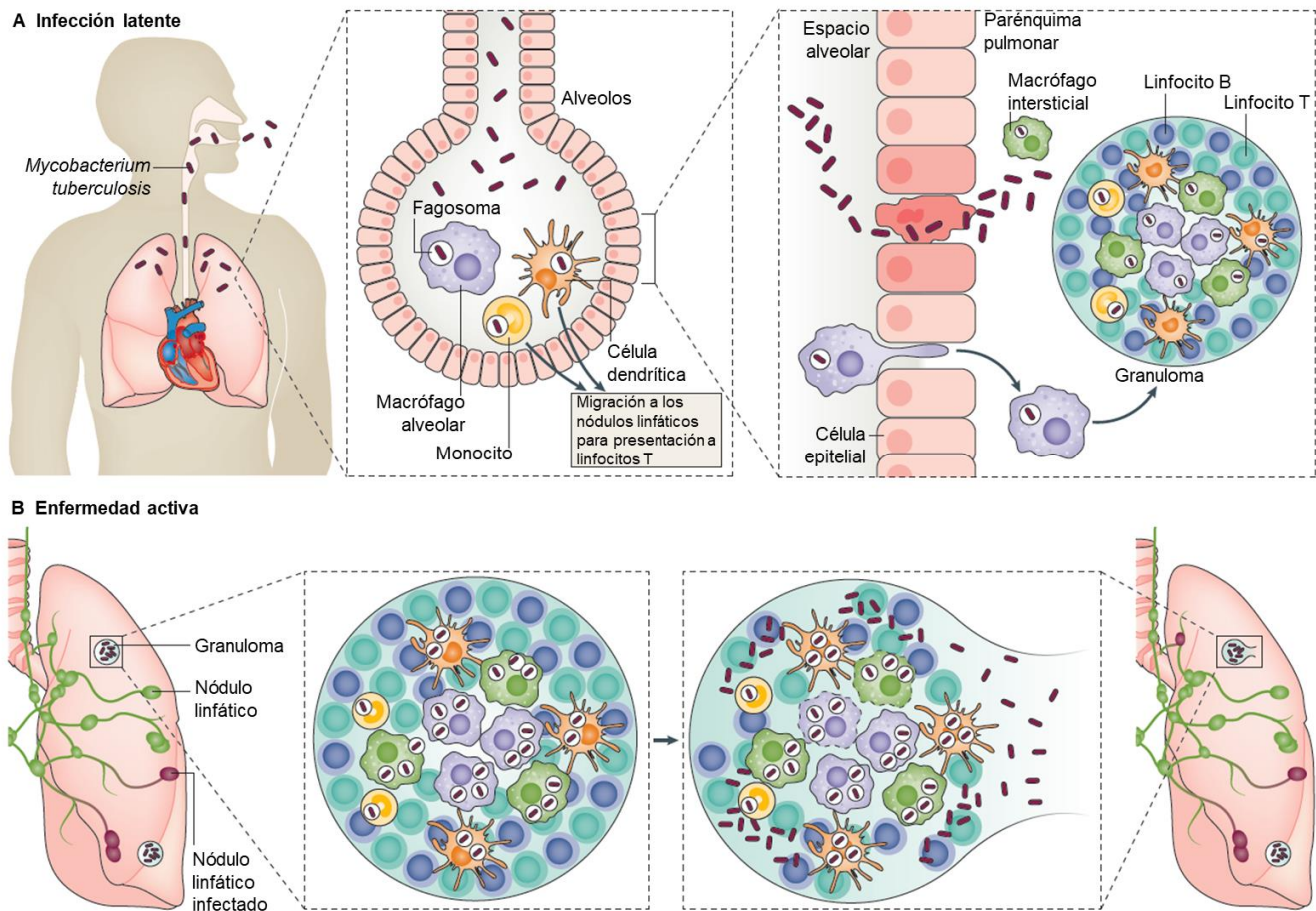


Figura 3. Infección de *Mycobacterium tuberculosis*. Proceso de infección latente mediante la activación de los macrófagos alveolares y formación del granuloma **(A)** e infección activa mediante la reactivación a partir de la falta de contención en los fagosomas **(B)**. Imagen tomada y modificada de Pai et al., 2016.

Aunque la enfermedad de Tb puede verse como un proceso continuo desde la infección por *Mtb* hasta la enfermedad infecciosa activa, los pacientes se clasifican en infección de tuberculosis latente o enfermedad de tuberculosis activa. La exposición a *Mtb* puede resultar en la eliminación del patógeno, ya sea debido a respuestas inmunes innatas o adquiridas de las células T. Las personas que han eliminado la infección a través de respuestas inmunes innatas o respuestas inmunes adquiridas pueden tener resultados negativos en la prueba cutánea de tuberculina (TST) o en el ensayo de liberación de interferón- γ (IGRA) (Pai et al., 2016). Algunas personas eliminarán el patógeno, pero conservarán una fuerte respuesta de células T de memoria y darán positivo en la TST o IGRA. Si el patógeno no se elimina, las bacterias persisten en un estado inactivo o latente que puede detectarse como resultados positivos de TST o IGR.

Es posible que los pacientes con tuberculosis subclínica no presenten síntomas, pero es común que tengan resultados positivos en cultivo. Los pacientes con enfermedad de tuberculosis activa experimentan síntomas como tos, fiebre y pérdida de peso, y el diagnóstico generalmente puede confirmarse con frotis de esputo, cultivo y pruebas moleculares (Pai et al., 2016). En general *Mtb*, posee un gran número de moléculas que tienen la capacidad de alterar la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Chai et al., 2020).

2. Antígenos de *Mtb* y el efecto de sus glicosilaciones en el estudio de la patogenicidad de Tb

La producción de antígenos de *Mtb* es importante por varios aspectos relacionados con la investigación. En general, son fundamentales para el estudio de la interacción de los antígenos y sus efectos *in vivo* e *in vitro* (Ihssen et al., 2010; Mustafa, 2002; Shi et al., 2010; Uma Devi et al., 2001; Zhu et al., 1997), en el diseño de vacunas más efectivas contra *Mtb* (Olsen et al., 2001; Ottenhoff et al., 2012), así como en el desarrollo de herramientas para el diagnóstico de Tb (Bekmurzayeva et al., 2013; Flores et al., 2011; Kunnath-Velayudhan et al., 2010; Tiwari et al., 2014; Y. B. Young et al., 2004). De hecho, el uso de antígenos recombinantes para la detección de la Tb latente y activa provee un diagnóstico simple y preciso (Khurshid et al., 2017) comparado con otras pruebas diagnósticas usadas hoy en día, como la prueba cutánea de derivado proteico purificado (PPD, *purified protein derivative*) o QuantiFERON® que es una prueba sanguínea basada en la reacción del sistema inmune de una persona ante la presencia de *Mtb* por ensayo de la liberación de interferón- γ (IGRA) (Dorman et al., 2014; Mazurek et al., 2005; Mori et al., 2004; World Health Organization, 2011). Por estas razones, es importante la posibilidad de producir antígenos de *Mtb* con conformaciones y estructuras similares a los antígenos nativos para que puedan ser usados para el desarrollo de herramientas diagnósticas y vacunas (García-Ruiz et al., 2022).

Se ha encontrado en sobrenadantes de cultivo de *Mtb* una variedad de antígenos de proteínas secretadas. Algunas de estas, como Rv2164c, Rv3491, Rv0175, Rv0934, Rv1887, Rv1096, Rv2068c, Rv2744c, Rv2799, Rv3835, y Rv1860, entre otras, presentan MPt basadas en la adición de residuos de manosa y/o acetilaciones (González-Zamorano et al., 2009; Nandakumar et al., 2013; Ragas et al., 2007; Smith et al., 2014). Estas modificaciones postraduccionales tienen un papel en la virulencia, colonización e invasión de las células del hospedero (Flores et

al., 2011; Liu et al., 2013; Ragas et al., 2007; Villeneuve et al., 2003). Sin embargo, la importancia de la O-manosilación de las glicoproteínas en la infección y las respuestas inmunes del hospedero están pobremente entendidas. Anteriormente, se ha encontrado que la glicolipoproteína de 19 kDa con O-glicosilaciones está involucrada en la activación de diferentes respuestas de la inmunidad innata (K. A. Wilkinson et al., 2009). También se ha descrito que las manosas de la superficie de *Mtb* contribuyen con los procesos de sobrevivencia dentro de los macrófagos, por ejemplo, inhibiendo la fusión de los fagolisosomas y las vacuolas antimicrobianas lisosomales (Kang et al., 2005; Rajaram et al., 2011). Los epitopes manosídicos de otras variantes de micobacterias (no *Mtb*) podrían no influir en las respuestas inmunes del hospedero (Appelmelk et al., 2008), lo que sugiere una manosilación específica de especie/cepa o mecanismos patogénicos únicos basados en manosas de *Mtb*. Se ha hipotetizado que los epítopes con manosas con enlaces α 1-2 reconocen a cepas de *Mtb* virulenta generando una alta avidéz a ligandos para receptores del hospedero para promover infecciones latentes de Tb (Torrelles et al., 2010).

Muchos de los estudios del efecto de proteínas de *Mtb* se han realizaron con proteína purificada o recombinante que puede no reflejar completamente el papel de la molécula en el contexto de la infección natural. En particular, muchas de estas proteínas recombinantes han sido expresadas en *E. coli* la cual no puede reproducir patrones similares o nativos de modificación postraduccional de *Mtb* (Chaouki Benabdeselem et al., 2006; Piubelli et al., 2013). Como un ejemplo de la importancia de estas MPt, se encuentran los estudios realizados con la proteína rica en alaninas y prolinas (APA), la cual es una proteína secretada inmundominante de *Mtb*. Se ha demostrado que los patrones de O-manosilación determinan la actividad inmunogénica de APA (Horn et al., 1999; Nandakumar et al., 2013; Romain et al., 1999). La proteína nativa induce una potente respuesta tardía de hipersensibilidad y estimula la activación de linfocitos T en ensayos *in vitro* e *in vivo*, en contraste con la proteína APA recombinante no glicosilada producida en *E. coli* (Horn et al., 1999; Romain et al., 1999). Además, los anticuerpos humanos derivados de pacientes con Tb reaccionaron fuertemente con la forma de APA O-glicosilada, mientras que la proteína no glicosilada carece de la capacidad de reconocimiento de estos anticuerpos. Además, se ha sugerido que las propiedades protectoras de la vacuna antituberculosa están relacionadas con el patrón de O-manosilación generado por el bacilo de Calmette-Guérin de *M. bovis* (Horn et al., 1999; Priti Kumar et al., 2003; Liu et al., 2013; Romain et al., 1999). Otras proteínas O-manosiladas también son potentes antígenos de *Mtb*, como

PstS-1, LpqH y LprG (González-Zamorano et al., 2009; Målen et al., 2007; van Els et al., 2014), en las que se ha sugerido que sus estructuras de glucano interactúan con los receptores del huésped, como DC-SIGN en células dendríticas humanas (Tallieux et al., 2003), receptores tipo Toll (Sanchez et al., 2009) y receptores de manosa (Esparza et al., 2015).

3. PstS-1 y su papel en desarrollo de respuestas inmunes adaptativas a innatas

Las proteínas de membrana de *Mtb* se han considerado durante mucho tiempo inmunógenos y no se han estudiado sistemáticamente. Las proteínas de membrana son aquellas que interactúan con o componentes de membranas biológicas e incluyen proteínas de membrana integrales que están ancladas permanentemente o son componentes de la membrana, así como proteínas de membrana periféricas, que solo están unidas temporalmente a la bicapa lipídica o a otras proteínas integrales. Ciertas proteínas de membrana desempeñan funciones celulares como por ejemplo, las proteínas receptoras de membrana transmiten señales entre los entornos interno y externo, las proteínas de transporte mueven moléculas e iones a través de la membrana y las moléculas de adhesión celular, como las proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria, permiten células para identificarse e interactuar entre sí (H. Li et al., 2019; Nigou, 2003). Dentro de estas proteínas de membrana se destaca la proteína de unión a fosfato de 38 kDa, PstS-1.

PstS-1 (también conocida como Rv0934, Phos1 o proteína de unión a fosfato 1 [PBP-1]) es una glicoproteína producida y secretada por *Mtb*. Esta proteína, de 38 kDa, está conformada por 374 aminoácidos incluyendo un péptido señal que es eliminado proteolíticamente para generar una proteína madura de 351 aminoácidos, la cual es exportada a la membrana superficial externa de *Mtb* (Ase Bengard Andersen et al., 1989; Harboe et al., 1992; Vordermeier et al., 1995). En la actualidad no se ha determinado la estructura secundaria de la proteína nativa. Sin embargo, Vyas y colaboradores determinaron la estructura tridimensional de la PstS-1 madura recombinante expresada en *E. coli* mediante el método difracción de rayos X (Vyas et al., 2003). El uso de esta proteína sin MPt, puede presentar diferencias con la estructura de la proteína nativa que, como se mencionó, está glicosilada. En su análisis encontraron que la estructura de esta PstS-1 recombinante se compone de dos dominios globulares similares que están atravesados por una hendidura profunda donde se une al fosfato inorgánico (Fig. 4). La partición de la cadena polipeptídica crea un par de hebras antiparalelas ubicadas en la base de la hendidura que conectan los dos lados mediante hélices alfa. La estructura de PstS-1 se

determinó con un fosfato inorgánico (Pi) unido que se copurificó con la proteína. El Pi unido está completamente secuestrado en la hendidura entre los dos dominios (Fig. 4). Aunque la estructura terciaria general de la molécula PstS-1 se parece a la de otros veinte receptores de ligando primario ABC bacterianos que varían en tamaño (25–60 kDa) y carecen de una similitud de secuencia significativa (Quioco et al., 1996; Vyas et al., 2003), se encontró que esta proteína está más estrechamente alineada con la estructura PBP de *E. coli* (PDB: 6CVL) (Luecke et al., 1990; Vyas et al., 2003).

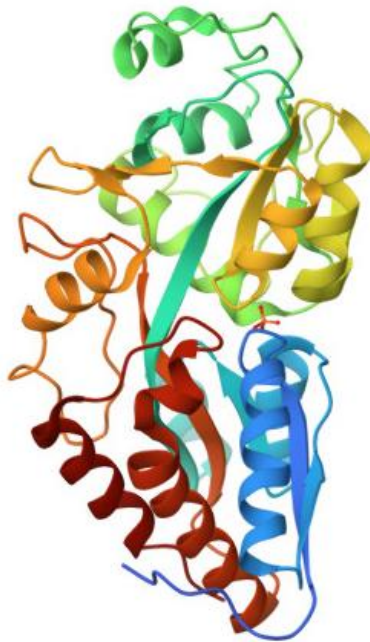


Figura 4. Estructura de PstS-1 recombinante producida en *E. coli* determinada mediante cristalografía y difracción de rayos X por Vyas y colaboradores (Vyas et al., 2003). PDB: 1PC3.

Se ha descrito que pertenece al sistema de transporte de fosfato tipo ABC (Andersen et al., 1990; Espitia et al., 1992) y se determinó que su expresión en la pared celular aumenta en ausencia de fosfato en el medio pudiendo mejorar el consumo de fosfato por parte del bacilo (Espitia et al., 1992). Aunque se sabe que la proteína nativa está O-manosilada (González-Zamorano et al., 2009; Villeneuve et al., 2003), los sitios exactos de su O-glicosilación siguen sin estar claros. Utilizando una herramienta predictiva para analizar varias glicoproteínas de *Mtb*, se ha propuesto que la proteína PstS-1 tiene tres sitios de O-glicosilación, muy probablemente en las treoninas 20, 21 y 28 en el extremo N (Herrmann et al., 2000). Además, se realizó un análisis *in silico* de las posibles MPt de PstS-1 encontrado que los residuos de serina y treonina de la región N-terminal tienen una mayor posibilidad de ser modificados

(García-Ruiz et al., 2022). Sin embargo, a la fecha no se ha determinado de forma experimental el patrón de glicosilación de la proteína nativa o alguna versión recombinante producida en un sistema eucarionte.

Inmunológicamente, se sabe que la proteína PstS-1 induce una respuesta inmune adaptativa y está asociada con la forma activa de Tb (Bothamley et al., 1992; Silva et al., 2003). La reactividad serológica de este Ag tiene una fuerte asociación con la infección latente o reciente exposición a *Mtb* y es por esto que el Ag de 38-kDa se ha incluido en algunos ensayos serodiagnósticos de tuberculosis activa (Bothamley et al., 1992; Silva et al., 2003). Además, se ha considerado como un antígeno fundamental para el estudio de la antigenicidad de otras proteínas de membrana de *Mtb* (H. Li et al., 2019). PstS-1 fue caracterizado como el antígeno especie específico más inmunodominante de las proteínas secretadas por *Mtb*. Esta se encuentra presente en los derivados proteicos purificados (PPD) usados para la prueba de hipersensibilidad de tipo tardía (DTH) para la tuberculosis. Por si sola puede inducir una prueba de DTH que es comparable a la de PPD (Ase Bengard Andersen et al., 1989; P. Andersen, 1994; Harboe et al., 1992; Vordermeier et al., 1995). En el 2021, Watson y colaboradores realizaron un estudio enfocado en la importancia del reconocimiento de anticuerpos por PstS-1 como posible terapia profiláctica para Tb (Watson et al., 2021). Encontraron que un paciente con tuberculosis activa presentaba un alto reconocimiento hacia PstS-1, incluso por encima de otros antígenos de la microbacteria. A través de su aislamiento y caracterización se generó un anticuerpo (Ab) monoclonal que se utilizó como tratamiento profiláctico en ratones Balb/c infectados con *Mtb*. Se encontró que el uso de este Ab anti-PstS1 reducía la carga pulmonar bacteriana en un 50%. Este estudio demostró como las respuestas inhibitoras de los linfocitos B anti-PstS1 surgen durante la tuberculosis activa (Watson et al., 2021).

Además, se ha demostrado que PstS-1 tiene la capacidad de inducir respuestas inmunes innatas mediante la activación de TLR2 y TLR4 y celulares como una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ y respuestas Th1 (Fonseca et al., 2001; Jung et al., 2006). En el estudio realizado por Fonseca y colaboradores demostraron que la proteína de 38-kDa recombinante producida en *E. coli* (carente de MPt) induce una elevada producción de IFN- γ y una menor producción de IL-4 en células de bazo de ratón. En este estudio analizaron también el efecto de tres péptidos sintéticos provenientes de la proteína 38-kDa (P1, aminoácidos [aa] 97 al 108; P3, aa 166 al 175; y P4, aa 309 al 318) en la producción de IFN- γ , encontrando que

el péptido P4, cercano al C-terminal, induce la producción de IFN- γ en linfocitos T a un mismo nivel que la proteína 38-kDa recombinante (Fonseca et al., 2001). En otro estudio, se purificó a PstS-1 de filtrados de cultivo de *Mtb* H37Rv y se examinó el papel de la señalización de las MAPKs y la subsecuente producción de citocinas pro-inflamatorias en monocitos primarios de humano. Se encontró que Rv0934 induce la activación de la cinasa reguladora de la señal extracelular 1/2 (ERK1/2) y p38 y la subsecuente producción de TNF- α e IL-6 a través de TLR2 y TLR4 (Jung et al., 2006) (Fig. 5). Sánchez y colaboradores demostraron que Rv0934 puede inducir apoptosis dependiente de caspasas en macrófagos involucrando a TNF-a y FasL y la sobre regulación de los receptores TNFR1, TNFR2, Fas y TLR2 (Sanchez et al., 2009). A pesar del extenso estudio que analiza el efecto de Rv0934 y sus péptidos sobre la activación de la inmunidad celular, aún no se conoce que segmentos de la proteína de 38-kDa activan la respuesta inmune innata relacionada con los receptores TLR2 y TLR4 en macrófagos, los cuales tienen un papel fundamental en la respuesta antimicrobiana contra la infección por *Mtb*.

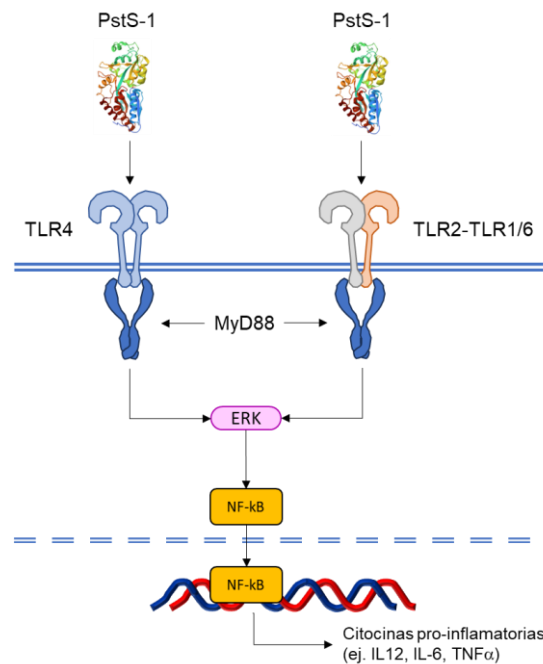


Figura 5. Respuesta asociada al reconocimiento de PstS-1 por el TLR4 y TLR2 en monocitos. PstS-1 de *Mtb* puede ser reconocido en monocitos por los receptores TLR4 y TLR2. Como resultado del reconocimiento se desencadena una señalización intracelular a través de MyD88 y la MAP cinasa ERK la cual induce la traslocación al núcleo de NF- κ B y la subsecuente producción de citocinas pro-inflamatorias. Figura basada en los resultados obtenidos por Jung et al., 2006.

4 *Pichia pastoris* como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes O-manosiladas

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) puede utilizar el metanol como fuente de carbono para su crecimiento y actualmente es conocida como un sistema hospedero para la expresión de proteínas recombinantes. A continuación, se enlistan algunas de las ventajas de *P. pastoris* para la expresión de diferentes proteínas recombinantes (Byrne, 2015):

- Sistema de expresión eucarionte.
- Es un sistema relativamente económico en comparación con sistemas como las células de mamífero.
- Tiempos de expresión relativamente rápido comparado con sistemas de células de mamífero.
- Procesamiento postraducciona
- Secreción de proteínas recombinantes al medio de cultivo.

Mediante el uso de biorreactores industriales, se pueden producir proteínas de interés a gran escala a partir de pequeños volúmenes de cultivo. Recientemente, los estudios han demostrado que el sistema de expresión de *P. pastoris* es único en la producción de proteínas de membrana (Byrne, 2015). Además, debido a una producción limitada de proteínas secretoras endógenas, la purificación de proteínas recombinantes es menos compleja (Tachioka et al., 2016).

4.1. *Pichia pastoris* y su capacidad de producir glicoproteínas recombinantes

Como se mencionó, *P. pastoris* es capaz de realizar MPt como la O- y N- glicosilación y la formación de enlaces disulfuro. Se sabe que las glicosilaciones permiten el plegamiento correcto, solubilidad y una adecuada actividad biológica de glicoproteínas terapéuticas (G. P. L. Cereghino et al., 2002). La N-glicosilación se caracteriza por unir carbohidratos en los nitrógenos de las cadenas laterales de la asparagina (Asn); la O-glicosilación se da mediante la unión de carbohidratos en el oxígeno del grupo hidroxilo de la serina, treonina y tirosina. Intracelularmente, éstas MPt se llevan a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi de la levadura a través de una serie de manosiltransferasas (Fig. 6). Se sabe que en levaduras como *P. pastoris*, la N-glicosilación está asociada a estructuras hipermanosiladas de glicanos y en humanos a estructuras complejas e híbridas de glicanos (Vervecken et al., 2004). La O-

glicosilación en los residuos de serina o treonina se da mediante enlaces glucosídicos. Una diferencia importante entre ambos tipos de glicosilación es que la cantidad de residuos de manosa en la O-glicosilación es menor que las estructuras hipermanosiladas de la N-glicosilación que, en *P. pastoris* forman estructuras de manosa que pueden contener hasta 40 residuos de manosa (Braakman et al., 2013; Bretthauer et al., 1999; Gentsch et al., 1997; Lussier et al., 1997; Vervecken et al., 2004).

En levaduras como *S. cerevisiae*, la O-manosilación también es una modificación postraduccional importante, desempeñando funciones en la composición de las paredes celulares, diferenciación celular, formación del septo y viabilidad de la levadura durante la fisión, transporte de vesículas y virulencia (Garfoot et al., 2018; Lengeler et al., 2008; Proszynski et al., 2004; Willer et al., 2003). A diferencia de *S. cerevisiae*, *P. pastoris* no hiperglicosila proteínas terapéuticas y no contiene manosas unidas a α -1,3 terminales potencialmente inmunogénicas (De Wachter et al., 2018) (Fig. 6). Se cree que los enlaces glicano α -1,3 en glicoproteínas producidas a partir de *S. cerevisiae* son los principales responsables de la naturaleza hiperantigénica de estas proteínas (Bretthauer et al., 1999; Gentsch et al., 1997; Häusler et al., 1992; Romero et al., 1999; Yamada et al., 1994). Debido a sus características atractivas para la producción de proteínas heterólogas (baja incidencia de hiperglicosilación), *P. pastoris* es un organismo interesante para la producción de glicoproteínas terapéuticas.

Cabe mencionar que las vías de O-manosilación entre organismos como las levaduras y los actinomicetos como *Mtb* se encuentran conservadas evolutivamente (Gentsch et al., 1997). La O-manosilación en los actinomicetos se da mediante la adición de manosas a los residuos de serina o treonina con enlaces α -1,2 en las proteínas que residen en las membranas bacterianas (Ahmad et al., 2014; Akasaka-Manyá et al., 2011; Dobos et al., 1996; Duman et al., 1998). De manera similar, en *P. pastoris*, las O-manosilaciones son cadenas lineales de cuatro a cinco residuos de manosa unidos mediante enlaces α -1,2 (Duman et al., 1998; Trimble et al., 2004). Por lo tanto, la levadura metilotrófica *P. pastoris* se prefiere a *S. cerevisiae* como un sistema heterólogo para producir glicoantígenos a partir de *Mtb*, porque sus cadenas de manosa son más cortas (VanderVen et al., 2005) siendo similares a las modificaciones realizadas por *Mtb*. Esto se demostró durante la producción del antígeno rCFP32 en *P. pastoris*, que, en comparación con el rCFP32 producido en *E. coli* fue inmunorreactiva, según lo evaluado por la producción de anticuerpos *in vitro* y los títulos séricos de pacientes con Tb (Benabdeselem et

al., 2007; Benabdesselem et al., 2006). Además, el uso de un sistema heterólogo basado en la levadura *P. pastoris* metilotrófica da como resultado una alta productividad de proteínas recombinantes en condiciones libres de endotoxinas y ADN viral (G. P. L. Cereghino et al., 2002; Damasceno et al., 2012; Gellissen et al., 2005). *P. pastoris* se considera un organismo seguro, en el que se han producido varios productos biofarmacéuticos humanos (Walsh, 2014).

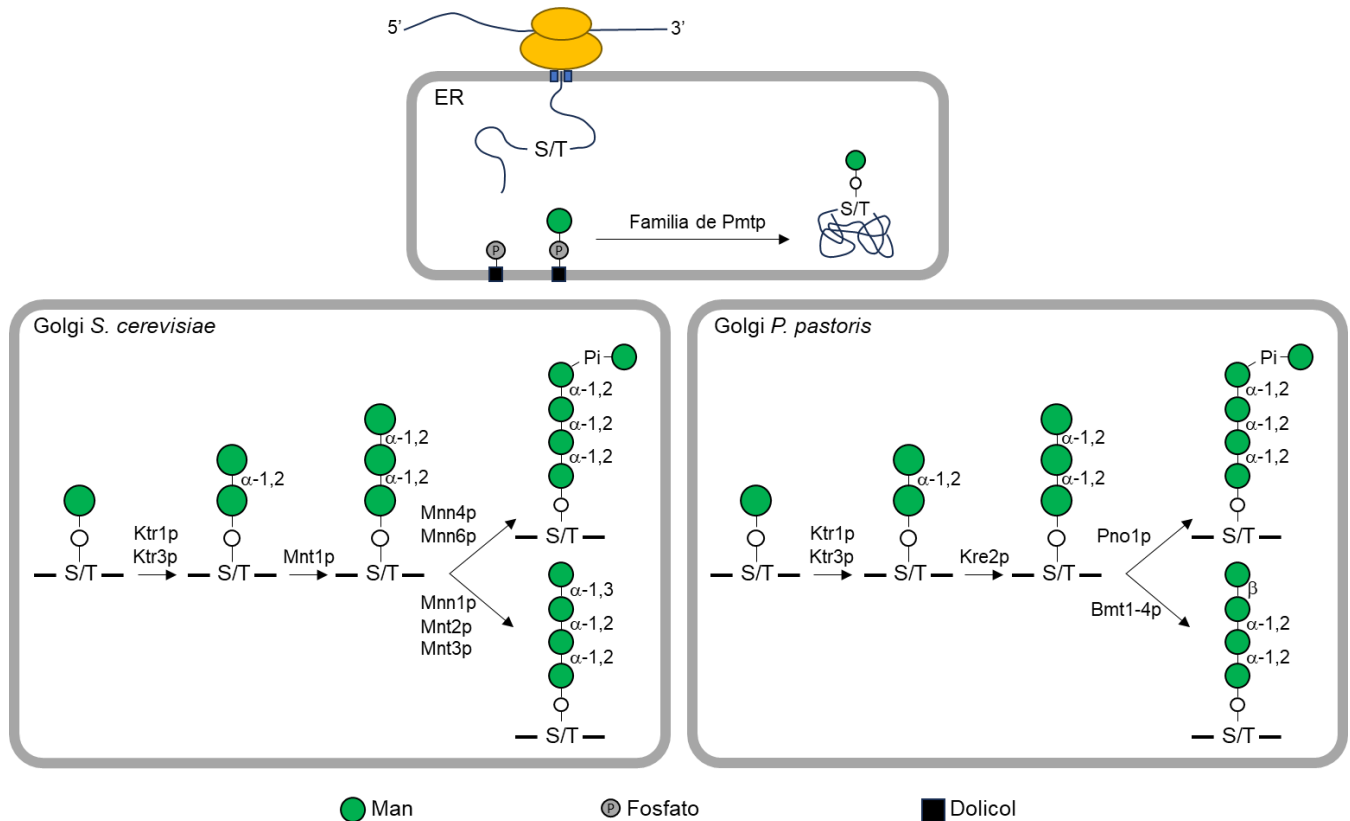


Figura 6. O-glicosilación de tipo silvestre en *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. En el retículo endoplásmico (ER), los residuos de serina (S) y treonina (T) pueden ser reconocidos por Pmt1/2p que agrega residuos de α -manosa. En el Golgi, Ktr1p/Ktr3p cataliza la transferencia de una segunda α -1,2-manosa, después de lo cual Mnt1p/Kre2p puede agregar una tercera α -1,2-manosa. Además, Mnn4p/Mnn6p o Pno1p añaden residuos de fosfomanosa en *S. cerevisiae* o β -manosas en *P. pastoris*. Las diferencias en la estructura de O- glicosilación pueden depender de la cepa de levadura (como se muestra en esta figura) pero también de su condición de crecimiento. Tenga en cuenta que todas las enzimas son en realidad proteínas transmembranales. La figura fue tomada de De Wachter et al., 2018.

4.2. Proteínas recombinantes de *Mtb* expresadas en *Pichia pastoris* como candidatos para el desarrollo de vacunas y/o el análisis de la modulación de la respuesta inmune

El uso de proteínas recombinantes como herramientas de diagnóstico, análisis y terapia es un mercado en crecimiento dentro de la industria de la biotecnología médica humana. *P. pastoris* ha sido utilizada como sistema de expresión de diversas moléculas biológicas recombinantes (Karbalaie et al., 2020). En el caso del estudio de tuberculosis, se ha encontrado que las proteínas expresadas en *P. pastoris* pueden presentar patrones de glicosilación similares a las nativas, como es el caso de la proteína APA (Wang et al., 2018), la cual se ha encontrado que induce la producción de citocinas en macrófagos (García-González et al., 2021) e inmunoreactividad a sueros de paciente con Tb. Incluso, existen algunas proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* que podrían ser candidatos importantes para el desarrollo de vacunas contra *Mtb* (Baghani et al., 2017; Benabdessalem et al., 2019; Chaouki Benabdessalem et al., 2006; Farsiani et al., 2016; Kebriaei et al., 2016; Mosavat et al., 2016; Soleimanpour et al., 2015). En la Tabla 1 se enlistan algunas de las proteínas de *Mtb* producidas en *P. pastoris*.

Tabla 1. Proteínas recombinantes basadas en antígenos de *Mtb* expresadas en *P. pastoris*

Nombre del constructo	Hallazgos encontrados	Referencias
Apa	Patrones de glicosilación similares a la proteína nativa	(Wang et al., 2018)
HBHA	Inmunogenicidad mediante la producción de altos niveles de IgG e interferón gamma.	(Teng et al., 2018)
CFP10-Fcy2a	Candidato a vacuna	(Baghani et al., 2017)
CFP32	Inmunorreactividad, candidato a vacuna	(Chaouki Benabdessalem et al., 2006)
ESAT6-CFP10-Fcy2a	Candidato a vacuna	(Farsiani et al., 2016)
ESAT6-Fcy2a	Candidato a vacuna	(Kebriaei et al., 2016)
CFP10-HspX-Fcy2a	Candidato a vacuna	(Mosavat et al., 2016)
ESAT6-HspX-Fcy2a	Candidato a vacuna	(Soleimanpour et al., 2015)
MarP	Induce la producción de citocinas en macrófagos	(García-González et al., 2021)

Además de los hallazgos relacionados con el aumento de la inmunorreactividad de proteínas producidas en *P. pastoris*. Se ha demostrado que algunos antígenos manosilados por *P. pastoris* tienen una mejor presentación de antígenos y propiedades de activación de células T en comparación con sus homólogos no glicosilados. Es posible que la inmunogenicidad de las glicoproteínas manosiladas está relacionado con ciertos receptores de unión a manosa presentes en células presentadoras de antígenos (Luong et al., 2007).

De esta forma, la intención de este estudio es producir el glicoantígeno PstS-1 con características postraduccionales similares a las del antígeno nativo producido por *Mtb* en *P. pastoris*. Además, esto permitirá evitar el uso y manipulación de una cepa de *Mtb* que requiera largos periodos de cultivo y obtener un glicoantígeno recombinante sin etiquetas, PstS-1, O-manosilado. Este trabajo describe la producción en matraces agitados orbitalmente y en biorreactores, de una forma recombinante del glicoantígeno O-manosilado PstS-1 (la cual presenta una identidad de secuencia del 98.8% con la secuencia nativa), su purificación y caracterización, sus modificaciones de O-manosilación, y su reactividad inmunológica a sueros de pacientes con Tb. La producción de esta glicoproteína ayudará en el estudio de su actividad inmunológica y será útil como herramienta de diagnóstico y/o como vacuna contra la Tb.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los esfuerzos realizados por la Organización Mundial de la Salud en su estrategia para el fin de la tuberculosis (Tb), en el 2022 se reportó que esta enfermedad, con una tasa de mortalidad del 50% sin tratamiento (Lönnroth et al., 2009), fue la segunda causa de muerte por agente infeccioso solo por debajo de la enfermedad de COVID-19, indicando que esta enfermedad se encuentra lejos de ser erradicada (World Health Organization, 2022). Uno de los principales métodos de prevención de la TB está basada en la vacuna BCG, la cual tiene una pobre eficacia (Pawan Kumar, 2021). Es por esta razón, que continúa la búsqueda de posibles candidatos vacunales o herramientas diagnósticas que mejoren el tratamiento de esta enfermedad.

PstS-1 es uno de los principales antígenos especie específico inmunodominante de todas las proteínas antigénicas secretadas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (Bothamley et al., 1992; Harboe et al., 1992; Silva et al., 2003). Esta se encuentra presente en los derivados proteicos purificados (PPD) y se sabe que la forma nativa de este antígeno presenta O-glicosilaciones (González-Zamorano et al., 2009). Sin embargo, hasta el día de hoy no se la logrado determinar el patrón de O-glicanos. Así como se ha observado con otros antígenos glicosilados de *Mtb*, como APA (Horn et al., 1999; Romain et al., 1999), la adición de manosas podría tener un papel importante en el desarrollo de las respuestas de la inmunidad innata y adaptativa. En el 2021 Watson y colaboradores realizaron un estudio enfocado en la importancia del reconocimiento de anticuerpos de PstS-1 como posible terapia profiláctica para Tb (Watson et al., 2021). Un tratamiento profiláctico con anticuerpos específicos hacia PstS-1 en ratones Balb/c infectados con *Mtb* reduce la carga pulmonar bacteriana en un 50%. Este estudio demostró que las respuestas inhibitoras de los linfocitos B anti-PstS1 surgen durante la tuberculosis activa (Watson et al., 2021) lo cual enfatiza la importancia de PstS-1 como un antígeno clave para la activación de la respuesta humoral por parte de *Mtb*.

En general, el uso de proteínas recombinantes es una herramienta eficaz para el desarrollo de vacunas, tratamientos y sistemas de detección diagnósticos (Flores et al., 2011; Ottenhoff et al., 2012). Sin embargo, las características estructurales, presencia de etiquetas para la purificación y MPt pueden ser un determinante que puede interferir con el estudio de la respuesta inmunogénica e inmunorreactividades de las proteínas en evaluación (Fonda et al., 2002; Horn et al., 1999). Las proteínas recombinantes de *Mtb* expresadas en *E. coli* (el principal sistema de

expresión de proteínas recombinantes) han sido comúnmente usadas en diferentes ensayos, aunque la discusión sobre las diferencias de las características fisicoquímicas y estructurales es escasa. Cabe resaltar que usualmente las proteínas recombinantes producidas en *E. coli*, carecen de MPt, como glicosilaciones, que podrían ser importantes en su función y estructura, haciéndolas disímiles a las proteínas secretadas por *Mtb* (Horn et al., 1999; Romain et al., 1999).

La levadura metilotrófica, *P. pastoris*, se ha usado como sistema de expresión para proteínas recombinantes debido a ventajas como el procesamiento postraduccion, secreción de las proteínas recombinantes, sistema de expresión económico, tiempos de expresión relativamente cortos, entre otras (Byrne, 2015). En el caso de la producción de antígenos recombinantes de *Mtb*, *P. pastoris* tiene la capacidad de realizar la O-manosilación de sus proteínas de forma similar en la que lo hace las actinobacterias como es el caso de *Mtb*, uniendo manosas mediante enlaces α 1-2 (Ahmad et al., 2014; Duman et al., 1998).

Todo lo anterior enmarca la necesidad de obtener antígenos de *Mtb*, cuya producción endógena es compleja, riesgosa por la manipulación de cepas patógenas, con procesos que pueden tomar meses, y por tanto costosa. De aquí que alrededor del mundo se buscan nuevas formas para producir antígenos con características similares a los nativos. Su producción permitirá realizar estudios precisos del papel de los antígenos secretados de *Mtb*, así como obtener un mejor análisis de la respuesta inmune innata y adaptativa debido a la posible similitud con la proteína nativa. Además, se podrá estudiar su reconocimiento por Ab de pacientes con la enfermedad para el diseño de vacunas o herramientas diagnósticas. Por lo que en este trabajo nos evocamos al estudio de la producción y purificación del antígeno recombinante O-manosilado, rPstS-1, en *P. pastoris*, enfatizando que este presentará características similares al antígeno nativo.

HIPÓTESIS

El glicoantígeno inmunodominante de *Mycobacterium tuberculosis*, PstS-1, al ser producido de forma recombinante en *Pichia pastoris*, se produce con características bioquímicas y postraduccionales que aumentan su reconocimiento por anticuerpos de suero de pacientes con tuberculosis activa comparado con la proteína recombinante no glicosilada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el bioproceso de la glicoproteína recombinante rPstS-1 producida en *Pichia pastoris*, determinando las propiedades bioquímicas, postraduccionales e inmunogénicas de la molécula a través del reconocimiento por anticuerpos de pacientes con tuberculosis activa.

Objetivos específicos

- Caracterizar la cinética crecimiento y los parámetros estequiométricos de una clona de *Pichia pastoris* productora del glicoantígeno recombinante rPstS-1 en matraz agitado y biorreactor.
- Desarrollar y caracterizar el proceso de producción y purificación de las rPstS-1.
- Evaluar la caracterización bioquímica, conformacional y composición de las rPstS-1 mediante SDS-PAGE, dicróismo circular y espectrometría de masas.
- Analizar y caracterizar las modificaciones postraduccionales como O-glicosilaciones de la glicoproteína completa y los péptidos resultantes de la proteólisis de rPstS-1.
- Estudiar la serorreactividad de rPstS-1 en pacientes con tuberculosis activa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y cepas

Para los componentes de los medios de cultivo la peptona, extracto de levadura y agar se compraron de Difco™ (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), el metanol, dextrosa y sales de JT Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.), y el sorbitol y Triton X-100 se obtuvieron de Merck (Billerica, MA, EE. UU.). Para los reactivos de biología molecular, la Zeocin™, ligasa T4 y los reactivos de PCR se compraron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.), las enzimas de restricción PstI y KpnI se compraron de Jena Bioscience GmbH (Jena, Alemania) y el kit de purificación del plásmido Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit se compró a Zymo Research (Irvine, CA, EE. UU.). Los reactivos de pPICZ α B-PstS1 de proteínas, SDS-PAGE y Western Blot se adquirieron de Merck, y el sustrato quimioluminiscente Super Signal® West Pico se adquirió de ThermoFisher Scientific. Los reactivos de grado HPLC acetonitrilo y ácido trifluoroacético se adquirieron de JT Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). Los pasos de propagación y subclonación de plásmidos se llevaron a cabo en *E. coli* químicamente competente One Shot™ TOP 10 adquirida de ThermoFisher Scientific y cultivada en medio Luria-Bertani (Merck). La expresión de rPstS-1 se realizó en *Pichia pastoris* X-33 utilizando el vector pPICZ α B (ThermoFisher Scientific). La PstS-1 también se expresó en *Escherichia coli* BL21(DE3) con una cola de 6 histidinas (González-Zamorano et al., 2009).

Construcción del vector pPICZ α B-PstS1 y transformación de *Pichia pastoris* X-33

La secuencia del gen que codifica PstS1 (Rv0934) se obtuvo de GenBank ID No. 885724. Esta secuencia de nucleótidos se modificó para crear el uso preferencial de codones para *P. pastoris* (Bai et al., 2011; De Schutter et al., 2009). Para evitar la N-glicosilación, las asparaginas de los residuos 57 y 247 se sustituyeron por glutaminas (Halliwell et al., 2001). La secuencia optimizada fue sintetizada químicamente y clonada en el plásmido pUC57 por Gen-Script (Piscataway, NJ, EE. UU.). El fragmento sintético codificante se ligó en el vector pPICZ α B utilizando la T4 ADN ligasa. El fragmento se colocó río abajo del promotor AOX1 (alcohol oxidasa 1). Se incorporó un codón de paro (TAA) en el extremo 3' de la secuencia. El plásmido recombinante pPICZ α B-PstS1 se propagó en *E. coli* químicamente competente One Shot™ TOP 10 usando 25 μ g/mL de Zeocin™. El plásmido pPICZ α B-PstS1 se linealizó y se usó para transformar *P. pastoris* X-33 por electroporación (BTX; Genetronics, San Diego, CA, EE. UU.).

Las células transformadas se seleccionaron usando agar YPD (extracto de levadura 10 g/L, dextrosa 20 g/L, peptona 20 g/L, sorbitol 1 M y agar 20 g/L) suplementado con Zeocin™ a 30 °C. A continuación, los clones positivos se almacenaron en crioviales de 1.0 mL a -80 °C en glicerol al 20%. Las clonas de mayor producción fueron seleccionadas.

Métodos analíticos

El crecimiento de *Pichia pastoris* se determinó midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Scientific). La biomasa se evaluó midiendo el peso seco; se filtraron 5 mL de cultivo a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm (Merck-Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) y se lavaron una vez con un volumen de agua destilada. La biomasa obtenida se secó durante 24 h en una estufa a 65 °C, luego se colocó durante 1 h en un desecador y se pesó. El sobrenadante se utilizó para medir el consumo de glicerol mediante un método colorimétrico (Kuhn et al., 2015).

Producción en matraz agitado y biorreactor de rPstS-1 en *Pichia pastoris*

Los matraces agitados con baffles (MAB, 250 mL, matraz Duran® Erlenmeyer, cuello estrecho, vidrio de borosilicato, Mainz, Alemania) con 50 mL de medio BMGY (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicerol 10 mL/L y fosfato de potasio 100 mM, pH inicial de 6.0) se inocularon con 200 µL de cultivo de crioviales de la clona seleccionada. Después de agotado el glicerol, las células se cosecharon por centrifugación a 6,300 × g durante 15 min y el precipitado resultante se resuspendió en 50 mL de BMMY (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, metanol 10 mL/L y fosfato de potasio 100 mM, pH 6.0). Todos los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm (New Brunswick Scientific C251, Eppendorf Inc., Enfield, CT, EE. UU.).

Los biorreactores con 1.0 L de medio BMGY (Applikon Biotechnology, Países Bajos), se inocularon con cultivos de MAB a una D.O. inicial de 0.5 UA. El inóculo fue incubado a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Los cultivos en biorreactor se realizaron a 29 °C, sin control de pH y la tensión de oxígeno disuelto (DOT) se fijó al 35% (respecto a la saturación del aire) y se controló en cascada, variando la velocidad de agitación (entre 200 y 1000 rpm), se mantuvo un flujo de aire de 1.0 L/min (1 vvm) utilizando una estrategia de control proporcional-integral-derivada (PID) (Trujillo-Roldan et al., 2001). Los valores DOT, temperatura, agitación y pH fueron

adquiridos y controlados por el software ADI-1010 y BioXpert® (Applikon Biotechnology). El consumo de glicerol (1%, 12.6 g/L) se infirió cuando se alcanzó el 95% del DOT, momento en el que se inició la fase de inducción mediante la adición de metanol (7.9 g/L). Cada vez que el DOT superó el 80%, se realizó la alimentación de metanol. Las muestras se recolectaron cada 6 h (1.0 mL), los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 8,000 x g y se congelaron para su posterior análisis. Todos los cultivos se cultivaron como tres réplicas independientes y los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

Producción de rPstS-1 de *E. coli* en biorreactores

La *E. coli* (cepa DE3) utilizada para producir rPstS-1 se cultivó en un biorreactor (1.0 L de medio de cultivo Luria-Bertani, Applikon Biotechnology). Los cultivos del biorreactor se realizaron a 37 °C, sin control de pH, y el DOT se fijó al 35% (respecto a la saturación del aire) y se controló en cascada cambiando la velocidad de agitación (entre 200 y 1000 rpm), manteniendo un flujo de aire de 1.0 L/min (1 vvm) utilizando una estrategia de control proporcional integral derivada (PID) (Trujillo-Roldan et al., 2001). Después de 4 h de crecimiento (D.O. 600 cerca de 1.5 U.A.) se inició la fase de inducción mediante la adición de 0.1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Después de 4 h de inducción (D.O. 600 de 5.9 U.A.), la biomasa se recuperó por centrifugación. La suspensión celular se sonicó en búfer de lisis que contenía Triton X-100 al 0.5 % (v/v) y las muestras se centrifugaron (10,000 x g durante 10 min). La PstS-1 recombinante se produjo en cuerpos de inclusión, que se solubilizaron utilizando un búfer de desnaturalización (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, GuHCl 6 M, pH 8).

Cuantificación de proteína total, SDS-PAGE y Western blot

La concentración de proteínas solubles totales en los sobrenadantes se determinó mediante un ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las curvas de calibración se prepararon utilizando albúmina de suero bovino. Las muestras y los estándares se prepararon por triplicado y las absorbancias se midieron a 595 nm utilizando un lector de placas (Stat Fax 4200, Awareness Technology, Palm City, FL, EE. UU.). La proteína total de 500 μ L o 1 mL de sobrenadante se precipitó con 1 volumen de ácido tricloroacético (30%) en acetona fría. La precipitación se llevó a cabo durante la noche a -20 °C y luego se centrifugó a 14,000 x g durante 25 min. Los sedimentos se lavaron con acetona (80%), se secaron a 60 °C durante 5 min y luego se suspendieron en 20 μ L de

agua Milli-Q. Las muestras precipitadas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250, los geles teñidos se tomaron imágenes usando el software Image-Lab™ y el Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad Inc, EE. UU.). Se usó un marcador de peso molecular de proteína preteñida PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Para identificar la rPstS-1 producida se realizó inmunodetección de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y luego se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P™. Las membranas transferidas se bloquearon con leche desnatada (5%) en solución amortiguador de fosfato salino (PBS) que contenía Tween-20 (0.05%). Después de tres lavados con PBS-Tween-20, las membranas se incubaron con un Ab policlonal anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 (ArtNr: OACA02044. Aviva System Biology Co., San Diego, CA, EE. UU.; diluido a 1/2000) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas se lavaron dos veces con PBS-Tween-20 y se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulina G de ratón conjugados con peroxidasa diluidos 1/2000, a temperatura ambiente durante 30 min. Las membranas se lavaron de nuevo dos veces con PBS-Tween-20 y las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante quimioluminiscencia (Thermo Scientific, SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate). Las bandas se visualizaron utilizando un escáner C-digital (LICOR, NE, EE. UU.).

Para un estudio comparativo de la capacidad de los antígenos para ser reconocidos por un Ab, se realizaron experimentos de Western blot (Chaouki Benabdeselem et al., 2006) utilizando tres cantidades diferentes de rPstS-1 producida en *P. pastoris* o *E. coli* (2.0, 1.0 y 0.5 µg). La membrana se incubó con un Ab policlonal de conejo anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 (ArtNr: OACA02044. Aviva System Biology Co. USA; diluido 1/2000) durante 1 h a temperatura ambiente, o con una muestra de suero humano (diluido 1 /300 en TBS) de un paciente con Tb activa confirmada clínicamente, e incubados durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos unidos se detectaron usando una IgG-Fc antihumana de cabra conjugada con HRP (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, EE.) a temperatura ambiente. Las proteínas rPstS-1 purificadas de *P. pastoris* y *E. coli* se cuantificaron mediante un ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia (Thermo Scientific, SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) y la visualización de bandas se realizó

con un escáner C-digital (LICOR, NE, EE. UU.). El análisis densitométrico se realizó utilizando Image Lab™ Software 6.0.1 (Bio-Rad).

Purificación de rPstS-1

Después de 73 h de cultivo de *P. pastoris* recombinante en presencia de metanol en el biorreactor, se clarificó la biomasa mediante filtración tangencial en un sistema Sartojet Sartorius (Sartorius Stedim, Gotinga, Alemania), utilizando una membrana Sartocan® con corte de 100 kDa. A continuación, se utilizó una membrana Sartocan® con un corte de 10 kDa para concentrar el filtrado anterior. La fracción retenida (10-100 kDa) se concentró por liofilización hasta el 90% del volumen inicial y luego se pasó por un filtro de polipropileno de 0.2 µm (Minisart Sryinge filter, Sartorius). La rPstS-1 se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RPHPLC, Shimadzu, Kyoto, Japón). Las muestras se separaron con una columna PROTO300 Semi-Prep C4 (10 µm, 250 × 10 mm) y una columna XBridge Protein BEH C4 (300 Å, 3,5 mm, 4,6 mm × 150 mm). La composición de los disolventes fue: amortiguador A contenía agua Milli Q con ácido trifluoroacético al 0.1 % y el amortiguador B contenía acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %. La proteína recombinante se eluyó con un gradiente de acetonitrilo. La separación comenzó con una solución de tampón B al 20 % durante 5 min, luego se aplicó un gradiente de tampón B del 20% al 60% durante los siguientes 20 min. La elución se controló midiendo las absorbancias a 220 y 280 nm. La pureza se evaluó a partir del cromatograma obtenido de cada corrida analizando el área representativa de cada pico.

La purificación de rPstS-1 de *E. coli* etiquetada con cola de histidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con Ni-NTA Agarosa (Qiagen, Venlo, Países Bajos) usando un sistema cromatográfico FPLC (Econo System, Bio-Rad Richmond, CA, EE. UU.). La rPstS-1 se eluyó con NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, urea 8 M, imidazol 250 mM, pH 5,9. A continuación, la rPstS-1 se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando una columna PROTO300 Semi-Prep C4 (10 µm, 250 × 10 mm) y el XBridge Protein BEH C4. columna (300 Å, 3.5 mm, 4.6 mm X 150 mm). La proteína recombinante se eluyó con un gradiente de 0% a 60% de acetonitrilo, utilizando amortiguador A (agua Milli Q que contenía 0.1% de ácido trifluoroacético) y amortiguador B (acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético). La elución se controló midiendo las absorbancias a 220 y 280 nm.

Espectroscopía de dicroísmo circular

La estructura secundaria de ambas formas de rPstS-1 (de *P. pastoris* y *E. coli*) se determinó mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD) en la región de UV lejano usando un espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., MD. EE. UU.). Los espectros de CD se obtuvieron de muestras disueltas en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 12 mM a pH 8, con concentraciones de proteína de 125 y 250 µg/mL. Los espectros se registraron de 190 a 260 nm a una velocidad de exploración de 20 nm/min y un tiempo de respuesta de 1 s, representando cada espectro la suma de cuatro acumulaciones. Todos los espectros se adquirieron a 25 °C en una celda de 1 mm. Los datos de CD se analizaron utilizando la herramienta CAPITO CD Analysis & Plotting (<http://capito.nmr.leibniz-fli.de/index.php>) para proporcionar estimaciones del contenido de la estructura secundaria (Wiedemann et al., 2013). La elipticidad media de los residuos ($[\Theta]$ en grad.cm².dmol⁻¹) se calculó de acuerdo con la ecuación (Kelly et al., 2000): $[\Theta] = MRW\Theta/10d.c$ donde MRW es el peso medio del residuo, Θ es la elipticidad observada (miligrados), d es el paso óptico (cm) y c es la concentración (mg/mL).

Análisis de espectrometría de masas

La masa molecular de rPstS-1 de *P. pastoris* se determinó por MALDI-TOF, utilizando un instrumento Bruker Microflex. Se realizó una solución de rPstS-1 y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (10 mg/ml) (1:1 v/v) y se colocaron sobre placas de acero inoxidable. Las muestras se analizaron en modo de detección de iones positivos y lineal. La identificación de la secuencia de la rPstS-1 de *P. pastoris* purificada por RP-HPLC se llevó a cabo como se describe (Gamboa-Suasnavart et al., 2011). Brevemente, 50 µg de rPstS-1 se redujeron con DTT 10 mM en NH₄HCO₃ 100 mM durante 5 min a temperatura ambiente y luego se alquilaron con yodoacetamida 54 mM en NH₄HCO₃ 100 mM a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. Después, la proteína se digirió con tripsina (recombinante, grado de proteómica, Roche, Cat. No. 03708985001) bajo las condiciones descritas por el proveedor (Roche, 2010). Por otro lado, una segunda muestra tratada (reducida y alquilada) que contenía 50 µg de proteína purificada fue digerida con la enzima proteolítica Lys-C (Roche, Suiza) como describe el proveedor (Roche, 2021). Los análisis de espectrometría de masas de los péptidos digeridos se realizaron con 1 µL de la reacción enzimática mezclada con 5 µL de acetonitrilo (ACN) al 30%, agua al 70%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % saturado con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Después de esto, se analizó 1 µL de esta solución en un analizador de tiempo

de vuelo de ionización por desorción láser asistido por matriz (MALDI-TOF, Bruker Microflex). Los espectros se registraron en el modo lineal positivo para el rango de masas de 1,000 a 13,000 Da.

La identificación de la secuencia de los péptidos trípticos se realizó mediante un MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los péptidos digeridos se reconstituyeron en una solución de H₂O:ACN:TFA (50:50:0.1) a concentraciones nanomolares. Para cristalizar los péptidos se mezcló 0.5 µL de la muestra con 1.0 µL de la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico así como con 1.0 µL de las matrices ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y α- ácido ciano-4-hidroxicinámico. Ambas preparaciones se realizaron en concentraciones micromolares y se depositaron en placas de acero inoxidable a temperatura ambiente hasta su completa evaporación y formación simultánea de cristales. Para ionizar las muestras se utilizaron pulsos de láser utilizando una fuente de nitrógeno y una longitud de onda de 355 nm. Las señales detectadas fueron almacenadas y analizadas con el programa ProteinPilot 1.4 acoplado al sistema.

Se analizaron por espectrometría de masas los péptidos purificados por RP-HPLC obtenidos de la tripsinización de las proteínas recombinantes de rPstS-1 producidas en *E. coli* y *P. pastoris* como se describe a continuación. Las proteínas purificadas (1.5 mg) se sometieron a digestión tríptica (recombinante, grado de proteómica, Roche, Cat. No. 03708985001) como se describe por el proveedor (Roche, 2010) y se concentraron por ultrafiltración con tubos/filtro Amicon con corte de 3 kDa. Se agregó la enzima en una relación 1:100 del peso de la proteína obtenida. La proteína se incubó con la enzima a 37 °C durante 16 h. Una vez realizada la digestión, se purificaron los péptidos obtenidos de la tripsinización mediante RP-HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando una columna XBridge Protein BEH C4 (300 Å, 3.5 mm, 4.6 mm X 150 mm). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 0% a 60% de acetonitrilo, utilizando amortiguador A (agua Milli Q que contenía 0.1% de ácido trifluoroacético) y amortiguador B (acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético). La elución se controló midiendo las absorbancias a 220 y 280 nm. Se recolectaron las fracciones pertenecientes a cada uno de los picos de elución. Los análisis de espectrometría de masas de las fracciones recolectadas se realizaron con 1 µL de las fracciones mezclada con 5 µL de acetonitrilo (Acn) al 30%, agua al 70%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% saturado con ácido α-ciano-4-hidroxicinámico. Después de esto,

se analizó 1 μL de esta solución en un analizador de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistido por matriz (MALDI-TOF, Bruker Microflex).

Ensayos de serorreactividad por ELISA

Se recubrió una microplaca de 96 pozos (Nunc-ImmunoPlate, Maxisorp Surface, Thermo Fisher) con 100 μL /pozo de la proteína recombinante (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en amortiguador de fosfato salino (PBS) y se incubó durante la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$, luego se lavó tres veces durante 1 min cada una con PBS, se bloquearon con 150 μL de BSA (0.25 %) en PBS durante 1.5 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y luego se lavaron cinco veces con PBS. A continuación, se añadieron al pozo correspondiente 100 μL de cada suero, diluidos en solución de bloqueo (en dos diluciones: 1:100 y 1:500), se incubó durante 1.5 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y luego se lavó tres veces con 250 μL de Tween 20 (0,05%) en PBS. A continuación, los pozos se incubaron con 100 μL de Ab secundario IgG2 antihumano de ratón (1:500 PBS/Tween 0,05 %) acoplado a fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific), durante 1.5 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad y se lavaron cuatro veces. con 250 μL de Tween 20 (0,05%) en PBS. Para medir la actividad de la fosfatasa alcalina se utilizaron como sustrato tabletas de fosfato de p-nitrofenilo SIGMAFAST™ (Merck, Billerica, MA, EE. UU.). Se añadió el sustrato diluido (75 μL) a cada pozo seguido de incubación durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Synergy|HTX, Biotek, Winooski, VT, EE. UU.). Cada análisis de suero se realizó por duplicado. Los sueros de pacientes con Tb (n = 30) fueron seleccionados al azar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER, Ciudad de México, México). La Tb pulmonar activa en todos los pacientes fue confirmada por frotis de esputo clínicamente positivo, microscopía, cultivo en medio Middlebrook 7H10 e identificación por métodos moleculares y resistencia a rifampicina mediante la prueba GeneXpert. Los sueros fueron recolectados antes de iniciar el tratamiento antibiótico, luego de la confirmación de la fase aguda de la enfermedad. Adicionalmente, los sueros de sujetos con pruebas de PPD positivas (n = 5) y negativas (n = 5) fueron seleccionados de un tamizaje para evaluar infecciones micobacterianas en personas del Estado de México, México. Estos sujetos no presentaron ninguna evidencia clínica de tuberculosis activa.

Análisis estadísticos

Todos los datos de los parámetros cinéticos se representan como la media de triplicados \pm desviación estándar. La significancia estadística entre grupos en el ensayo de reactividad de anticuerpos se determinó utilizando la media de 30 sueros de pacientes con Tb activa en comparación con PBS como control y grupos de PPD positivo y negativo ($n = 5$, cada uno). Se utilizó la prueba de Dunn para todas las comparaciones por pares y comparaciones contra un grupo de control (PBS) después de ANOVA basado en rangos, basado en el tratamiento de tamaños de grupo desiguales. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si la $P < 0,05$.

RESULTADOS

Construcción de plásmido para la producción de rPstS-1 de *Mtb* en *P. pastoris*

El trabajo realizado con el diseño del plásmido y transformación para la expresión de rPstS-1 de *Mtb* en *P. pastoris* se llevó a cabo por la Dra. Valdez Cruz y del M. en C. Daniel Juárez. La secuencia del gen que codifica para la proteína nativa PstS-1 de *Mtb* (Rv0934) se obtuvo de GeneBank number: P9WGU1. Las modificaciones se implementaron utilizando el software Gene Designer 2.0. Se eliminaron el péptido señal y de lipidación (secuencia codificante para los residuos 1 a 21 de los 23 residuos del péptido señal). Los posibles sitios consenso de N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) también fueron eliminados para evitar N-glicosilaciones las cuales están asociadas a estructuras hipermanosiladas de glicanos (van Kooyk et al., 2008). Se decidió mutar los codones para los aminoácidos Asn 57 y Asn 247 (N) por Gln (Q). A partir de las secuencias obtenidas del GenBank se realizó una optimización de codones de la secuencia codificante para *P. pastoris* (Bai et al., 2011; De Schutter et al., 2009). El primer aminoácido de la proteína recombinantes es una alanina, de esta forma se evita que el grupo tiol de la cisteína pueda interaccionar con la membrana celular. El análisis de identidad por superposición de los 353 residuos de la proteína recombinante comparada con la nativa presenta una identidad del 99.4%.

Para el diseño del plásmido la secuencia codificante se clonó río debajo de la secuencia del factor de acoplamiento α en el vector pPICZ α B. Se conservó el marco de lectura abierto y bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 de *P. pastoris*, La rPstS-1 se expresó sin etiquetas ya que estas podrían alterar las propiedades biológicas o fisicoquímicas (Fonda et al., 2002; Halliwell et al., 2001; Sainsbury et al., 2016; J. Wu et al., 1999). El plásmido construido se verificó por PCR (Fig. 8A) y secuenciación (dato no mostrado). En la Figura 7 se muestra el diagrama del plásmido pPICZ α B-PstS1 usado para la transformación de la cepa de X33 de *P. pastoris*.

Mediante la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005) se analizaron las características fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos perteneciente la proteína recombinante rPstS-1. Se determinó un peso molecular teórico de 36,059.36 Da, punto isoeléctrico teórico de 4.82 y coeficiente de extinción molar de aproximadamente 1.023 M⁻¹ cm⁻¹, a 280 nm medido en agua.

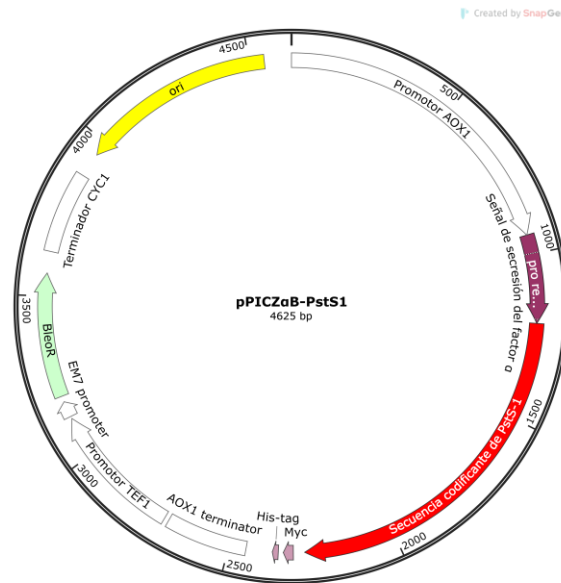


Figura 7. Diagrama del plásmido pPICZ α B-PstS1 utilizando el programa SnapGene®. Se observa la región de la secuencia promotora de AOX1 (flecha blanca superior), la secuencia de secreción perteneciente al factor de acoplamiento α (flecha morada) y la secuencia del gen codificante de PstS-1. El casete de restricción para bleomicina (zeocina) se observa en la flecha verde.

Transformación de *P. pastoris* X-33 con plásmido pPICZ α B-PstS1

Una vez realizada la transformación de las células por electroporación se obtuvieron y se seleccionaron 55 clonas positivas de *P. pastoris* X-33 con pPICZ α B-PstS1 (X33::pPIC-PstS1). Adicionalmente, se transformó *P. pastoris* X-33 con el vector pPICZ α B vacío (X33::pPICZ α B) como control (Fig. 8B).

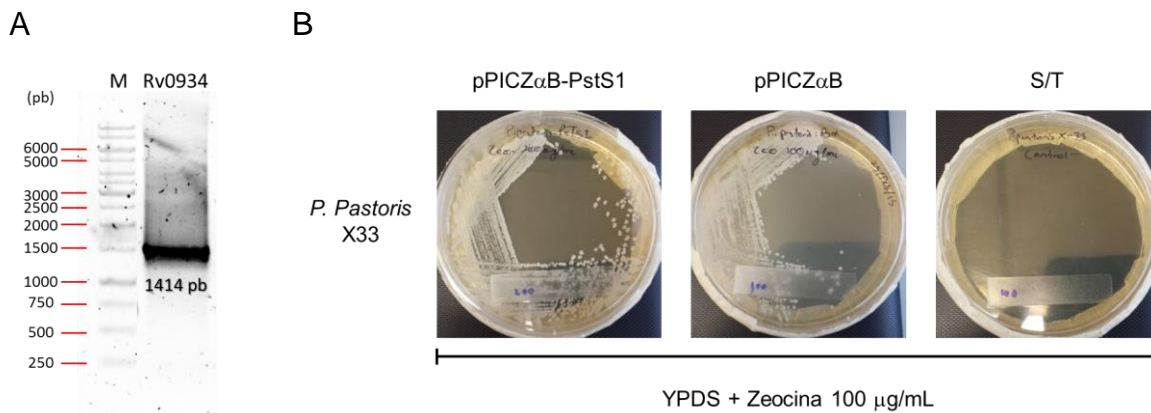


Figura 8. Transformantes de *P. pastoris* X-33 con plásmidos pPICZ α B-PstS1 y pPICZ α B. A. PCR tiempo final del plásmido pPICZ α B-PstS1 para verificar la correcta ligación de la secuencia nucleotídica de la proteína PstS-1 al plásmido pPICZ α B esperando obtener una banda de 1,414 pb. B. Las levaduras se

transformaron por electroporación con los plásmidos pPICZ α B-PstS1 y pPICZ α B. Como control se ocupó la cepa X-33 sin transformar (S/T). Se utilizó YPDS+Zeocina (100 μ g/mL).

Selección de clona X33::pPIC-PstS1 productora de rPstS-1.

Tras el análisis de aumento de antibiótico se seleccionaron 8 clonas, de las cuales se generaron bancos maestros y se comparó tanto su crecimiento (Tabla 2) como la productividad mediante SDS-PAGE (Figura 9). El crecimiento de las clonas seleccionadas se realizó en matraces agitados con baffles (MAB) de 250 mL con volumen de 50 mL de medio BMGY durante 36 h y, tras el agotamiento del glicerol, se cambió el medio a BMMY. La fase de producción de la rPstS-1 en el medio BMMY fue durante 60 h y la inducción se realizó adicionando 1% de metanol cada 12 h. Después se determinó la producción de las proteínas recombinantes y los pesos secos finales del crecimiento con el medio BMMY. En la Tabla 2 se muestran las D.O. (600 nm) y el peso seco de las clonas comparando el peso inicial al colocar medio BMMY con el final después de las 60 h. Se observó que las clonas con mayor D.O. después de 60 h en medio BMMY fueron la clona 1, 2 y 7, las cuales alcanzaron D.O. mayores de 17.3. Las clonas 2, 4, 7 y 8 obtuvieron pesos secos por arriba de de 5.9 g/L (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de crecimiento y productividad final de rPstS-1 en las clonas seleccionadas de X33::pPIC-PstS1

	Clona	D.O.* (U.A. 600 nm)	PSC* (g/L)	Banda ~38 kDa (%)
X33::pPIC-PstS1	1	17.8**	5.8	11.9
	2	17.3**	5.9**	16.2**
	3	15.2	5.7	13.3
	4	14.55	5.9*	10.5
	5	13.4	4.5	6
	6	15.55	5.4	6.4
	7	19.05**	6.8**	17.8**
	8	15.5	6.1**	15.6**
X-33		13.75	5.1	

D.O., densidad óptica; PSC, peso seco celular; U.A., unidades de absorbancia.

* El análisis se realizó con muestras del tiempo final de cultivo a las 60 h en medio BMMY.

** Las primeras tres clonas con mayor crecimiento (D.O. y PSC) o % de banda de ~38 kDa.

Además, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida a las muestras de proteínas del sobrenadante utilizando el mismo volumen de muestra (1 mL de sobrenadante sin células). En las clonas productoras de rPstS-1 se observó la presencia de una banda de aproximadamente ~38 kDa la cual no se observa en el control (Fig. 9). Haciendo un análisis densitométrico de la banda de ~38 kDa de todos los carriles, se llegó a la conclusión que las clonas 2, 7 y 8 presentaban un mayor porcentaje de expresión, 16.2%, 17.8% y 15.6% respectivamente. De acuerdo con los resultados la **clona 7** presentó las mejores características de producción de la proteína rPstS-1.

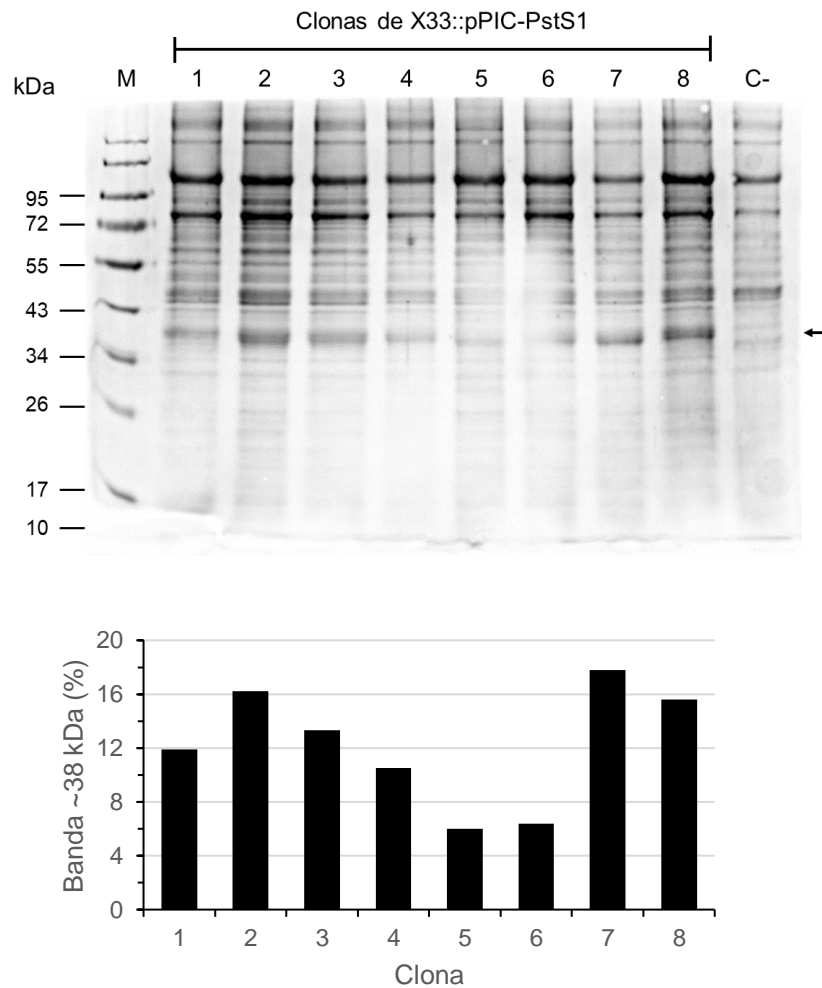


Figura 9. Electroforesis de proteínas del sobrenadante de las diferentes clonas de X33::pPIC-PstS1 productoras de rPstS-1 y análisis densitométrico de la banda de ~38 kDa. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomasie. Las clonas seleccionadas fueron inducidas con medio BMMY (1% de metanol) y se precipitó 1 mL de proteína usando el mismo volumen del sobrenadante de cada clona. La flecha señala la banda de ~38 kDa que podría corresponder con rPstS-1. M, marcador de peso; C- (control negativo), clona X33::pPICZαB. El porcentaje corresponde al total de las bandas presentes en cada carril.

Identificación de rPstS-1 producida en *P. pastoris* por espectrometría de masas

Una vez seleccionada la clona de *P. pastoris* X33::pPIC-PstS1 para la producción de rPstS-1 se realizó el análisis de la banda de ~38 kDa del gel de SDS-PAGE. Esta banda fue analizada por espectrometría de masas en el INMEGEN con el Dr. Sergio Román. Para la identificación se realizó una digestión proteolítica a la proteína de la banda con tripsina. La identificación de los péptidos producto de la digestión se realizó con MALDI TOF/TOF 4800 MS/MS y se utilizó el programa ProteinPilot™ para la identificación de los péptidos. Como se muestra en la Tabla 3 se pudieron identificar 7 péptidos pertenecientes a la proteína Rv0934 de *Mtb*. Se encontró que 5 de los péptidos tenían una confianza del 99%. Otros dos péptidos obtuvieron porcentajes de confianza del 93 y 83% debido a posibles modificaciones de oxidación y metilación, respectivamente. Este resultado nos da la certeza que se produjo la proteína recombinante rPstS-1 de *Mtb*.

Tabla 3. Identificación de péptidos de rPstS-1 por MALDI TOF/TOF MS/MS

Secuencia peptídica	Número UniProt	% confianza*	Modificación	PM	PMT
VLAAMYQGTIK		99	---	1193.6266	1193.6372
TWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHR		99	---	2750.5609	2750.5056
SDGSGDTFLFTQYLSK		99	---	1764.8046	1764.8126
DAATAQTLQAFHWAITDGNK	P9WGU1 (PSTS1_MYCTU)	99	---	2271.1964	2271.1624
ASFLDQVHFQPLPPAVVK		99	---	1992.1214	1992.1023
GLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLK		93	Oxidación(M)@3	2781.222	2795.5166
GLGEAQLGNSSGNFLLPDAQSIQAAA AGFASK		83	Metil(E)@4	3091.384	3103.5947

El programa ProteinPilot™ utiliza la base de datos UniProt para el análisis de los péptidos mediante un algoritmo. PM, peso molecular; PMT, peso molecular teórico. * El porcentaje de confianza de los péptidos se basa en el número de coincidencias entre los datos y fragmentos ionizados teóricos.

Caracterización cinética de crecimiento de X33::pPIC-PstS1 y clonas control en medio BMGY y BMMY y perfil de proteínas en matraces agitados con bafles.

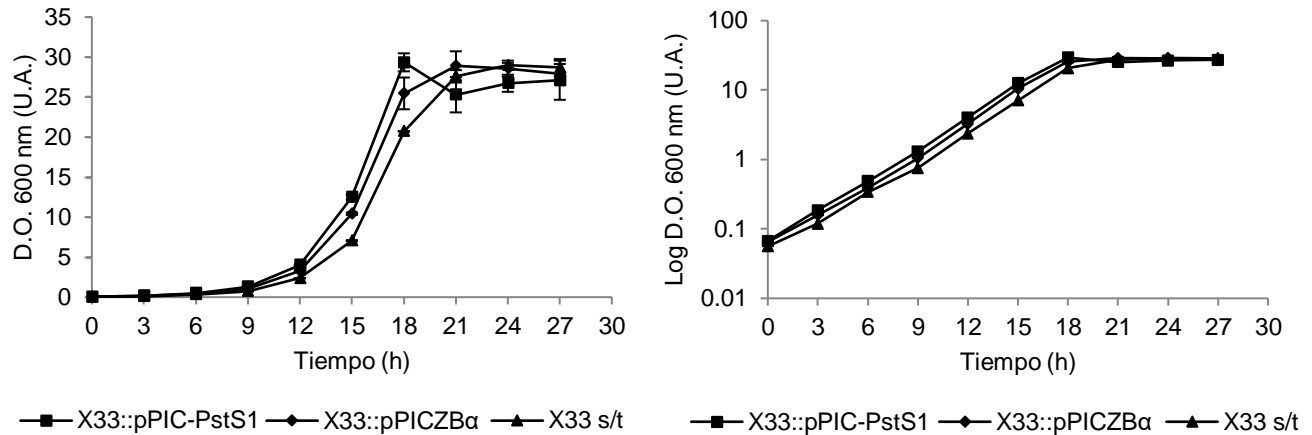
Se realizó la caracterización y comparación del crecimiento y perfil de proteínas mediante SDS-PAGE entre la clona productora de rPstS-1 y las cepas control con el vector vacío y sin transformar en medio BMGY y BMMY. En experimentos iniciales se determinó el crecimiento mediante D.O. en matraces agitados con bafles en medio BMGY y BMMY. El crecimiento de las cepas en medio BMGY se comenzó con 0.065 D.O. y se observó que tanto la clona

productora como las cepas control alcanzaron la fase estacionaria a las 18 h de cultivo (Fig. 10A). La clona 7 alcanzó una D.O. máxima de 29.35 UA (± 1.13) a las 18 horas de cultivo, la cepa con el vector vacío 28.9 UA (± 1.80) a las 21 h de cultivo y la cepa sin transformar, X-33, alcanzó una D.O. máxima de 29.00 UA (± 0.28) a las 24 h de cultivo (Fig. 10A). En cuanto a la velocidad específica de crecimiento (μ) la cepa productora de rPstS-1, con el vector vacío y sin transformar tuvieron valores de 0.451, 0.440 y 0.421 h⁻¹ respectivamente (Fig. 10B). Estos resultados indican que tanto las D.O. y velocidades de crecimiento en medio BMGY no presentaron diferencias significativas.

Una vez realizados los cultivos en medio BMGY se recuperó la biomasa y se cambió a medio BMMY para realizar un análisis de crecimiento del cultivo en condiciones de inducción de la producción de rPstS-1. Los resultados de la cinética en BMMY se muestran en la Figura 11. El crecimiento se comenzó a una D.O. de aproximadamente de ~1.1 UA para todas las cepas. Como se puede observar en la Figura 11A, la fase estacionaria comenzó después de 18 h de crecimiento para las tres colonias. Una vez terminado el crecimiento en medio BMMY a las 68 h, se determinó la máxima D.O. Para la clona 7 X33::pPICZ α B-PstS1 la máxima D.O. fue de 33.3 UA, X33::pPICZ α B alcanzó 31.4 UA y la clona X-33 sin transformar tuvo una D.O. de 32.3 UA (Fig. 11A). La μ para las colonias fueron las siguientes: 0.4215 h⁻¹ (± 0.007) para X33::pPICZ α B-PstS1; 0.4158 h⁻¹ (± 0.013) para X33::pPICZ α B; y 0.4435 h⁻¹ (± 0.036) para X-33 (Fig. 11B). Lo cual sugiere que no hay diferencias significativas en el crecimiento en medio BMMY de las tres cepas.

Por otra parte, el análisis del peso seco al final de los cultivos se observó que la clona X33::pPICZ α B-PstS1 tuvo un valor de 12.57 g/L (± 0.01), la clona X33::pPICZ β fue de 14.09 g/L (± 0.02) y X-33 sin transformar tuvo un peso seco de 13.89 g/L (± 1.36) (Fig. 12). Estos resultados indican que no hubo diferencias significativas en los valores de crecimiento obtenidos de D.O. y velocidades de crecimiento tanto para el crecimiento en medio BMGY y BMMY entre las tres clonas.

A



B

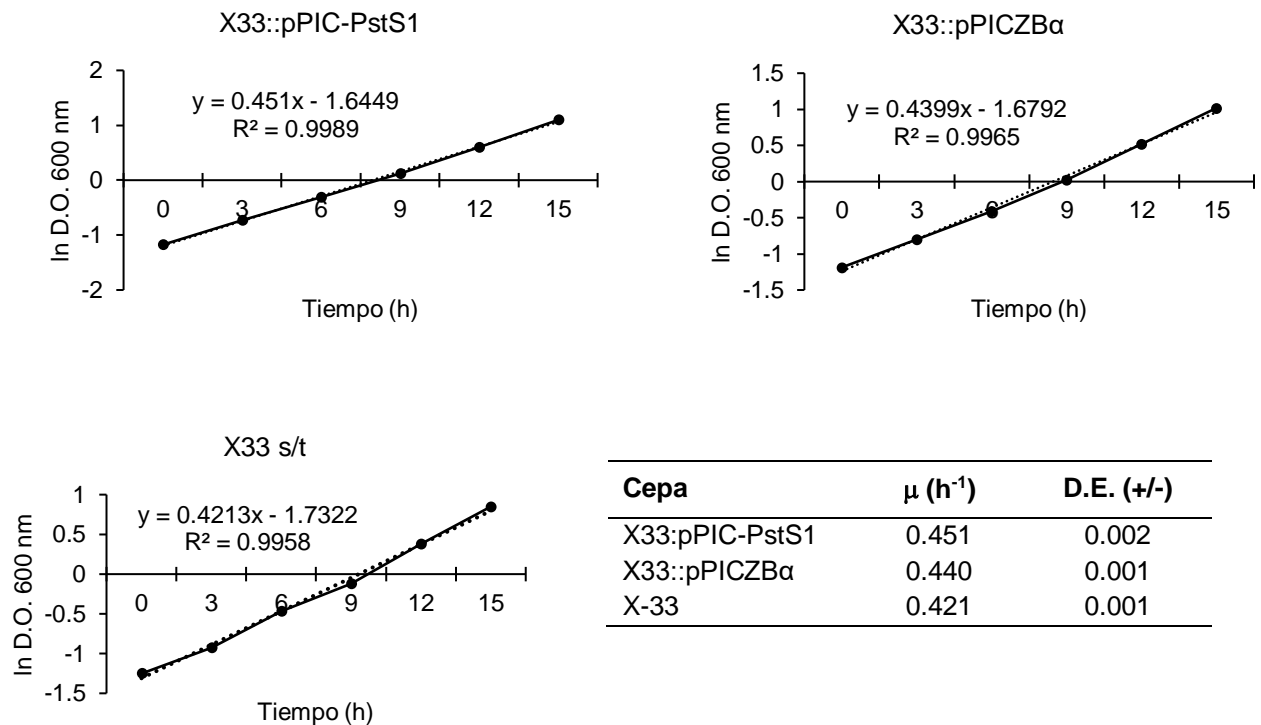
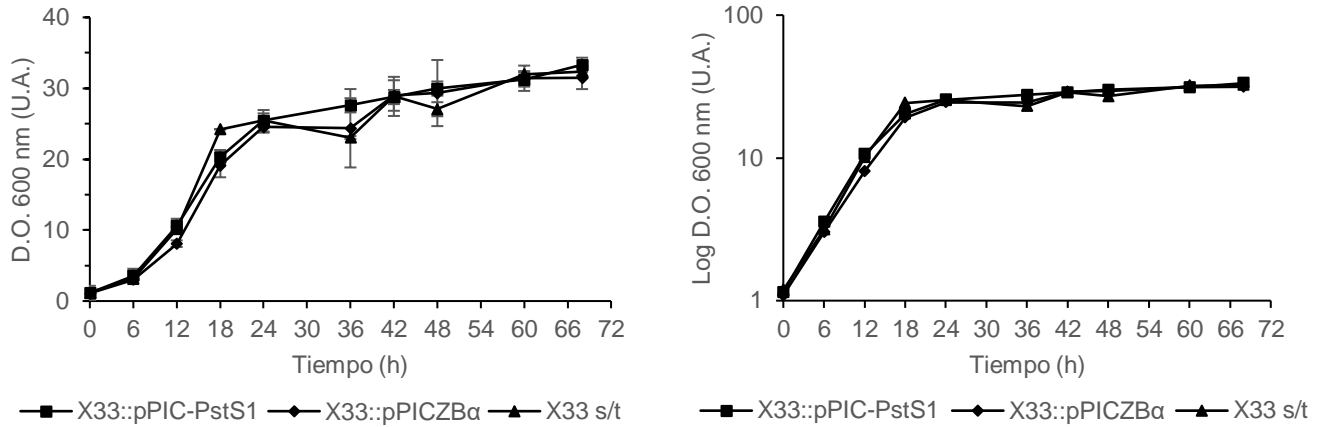


Figura 10. Cinética de crecimiento de clonas X33::pPIC-PstS1, X33::pPICZBa y X33 s/t en medio BMGY. Las levaduras crecieron en matraces agitados con baffles de 250 mL con 50 mL de volumen de medio en condiciones de 30° C y 150 r.p.m. durante 27 h. **A.** Gráficas de la cinética de crecimiento tomando muestra cada 3 h y obteniendo la D.O. (600 nm); a la derecha se muestra la gráfica en escala logarítmica. **B.** Gráficas y fórmula de la pendiente en la fase logarítmica de crecimiento para el análisis y cálculo de la velocidad específica de crecimiento de cada una de las clonas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

A



B

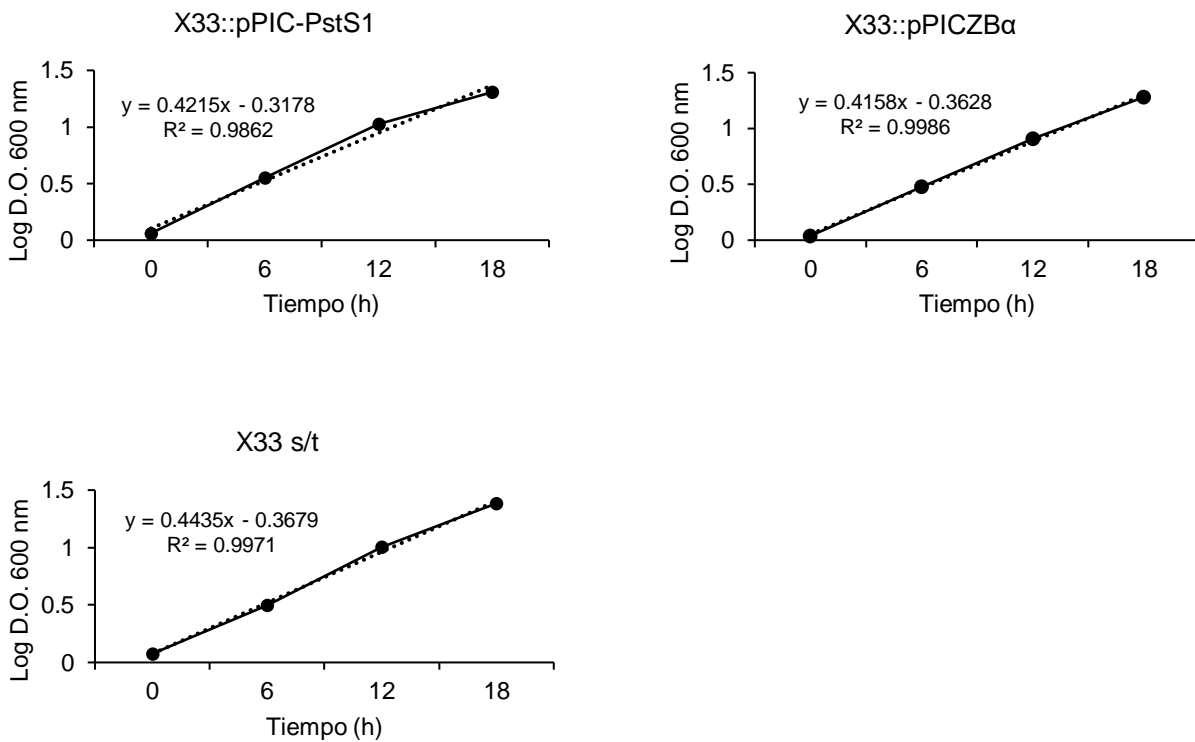


Figura 11. Cinética de crecimiento de X33::pPIC-PstS1, X33::pPICZBα y X33 s/t en medio BMMY. Las levaduras crecieron en matraces agitados con baffles de 250 mL con 50 mL de volumen de medio en condiciones de 30° C y 150 r.p.m. durante 68 h. **A.** Gráficas de la cinética de crecimiento tomando muestra cada 6 h y obteniendo la D.O. (600 nm); a la izquierda se muestra la gráfica en escala logarítmica. **B.** Gráficas y fórmula de la pendiente en la fase logarítmica de crecimiento para el análisis y cálculo de la velocidad específica de crecimiento de cada clona. Los experimentos se realizaron por triplicado.

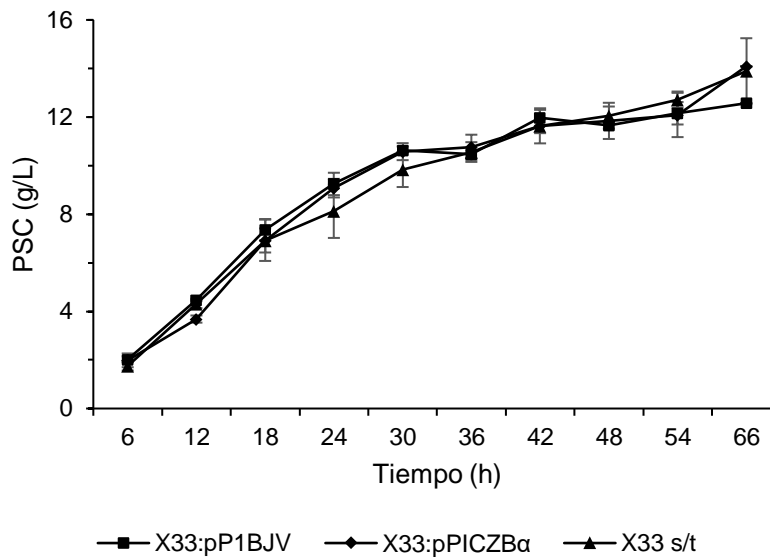


Figura 12. Gráfica de cinética de peso seco de las diferentes cepas de *P. pastoris*, clona productora de rPstS-1 y las clonas control en medio BMMY. Las cinéticas se realizaron por triplicado y se calculó de desviación estándar. PSC, peso seco celular. S/T, sin transformar.

Para realizar un análisis comparativo del perfil de proteínas de sobrenadante de las cepas en medio BMMY de forma cinética se utilizó muestra a diferentes tiempos de cultivo y se separaron por SDS-PAGE. Para el análisis se tomó 1 mL de sobrenadante sin biomasa de cada uno de los diferentes tiempos, la proteína se precipitó y se utilizó el mismo volumen de carga de cada una de las muestras procesadas. Como se puede observar en el gel de la cinética de la clona productora X33::pPIC-PstS1 de la Figura 13, la expresión de rPstS-1 se da principalmente a partir de las 24 h. En las cinéticas con X33::pPICZBα y X33 s/t no se observó un cambio significativo en el patrón de las bandas, solo en el aumento acumulativo de las proteínas en los geles teñidos como se observa en la Figura 13.

De los resultados obtenidos podemos concluir que la clona 7 X33::pPIC-PstS1 aumenta la producción de la proteína recombinante en la fase estacionaria de crecimiento. Además, se puede observar que el aumento del peso seco celular se mantiene hasta la hora 68 a pesar de que el aumento de la D.O. se mantiene en las últimas horas del cultivo.

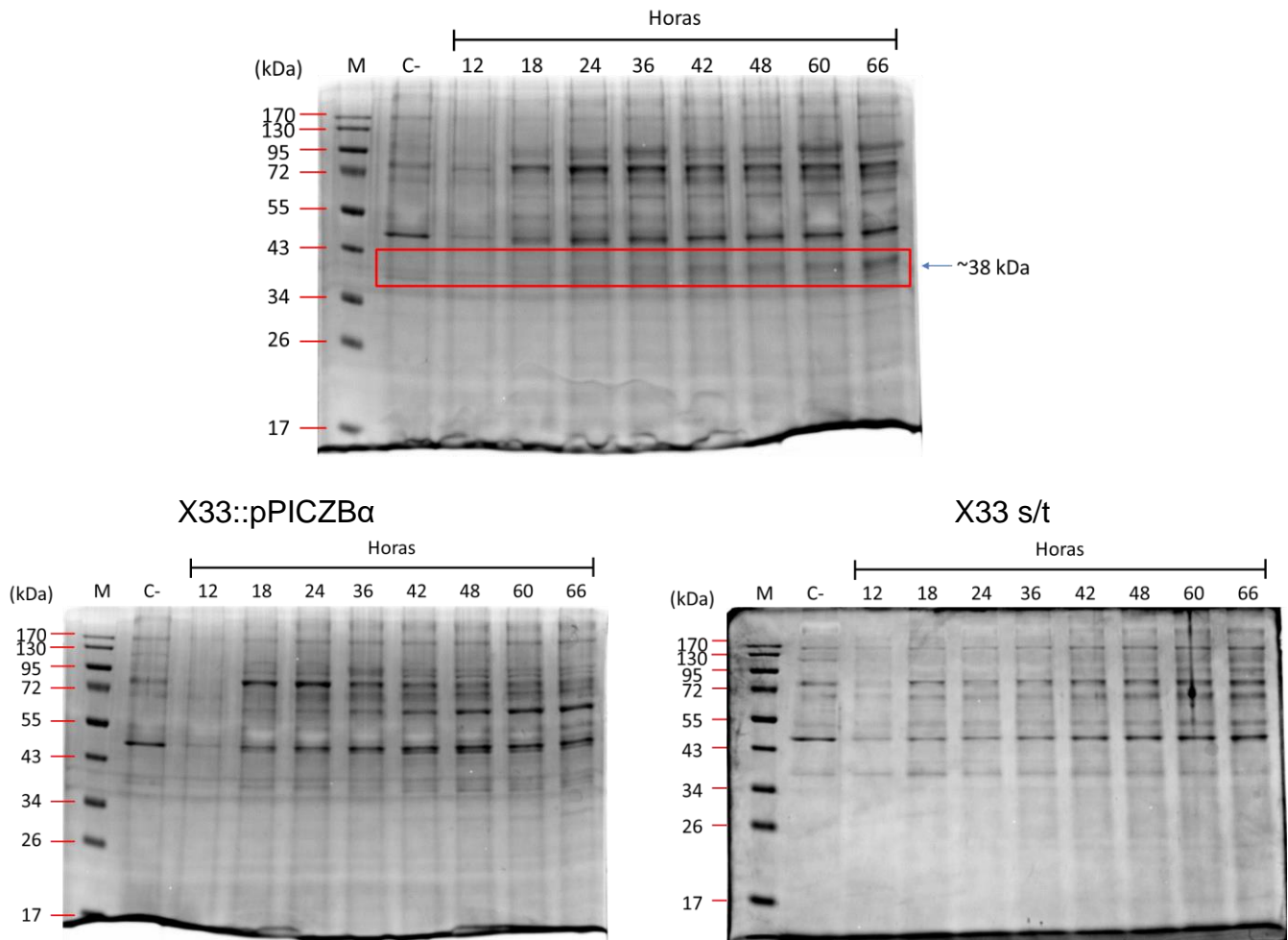


Figura 13. Proteína total del sobrenadante en las cinéticas de las diferentes cepas de *P. pastoris* X-33. X33::pPIC-PstS1, X33::pPICZB α y X33 s/t. Se tomaron muestras a diferentes tiempos en la cinética con el medio BMMY y se precipitó la proteína del medio de cultivo para separar las proteínas por SDS-PAGE al 15% de acrilamida. M, marcador de peso; C-, control negativo (muestra de hora 48 en crecimiento con medio BMGY).

A través de un análisis por densitometría del carril de la muestra a la hora 66 de la clona 7 X33::pPIC-PstS1 en BMMY se realizó un cálculo aproximado de la producción de rPstS-1. La concentración de la proteína total en sobrenadante es de 0.375 g/L. Mediante el análisis por densitometría del gel de acrilamida de la clona productora de rPstS-1 se determinó que la banda de ~38 kDa representa aproximadamente el 8.8% del total de las bandas.

Caracterización del cultivo de X33::pPIC-PstS1 para la producción de rPstS-1 en matraz agitado con bafles y biorreactor

Se realizó la caracterización del crecimiento y análisis estequiométrico de la cepa de *P. pastoris* X-33 productora de rPstS-1 en dos métodos diferentes de cultivo (matraces y biorreactor) y a dos escalas diferentes de cultivo (50 mL y 1 L). El crecimiento en 50 mL se realizó en matraces con bafles de 250 mL. Las condiciones de temperatura y agitación se ajustaron a 30 °C y 250 rpm respectivamente y en medio BMGY. El monitoreo del glicerol permitió determinar el consumo completo de glicerol a las 32 h de cultivo. Después de esto, se realizó cambio de medio recuperando todas las células y se colocaron en 50 mL de BMMY (metanol al 1% ,10 mL/L). Se adicionó metanol al cultivo cada 12 h hasta 73 h después. En medio BMGY, la biomasa máxima alcanzada fue de 26.6 ± 0.4 A.U. (8.8 ± 0.2 g/L), con una tasa de crecimiento específica previa a la inducción de 0.323 ± 0.025 /h (Fig. 14A, Tabla 4). Durante la fase de cultivo con BMMY, utilizado también para inducir la expresión de rPstS-1, la biomasa máxima alcanzada fue de 32.7 ± 0.8 A.U. (10.8 ± 0.3 g/L) (Fig. 14A, Tabla 4), con una tasa de crecimiento específica postinducción de 0.003 ± 0.001 /h (Tabla 4). Se observó un aumento aproximado del 23% del nivel de biomasa acumulada después de la inducción. Además, la tasa específica de consumo de glicerol (q_s) fue de 0.021 ± 0.004 g_{Glic}/g_{PSC} h y un rendimiento de biomasa por glicerol consumido de 0.69 ± 0.01 g_{PSC}/g_{Glic}. El rendimiento de biomasa a metanol fue de 0.051 ± 0.004 g_{PSC}/g_{Met}.

Más adelante se realizó la caracterización en cultivos de biorreactor. Para ello se utilizó un perfil de alimentación típico para una fuente de carbono; este comenzó con un cultivo en lote de glicerol (BMGY), y cuando se observó un aumento en la tensión de oxígeno disuelto (DOT) (como resultado del agotamiento de la fuente de carbono) se inició la fase de cultivo alimentado en lote de metanol. Esta estrategia se siguió para evitar que el metanol se acumulara en niveles elevados, lo que podría provocar la acumulación de formaldehído en niveles tóxicos (Hazeu et al., 1983; Swartz et al., 1981). Usando glicerol como fuente de carbono, se obtuvo una biomasa máxima de 10.4 ± 0.9 g/L (Fig. 14B, Tabla 4). Se observó un agotamiento del glicerol después de 24 h de cultivo. Después del consumo del glicerol, se realizó la alimentación de metanol (10 mL/L) cada 12 h para inducir la expresión de rPstS-1 (Fig. 14B). Se obtuvo una biomasa máxima de 15.5 ± 0.9 g/L al final del cultivo, logrando un nivel de biomasa alrededor de un 49% más alto después de la adición de metanol (Tabla 4).

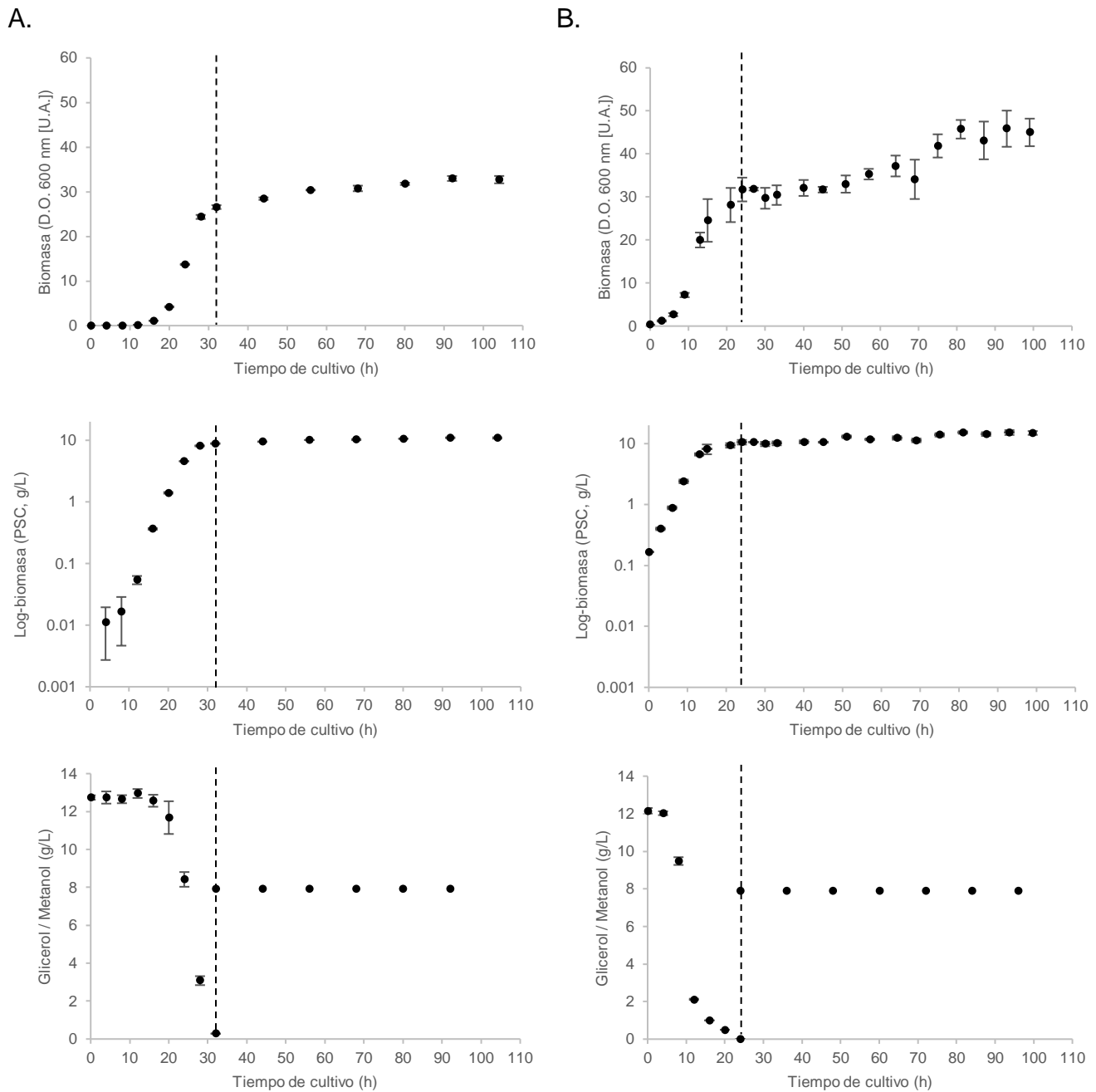


Figura 14. Crecimiento cinético de la cepa recombinante *P. pastoris* productora de rPstS-1 en dos métodos diferentes de cultivo y a dos escalas diferentes. Se muestra el crecimiento en matraz agitado con baffles (A) y en biorreactor (B). Las mediciones se presentan como densidad óptica (superior), dcw (en medio) y consumo de fuente de carbono (inferior). Se muestra la fase de glicerol y la alimentación de metanol (el comienzo de alimentación/inducción se muestra a partir de la línea discontinua). D.O., densidad óptica; PSC, peso seco celular; U.A., unidades de absorbancia.

Tabla 4. Parámetros estequiométricos y cinéticos del crecimiento del cultivo de *P. pastoris* y la producción de rPstS-1 en matraz agitado con baffles de 0.25 L y en biorreactores de 1 L.

Parámetro	MAB	Biorreactor
Max D.O. 600 nm glicerol (U.A.)	26.5 ± 0.4	31.5 ± 2.2 ^b
Max D.O. 600 nm metanol (U.A.)	32.7 ± 0.8	47.0 ± 2.6 ^a
Max biomasa glicerol (g/L)	8.8 ± 0.2 g/L	10.4 ± 0.9 ^b
Max biomasa metanol (g/L)	10.8 ± 0.3 g/L	15.5 ± 0.9 ^a
μ glicerol (/h)	0.323 ± 0.025	0.286 ± 0.033
μ metanol (/h)	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.001 ^b
Y _{x/s} (g _{PSC} /g _{Glic})	0.69 ± 0.01	0.81 ± 0.03 ^b
Y _{x/s} (g _{PSC} /g _{Met})	0.051 ± 0.004	0.092 ± 0.004 ^a
q _s (g _{Glic} /g _{PSC} h)	0.021 ± 0.004	0.034 ± 0.013
Proteína total de sobrenadante (mg/L)	127 ± 15	185 ± 9 ^a
Y _{PTS/PSC} (mg _{PTS} /g _{PSC})	11.75 ± 1.13	11.92 ± 0.59
rPstS-1 (mg/L)	46 ± 5	46 ± 4
q _{rPstS-1} (mg/L h)	0.639 ± 0.070	0.633 ± 0.054
q _{p(rPstS-1)} (mg _{rPstS-1} /g _{PSC} h)	0.059 ± 0.002	0.040 ± 0.004 ^a
Y _{rPstS-1/x} (mg _{rPstS-1} /g _{PSC})	3.3 ± 0.01	4.0 ± 0.02 ^a

Se muestran el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas biológicas.

MAB, matraz agitado con baffles; D.O., densidad óptica; U.A., unidades de absorbancia; μ, velocidad específica de crecimiento; PTS, proteína total de sobrenadante; PSC, peso seco celular; Y_{x/s}, rendimiento total del peso seco celular por glicerol; Y_{x/s}, rendimiento total del peso seco celular por metanol; Y_{PTS/PSC}, rendimiento de PTS por PSC; q_s, velocidad específica de consumo de glicerol por PSC; q_{rPstS-1}, productividad volumétrica de rPstS-1; q_{p(rPstS-1)}, productividad específica de rPstS-1; Y_{rPstS-1/x}, rendimiento de rPstS-1 por PSC. La μ se calculó en las primeras 8 h de cultivo.

El valor de *p* se calculó usando la prueba de *t* comparando los resultados de matraz agitado contra biorreactor

^a *p* < 0.005; ^b *p* < 0.05

Determinación de la producción de rPstS-1 en X33::pPIC-PstS1

El análisis de la producción de rPstS-1 producida en *P. pastoris* se realizó en MAB y biorreactor. Después de 73 h de cultivo en MAB en medio BMMY (metanol 1% cada 12 horas), el contenido de proteína del sobrenadante fue de 127 ± 15 mg/L. Un análisis densitométrico de las bandas pertenecientes a las proteínas secretadas (Fig. 15A) mostró que la proteína rPstS-1 (~38 kDa) representa ~ 36% (46 ± 5 mg/L, Tabla 4) de la proteína secretada. Después de la inducción, la

proteína recombinante fue mayoritaria, mientras que las proteínas endógenas se encontraron poco representadas (Fig. 15A).

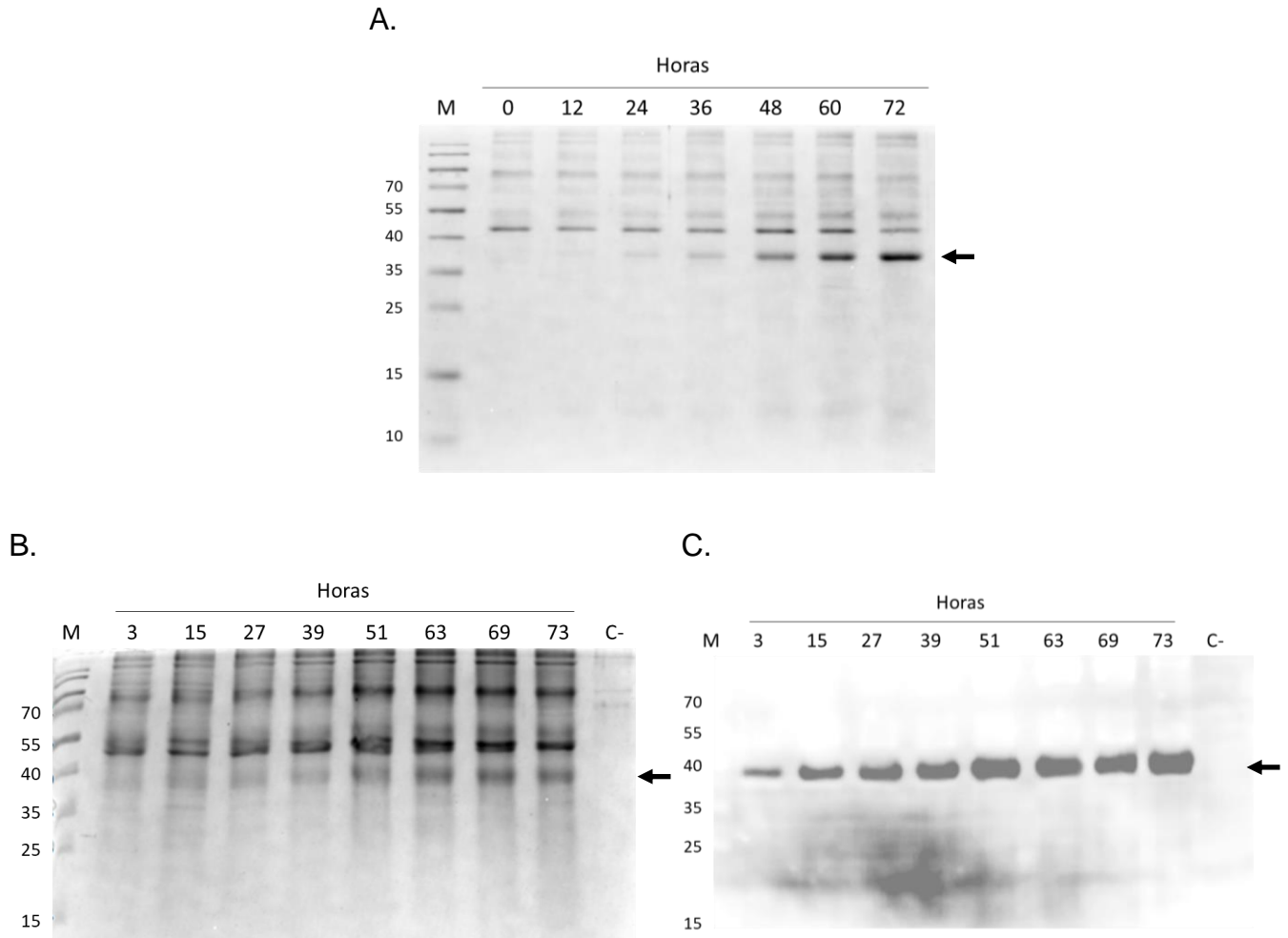


Figura 15. Análisis de proteínas totales del sobrenadante del cultivo. **A.** SDS-PAGE 12 % de proteína obtenida de cultivos en matraces agitados con baffles. **B.** SDS-PAGE 12 % de proteína obtenida de sobrenadantes del biorreactor. **C.** Inmunodetección de rPstS-1 a partir de sobrenadantes del biorreactor con el Ab policlonal anti-PstS1. Las flechas negras indican la banda correspondiente a rPstS-1. El tiempo posterior a la inducción de cada muestra tomada se indica en la parte superior de cada carril. M, marcador de peso molecular; C-, control negativo (muestra de sobrenadante de un cultivo de *P. pastoris* X-33 de tipo silvestre). El SDS-PAGE y el Western blot en biorreactor se realizaron con colaboración del M. en C. Juárez-López.

Después de 72 h de inducción con metanol en los cultivos del biorreactor, el contenido de proteína total del sobrenadante fue de 185 ± 9 mg/L (Tabla 4). El nivel de rPstS-1 secretada en el sobrenadante fue de 46 ± 4 mg/l (Fig. 15B, Tabla 4). Durante la fase de inducción con metanol

en biorreactores se tomaron muestras cada 12 h. Para confirmar la identidad de rPstS-1, el sobrenadante se analizó mediante un ensayo de Western blot utilizando un Ab policlonal anti-pstS1 (Fig. 15C). Se confirmó la identidad de la rPstS-1 sin aparente degradación, ni se detectó antes de la inducción con metanol (Fig. 15C). La detección de la proteína recombinante se puede observar desde las primeras 3 h de inducción y su aumento de forma dependiente al tiempo (Fig. 15C).

Purificación de rPstS-1 producida en X33::pPIC-PstS1

El proceso de purificación se diseñó considerando tanto el peso molecular de la proteína y su hidrofobicidad. El diagrama de purificación con las operaciones unitarias del proceso “downstream” se presenta en la Figura 16 y se describe más adelante.

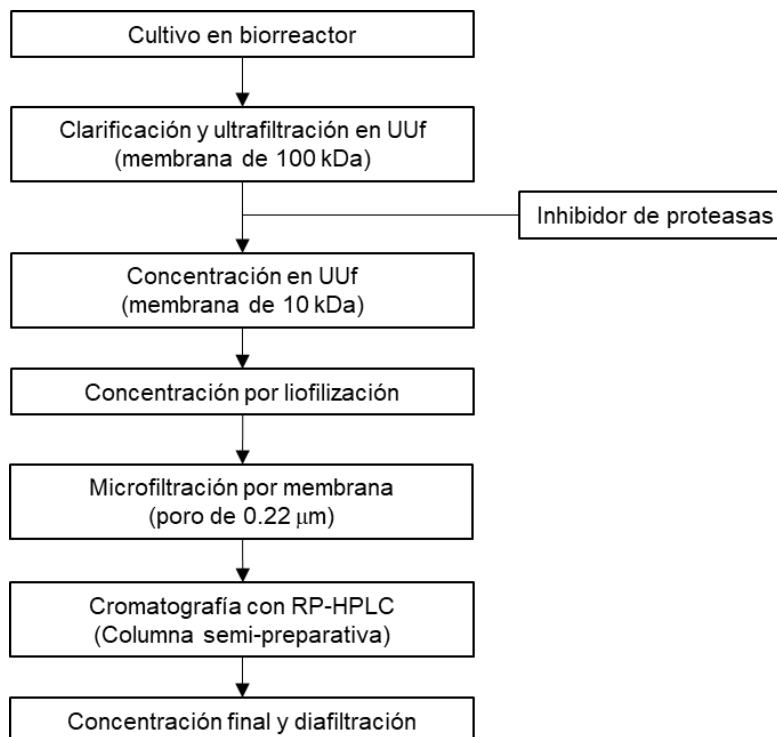


Figura 16. Diagrama del proceso “downstream” para la purificación de rPstS-1 producida en *P. pastoris* de un cultivo en biorreactor. kDa, kilodalton; RP-HPLC, fase reversa en HPLC; UUf, unidad de ultrafiltración.

Para este proceso de purificación se utilizó una estrategia diferente con el propósito de ahorrarse un paso y tratar de mejorar el rendimiento final. Esta operación unitaria consistió en realizar tanto la clarificación como la eliminación de todas las proteínas mayores de 100 kDa en

un solo paso mediante el uso de una membrana de ultrafiltración tangencial de celulosa estabilizada con corte molecular de 100 kDa (Fig. 16 y Fig. 17). Para reducir la actividad de las proteasas en el proceso de purificación se agregó PMSF a una concentración final de 0.1 mM.

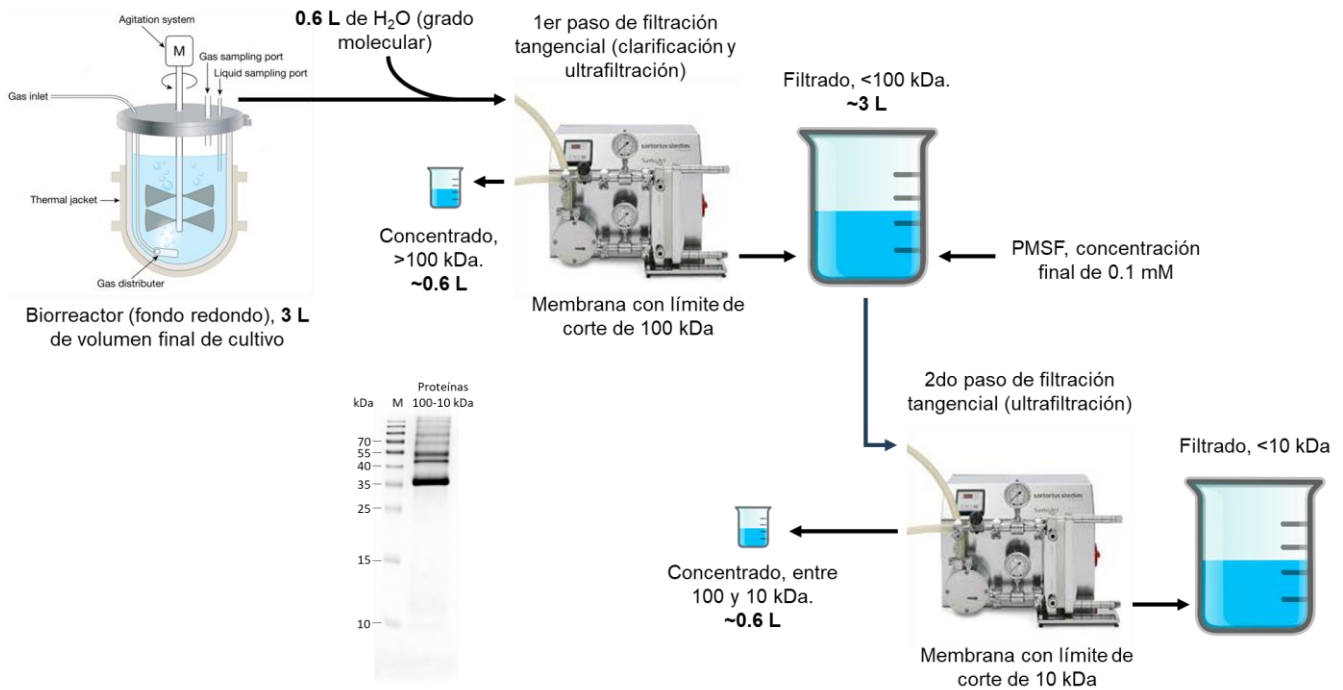


Figura 17. Diagrama del procesamiento de cultivo de *P. pastoris* por filtración tangencial para la purificación de rPstS-1. El cultivo se procesó por ultrafiltración tangencial para la clarificación (100 kDa). La adición de agua tuvo el propósito de reducir la cantidad de proteína restante del concentrado. Después de adicionar PMSF al filtrado se continuó con la concentración utilizando una membrana de 10 kDa. Se especifican los volúmenes obtenidos de cada uno de los pasos de la filtración tangencial. En la parte inferior izquierda se presenta el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie para la determinación de las proteínas presentes en el concentrado. La presión transmembranal se mantuvo constante a ~1.2 bar. PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

El siguiente paso de purificación consistió en la concentración del filtrado obtenido del paso anterior que contenía todas proteínas menores a 100 kDa con un corte molecular de 10 kDa (Fig. 17). Además de la concentración, este paso también permitió la eliminación de las proteínas con un tamaño molecular menor a los 10 kDa como se puede observar en el gel de poliacrilamida de la Figura 17. Al final de la filtración tangencial el volumen del concentrado fue 5 veces menor, es decir se obtuvieron ~0.2 L por cada litro procesado. Las dos filtraciones tangenciales dieron recuperaciones del 41% y 29%, respectivamente (Tabla 5). La presión

transmembranal en ambos pasos de filtración se mantuvo constante aproximadamente a 1.2 bar. Los dos pasos anteriores a la cromatografía fue el concentrado por liofilización del volumen final reduciendo aproximadamente 5 veces el volumen inicial y la subsecuente filtración por membrana de PVDF de 0.22 μm . Al finalizar se obtuvieron ~ 0.04 L por cada litro procesado de cultivo con una concentración aproximada de ~ 1.22 mg/L con una recuperación total de proteína de 49.0 ± 3.4 mg/L (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de purificación de rPstS-1 producida en *P. pastoris*.

Paso de purificación	Recuperación de proteína total (mg/L) ^a	rPstS-1 (mg/L) ^a	Recuperación (%)	Pureza (%)
Proteína total de sobrenadante	185 ± 9	46 ± 4	100	25 ± 3
Ultrafiltración (>100 kDa)	80 ± 2.9	18.9 ± 5.0	41.0 ± 14.9	23.5 ± 5.4
Diafiltración (100-10 kDa)	49.0 ± 3.4	13.2 ± 4.2	28.6 ± 7.1	26.5 ± 6.7
Cromatografía de fase reversa	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.2	9.1 ± 1.1	97.7 ± 0.6

^a La proteína total de sobrenadante se calculó mediante el método de Bradford. La proteína rPstS-1 se calculó mediante densitometría en gel después de cada etapa de purificación, y cada paso de purificación de proteínas se calculó por litro de volumen de cultivo celular inicial.

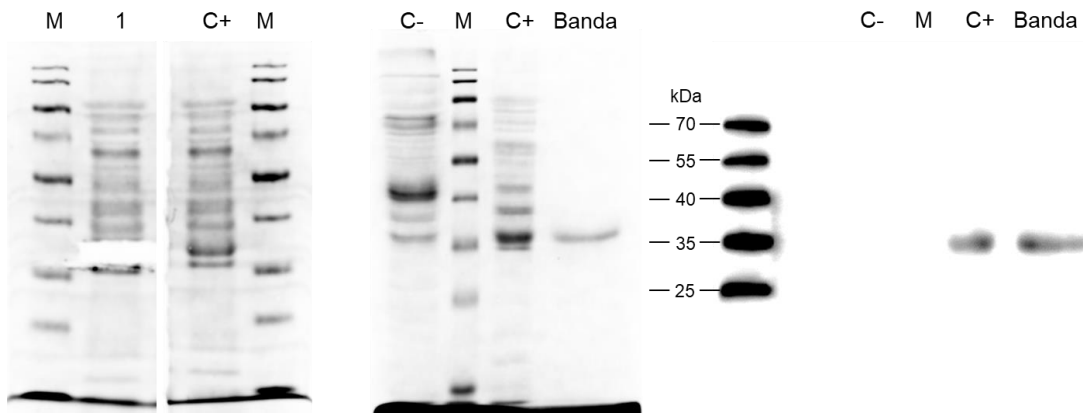
Una vez el sobrenadante ultrafiltrado y concentrado se determinó el porcentaje de concentración de acetonitrilo al que eluye la rPstS-1 en RP-HPLC. La muestra que contenía las proteínas entre 100 y 10 kDa se separaron por SDS-PAGE (Figura 18A y 18B) y la banda correspondiente a la rPstS-1 se cortó y se procesó mediante un gradiente lineal en RP-HPLC, determinando que la proteína recombinante eluía a una concentración de 46% de Acn + TFA (Figura 18D). Al final se confirmó su identidad por ensayo Western blot (Fig. 18C).

Una vez conocida la concentración de Acn+TFA a la que eluye rPstS-1 se comenzó la corrida con una concentración de 30% de Acn+TFA para evitar que proteínas con menor hidrofobicidad interaccionen con la resina C4 y de esta forma resolver las siguientes fracciones (Fig. 19). Para obtener una mejor definición de la fracción correspondiente a la proteína de interés se realizó un gradiente lento que iba del 30 al 50% de Acn+TFA en 10 minutos. De esta forma se logró definir 4 fracciones de las cuales, la mayoritaria (tiempo de retención de 19.9 min), pertenecía a rPstS-1 como se puede observar en el cromatograma (Fig. 19). De esta forma por cada ciclo cromatográfico que recuperaban aproximadamente 0.6 mg de proteína rPstS-1.

A.

B.

C.



D.

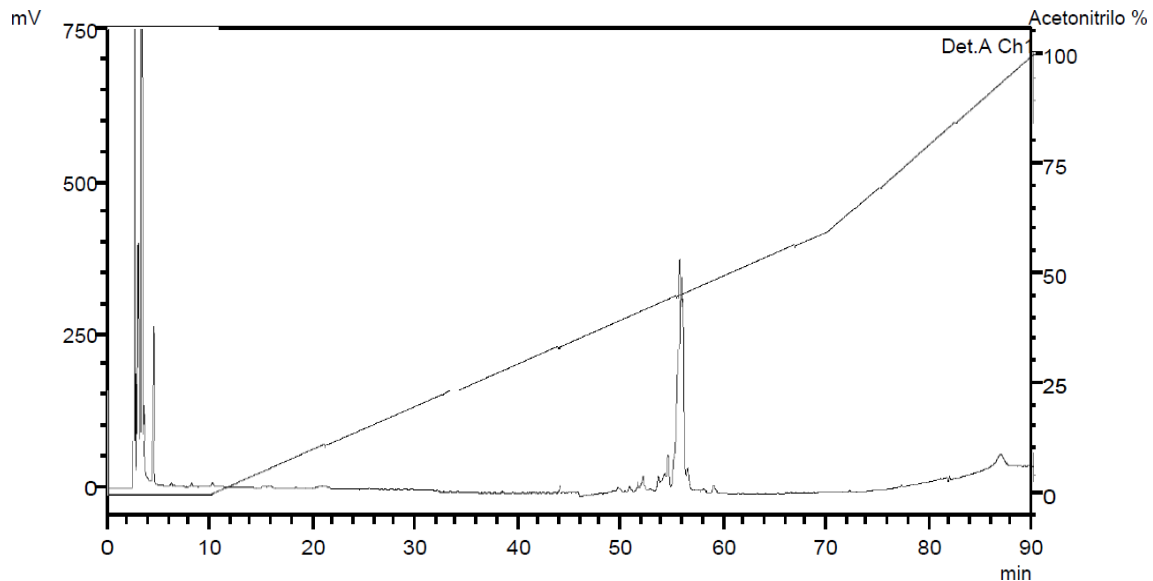


Figura 18. Purificación de rPstS-1 por ultrafiltración y análisis de banda separada por SDS-PAGE en RP-HPLC. **A.** Gel de poliacrilamida al 12% con proteínas de sobrenadante de 100 a 10 kDa obtenidas por ultrafiltración tangencial; se muestra la banda cortada correspondiente a rPstS-1 producida en *P. pastoris*. **B.** Electroforesis de las muestras en gel de poliacrilamida al 12% y teñido con azul de Coomassie. **C.** Western blot usando anticuerpo anti-PstS-1 para inmunodetección de la proteína recombinante. **D.** Cromatograma de la proteína eluida procesada por cromatografía de RP-HPLC correspondiente a la banda de ~38 kDa; se realizó un gradiente lineal de 0 al 60% de Acn+TFA en 60 minutos. C-, proteínas de sobrenadante de medio BMGY de CLONA 7 X33::pPIC-PstS1; M, marcador; C+, proteínas ultrapurificadas entre 100-10 kDa de sobrenadante de medio BMMY de clona 7 X33::pPIC-PstS1 (tiempo final); Banda, proteína de banda cortada de ~38 kDa del gel.

Luego del paso de RP-HPLC se realizó un análisis por RP-HPLC para comprobar el porcentaje de pureza de la proteína purificada. La recuperación total de rPstS-1 fue de 4 mg por cada litro de cultivo procesado. Además, mediante el análisis cromatográfico se pudo comprobar que se

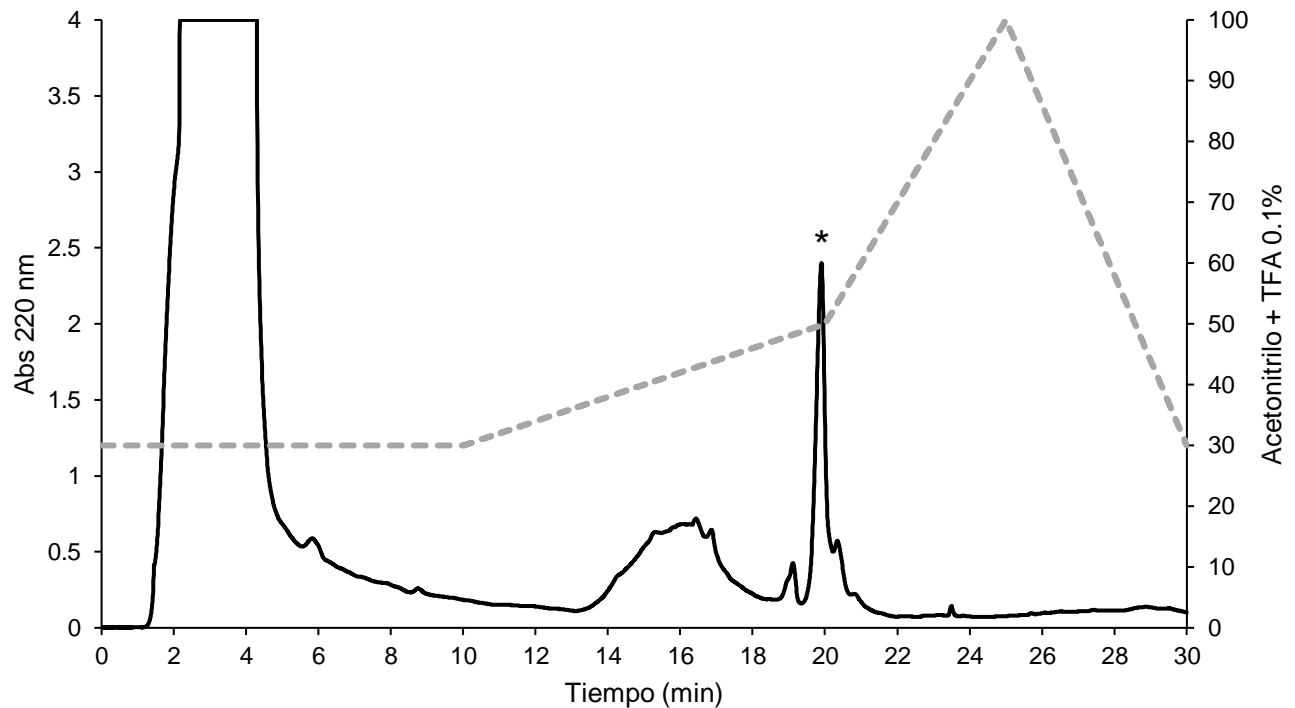


Figura 19. Cromatografía semipreparativa de RP-HPLC para la purificación de rPstS-1 producida en *P. pastoris*. Se presenta el cromatograma correspondiente al ciclo cromatográfico, así como las condiciones utilizadas. Se procesaron 7.35 mg de la muestra por RP-HPLC a un flujo de 2.5 mL/min con una columna semipreparativa PROTO300 Semi-Prep C4 column (10 μ m, 250 \times 10 mm). Fase móvil A: agua + 0.1% TFA; fase móvil B: acetonitrilo + 0.1% TFA. La fracción correspondiente a rPstS-1 se señala con un asterisco.

alcanzó una pureza del 98% (Tabla 5) como se puede observar en cromatograma de la Figura 20. El último paso del procesamiento “downstream” de la proteína consistió en la diafiltración y concentrado de la fracción eluida correspondiente a rPstS-1. El volumen que contenía la proteína obtenida de la purificación se concentró 5 veces en tubos ultrafiltración para centrífuga con corte de 3 kDa. Una vez concentrado, se realizó intercambio del amortiguador por goteo utilizando el amortiguador para la lisis con tripsina o para los ensayos de análisis estructural y ensayos de reactividad.

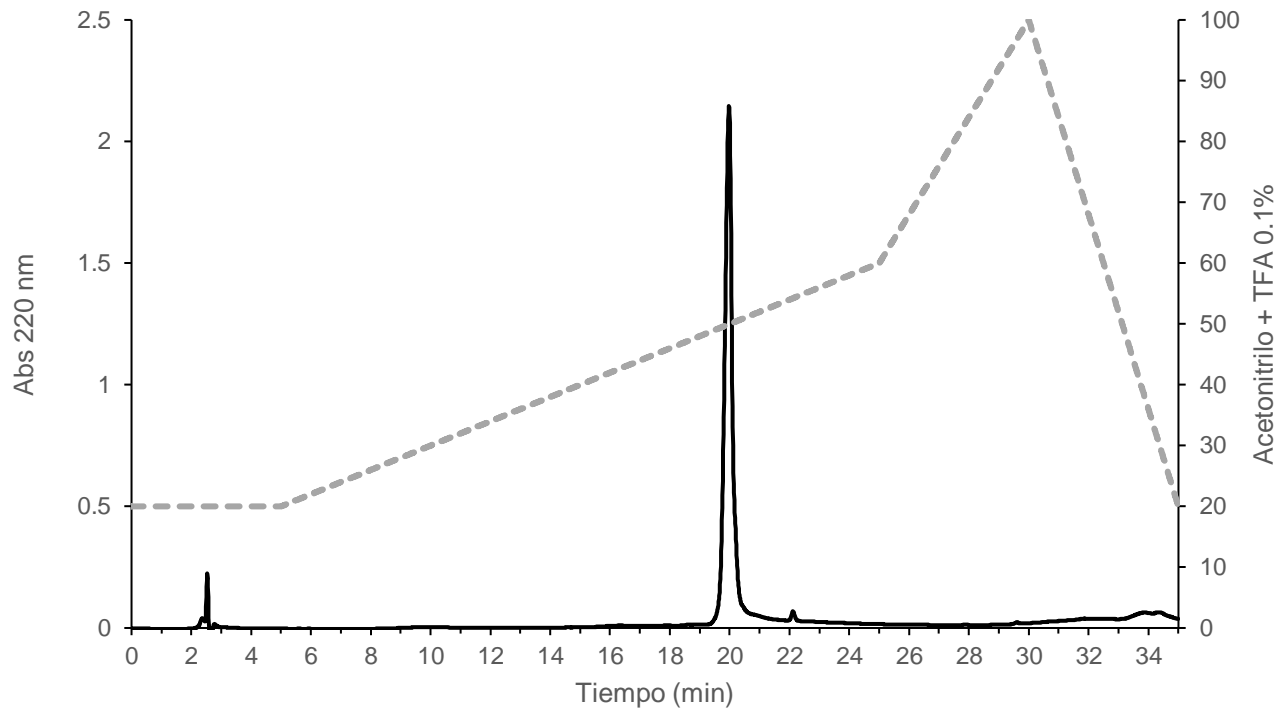


Figura 20. Análisis de pureza final de rPstS-1 producida en *P. pastoris* por cromatografía analítica de RP-HPLC. Se presenta el cromatograma correspondiente al ciclo cromatográfico, así como las condiciones utilizadas. Se procesaron 0.05 mg de la muestra por RP-HPLC a un flujo de 0.8 mL/min con una columna analítica XBridge Protein BEH C4 Column (300Å, 3.5 mm, 4.6 mm X 150 mm). Fase móvil A: agua + 0.1% TFA; fase móvil B: acetonitrilo + 0.1% TFA.

Todos los pasos de purificación se monitorearon mediante SDS-PAGE (Figura 21A), y el análisis densitométrico de SDS-PAGE mostró una pureza de hasta el 90% para rPstS-1 después del paso final (Fig. 21A). Además, la presencia de rPstS-1 durante los diferentes pasos de purificación fue seguida mediante Western blot (Fig. 21B). Este estudio muestra la utilidad de la tecnología de filtración tangencial para purificar rPstS-1 O-manosilado sin etiquetas de afinidad, a partir de un sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*. Cabe señalar que la tecnología presentada aquí es escalable y puede aplicarse para la producción a gran escala de rPstS-1 y otros antígenos de *Mtb* producidos de manera similar.

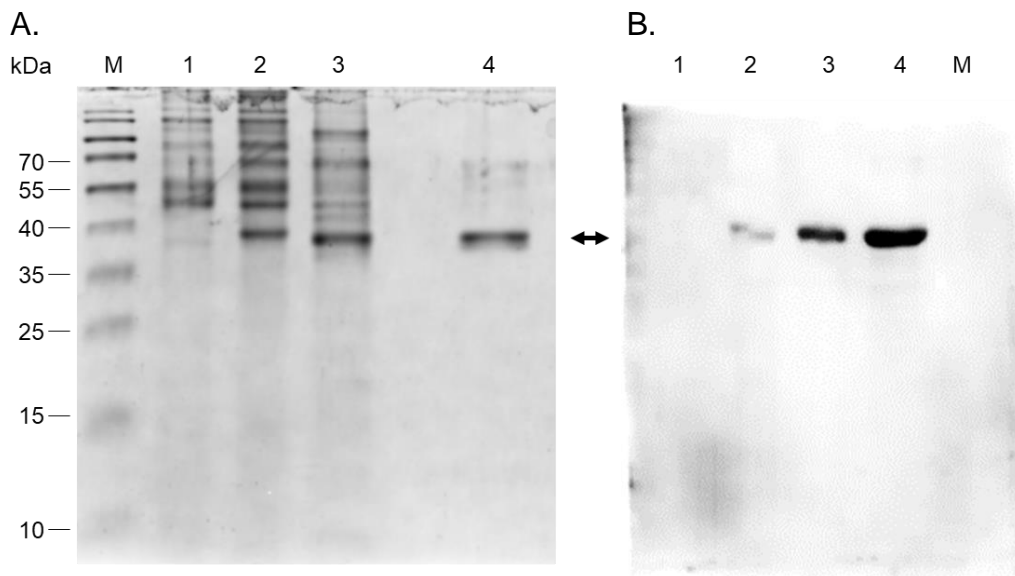


Figura 21. Purificación de rPstS-1 producida en *P. pastoris*. **A.** SDS-PAGE al 12% con muestra de cada paso del proceso de purificación. **B.** Inmunodetección de rPstS-1 con anti-PstS1 en cada uno de los pasos de purificación. La flecha señala la banda correspondiente a rPstS-1. M, marcador de peso molecular; 1, proteína total de sobrenadante del último tiempo en medio BMGY; 2, proteína total de sobrenadante obtenida después de 72 h de inducción; 3, proteínas de 100 a 10 kDa obtenidas por filtración tangencial; 4, rPstS-1 purificada por RP-HPLC.

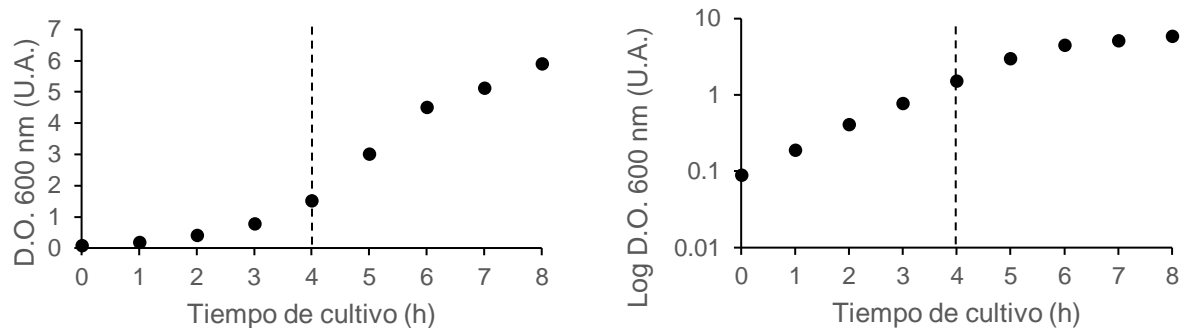
Producción y purificación de rPstS-1 en *E. coli*

La mayoría de los estudios que han analizado el efecto de la proteína PstS-1 sobre la activación y modulación de la respuesta inmune han utilizado una proteína recombinante producida en *E. coli*. Sin embargo, el hecho de que esta proteína de la pared celular de *Mtb* se encuentra glicosilada de forma nativa podría replantear la mayoría de los estudios realizados hasta el momento. Es por esta razón, que es importante para este estudio realizar una comparación entre la proteína rPstS-1 sin glicosilaciones (producida en *E. coli*) y con glicosilaciones (producida en *P. pastoris*) y determinar si las glicosilaciones tienen un efecto sobre la estructura secundaria y la reactividad con suero de pacientes con tuberculosis activa. El análisis de la producción de rPstS-1 producida en *E. coli* se presenta a continuación.

Para la producción de rPstS-1 se utilizó una cepa de *E. coli* DE3 (DE3::rPstS1) recombinante donada por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón que contiene una etiqueta de cola de seis histidinas (His-tag). El crecimiento de la cepa DE3::rPstS1 se realizó en biorreactor de 1 L en medio LB y se comenzó con una D.O. de 0.09 U.A. (Fig. 22A) por un inóculo de 50 mL. Después de 4 h, el

cultivo alcanzó una D.O. de 1.53 U.A. y se comenzó la inducción con 0.1 mM de IPTG (Fig. 22A). La fase de inducción se realizó por otras 4 h y el cultivo alcanzó una D.O. de 5.9 U.A. (Fig. 22A). La velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial del cultivo, correspondiente a las primeras 4 h de cultivo, fue de 0.609 h^{-1} (Fig. 22A y 22B). Una vez terminado el cultivo el reactor se cosecho para la purificación de la proteína recombinante.

A.



B.

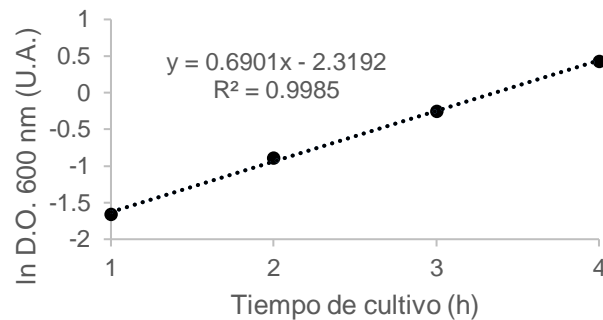


Figura 22. Cinética de crecimiento de la cepa DE3::rPstS1 en medio LB. El cultivo se creció en biorreactor de 1L con control de oxígeno disuelto y sin control de pH a 37 °C en medio LB. **A.** Gráfica de la cinética de crecimiento tomando muestra cada hora y obteniendo la D.O. (600 nm); a la derecha se muestra la gráfica en escala logarítmica. **B.** Gráfica y fórmula de la pendiente en la fase logarítmica de crecimiento para el análisis y cálculo de la μ . La línea discontinua señala el inicio de la inducción con IPTG. El resultado es el análisis de un experimento sin réplicas.

El proceso de purificación de la proteína rPstS-1 con cola de histidinas (His-rPstS1) se llevó a cabo por centrifugación, purificación de cuerpos de inclusión (CI) captura por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) y pulido por RP-HPLC. En la Figura 23 se presenta el diagrama del proceso de purificación. Una vez realizada la cosecha del cultivo se clarificó por centrifugación, se lisó la biomasa. Se observó la agregación de proteínas en CI, los cuales contienen a la His-rPstS-1, las proteínas solubles e insolubles fueron separadas por SDS-PAGE

y la proteína recombinante se identificó por Western blot (Fig. 24A y 24B). Tras la purificación y solubilización de los CI se obtuvo una concentración de proteína total de 129 mg/L (Tabla 6). Además, por densitometría de los geles teñido con azul de Coomasie se logró determinar que la proteína recombinante representa el 64% de la proteína de los CI (Tabla 6).

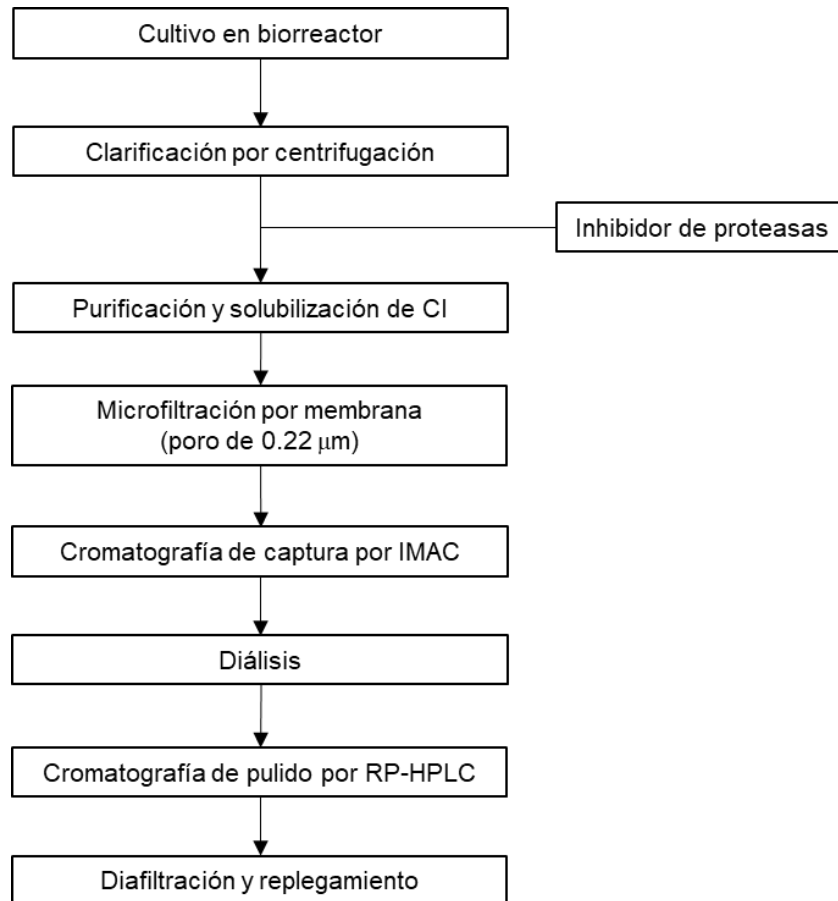


Figura 23. Diagrama del proceso “downstream” para la purificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* de un cultivo en biorreactor. CI, cuerpos de inclusión; IMAC, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados; RP-HPLC, fase reversa en HPLC.

Una vez solubilizados los CI se realizó la purificación de His-rPstS1 por cromatografía IMAC y RP-HPLC. La fase de captura se realizó con resina cromatográfica Ni-NTA en un sistema FPLC y se logró recuperar 55 mg de la proteína recombinante (Tabla 6) mediante las condiciones cromatográficas que se mencionan en la Figura 25; en el cromatograma correspondiente a este paso de purificación se observó una fracción mayoritaria en la elución que pertenecía a la proteína His-rPstS1 (Figura 25). Hay que mencionar que el porcentaje de pureza después de la cromatografía de captura fue del 94% (Tabla 6).

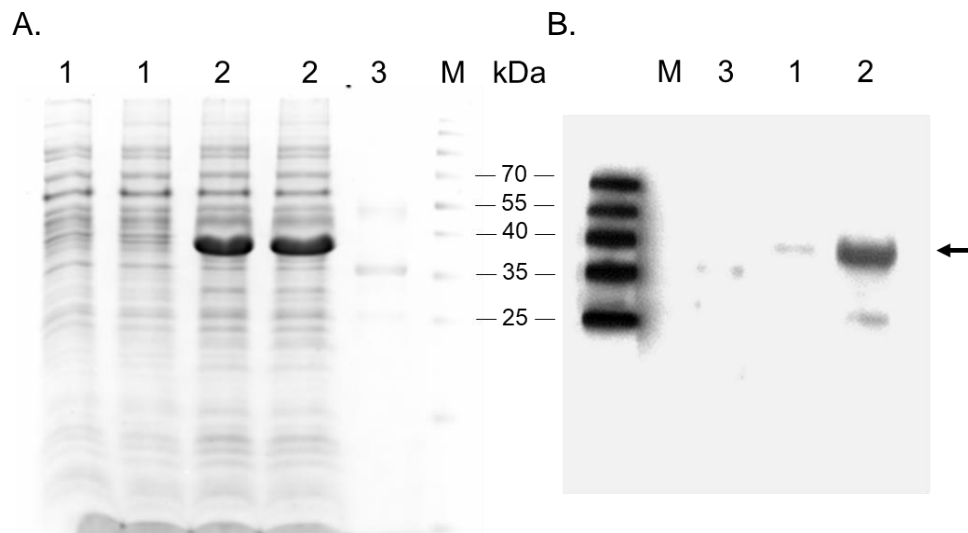


Figura 24. Identificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* DE3. **A.** SDS-PAGE con muestras procesadas por la lisis inicial del cultivo en biorreactor para la identificación de la proteína recombinante en proteína soluble o precipitada (CI). **B.** Inmunodetección para la identificación de His-rPstS1 con Ab anti-PstS1. La flecha señala la banda correspondiente a la proteína recombinante de interés. M, marcador de peso molecular; 1, proteína soluble de DE3::rPstS1; 2, proteína precipitada DE3::rPstS1; 3, rPstS-1 de *P. pastoris*.

Para una correcta caracterización de la estructura secundaria por dicróismo circular es necesario utilizar una proteína con un alto porcentaje de pureza y a pesar de haber obtenido un alto porcentaje de pureza en la cromatografía de captura se realizó un paso adicional de cromatografía de pulido. Esta se realizó por RP-HPLC y las condiciones cromatográficas se mencionan en la Figura 26. Como se puede observar en el cromatograma, la elución de la proteína se da a un porcentaje de Acn+TFA cercano al 50% (Fig. 26), el cual es similar a la concentración a la cual eluyó rPstS-1 producida en *P. pastoris* (Fig. 19). Tras la cromatografía de RP-HPLC se logró obtener una recuperación de 32.3 mg/L de cultivo de His-rPstS1 con una pureza del 99% (Tabla 6), la cual se confirmó por densitometría de los geles teñidos (Fig. 27).

Tabla 6. Resumen de purificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* DE3

Paso de purificación	Recuperación de proteína total (mg/L) ^a	His-rPstS1 (mg/L)	Recuperación (%)	Pureza (%)
Cuerpos de inclusión	129	83	100	64
Cromatografía de IMAC	59	55	67	94
Cromatografía de fase reversa	32.85	32.51	39	99

^a La proteína total de sobrenadante se calculó mediante el método de Bradford. La proteína 6xHis-rPstS1 se calculó mediante densitometría en gel después de cada etapa de purificación (Fig. 21), y cada paso de purificación de proteínas se calculó por litro de volumen de cultivo celular inicial. Los resultados provienen de una réplica. IMAC, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados.

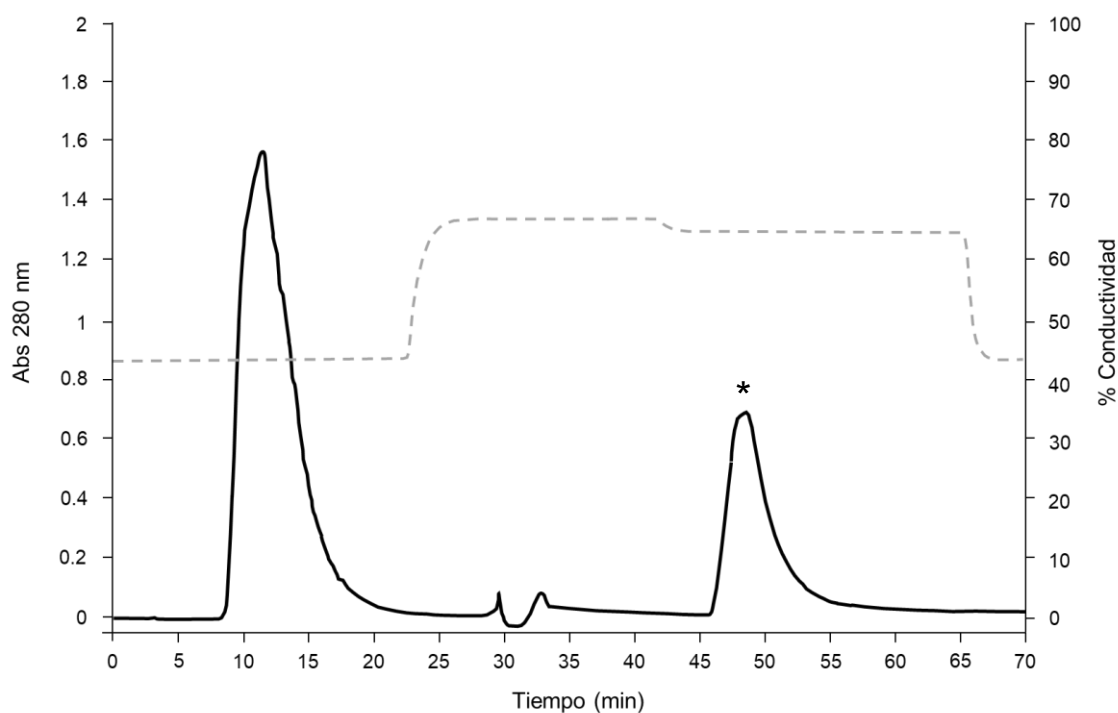


Figura 25. Cromatografía preparativa por IMAC en sistema FPLC para la purificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* DE3. Se presenta el cromatograma correspondiente al ciclo cromatográfico, así como las condiciones utilizadas. Se procesaron 25.95 mg de la muestra por IMAC a un flujo de 1 mL/min utilizando la resina Ni-NTA Agarose (Qiagen), 2.5 mL (CDU 50 mg/mL) en una columna empacada de 7 mm de diámetro y 65 mm de altura de columna. Amortiguador de equilibrio (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, GuHCl 6 M, pH 8), amortiguador de lavado (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, urea 8 M, imidazol 10 mM, pH 7) y amortiguador de elución (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, urea 8 M, imidazol 250 mM, pH 5). La fracción correspondiente a His-rPstS1 se señala con un asterisco.

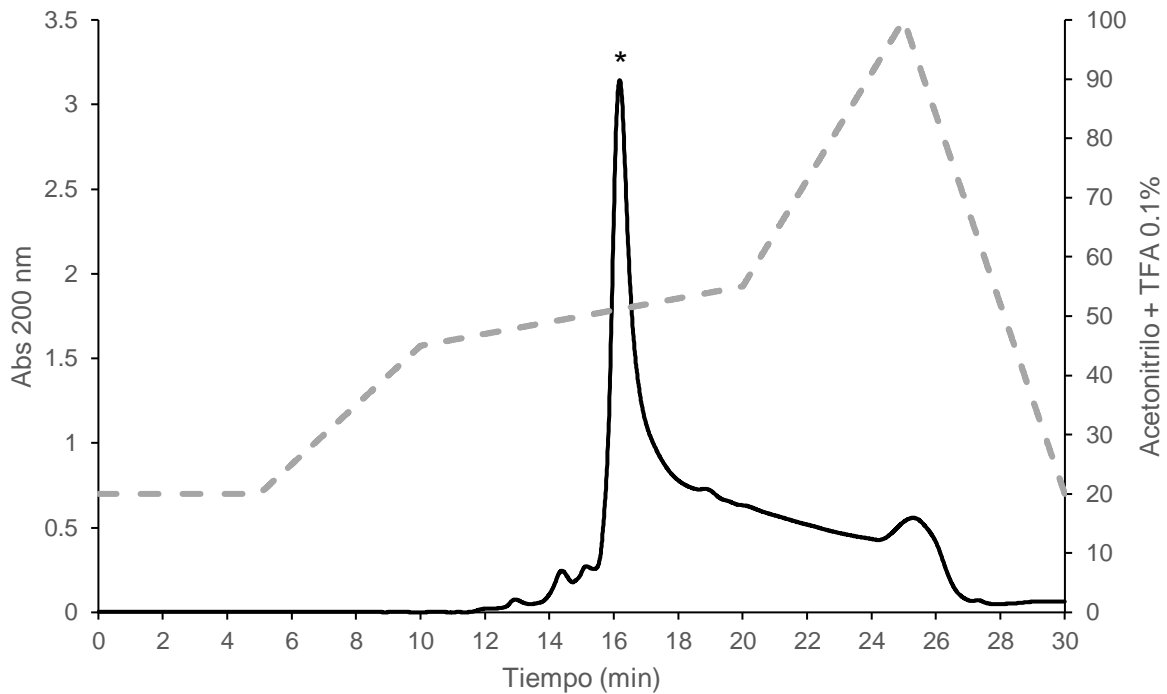


Figura 26. Cromatografía semipreparativa por RP-HPLC para la purificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* DE3. Se procesaron 1.79 mg de la muestra por RP-HPLC a un flujo de 2.5 mL/min con una columna semipreparativa PROTO300 Semi-Prep C4 column (10 μ m, 250 \times 10 mm). Fase móvil A: agua + 0.1% TFA; fase móvil B: acetonitrilo + 0.1% TFA. La fracción correspondiente a His-rPstS1 se señala con un asterisco.

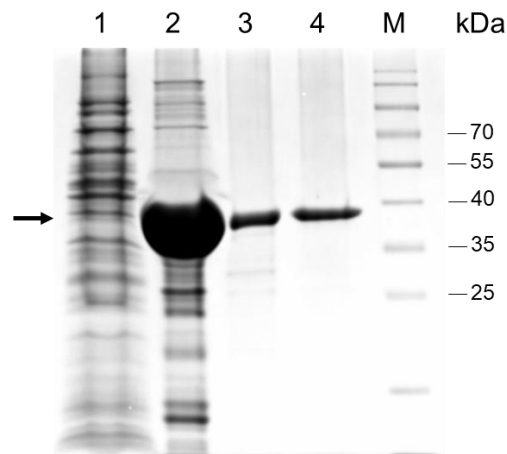


Figura 27. Purificación de His-rPstS1 producida en *E. coli* DE3. **A.** SDS-PAGE al 12% con muestra de cada paso del proceso de purificación. La flecha señala la banda correspondiente a rPstS-1. M, marcador de peso molecular; 1, proteína soluble; 2, proteína de Cl; 3, proteína obtenida por IMAC; 4, His-rPstS1 purificada por RP-HPLC.

Los últimos pasos del procesamiento de la proteína consistieron en la diafiltración y replegamiento de la proteína para el análisis de la estructura secundaria por dicroísmo circular. Cabe mencionar que con el desarrollo de este proceso “downstream” se permitió obtener la proteína con un buen rendimiento (39% de recuperación y 32 mg/L) y una alta pureza (99%) y con la posibilidad de escalamiento de este proceso.

Determinación de estructura secundaria de los rPstS-1

La estructura secundaria de rPstS-1 se determinó mediante espectroscopia de dicroísmo circular (DC) de UV lejano. En ambas concentraciones de rPstS-1 probadas, los espectros obtenidos a 25 °C mostraron un pico negativo máximo a 207 nm, además de un pico amplio entre 212 y 220 nm, y un pico positivo a 197 nm (Fig. 28). Se obtuvo una elipticidad molar de -4916.67 grados*cm²/dmol para rPstS-1 a 0.125 mg/mL y -4209.29 grados*cm²/dmol para rPstS-1 a una concentración de 0.250 mg/mL. El análisis del espectro de DC de rPstS-1 con dos concentraciones diferentes fue analizado usando CAPITO (Wiedemann et al., 2013). Se encontró una estructura secundaria que consta de 10% de hélice α , 38% de láminas β y 56% de estructuras desordenadas para rPstS-1 a 0.125 mg/mL. Además, a 0.250 mg/mL de rPstS-1, el espectro mostró un 5% de hélice α , un 40 % de láminas β y un 53 % de estructuras desordenadas (Fig. 28, Tabla 7). De acuerdo con los resultados obtenidos por Uma Devi y colaboradores el alto contenido de láminas β coincide con el espectro de DC de la proteína nativa purificada, desnaturalizada y replegada de 38 kDa obtenida de un cultivo H37Rv (Uma Devi et al., 2001).

Por otro lado, los espectros de His-rPstS1 producido en *E. coli* mostraron dos picos mínimos a 209 nm y 218 nm en ambas concentraciones de proteína (Fig. 28). La His-rPstS1 mostró un mayor contenido de hélice α (16% de hélice α a 125 μ g/mL y 20% de hélice α a 250 μ g/mL, Fig. 28, Tabla 7).

Los datos obtenidos en este estudio muestran picos similares a los del espectro de DC obtenido del antígeno de referencia recombinante de 38 KDa del banco de la OMS, que tiene dos picos negativos a 218 nm y 222 nm (Uma Devi et al., 2001), y también al espectro del rPstS-1 de longitud completa expresada en *E. coli* que también muestra picos negativos a 208 nm y 218 nm, además de un pico positivo a 190 nm (Khurshid et al., 2013). Sin embargo, un análisis de la estructura secundaria de rPstS-1 utilizando el software CDNN mostró que rPstS1 expresado

en *E. coli* tenía una conformación que consistía en 40% de hélices α y 8,9% de láminas β antiparalelas y 5,6% paralelas (Wiedemann et al., 2013). Además, los datos obtenidos de la estructura de rayos X de rPstS-1 expresada en *E. coli* mostraron una composición de 34% de hélices α , 18% de láminas β y 41% de estructuras desordenadas (número de acceso PDB 1PC3) (Vyas et al., 2003).

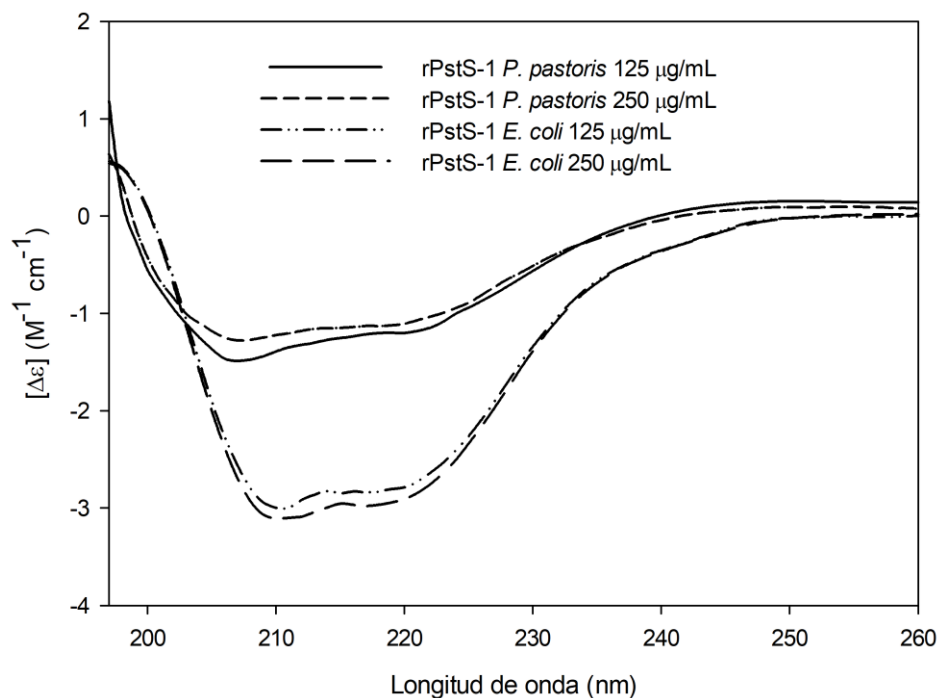


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular del análisis estructural de rPstS-1 producidas en *P. pastoris* y *E. coli*. Se procesaron las proteínas purificadas por HPLC mediante el escáner del espectro de dicroísmo circular en un rango de 190-260 nm a 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 7. Estructura secundaria de rPstS-1 de *P. pastoris* y *E. coli*. Comparación del contenido de estructura secundaria obtenido mediante el análisis de datos de DC con servidor CAPITO y datos experimentales obtenidos por NMR de Vyas y colaboradores (Vyas et al., 2003).

Estructura secundaria	NMR		CAPITO (DC)		
	<i>E. coli</i>		<i>P. pastoris</i>		
	PDB: 1PC3	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
Hélice (%)	34	16	20	10	5
Lámina β (%)	18	28	29	38	40
Irregular (%)	41	50	52	56	53

CAPITO CD Analysis & Plotting Tool (Wiedemann et al., 2013); DC, dicroísmo circular; RMN, resonancia magnética nuclear; PDB, banco de datos de proteínas.

El espectro de DC de His-rPstS1 producido en *E. coli* difiere de la estructura secundaria sugerida por el espectro del antígeno nativo de 38 kDa purificado, desnaturalizado y replegado de H37Rv (Uma Devi et al., 2001). Estas diferencias pueden surgir debido posiblemente a factores como etiquetas agregadas, los pasos de purificación utilizados o el proceso de replegamiento utilizado para las proteínas expresadas en *E. coli*. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la estructura secundaria de rPstS-1 producida en *P. pastoris* difiere de la producida en bacterias.

Análisis por espectrometría de masas de rPstS-1 producida en *P. pastoris* y los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina

Con el propósito de determinar las posibles modificaciones postraduccionales (MPt) de las proteínas recombinantes estas se analizaron mediante espectrometría de masas. Se analizó la proteína completa de rPstS-1 producida en *P. pastoris*, así como cada una de las fracciones obtenidas de la digestión por tripsina de la rPstS-1 producida en *P. pastoris* y *E. coli*. El peso molecular teórico de la producida en la levadura es de 36,059.36 Da. El análisis realizado a la rPstS-1 producida en *P. pastoris* mostró un pico con un peso molecular cercano al teórico y a la vez una serie de picos que podrían pertenecer a diferentes isoformas de la proteína recombinante debido a las diversas MPt, como la unión de residuos de hexosas, entre otras (Fig. 29). Para analizar las posibles MPt como la O-manosilación, se digirieron ambas rPstS-1 con tripsina y se analizaron cada una de las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Cabe mencionar, que el perfil cromatográfico correspondiente al análisis de la digestión de ambas proteínas recombinantes fue similar. Sin embargo, en el caso del perfil obtenido de la digestión de rPstS-1 producida en *P. pastoris* presentaba fracciones eluídas con picos asimétricos pudiendo corresponder a una mayor complejidad del contenido correspondiente a los péptidos (Fig. 30). En la Figura 31 y Tabla 8 (Anexo 1) se muestra el análisis de los espectros obtenidos por espectrometría de tiempo de vuelo de ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Como se esperaba, los péptidos pertenecientes a la rPstS-1 de *E. coli* no presentaban MPt. Sin embargo, en varios de los péptidos de la rPstS-1 de *P. pastoris* se encontró la adición de hexosas. Para el P2T (aa 55-97) se encontró que presentaba 5, 6 y 7 residuos de manosas; P6T (aa 139-164), 4 manosas; P10T (aa 239-270), 2, 3 y 4 manosas; P14T (aa 325-342), 4, 6 y 7 manosas (Tabla 8, Fig. 31 y Anexo 1). En el caso del P9T (aa 189-238) se encontró que este péptido además de estar modificado por 1, 2 y 3 manosas, podría

estar modificada por una cisteinilación. Cabe mencionar que de los tres residuos de cisteínas presentes en PstS-1, dos se encuentran en este péptido. Utilizando el modelo en 3D de la proteína recombinante cristalizada correspondiente a rPstS-1 (PDB: 1PC3) se ubicaron espacialmente cada uno de los péptidos obtenidos de la digestión de las proteínas recombinantes. Se encontró que aquellos péptidos modificados tenían una ubicación con residuos más expuestos en comparación con los no modificados (Fig. 31 y Anexo 1).

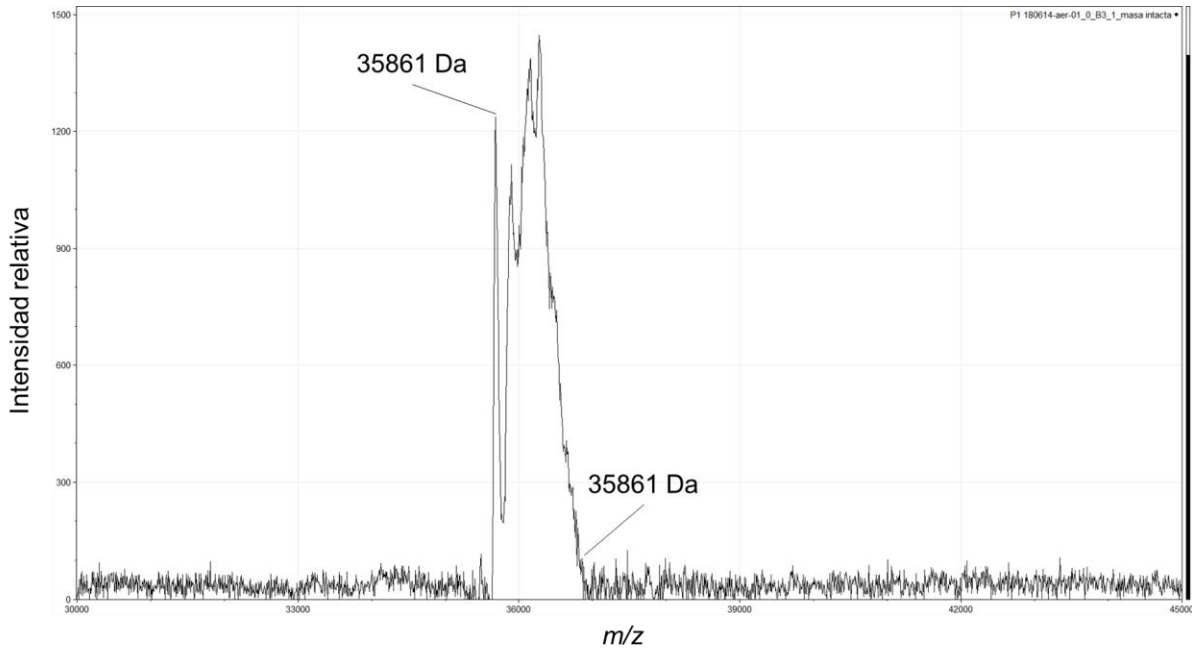


Figura 29. Espectro de MALDI-TOF de masa intacta de rPstS-1 producida en *P. pastoris*. Matriz de ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico.

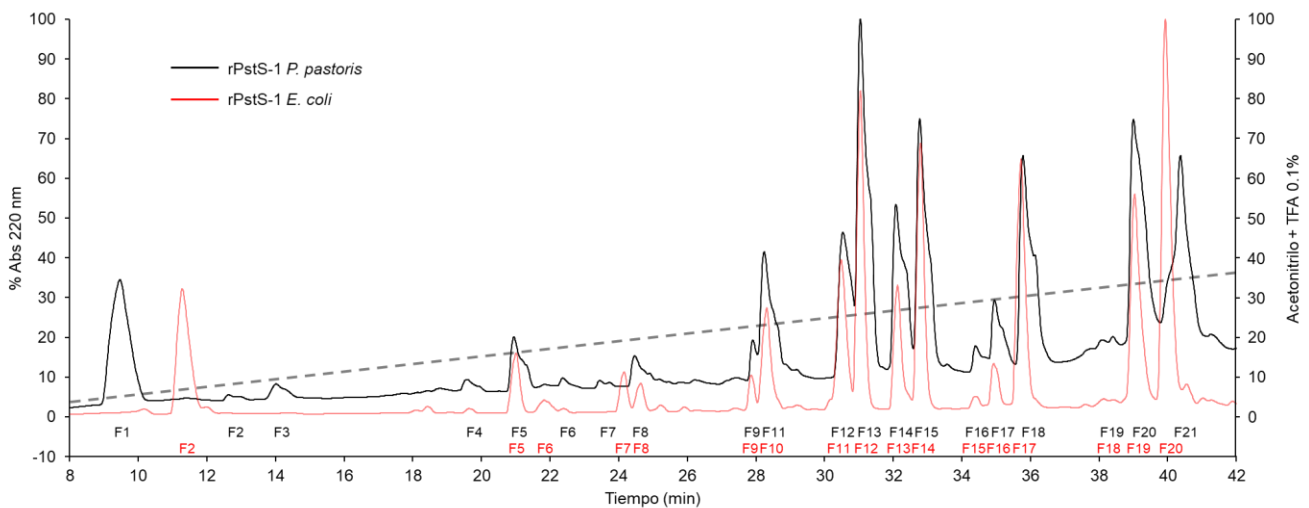


Figura 30. Cromatogramas de la digestión de rPstS-1 producida en *P. pastoris* (línea negra) y *E. coli* (línea roja). El cromatograma se obtuvo del procesamiento de las digestiones de las proteínas con

tripsina (recombinante, grado de proteómica, Roche) mediante cromatografía en fase reversa en sistema HPLC. En la parte inferior del cromatograma se indican las diferentes fracciones (F#) que se recuperaron de cada ciclo cromatográfico. Se procesaron 1.5 mg de la muestra por RP-HPLC a un flujo de 0.8 mL/min con una columna analítica XBridge Protein BEH C4 Column (300Å, 3.5 mm, 4.6 mm X 150 mm). Fase móvil A: agua + 0.1% TFA; fase móvil B: acetonitrilo + 0.1% TFA.

```

Mtb PstS-1 22 AGCGSKPPSGSPETGAGAGTVATTPASSPVTLAETGSTLLYPLNLMGPAFHERYPNVTITTAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHHKGLM
rPstS-1      1 AGCGSKPPSGSPETGAGAGTVATTPASSPVTLAETGSTLLYPLNLMGPAFHERYPNVTITTAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHHKGLM
*****
Mtb PstS-1 122 NIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRS DGS GDT FLFTQVLSKQDPEGWGKSPGFGITVDFEA
rPstS-1    101 NIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRS DGS GDT FLFTQVLSKQDPEGWGKSPGFGITVDFEA
*****
Mtb PstS-1 222 VPGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASORGLGEAQLGNSSGNFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAISMDGPPADGYPINYEYAIVNN
rPstS-1    201 VPGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASORGLGEAQLGSSGNFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAISMDGPPADGYPINYEYAIVNN
*****
Mtb PstS-1 322 RQKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQVHFQLEPPAVVVKLSDALIATISS
rPstS-1    301 RQKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQVHFQLEPPAVVVKLSDALIATISS
*****
    
```

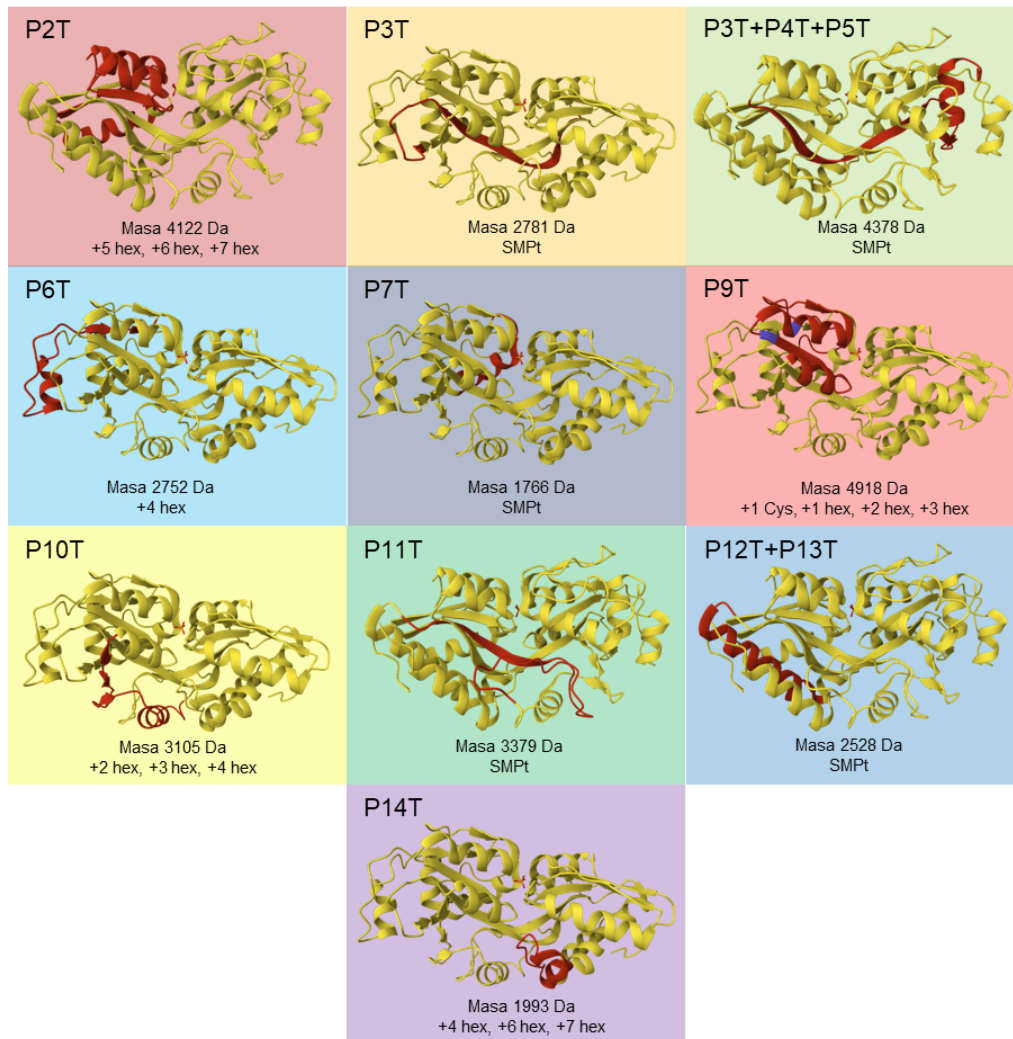


Figura 31. Péptidos de rPstS-1 determinados por análisis por MALDI-TOF y análisis sus MPt. Se presentan los resultados independientes de cada uno de los péptidos encontrados. **Superior:** secuencia correspondiente a PstS-1 nativa y a la rPstS-1 producida en *P. pastoris*; cada uno de los colores

representan los diferentes péptidos analizados. **Inferior:** ubicación del péptido en la estructura determinada por cristalografía y difracción de rayos X de PstS-1 recombinante, PDB: 1PC3; se indica la masa teórica correspondiente de cada péptido, así como la modificación postraduccional encontrada. hex: hexosas; SMPt: sin modificaciones postraduccionales. * Péptido correspondiente a los aminoácidos 118-158. ** Péptido correspondiente a los aminoácidos 322-344.

Tabla 8. Análisis de los espectros obtenidos de las digestiones de rPstS-1 producida en *P. pastoris* y *E. coli* por MALDI/TOF (matriz de ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico)

Péptido	Digestión rPstS-1 de <i>P. pastoris</i>					Digestión rPstS-1 de <i>E. coli</i>				
	Aminoácidos	Masa teórica (Da)	Masa Experimental (Da)	Modificación	Fracción eluida	Aminoácidos	Masa teórica (Da)	Masa Experimental (Da)	Modificación	Fracción eluida
T1	1-54	5314	ND	-	-	1-52	5214	ND	-	-
		4122	4117		F11					
			4127	SMPt	F19					
T2	55-97	4932	4939	5 Man	F19	53-95	4107	4107	SMPt	F9
		5094	5087	6 Man	F19					
		5256	5251	7 Man	F19					
T3	98-123	2781	2783	SMPt	F17	96-121	2781	2780	SMPt	F16
T3+T4+T5	124-138	4368	4373		F6	124-138	4368	ND	-	-
			4375	SMPt	F7					
T4	124-127	431	ND	-	-	122-125	431	ND	-	-
T5	128-138	1194	ND	-	-	126-136	1194	1193	SMPt	F5
T6	139-164	2752	2753	SMPt	F13	137-162	2752	2751	SMPt	F12
			2758		F12					
		3400	3395	4 Man	F13					
T7	165-180	1766	1757	SMPt	F11	163-178	1766	1766	SMPt	F10
T8	181-188	916	ND	-	-	179-186	916	ND	-	-
		4918	4919		F21					
			4921	SMPt	F20					
		5080	5064		F21					
			5087	1 Man	F19					
T9	189-238	5038	5028	1 Cys	F21	187-236	4918	4812	SMPt	F19
			5027		F19					
		5200	5200	1 Cys + 1 Man	F21					
			5196		F19					
		5362	5361	1 Cys + 2 Man	F19					
		5524	5520	1 Cys + 3 Man	F19					
		3105	3104		F15					
			3105	SMPt	F14					
T10	239-270	3429	3437	2 Man	F15	237-268	3091	3090	SMPt	F13
			3438		F14					
		3591	3600	3 Man	F14					
			3600		F15					
		3753	3768	4 Man	F15					
T11	271-301	3379	3376	SMPt	F15	269-299	3379	3377	SMPt	F14
			3378		F14					
T12+T13	302-324	2528	2526	SMPt	F16	300-322	2528	2528	SMPt	F15
			2280		F18					
T13	304-324	2273	2274	SMPt	F17	302-322	2273	2271	SMPt	F17
			2275		F19					
		1993	2001	SMPt	F12					
			1995		F13					
T14	325-342	2641	2668	4 Man	F12	323-340	1993	1992	SMPt	F11
		2965	2960	6 Man	F13					
		3127	3125	7 Man	F12					
T15	343-353	1090	ND	-	-	341-357	1913	ND	-	-

Cys, cisteína; Man, manosa; ND, no hay datos; SMPt, sin modificaciones postraduccionales.

Serorreactividad a rPstS-1 con muestras de suero de pacientes con Tb activa

Derivado de los resultados anteriores sobre la posibilidad de que la estructura de rPstS-1 producida en *P. pastoris* es similar a la proteína antigénica nativa, se evaluó su serorreactividad

mediante ELISA. Esto se llevó a cabo utilizando muestras de suero humano de pacientes con Tb activa (clínicamente confirmada) y se compararon con sueros de sujetos con prueba PPD positiva y negativa, que no presentaron ninguna evidencia clínica de Tb activa. Se encontró que los sueros de treinta pacientes con Tb activa mostraron una respuesta positiva ($P < 0.05$) contra el rPstS-1 producido en *P. pastoris*, en comparación con los grupos de PPD positivo y negativo (Fig. 32). Para confirmar la importancia del patrón de glicosilación de rPstS-1 producido en *P. pastoris*, también se determinó la serorreactividad de la versión de rPstS-1 no glicosilada producida por cultivos de *E. coli* (González-Zamorano et al., 2009). El reconocimiento de rPstS-1 de *P. pastoris* por IgG2 del suero de pacientes con Tb activa fue entre 3.2 y 3.5 veces mayor (valores medios) que en los sujetos PPD negativos y PPD positivos, respectivamente (Fig. 32). Es importante destacar que rPstS-1 producido en *P. pastoris* mostró un reconocimiento 2 veces mayor (media) y estadísticamente significativo ($P < 0,05$) en comparación con la His-tag-PstS1 no glicosilado producido en *E. coli* (Fig. 32). En este estudio, el uso de IgG2 para el reconocimiento se debió a que este tiene la capacidad de reconocer carbohidratos y antígenos proteicos de bacterias (Sousa et al., 1998; Vidarsson et al., 2014). El reconocimiento de rPstS-1 de *P. pastoris* por sueros de pacientes con tuberculosis sugiere que la proteína recombinante tiene una conformación similar a la proteína nativa. Esto podría estar relacionado con la O-manosilación de rPstS-1 que podría mejorar el reconocimiento por parte del suero de tuberculosis en comparación con el reconocimiento de rPstS-1 no glicosilado producido en *E. coli*. Además, el nivel de reconocimiento de rPstS-1 de sueros de pacientes PPD- y PPD+ fue similar al control en el caso de las proteínas expresadas en los dos sistemas de expresión. Esto nos permite concluir que principalmente la rPstS-1 expresada en *P. pastoris* tiene un mayor reconocimiento por parte de los pacientes con tuberculosis activa en comparación con los PPD+, lo cual es importante ya que esta proteína recombinante podría ser una herramienta para el diagnóstico diferencial de personas con *Mtb* en una forma clínicamente latente y tuberculosis activa.

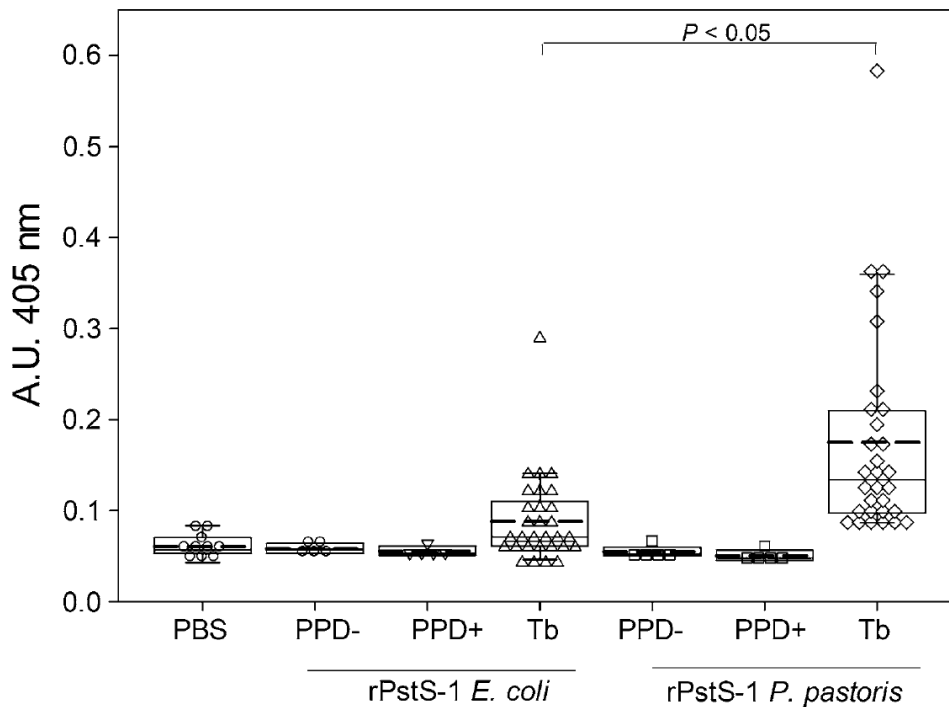
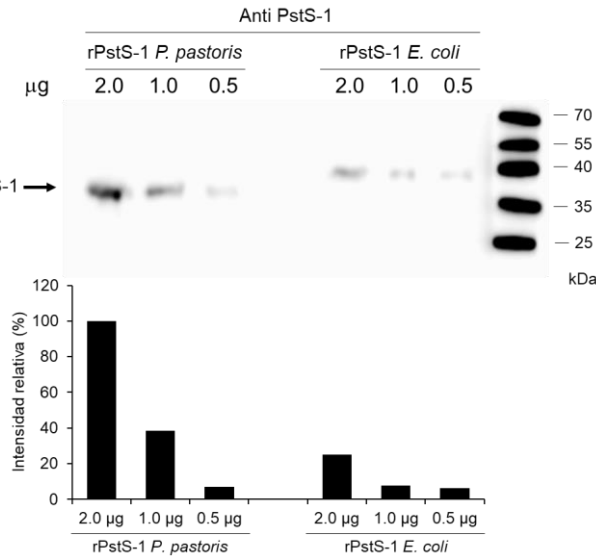


Figura 32. Análisis del diagrama de cajas de la reactividad de los anticuerpos a los antígenos recombinantes rPstS-1. Se probaron las proteínas recombinantes (de *E. coli* y *P. pastoris*) con sueros PPD negativos (n = 5), PPD positivos (n = 5) en dilución 1:100 y sueros de Tb activa (n = 30) en dilución 1:500. La reactividad se informa como la diferencia de las unidades de absorbancia observadas para los diferentes grupos de sueros mediante ELISA utilizando una IgG2 conjugada con AP. Se analizaron por duplicado diferentes sueros de cada grupo. Se muestran la media (carril discontinuo), la mediana, los percentiles 10, 25, 75 y 90 como cuadros verticales con barras de error. La prueba de Dunn se utilizó para todas las comparaciones por pares y comparaciones con un grupo control (PBS) siguiendo un ANOVA basado en rangos.

Para estimar cualitativamente la avidéz de los anticuerpos por rPstS-1 producido en *P. pastoris* y *E. coli*, se llevaron a cabo experimentos por Western blot (Chaouki Benabdeselem et al., 2006) utilizando un Ab policlonal de conejo anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 y una muestra de suero de paciente con tuberculosis activa clínicamente confirmada. Como se puede observar en la Figura 33A, el Ab policlonal anti-PstS-1 reaccionó fuertemente hacia rPstS-1 de *P. pastoris* en comparación con la His-Tag-rPstS1 de *E. coli*. Las intensidades de banda relativas (medidas por densitometría) de 2.0 y 1.0 µg de rPstS-1 de *P. pastoris* fueron de 3.9 y 5-1 veces mayor que las de His-tag-rPstS1 de *E. coli*, respectivamente, lo que sugiere una mayor avidéz hacia el rPstS-1 O-manosilada (Fig. 33B).

A.



B.

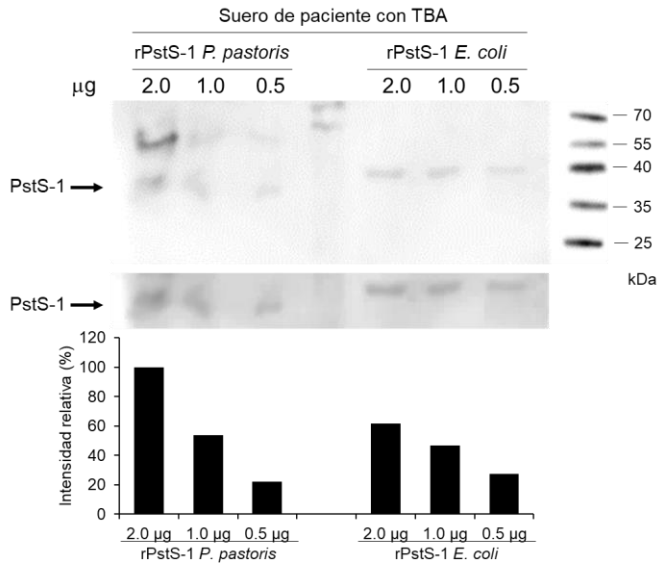


Figura 33. Ensayos de aidez para las rPstS-1 con Ab policlonal (A) y suero de paciente con tuberculosis activa (B). En la parte superior se observan los ensayos de inmunoreactividad hacia rPstS-1 producida en *P. pastoris* y *E. coli* en 3 concentraciones diferentes (2.0, 1.0 y 0.5 µg) ya sea con el Ab policlonal que reconoce a PstS-1 de *M. tuberculosis* y mediante el uso del suero de un paciente con Tb activa. En la parte inferior se encuentra el análisis densitométrico de las bandas que corresponden a las rPstS-1 (flecha). La intensidad relativa corresponde al 100% de la banda con mayor intensidad (2.0 µg de rPstS-1 de *P. pastoris* para ambos ensayos). Los resultados presentados son del análisis de un experimento.

Por otro lado, las intensidades relativas de las bandas para la reactividad del suero humano hacia 2 y 1 µg de rPstS-1 de *P. pastoris* fueron de 2.5 y 1.2 veces mayores que hacia la proteína recombinante producida en *E. coli*, respectivamente (Fig. 33B). Aunque se observó el reconocimiento de una proteína con un alto peso molecular en la muestra de rPstS-1 de *P. pastoris*, en la muestra de rPstS-1 de 2 µg de *E. coli* también se detectó una proteína de alrededor de 10 kDa, lo que indica que hay un bajo efecto de reactividad cruzada entre los experimentos. La mayor detección de rPstS-1 de *P. pastoris* en comparación con rPstS-1 de *E. coli* probablemente se deba a diferencias postraduccionales en la proteína producida en *P. pastoris*.

DISCUSIÓN

El uso de PstS-1 como una posible herramienta diagnóstica o incluso profiláctica se continúa proponiendo en estudios recientes. Los hallazgos encontrados por Watson y colaboradores en el 2021 permiten establecer como un Ab anti-PstS-1 puede ser una herramienta profiláctica para disminuir la carga bacteriana en ratones Balb/c infectados con *Mtb* (Watson et al., 2021). Además, PstS-1 es considerado como uno de los principales antígenos para el análisis de la respuesta antigénica de otras proteínas de membrana de *Mtb* debido a la evidencia que existe de ser un antígeno inmunodominante de la micobacteria (H. Li et al., 2019).

Los vectores pPIC α A, B y C son vectores de 3,6 kb utilizados para la expresión y producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Algunas proteínas recombinantes se expresan bajo el promotor de la alcohol oxidasa y en conjunto con el péptido señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos vectores permiten la expresión inducible de metanol de alto nivel del gen de interés, y pueden usarse en cualquier cepa de *Pichia* incluyendo la X-33 (Cregg et al., 1993). En este trabajo la secuencia codificante de PstS-1 (número GeneBank: P9WGU1) se clonó río debajo de la secuencia del factor de acoplamiento α en el vector pPICZ α B, conservando el marco de lectura abierto y bajo el control de pAOX1. Este promotor está estrechamente regulado por metanol (J. L. Cereghino et al., 2000; Hartner et al., 2006; Inan et al., 2001). Sin embargo, su mecanismo de regulación transcripcional solo se ha descrito parcialmente (Hartner et al., 2006). La inducción del promotor pAOX1 requiere la ausencia de una fuente de carbono represora, como el glicerol; el agotamiento de dicha fuente de carbono da como resultado una ligera represión del promotor. Además, el metanol (la fuente de carbono inducible) provoca una represión significativa de pAOX1, lo que normalmente da como resultado la producción de las enzimas necesarias para la utilización del metanol (G. P. L. Cereghino et al., 2002; Hartner et al., 2006; Inan et al., 2001; Ohi et al., 1994). En cuanto a los resultados obtenidos de las cinéticas realizadas usando las cepas control y la productora de rPstS-1 crecidas en glicerol y metanol, mostraron que la μ fue similar (Fig. 10). La correcta represión de la secuencia promotora AOX se observó en el medio BMGY, asociado a la presencia de glicerol. Esto ha sido observado durante el crecimiento de otras transformantes de *P. pastoris*.

Durante el diseño del plásmido para la transformación de la cepa de *P. pastoris* X-33 se realizaron modificaciones en las secuencias codificantes nativas como la eliminación de los

sitios de N-glicosilación. Las modificaciones en las secuencias para eliminar los sitios de N-glicosilación cambiando las Asn por Glu en los sitios consenso de N-glicosilación se realizó debido a que los antígenos glicosilados pueden modificar la respuesta inmune debido a las estructuras hipermanosiladas de glicanos (van Kooyk et al., 2008). De acuerdo con el estudio realizado por Tsujikawa y col. (1996) demostraron que la expresión de una enzima activadora del plasminógeno humano tipo urocinasa, con el sitio consenso de N-glicosilación mutado (N→Q), mantenía su actividad enzimática, lo que sugiere que la mutación de este aminoácido no afecta el plegamiento y/o la actividad de la enzima (Tsujikawa et al., 1996). De esta forma podemos asegurar que las mutaciones puntuales hechas en la secuencia nucleotídica del glicoantígeno rPstS-1 no afectarían la estructura de la proteína.

Una comparación entre los cultivos en MAB y biorreactor mostró que había velocidades de crecimiento específicas similares durante la fase de crecimiento en lote de *P. pastoris* X-33 (rPstS-1) en el medio de cultivo que contenía glicerol, similar a los resultados informados previamente (Looser et al., 2017; Paulová et al., 2012). Sin embargo, durante la fase de inducción de metanol, la velocidad de crecimiento específico se duplica en los biorreactores en comparación con los MAB de la cepa recombinante y sin diferencias con el control. Además, la biomasa máxima alcanzada en los biorreactores fue mayor tanto en BMGY como en BMMY, siendo alrededor de un 19 y un 43 % mayor, respectivamente, en comparación con la de los MAB (Tabla 4). Esto podría deberse a la transferencia de oxígeno limitada en los MAB en comparación con los cultivos del biorreactor (Baumann et al., 2008; Çalık et al., 2010; J. H. Woo et al., 2006), lo que afecta la velocidad de crecimiento específica posterior a la inducción (Swartz et al., 1981). También se observaron diferencias en el rendimiento de biomasa/glicerol, con un 17% más bajo en los MAB en comparación con los cultivos del biorreactor. Además, los rendimientos obtenidos en este estudio están de acuerdo con los informados por Chiruvolu et al. (Chiruvolu et al., 1998), quienes reportaron valores entre 0.70 y 0.78 g_{PSC}/g_{Glic} (PSC, peso seco celular) para biorreactores sin control de pH y 0.62 g_{PSC}/g_{Glic} en matraces de agitación. No se observaron diferencias significativas en la velocidad específica de consumo de glicerol (q_s) entre los cultivos del biorreactor y MAB.

Es importante señalar que, aunque hubo un nivel 69% mayor de proteína total en el sobrenadante producido en los biorreactores (185 ± 9 mg/L) en comparación con los MAB (127 ± 15 mg/L), los niveles totales de rPstS-1 fueron similares (46 ± 5 y 46 ± 4 mg/L, en los MAB y

el biorreactor, respectivamente). Como resultado, hubo una disminución en la producción específica de rPstS-1 en los biorreactores (32% menor que los MAB, Tabla 4), mientras que la productividad volumétrica de rPstS-1 en ambos sistemas fue la misma (Tabla 4). Cabe señalar que el nivel de acumulación de la proteína rPstS-1 en *P. pastoris* fue casi tres veces mayor por litro en comparación con el sistema bacteriano publicado anteriormente (Singh et al., 1992). Como resultado del desarrollo del proceso de producción de la rPstS-1 en *P. pastoris* se identifica el diagrama de la Figura 34.

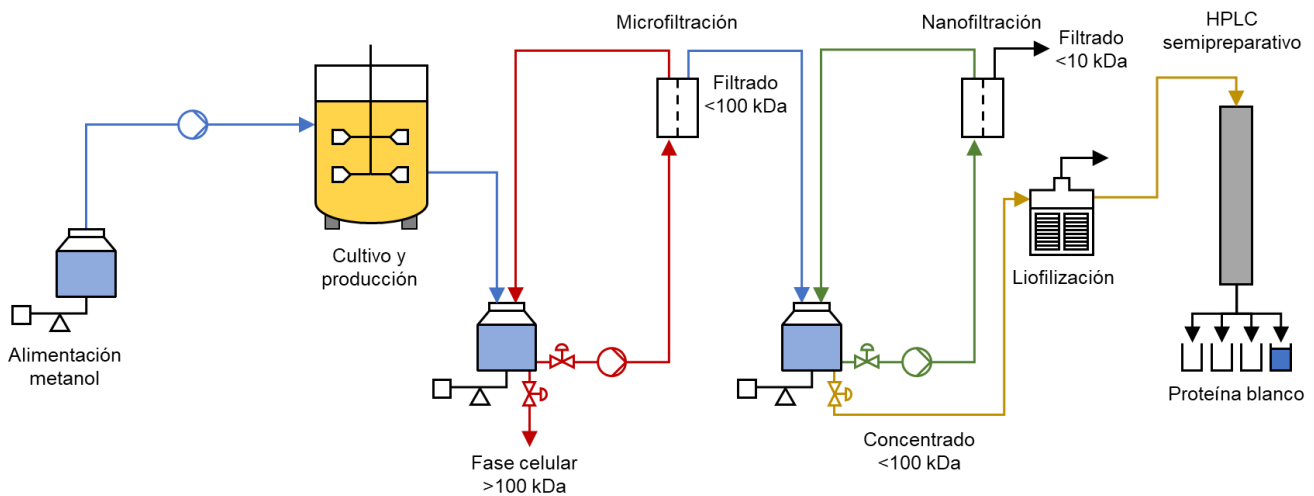


Figura 34. Diagrama de proceso de producción de rPstS-1 en *P. pastoris*

El proceso de purificación de rPstS-1 producida de la cepa de *P. pastoris* se realizó principalmente mediante filtración tangencial y cromatografía de fase reversa en sistema HPLC (RP-HPLC). Uno de los principales retos en el proceso de purificación de rPstS-1 fue que esta no presentaba ninguna etiqueta de purificación como cola de Histidinas o glutatión-S-transferasa, entre otras, ya que se sabe que estas podrían alterar las propiedades biológicas o fisicoquímicas (Fonda et al., 2002; Halliwell et al., 2001; Sainsbury et al., 2016). Una característica importante de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* es que esta secreta pocas proteínas endógenas al medio (Fig. 15A y 15B) lo cual representa una ventaja al momento de la purificación. Además, se pudo observar que el porcentaje de abundancia de la proteína recombinante fue mayor con respecto a las otras proteínas del medio lo cual permite que en los pasos de purificación, como la cromatografía, el componente mayoritario en la separación de las proteínas por fase reversa corresponde a la proteína recombinante. Uno de los primeros métodos cromatográficos probados para la separación de

las proteínas presentes en la muestra ultrafiltrada fue cromatografía de fase reversa en sistema HPLC, la cual permitió una correcta separación de la fracción perteneciente a rPstS-1. Otro método cromatográfico probado fue mediante intercambio aniónico débil en sistema FPLC (dato no mostrado) la cual no permitió una separación con una definición como la observada con el otro método cromatográfico. Fue por este motivo que se eligió la cromatografía de fase reversa como método cromatográfico.

Los primeros pasos de la purificación, la clarificación, ultrafiltración y diafiltración, se realizaron con un sistema de filtración tangencial lo cual permitió reducir la cantidad de moléculas del hospedero y concentrar la muestra usando membranas con corte e 100 y 10 kDa. Como se pudo observar en la Tabla 5, la reducción de proteínas del medio se redujo hasta un 5% después de la filtración tangencial. Además, fue importante definir si la fracción correspondiente con rPstS-1 se podía separar por cromatografía de fase reversa. Por esta razón, fue fundamental determinar la concentración necesaria de Acetonitrilo + Ácido trifluoroacético (Acn+TFA) en donde eluyera rPstS-1 y al mismo tiempo, localizar la fracción correspondiente en una muestra compleja obtenida después del paso de ultrafiltración tangencial mediante SDS-PAGE e inmunodetección. El rendimiento final de rPstS-1 producida en *P. pastoris* fue de 4.2 mg/L lo cual representa una recuperación del 9.1% de la proteína recombinante total producida. El bajo rendimiento de recuperación de rPstS-1 durante la filtración tangencial puede deberse a tres limitaciones operativas principales (1) volumen de retención del sistema, (2) rendimiento de lavado del circuito de retención y (3) volumen mínimo del tanque de trabajo del retenido (Rao et al., 2012). Otra mejora en el proceso de purificación puede ser en el paso de cromatografía donde se identificó una reducción de aproximadamente el ~20% en la recuperación de la proteína recombinante probablemente debido a que el volumen de inyección era mayor al 10% de la curva de saturación de la columna usada.

A diferencia de otros estudios, el análisis de la estructura secundaria de PstS-1 se realizó con una proteína expresada en levadura con capacidad de glicosilar y no en *E. coli*. Vyas y colaboradores (Vyas et al., 2003) mostraron la estructura de una PstS-1 recombinante expresada en *E. coli* (PDB: 1PC3) mediante cristalografía y difracción de rayos X. En este estudio encontraron una composición de estructura secundaria de un 34% de hélices alfa y un 18% de láminas beta. Además, otro estudio realizado por Khurshid y colegas (Khurshid et al., 2013) determinó mediante análisis de CD el espectro de una PstS-1 recombinante, también

expresada en *E. coli*, una composición de 40% de hélices y 8,9% de antiparalelas y 5,6 % hojas beta paralelas. Una característica importante de ambos análisis es el uso de proteínas no glicosiladas. En un primer informe (Daniel, 1989), se determinó que la PstS-1 nativa de *Mtb* tiene un contenido de carbohidratos del 11,6%. Debido a la falta de caracterización de la estructura secundaria de la PstS-1 nativa de *Mtb*, aún no se sabe cómo estas glicosilaciones pueden afectar la conformación de la proteína (Uma Devi et al., 2001; Vyas et al., 2003). Por lo tanto, las diferencias encontradas en nuestros análisis de espectro de CD de PstS-1 recombinante en comparación con los resultados de Vyas y Khurshid (2003) pueden deberse a la presencia de glicosilaciones en la proteína expresada en *P. pastoris*. El espectro de dicroísmo circular de UV lejano de rPstS-1 de *P. pastoris* presenta dos picos mínimos y el mínimo máximo fue entre a 210-212 nm el cual se aproxima al resultado reportado para la proteína nativa el cual presento un pico mínimo de 212 nm (Uma Devi et al., 2001). Las diferencias en los espectros entre la rPstS-1 de *P. pastoris* y la His-rPstS-1 de *E. coli*. puede estar relacionado con la O-manosilación de rPstS-1. Se ha demostrado que la estructura secundaria de proteínas recombinantes glicosiladas producidas en *P. pastoris* difiere de su versión no glicosilada. Kazenwadel y colaboradores (Kazenwadel et al., 2013) investigaron si la pérdida de función de la proteína AtDIR6 podría deberse a un cambio en la estructura secundaria mediante espectroscopia de DC en el rango de UV lejano (190-260 nm). El espectro de AtDIR6 glicosilado mostró un pico mínimo único a 220 nm y la versión no glicosilada presentó un cambio en el pico único de 4 nm y la intensidad de la banda positiva disminuyó en casi dos tercios con respecto a la versión glicosilada (Kazenwadel et al., 2013). Además, un análisis estructural de la proteína recombinante Der p 2 producida en *E. coli* y *P. pastoris* fue diferente de acuerdo con los resultados obtenidos por espectroscopia de DC (Tanyaratsrisakul et al., 2010). De acuerdo con lo anterior, podemos afirmar que las MPt afectan la conformación de la proteína permitiendo que la rPstS-1 pueda adquirir un plegamiento con mayor similitud a la proteína nativa.

El análisis de espectrometría de masas de rPstS1 intacto o de los péptidos obtenidos de la digestión con tripsina (Roche) mostró la detección de masas que corresponden con la proteína y los péptidos intactos, así como los modificados postraduccionalmente por la adición de manosas y posiblemente otras modificaciones. Para la proteína intacta, se evaluó una detección máxima correspondiente a rPstS1 de ~36059,6 Da. En 1986, Young y colaboradores reportaron inicialmente que el peso de PstS1 nativa correspondía a un peso molecular de 38,000 Da como se observa en el SDS-PAGE e inmunodetección. Sin embargo, el producto de la secuencia de

aminoácidos obtenida del gen fue determinada por Andersen y Hansen en 1989 (Ase Bengard Andersen et al., 1989) utilizando una librería de *Mtb*. La secuencia de aminoácidos constaba de 374 residuos, con un peso molecular teórico de 38,243 Da (UniProtKB P9WGU1) con un péptido señal que dirige la unión de lipidación en el extremo N- que consta de los primeros 23 residuos como lo sugieren Andersen y Hansen (Ase Bengard Andersen et al., 1989). En este trabajo se produjo una forma truncada de PstS1, ya que se eliminaron los aminoácidos 1-21 (MKIRLHTLLAVLTAAPLLAA) con la intención de evitar cualquier potencial lipidación y anclaje a la membrana. El peso molecular de la forma truncada de rPstS1 (en este estudio) producida en *P. pastoris*, y predicho por Compute pI/Mw (ExPASy), correspondió a un peso molecular de 36,059,36 Da, esto de acuerdo con el pico detectado (Fig. 23).

La PstS1 es una glicolipoproteína que contiene manosas como se informó anteriormente (Espitia et al., 1992; González-Zamorano et al., 2009; Herrmann et al., 2000) y no se ha descrito un mapeo completo de los sitios exactos de glicosilación, en comparación con el antígeno APA de 45/47 kDa, también de *Mtb* (Dobos et al., 1996). En este proyecto se encontró que los péptidos resultantes de la digestión de rPstS1 con tripsina eran modificados por hexosas (MANOSAS) de acuerdo con diferencias de aumentos de 162 Da (Tabla 8 y Anexo 1) y a su detección con ConA realizada por otros autores (González-Zamorano et al., 2009) Es por esta razón que se sugiere que estas hexosas corresponden a la unión de O-manosas. Hasta la fecha, no existe una secuencia consenso para definir los sitios de O-glicosilación. Sin embargo, Neubert y colaboradores (Neubert et al., 2016) al mapear el glicoproteoma O-manosa en *S. cerevisiae*, sugirieron que para que ocurra este evento de modificación es necesaria una región rica en serinas o treoninas. En nuestro estudio, solo P15 parece tener una región con 4 residuos potenciales para O-manosilación de acuerdo con el análisis realizado por García-Ruiz y colaboradores (García-Ruiz et al., 2022). Cabe señalar que el porcentaje de cobertura en el análisis de los péptidos (Tabla 8) fue del 82% de la secuencia total de rPstS-1. Los péptidos que se encontraron con adiciones de residuos de manosas fueron el T2 (5, 6 y 7 manosas), T6 (4 manosas), T9 (1, 2 y 3 manosas), T10 (2, 3 y 4 manosas) y T14 (4, 6 y 7 manosas). Mediante el uso de la estructura determinada por Vyas y colaboradores (Vyas et al., 2003) se ubicaron los péptidos analizados y se encontró que aquellos que presentaban MPTs contenían residuos expuestos. Con este hallazgo podemos afirmar que la proteína expresada adquiere una estructuración que corresponde con la actividad de transporte de fosfato de la proteína (Vyas et al., 2003).

Como se observó en los ensayos de reactividad, el reconocimiento en suero del antígeno recombinante por IgG2 en pacientes con tuberculosis activa fue mayor en comparación con los sujetos con PPD- y PPD+. Varios estudios han encontrado que PstS-1 es un antígeno importante para ser reconocido por anticuerpos en pacientes con tuberculosis activa (L. S. de Araujo et al., 2014; Hwang et al., 2014; R. J. Wilkinson et al., 1997; D. Young et al., 1986). Uno de los primeros estudios en los que Young y sus colaboradores determinaron la actividad inmunológica de PstS-1 consistió en la purificación y caracterización de dos anticuerpos (TB71 y TB72) anti-PstS-1. Estos anticuerpos tenían la particularidad que presentaban dos epítomos de PstS-1 expresados principalmente por *M. tuberculosis* que por *M. bovis*. Sin embargo, en sus resultados no encontraron diferencias en la proliferación de la respuesta de las células T en pacientes con tuberculosis y sujetos sanos vacunados con BCG (D. Young et al., 1986) lo cual confirma como PstS-1 tiene un papel importante en la respuesta inmune humoral. También Araujo y colaboradores demostraron que una proteína fusión de His-tag PstS-1(285-374):CFP10 (expresada en *E. coli*) aumentaba la positividad para determinar infección por *Mtb* mediante ensayos de perfil de interferón gamma de sangre total y ensayos de estimulación a largo plazo en personas con contacto reciente de pacientes con tuberculosis pulmonar. Además, esta proteína de fusión tenía mejores valores de positividad (~25%) que la proteína recombinante de fusión formada por las secuencias de ESAT-6 y CFP-10 mediante la evaluación por niveles de interferón gama y la prueba cutánea de tuberculina (TST). La respuesta de tuberculina hacia PstS-1(285-374):CFP10 fue positiva en sujetos en los ensayos de 22 h y 5 días siendo de 23/54 y 26/54 respectivamente, un ligero aumento en comparación con el nivel observado con la proteína de RD1, ESAT-6 y CFP-10, que fue de 18/54 y 24/54 (L. S. de Araujo et al., 2014). En otra investigación realizada por Hwang y colaboradores determinaron la antigenicidad, mediante ELISA, de una proteína de fusión His-tag de PstS-1 y la molécula chaperona de *E. coli* "Trigger Factor" (PstS1-TF) expresado en *E. coli*. Descubrieron que PstS1-TF (OD492, 1.109 ± 0.306) es capaz de producir resultados de serodiagnóstico más precisos y consistentes mediante ELISA y su análisis de característica operativa del receptor (ROC) que una proteína de fusión de PstS1 con glutatión transferasa (OD492, 0.632 ± 0.210) (89.5% and 78.9%, respectivamente) (Hwang et al., 2014). Otros experimentos de serorreactividad informados anteriormente, la detección de rPstS-1 producida en *E. coli* por anticuerpos derivados de pacientes con tuberculosis tuvo una variación entre el 36 al 77% (Khurshid et al., 2013; Watson et al., 2021; R. J. Wilkinson et al., 1997; X. Wu et al., 2010), esto posiblemente derivado de la falta de MPt presentes en la proteína nativa.

El reconocimiento de rPstS-1 por IgG2 se debe a que esta inmunoglobulina puede responder contra carbohidratos y antígenos proteicos. Los carbohidratos de las bacterias suelen inducir una respuesta independiente de linfocitos T tipo 2, principalmente de los isotipos IgG1 e IgG2 (Sousa et al., 1998; Vidarsson et al., 2014). La mayoría de los sistemas de detección de diagnóstico de tuberculosis que utilizan PstS-1 están fabricados para la detección de IgG (Steingart et al., 2011). Un estudio de Li y colaboradores evaluó, mediante ELISA, las respuestas de los anticuerpos IgG e IgM para el reconocimiento de una proteína de fusión de PstS1 y polipéptido de línea multiepítipo (LEP) de doce epítomos Th inmunodominantes que cubren ocho antígenos de *Mtb*, producido en *E. coli*. Encontraron que 175 (71,4%) de 245 pacientes con tuberculosis pulmonar fueron positivos para la detección de IgG en comparación con 44 (18%) pacientes positivos para IgM (J.-L. Li et al., 2015).

Hasta ahora se han desarrollado diferentes sistemas de detección de diagnóstico como la prueba cutánea PPD o QuantiFERON®-TB, que son ensayos inmunológicos basados en células T, ambas son pruebas indirectas basadas en la respuesta inmune a la tuberculosis y no evalúan directamente la presencia o viabilidad de los bacilos de la tuberculosis (Zellweger et al., 2020). Los factores de riesgo de la prueba falso-negativa QuantiFERON®-TB fueron en pacientes con infección de VIH. En pacientes con tuberculosis con baciloscopia de esputo negativa, la diabetes *mellitus* se asoció con prueba de QuantiFERON®-TB falso negativo (OR 2.85; IC del 95 %: 1.02 a 7.97, $p = 0.045$). La sensibilidad de la TST fue mayor que la sensibilidad de la prueba de QuantiFERON®-TB en pacientes con diabetes *mellitus* (OR 9.46; IC del 95%: 2.53 a 35,3) (Choi et al., 2015).

Se ha propuesto el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico utilizando antígenos proteicos secretados derivados de *Mtb*, como PstS-1. Estos antígenos son reconocidos por los anticuerpos de los pacientes con tuberculosis con alta sensibilidad y, por lo tanto, podrían ayudar en el desarrollo de diagnósticos sensibles para distinguir entre estados de tuberculosis activa y inactiva, lo cual es vital para la administración de tratamientos oportunos que contribuyan con un mejor pronóstico de los pacientes y además evitar el contagio (Z. Araujo et al., 2022; Davidow et al., 2005; X. Wu et al., 2010).

La diferencia significativa mostrada en el reconocimiento de rPstS-1 por anticuerpos IgG2 séricos de pacientes con tuberculosis activa, PPD+ y sujetos sanos podría deberse al uso de un antígeno con características similares a la PstS-1 nativa. Como se mencionó, las evidencias

encontradas por otras investigaciones en ensayos de inmunorreactividad son significativas en algunos casos o controvertidas, pero el denominador común de los antígenos utilizados en estos estudios es que se expresaron en *E. coli* como proteínas His-tag no glicosiladas. Como se sabe, PstS-1 es una glicoproteína y la presencia de carbohidratos y otras modificaciones como las etiquetas His podrían afectar tanto el plegamiento de proteínas como el reconocimiento de anticuerpos.

CONCLUSIONES

La PstS-1 recombinante (rPstS-1) fue producida de forma soluble sin la señal de lipidación, manosilada en la levadura *P. pastoris*. Se desarrolló y reprodujo un bioproceso productivo de la rPstS-1 en matraces agitados con baffles y biorreactores bajo condiciones controladas, obteniendo hasta 46 mg/L de proteína recombinante en ambas geometrías. De igual forma se obtuvo un protocolo de recuperación de la proteína recombinante en tres pasos, logrando 98% de pureza. En el proceso de purificación se demostró que la estrategia del uso de la tecnología de filtración tangencial para los primeros pasos de la purificación de rPstS-1 O-manosilado sin etiquetas, a partir de un sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*, es eficiente para recuperar la proteína con una pureza del 97%. Las tecnologías usadas para los procesos de purificación de estas proteínas recombinantes son escalables y podrían aplicarse no solo para la producción a gran escala de rPstS-1, sino también de otros antígenos de *Mtb*. La estructura primaria y secundaria de la proteína recombinante rPstS-1 producida en *P. pastoris*, así como su patrón de O-manosilación fue determinada. Los datos obtenidos sugieren que la estructura secundaria de rPstS-1 producida en *P. pastoris* difiere de la producida en bacterias. Las diferencias encontradas en la estructura secundaria podrían deberse a las MPT, en específico, las O-manosilaciones presentes en la rPstS-1 producida en *P. pastoris*. Por otro lado, el análisis de reactividad cruzada utilizando anticuerpos séricos de pacientes con tuberculosis activa demostró el reconocimiento de la glicoproteína recombinante producida en *P. pastoris*, lo que indica indirectamente la similitud entre la PstS-1 recombinante y la proteína nativa de *Mtb*. La similitud del nivel de detección de rPstS-1 entre los pacientes PPD+ y PPD- es una característica que permitirá evaluar a esta proteína recombinante para la diferenciación de pacientes con Tb activa y personas con una infección latente de *Mtb* y vacunados. En el mismo sentido, este ensayo mostró las diferencias de reconocimiento entre el antígeno producido en *E. coli* y el glicoantígeno producido en *P. pastoris*, siendo mejor reconocido aquel modificado postraduccionalmente. El trabajo en general muestra que esta levadura es una fábrica celular útil en la producción de glicoantígenos provenientes de micobacterias como *Mtb* que estén poco manosilados.

PERSPECTIVAS

- Determinar la interacción de PstS-1 con los receptores TLR a través de ensayos utilizando los péptidos obtenidos por la proteólisis con tripsina de la proteína recombinante.
- Caracterización de la respuesta inmune innata relacionada con la activación de los TLRs en monocitos por los péptidos de rPstS-1 y la proteína completa. Perfil de citocinas inducido por la activación de los TLRs en monocitos.
- Desarrollo de procesos para la producción de otros glicoantígenos de *Mtb* producidos en *P. pastoris* usando como referencia el proceso desarrollado para esta rPstS-1.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis por MALDI-TOF de los péptidos obtenidos de la digestión rPstS-1 para la determinación la adición de manosas.

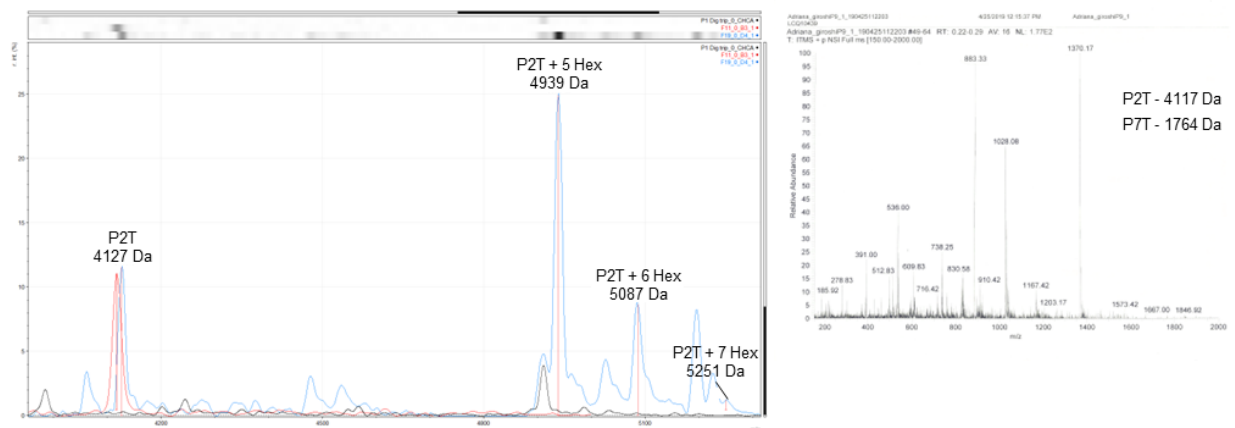
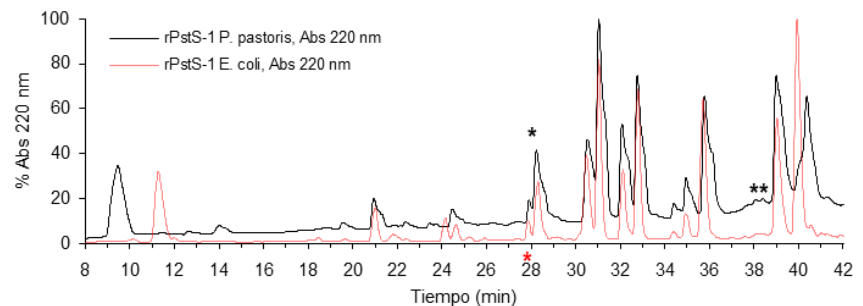
Se presenta el análisis independiente de cada uno de los péptidos encontrados. Superior: secuencia correspondiente al péptido; medio izquierda: ubicación del péptido en la estructura determinada por cristalografía y MNR de una PstS-1 recombinante, PDB: 1PC3; medio derecha: perfil cromatográfico de las digestiones de las rPstS-1, se señala con asteriscos la o las fracciones en la que se encontró el péptido analizado; inferior izquierda: espectro correspondiente al péptido de rPstS-1 de *P. pastoris*, se menciona el péptido encontrado y su modificación postraduccional correspondiente en relación a la masa encontrada; inferior derecha: espectro correspondiente al péptido de rPstS-1 de *E. coli*.

P2T

```

Mtb PstS-1   52  TLAPTGSTLLYPLFNLWGPAPHERYYPNVITTAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAOQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLA
rPstS-1     31  TLAPTGSTLLYPLFNLWGPAPHERYYPQVITTAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAOQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLA
*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****_*****

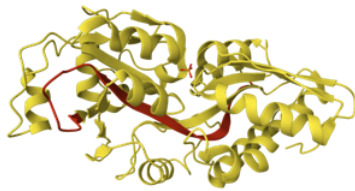
```



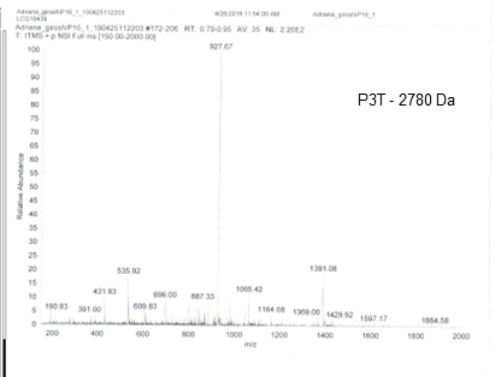
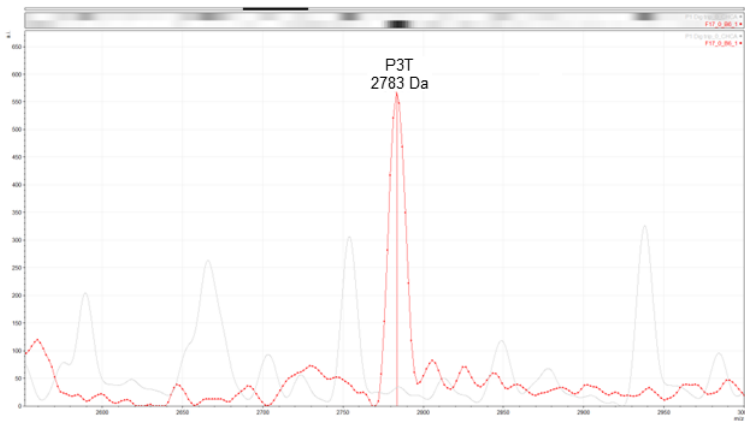
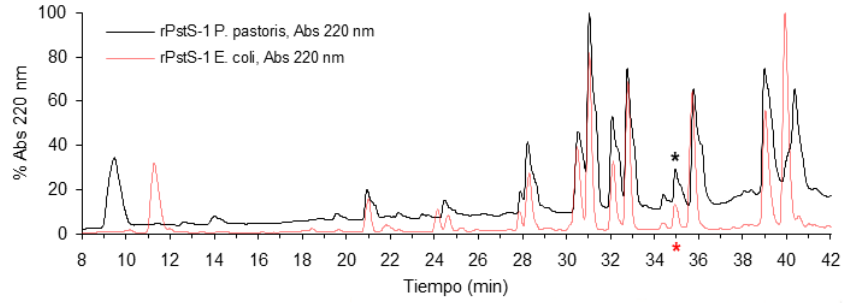
P3T

```

Mtb PstS-1 82 TAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGKVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVV
rPstS-1 61 TAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGKVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVV
*****
    
```



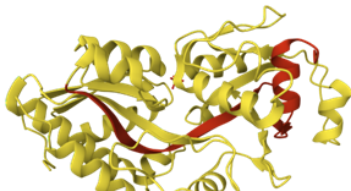
Masa teórica 2781 Da



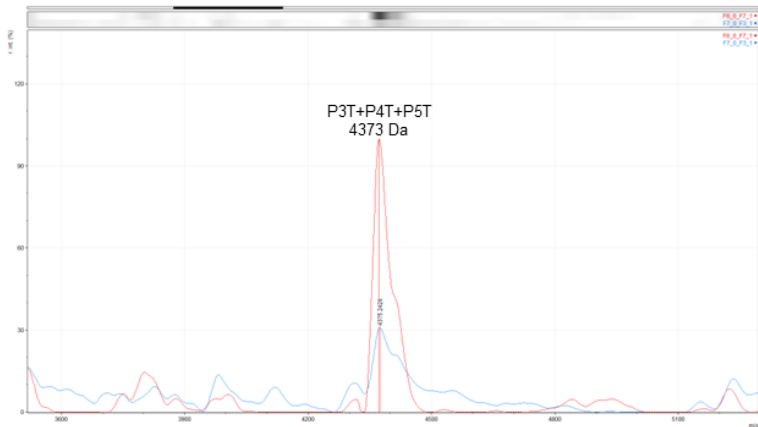
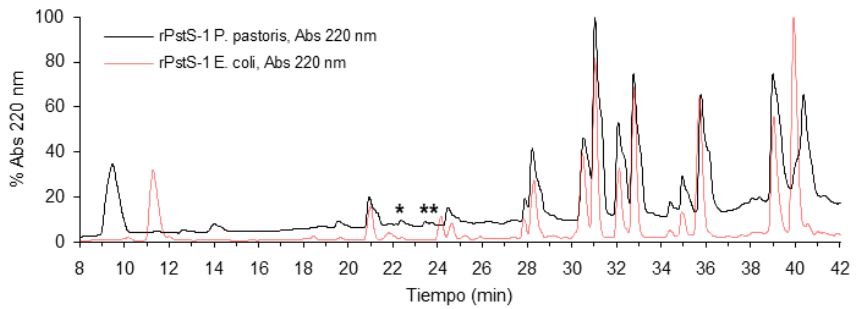
P3T + P4T + P5T

```

Mtb PstS-1 92 IAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGKVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVFLHRS DGS GD
rPstS-1 71 IAQAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKGLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLKLNKGKVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVFLHRS DGS GD
*****
    
```

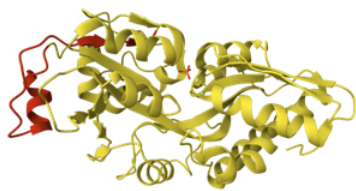


Masa teórica 4378 Da

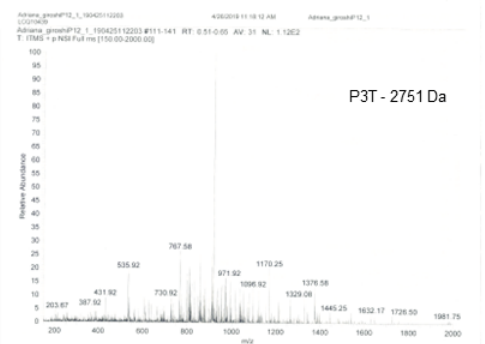
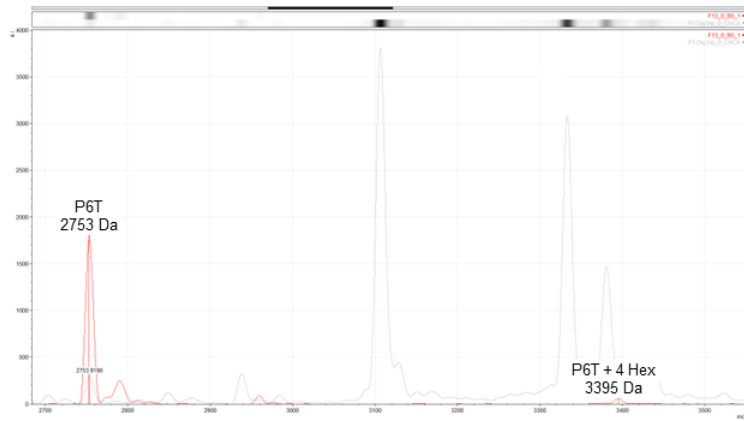
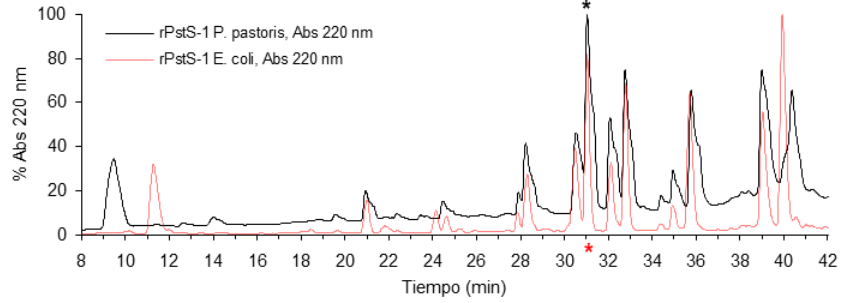


P6T

Mtb PstS-1 122 NIALAISAOQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLAAMYQGTII TWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRSDGSGDTFLFTQYLSKQDPEGWGKSPGFGTIVDFPA
 rPstS-1 101 NIALAISAOQVNYNLPGVSEHLKLNKGVLAAMYQGTII TWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRSDGSGDTFLFTQYLSKQDPEGWGKSPGFGTIVDFPA

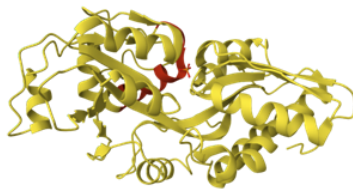


Masa teórica 2752 Da

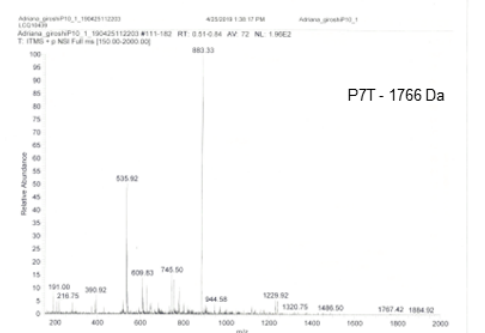
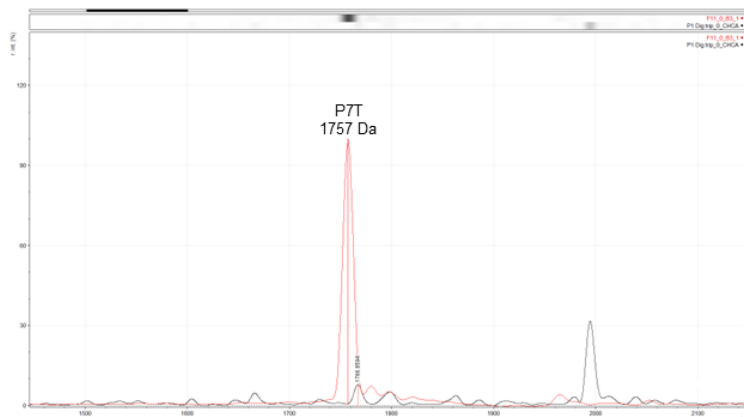
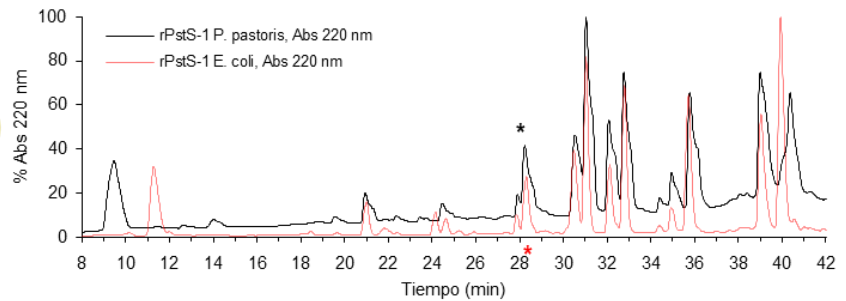


P7T

Mtb PstS-1 142 HLKLNKGVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRSDGSGDTFLFTQYLSKQDPEGWGKSPGFGTIVDFPAVPGALGENGGMVTGCAET
 rPstS-1 121 HLKLNKGVLAAMYQGTIKTWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRSDGSGDTFLFTQYLSKQDPEGWGKSPGFGTIVDFPAVPGALGENGGMVTGCAET

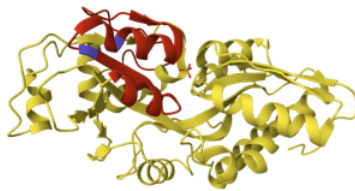


Masa teórica 1766 Da

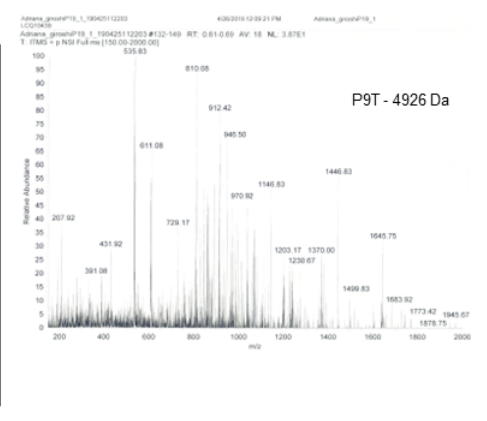
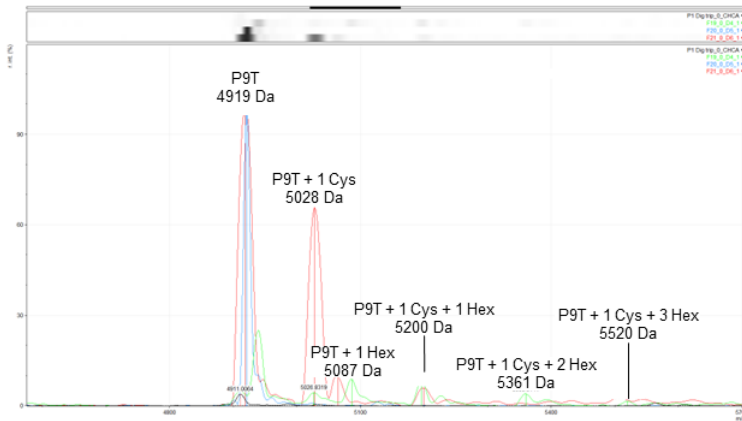
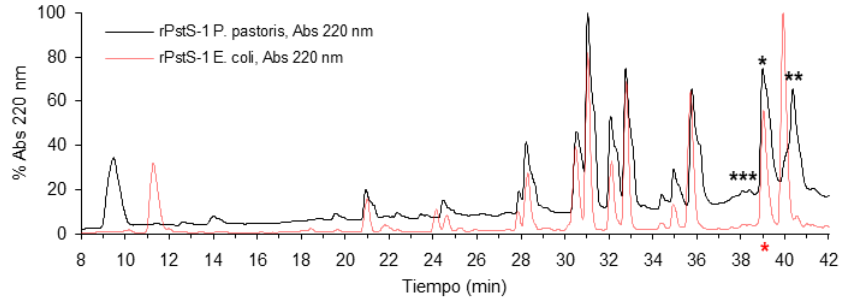


P9T

Mtb PstS-1 182 PLHRSDGSGDFTLFTQYLKQDPEGWGKSPGFGTTVDFFAVPFGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASQRLGLGEAQLGNSGNGFLLPDAQSI
 rPstS-1 161 PLHRSDGSGDFTLFTQYLKQDPEGWGKSPGFGTTVDFFAVPFGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASQRLGLGEAQLGSSGNGFLLPDAQSI

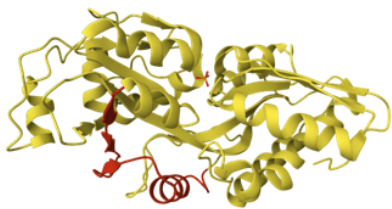


Masa teórica 4918 Da

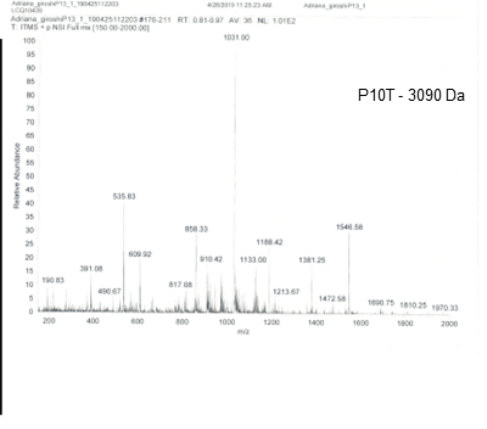
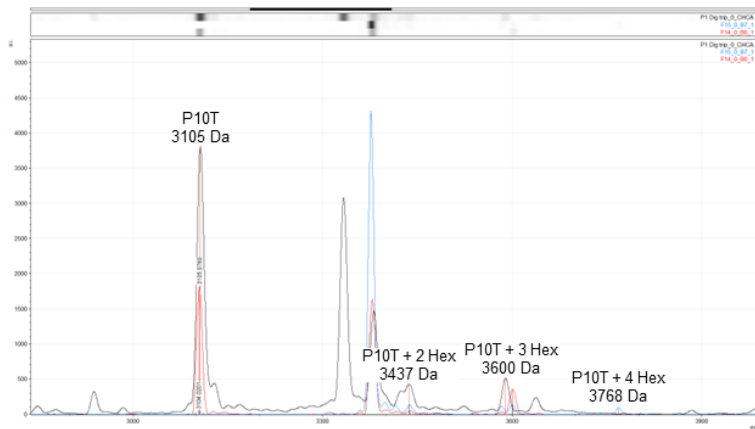
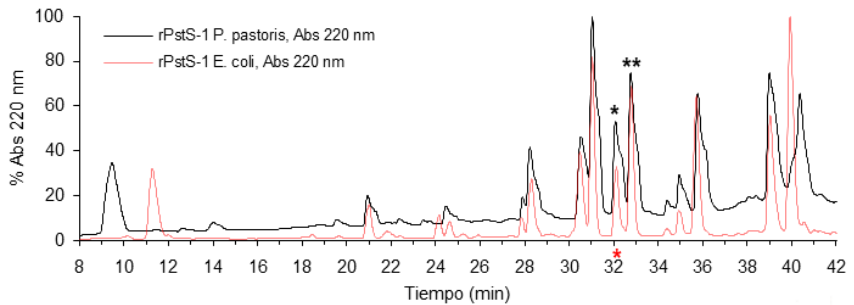


P10T

Mtb PstS-1 222 VFGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASQRLGLGEAQLGNSGNGFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAISMI DGPAPDGYPI INY EYAI VNN
 rPstS-1 201 VFGALGENGNGMVTGCAETPGCVAYIGISFLDQASQRLGLGEAQLGSSGNGFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAISMI DGPAPDGYPI INY EYAI VNN

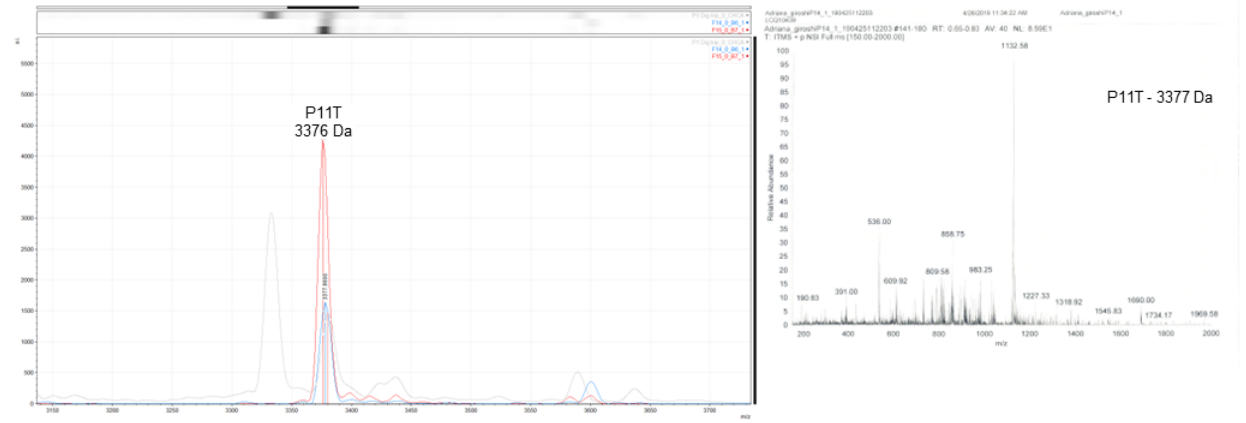
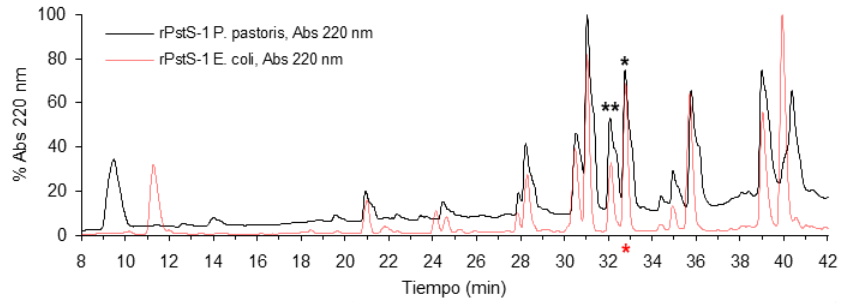


Masa teórica 3105 Da



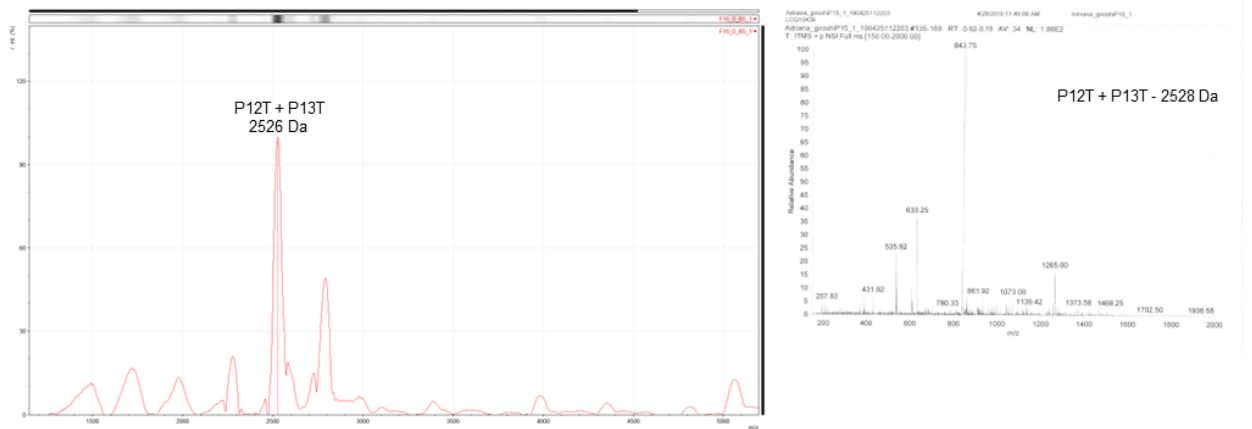
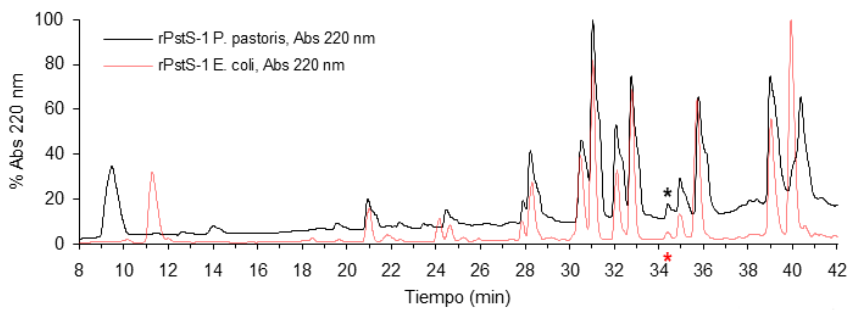
P11T

Mtb PstS-1 252 FLDQASQRGLGEAQLGNSNGNFFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPAPDGYPI INYEYAI VNNR QKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQ
 rPstS-1 231 FLDQASQRGLGEAQLGQSSGNFFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPAPDGYPI INYEYAI VNNR QKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQ



P12T + P13T

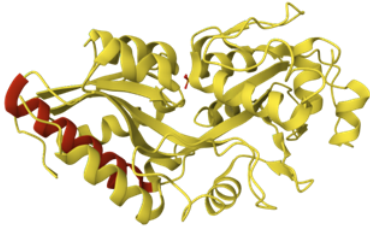
Mtb PstS-1 282 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPAPDGYPI INYEYAI VNNI QKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQVHFQPLPPAVKLSDALIATISS
 rPstS-1 261 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPAPDGYPI INYEYAI VNNI QKDAATAQTLQAFLHWAITDGNKASFLDQVHFQPLPPAVKLSDALIATISS



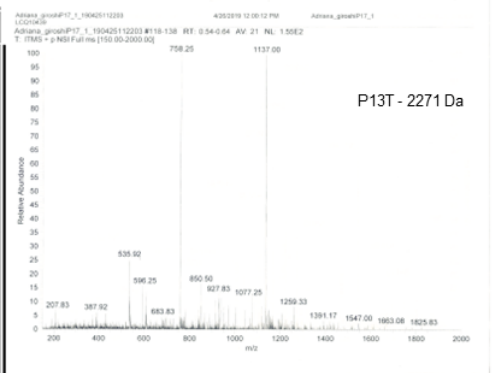
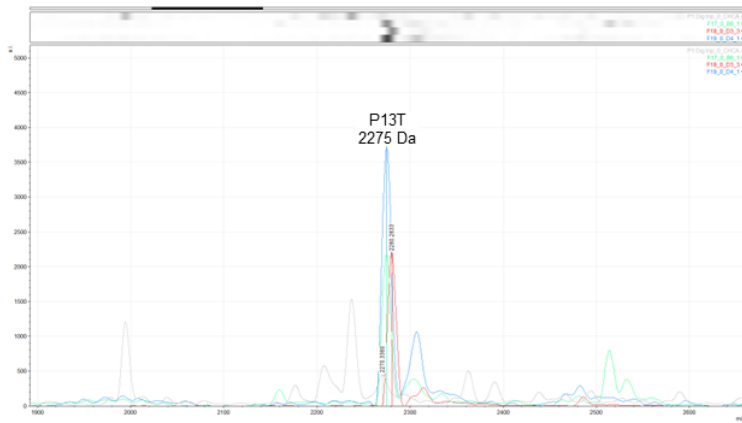
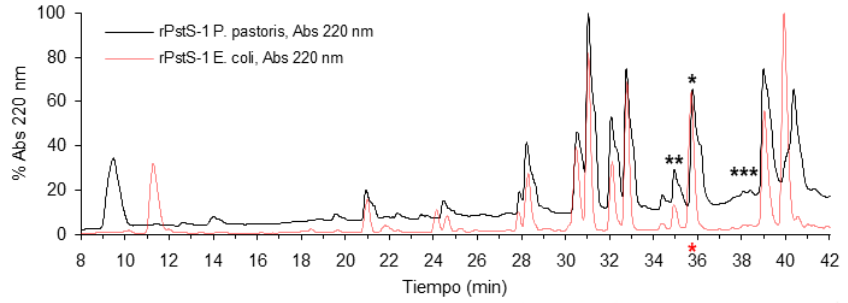
P13T

```

Mtb PstS-1 282 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPA PDGYPI INYEYAI VNNRQ DAATAQTLQAF LHWAITDGNK ASFLDQVHFQ LPPAVVKLSDAL IATISS
rPstS-1 261 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPA PDGYPI INYEYAI VNNRQ DAATAQTLQAF LHWAITDGNK ASFLDQVHFQ LPPAVVKLSDAL IATISS
*****
    
```



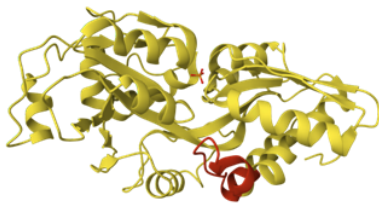
Masa teórica 2273 Da



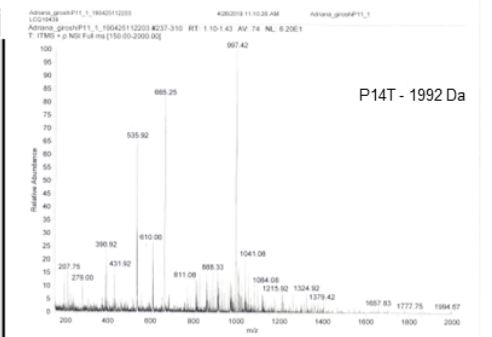
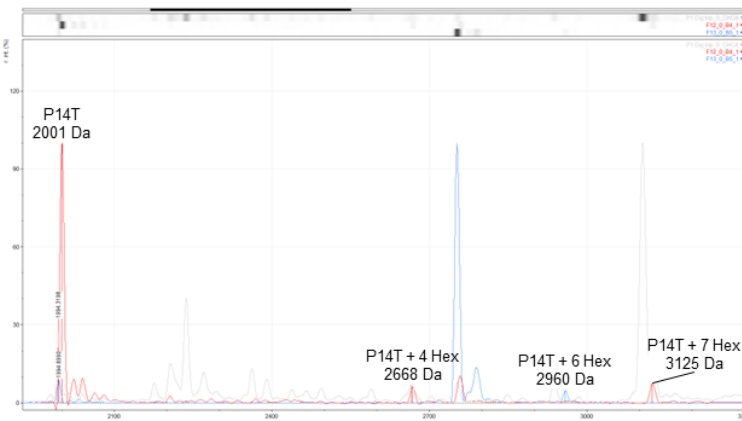
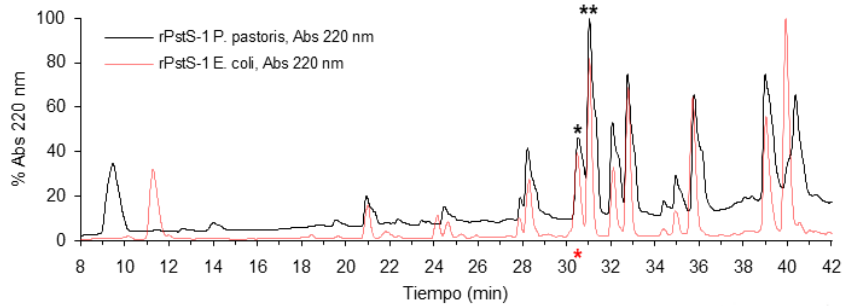
P14T

```

Mtb PstS-1 282 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPA PDGYPI INYEYAI VNNRQKDAATAQTLQAF LHWAITDGNK ASFLDQVHFQ LPPAVVKLSDAL IATISS
rPstS-1 261 QAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPA PDGYPI INYEYAI VNNRQKDAATAQTLQAF LHWAITDGNK ASFLDQVHFQ LPPAVVKLSDAL IATISS
*****
    
```



Masa teórica 1993 Da



Anexo 2. Solicitud de patente MX/a/2020/000538



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DIRECCION

OCT -2 2020 FH 2: 28
SECRETARIA DE SALUD
UNAM
con anexos

Oficio: IIBO/DIR/214/2020
Asunto: Respuesta a primer requerimiento de examen de forma.

Lic. Daniel Ojesto Martínez Porcayo
Director de Propiedad Intelectual
Dirección General de Asuntos Jurídicos, UNAM
Presente

En atención a su amable oficio DGAJ/DPI-jpitt-2357/2020 relacionado con el primer requisito del examen de forma fondo emitido por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) en relación a la invención denominada "**Nueva proteína PstS1 O-manosilada (PstS1-OM), diseñada con base en PstS-1 de Mycobacterium tuberculosis, proceso para su producción en Pichia pastoris su uso en diagnóstico, terapia y para generar anticuerpos**" registrado como la solicitud de patente MX/a/2020/000538, adjunto a la presente encontrará los siguientes documentos:

- Cesión de derechos de los inventores: Carlos Giroshi Bando Campos, Daniel Juárez López, Yolanda López Vidal, Clara Inés Espitia Pinzón y Erika Margarita Carrillo Casas; y
- Formato electrónico de pagos por servicios del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) con número de folio 10047692842 por el monto de \$377.89 (TRESCIENTOS SETENTA Y SIETE PESOS 89/100 M.N.) por el concepto establecido en el artículo 29 de las tarifas por los servicios que presta el IMPI.

Sin más por el momento reciba un saludo cordial.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 2 de octubre de 2020.
LA DIRECTORA

Ma Imelda López Villaseñor
DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

Anexo: Lo indicado.

MILV/MECF

SEGUIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Durante mis estudios de doctorado se contribuyó de forma fundamental en el desarrollo de otros proyectos de investigación que se mencionan a continuación. Como resultado del trabajo realizado se logró evidenciar la contribución con la publicación de dos artículos de investigación que mencionan a continuación:

- Debido a la necesidad de profundizar en el estudio del papel de ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* en las respuestas inmunes se contribuyó con el diseño y generación de una clona de *E. coli* termoinducible para la producción de una forma recombinante de esta proteína. Más adelante, esta clona se ocupó para un estudio relacionado con el papel de la escala de cultivo y la temperatura en la respuesta metabólica, la expresión de chaperonas y la arquitectura de los cuerpos de inclusión.

Cell Stress and Chaperones
<https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>

ORIGINAL PAPER



Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies

Sara Restrepo-Pineda¹ · Carlos G. Bando-Campos² · Norma A. Valdez-Cruz² · Mauricio A. Trujillo-Roldán¹

Received: 27 September 2018 / Revised: 1 May 2019 / Accepted: 6 May 2019
 © Cell Stress Society International 2019

Abstract

The heat-inducible expression system has been widely used to produce recombinant proteins in *Escherichia coli*. However, the rise in temperature affects cell growth, activates the bacterial Heat-Shock Response (HSR), and promotes the formation of insoluble protein aggregates known as inclusion bodies (IBs). In this work, we evaluate the effect of the culture scale (shake flasks and bioreactors) and induction temperature (39 and 42 °C) on the kinetic behavior of thermoinducible recombinant *E. coli* ATCC 53606 producing rESAT-6 (6-kDa early-secretory antigenic target from *Mycobacterium tuberculosis*), compared with cultures grown at 30 °C (without induction). Also, the expression of the major *E. coli* chaperones (DnaK and GroEL) was analyzed. We found that almost twice maximum biomass and rESAT-6 production were obtained in bioreactors (~3.29 g/L of biomass and ~0.27 g/L of rESAT-6) than in shake flasks (~1.41 g/L of biomass and ~0.14 g/L of rESAT-6) when induction was carried out at 42 °C, but similar amounts of rESAT-6 were obtained from cultures induced at 39 °C (~0.14 g/L). In all thermoinduced conditions, rESAT-6 was trapped in IBs. Furthermore, DnaK was preferably expressed in the soluble fraction, while GroEL was present in IBs. Importantly, IBs formed at 39 °C, in both shake flasks and bioreactors, were more susceptible to degradation by proteinase-K, indicating a lower amyloid content compared to IBs formed at 42 °C. Our work presents evidence that the culture scale and the induction temperature modify the *E. coli* metabolic response, expression of chaperones, and structure of the IBs during rESAT-6 protein production in a thermoinducible system.

Keywords Shake flasks · Bioreactors · Thermoinduction · Recombinant protein · Chaperones · Inclusion bodies

Notation		DOT	Dissolved oxygen tension,
AU	Absorbance units		% air saturation
BSA	Bovine serum albumin	HSPs	Heat-shock proteins

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mauricio A. Trujillo-Roldán
 maurotru@gmail.com; maurotru@biomedicas.unam.mx

Sara Restrepo-Pineda
 sarestrepo90@gmail.com

Carlos G. Bando-Campos
 dgiroschi@gmail.com

Norma A. Valdez-Cruz
 acrivaldez1@gmail.com

¹ Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510 Ciudad de México, Mexico

² Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, 04510 Ciudad de México, CP, Mexico

Published online: 04 June 2019

Springer

- A partir del conocimiento adquirido durante mis estudios de posgrado sobre las respuestas inmune innata y adquirida, así como los procesos de producción de biomoléculas recombinantes, como los anticuerpos, y su aplicación para el tratamiento de enfermedades, se participó en un artículo de revisión que hace referencia al panorama integrador de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 y sus posibles aplicaciones en la profilaxis y el tratamiento de la COVID-19.

Valdez-Cruz et al. *Microb Cell Fact* (2021) 20:88
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01576-5>

Microbial Cell Factories

REVIEW

Open Access

Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment



Norma A. Valdez-Cruz^{1*}, Enrique García-Hernández², Clara Espitia³, Laura Cobos-Marín⁴, Claudia Altamirano⁵, Carlos G. Bando-Campos¹, Luis F. Cofas-Vargas², Enrique W. Coronado-Aceves³, Ricardo A. González-Hernández¹, Pablo Hernández-Peralta⁴, Daniel Juárez-López¹, Paola A. Ortega-Portilla², Sara Restrepo-Pineda¹, Patricio Zelada-Cordero¹ and Mauricio A. Trujillo-Roldán^{1*}

Abstract

SARS-CoV-2 is a novel β -coronavirus that caused the COVID-19 pandemic disease, which spread rapidly, infecting more than 134 million people, and killing almost 2.9 million thus far. Based on the urgent need for therapeutic and prophylactic strategies, the identification and characterization of antibodies has been accelerated, since they have been fundamental in treating other viral diseases. Here, we summarized in an integrative manner the present understanding of the immune response and physiopathology caused by SARS-CoV-2, including the activation of the humoral immune response in SARS-CoV-2 infection and therefore, the synthesis of antibodies. Furthermore, we also discussed about the antibodies that can be generated in COVID-19 convalescent sera and their associated clinical studies, including a detailed characterization of a variety of human antibodies and identification of antibodies from other sources, which have powerful neutralizing capacities. Accordingly, the development of effective treatments to mitigate COVID-19 is expected. Finally, we reviewed the challenges faced in producing potential therapeutic antibodies and nanobodies by cell factories at an industrial level while ensuring their quality, efficacy, and safety.

Introduction

The recent disease outbreak caused by the new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a global health emergency, as april 2021 affecting more

than 134 million people and leading to almost 2.9 million deaths until date [1]. In the last two decades, other SARS-CoV-2-related pathogenic β -coronaviruses have caused syndromes such as severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV). SARS-CoV-2 is the causative agent of coronavirus disease (COVID-19). As the most transmissible coronavirus (CoV) identified to date, its vertiginous spread has led to the current COVID-19 pandemic [2–5]. This emphasizes the urgency in the research, design, innovation, and large-scale production of new prophylactic and therapeutic drugs.

CoVs are enveloped single-stranded positive-sense RNA viruses that can infect an extensive number of

*Correspondence: adri@biomedicas.unam.mx; maurotru@biomedicas.unam.mx

¹ Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México
 Full list of author information is available at the end of the article
 This article is dedicated to the memory of Dr. José de Jesús García Valdés of the Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, a pioneer in the study of ion-channels and scorpion toxins in México.



© The Author(s) 2021. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

REFERENCIAS

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(12), 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Hayashi, M., & Endo, T. (2011). Different roles of the two components of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *411*(4), 721–725. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.012
- Andersen, A B, Ljungqvist, L., & Olsen, M. (1990). Evidence that protein Antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *Journal of General Microbiology*, *136*(3), 477–480. doi: 10.1099/00221287-136-3-477
- Andersen, Ase Bengard, & Hansen, E. B. (1989). Structure and mapping of antigenic domains of protein Antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, *57*(8), 2481–2488. doi: 10.1128/iai.57.8.2481-2488.1989
- Andersen, P. (1994). Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infection and Immunity*, *62*(6), 2536–2544. doi: 10.1128/iai.62.6.2536-2544.1994
- Appelmeik, B. J., den Dunnen, J., Driessen, N. N., Ummels, R., Pak, M., Nigou, J., Larrouy-Maumus, G., Gurcha, S. S., Movahedzadeh, F., Geurtsen, J., Brown, E. J., Eysink Smeets, M. M., Besra, G. S., Willemsen, P. T. J., Lowary, T. L., van Kooyk, Y., Maaskant, J. J., Stoker, N. G., van der Ley, P., ... Bitter, W. (2008). The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the *Mycobacterium*-host interaction. *Cellular Microbiology*, *10*(4), 930–944. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01097.x
- Araujo, L. S. de, Mello, F. C. de Q., da Silva, N. de B. M., Leung, J. A. M., Machado, S. M. A., Sardella, I. G., Maciel, R. de M., & Saad, M. H. F. (2014). Evaluation of gamma interferon immune response elicited by the newly constructed PstS-1(285-374):CFP10 fusion protein to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(4), 552–560. doi: 10.1128/CVI.00726-13
- Araujo, Z., de Waard, J. H., Camargo, M., Lopez-Ramos, J. E., de Larrea, C. F., Vanegas, M., & Patarroyo, M. A. (2022). Diagnostic potential of the serological response to synthetic peptides from *Mycobacterium tuberculosis* antigens for discrimination between active and latent tuberculosis infections. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *28*(3). doi: 10.1007/s10989-022-10392-3

- Baghani, A. A., Soleimanpour, S., Farsiani, H., Mosavat, A., Yousefi, M., Meshkat, Z., Rezaee, S. A., Amel Jamehdar, S., Reza, M., Eydgahi, A., Sadeghian, H., & Ghazvini, K. (2017). CFP10: mFcy2 as a novel tuberculosis vaccine candidate increases immune response in mouse. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(2), 122–130. doi: 10.22038/ijbms.2017.8231
- Bai, J., Swartz, D. J., Protasevich, I. I., Brouillette, C. G., Harrell, P. M., Hildebrandt, E., Gasser, B., Mattanovich, D., Ward, A., Chang, G., & Urbatsch, I. L. (2011). A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-Glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0022577
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P., & Mattanovich, D. (2008). Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 177–183. doi: 10.1002/bit.21763
- Bekmurzayeva, A., Sypabekova, M., & Kanayeva, D. (2013). Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93(4), 381–388. doi: 10.1016/j.tube.2013.03.003
- Benabdessalem, C., Othman, H., Ouni, R., Ghouibi, N., Dahman, A., Riahi, R., Larguach, B., Jihene Bettaieb, Srairi-Abid, N., Barbouche, M.-R., & Fathallah, M. D. (2019). N-glycosylation and homodimeric folding significantly enhance the immunoreactivity of *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor CFP32 when produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(3), 845–850. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.140
- Benabdeselem, C, Barbouche, M. R., Jarboui, M. A., Dellagi, K., Ho, J. L., & Fathallah, D. M. (2007). High level expression of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein CFP32 in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 35(1), 41–49. doi: 10.1385/mb:35:1:41
- Benabdeselem, Chaouki, 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. doi: 10.1128/JCM.02672-05
- Bothamley, G. H., Beck, J. S., Potts, R. C., Grange, J. M., Kardjito, T., & Ivanyi, J. (1992). Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 166(1), 182–186. doi: 10.1093/infdis/166.1.182
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5). doi: 10.1101/cshperspect.a013201

- Bretthauer, R. K., & Castellino, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 193–200. doi: 10.1111/j.1470-8744.1999.tb00770.x
- Byrne, B. (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32, 9–17. doi: 10.1016/j.sbi.2015.01.005
- Çalık, P., İnankur, B., Soyaslan, E. Ş., Şahin, M., Taşpınar, H., Açıık, E., & Bayraktar, E. (2010). Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 226–233. doi: 10.1002/jctb.2292
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329–332. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00330-0
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
- Chai, Q., Wang, L., Liu, C. H., & Ge, B. (2020). New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(9), 901–913. doi: 10.1038/s41423-020-0502-z
- 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(2–3), 163–173. doi: 10.1007/BF02787771
- Choi, J. C., Jarlsberg, L. G., Grinsdale, J. A., Osmond, D. H., Higashi, J., Hopewell, P. C., & Kato-Maeda, M. (2015). Reduced sensitivity of the QuantiFERON-TB₆ test in diabetic patients with smear-negative tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(5), 582–588. doi: 10.5588/ijtld.14.0553
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 11(8), 905–910. doi: 10.1038/nbt0893-905
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., & Batt, C. A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31–39. doi: 10.1007/s00253-011-3654-z
- Daniel, T. M. (1989). The chemical composition of immunoaffinity-purified *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5. *American Review of Respiratory Disease*, 139(6), 1566–1567. doi: 10.1164/ajrccm/139.6.1566b

- Davidow, A., Kanaujia, G. V., Shi, L., Kaviar, J., Guo, X., Sung, N., Kaplan, G., Menzies, D., & Gennaro, M. L. (2005). Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection site. *Infection and Immunity*, 73(10), 6846–6851. doi: 10.1128/IAI.73.10.6846-6851.2005
- De Schutter, K., Lin, Y. C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van De Peer, Y., & Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6), 561–566. doi: 10.1038/nbt.1544
- De Wachter, C., Van Landuyt, L., & Callewaert, N. (2018). Engineering of yeast glycoprotein expression. in advances in glycobiochemistry (Vol. 175, pp. 93–135). doi: 10.1007/10_2018_69
- Dobos, K. M., Khoo, K.-H., Swiderek, K. M., Brennan, P. J., & Belisle, J. T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2498–2506. doi: 10.1128/jb.178.9.2498-2506.1996
- Dorman, S. E., Belknap, R., Graviss, E. A., Reves, R., Schluger, N., Weinfurter, P., Wang, Y., Cronin, W., Hirsch-Moverman, Y., Teeter, L. D., Parker, M., Garrett, D. O., & Daley, C. L. (2014). Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(1), 77–87. doi: 10.1164/rccm.201302-0365OC
- Duman, J. G., Miele, R. G., Liang, H., Grella, D. K., Lee Sim, K., Castellino, F. J., & Bretthauer, R. K. (1998). O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 28(1), 39–45. doi: 10.1111/j.1470-8744.1998.tb00510.x
- Esparza, M., Palomares, B., García, T., Espinosa, P., Zenteno, E., & Mancilla, R. (2015). PstS-1, the 38-kDa mycobacterium tuberculosis glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(1), 46–55. doi: 10.1111/sji.12249
- Espitia, C., Elinos, M., Hernandez-Pando, R., & Mancilla, R. (1992). Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-Kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infection and Immunity*, 60(7), 2998–3001. doi: 10.1128/iai.60.7.2998-3001.1992
- Farsiani, H., Mosavat, A., Soleimanpour, S., Sadeghian, H., Akbari Eydgahi, M. R., Ghazvini, K., Sankian, M., Aryan, E., Jamehdar, S. A., & Rezaee, S. A. (2016). Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6:CFP-10 complex. *Molecular BioSystems*, 12(7), 2189–2201. doi: 10.1039/c6mb00174b

- Flores, L. L., Steingart, K. R., Dendukuri, N., Schiller, I., Minion, J., Pai, M., Ramsay, A., Henry, M., & Laal, S. (2011). Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, *18*(10), 1616–1627. doi: 10.1128/CVI.05205-11
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., & Menart, V. (2002). Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. *TheScientificWorldJournal*, *2*, 1312–1325. doi: 10.1100/tsw.2002.215
- Fonseca, D. P. A. J., Benaissa-Trouw, B., Van Engelen, M., Kraaijeveld, C. A., Snippe, H., & Verheul, A. F. M. (2001). Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infection and Immunity*, *69*(8), 4839–4845. doi: 10.1128/IAI.69.8.4839-4845.2001
- Gamboa-Suasnavart, R. A., Valdez-Cruz, N. A., Cordova-Dávalos, L. E., Martínez-Sotelo, J. A., Servín-González, L., Espitia, C., & Trujillo-Roldán, M. A. (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*. doi: 10.1186/1475-2859-10-110
- García-González, G., Ascacio-Martínez, J. Á., Hernández-Bello, R., González, G. M., & Palma-Nicolás, J. P. (2021). Expression of recombinant protease MarP from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* and its effect on human monocytes. *Biotechnology Letters*, *43*(9), 1787–1798. doi: 10.1007/s10529-021-03149-3
- García-Ruiz, V., Orduña, P., Castillo-Rodal, A. I., Flores-Rodríguez, T. J., & López-Vidal, Y. (2022). Proteome profile changes induced by heterologous overexpression of *Mycobacterium tuberculosis*-derived antigens PstS-1 (Rv0934) and Ag85B (Rv1886c) in *Mycobacterium microti*. *Biomolecules*, *12*(1836). doi: 10.3390/biom12121836
- Garfoot, A. L., Goughenour, K. D., Wüthrich, M., Rajaram, M. V. S., Schlesinger, L. S., Klein, B. S., & Rappleye, C. A. (2018). O-mannosylation of proteins enables *Histoplasma* yeast survival at mammalian body temperatures. *MBio*, *9*(1). doi: 10.1128/mBio.02121-17
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Totowa, NJ: Humana Press. doi: 10.1385/1-59259-890-0:571
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., & Van Der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison. *FEMS Yeast Research*, *5*(11), 1079–1096. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.06.004

- Gentsch, M., & Tanner, W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*, 7(4), 481–486. doi: 10.1093/glycob/7.4.481
- González-Zamorano, M., Mendoza-Hernández, G., Xolalpa, W., Parada, C., Vallecillo, A. J., Bigi, F., & Espitia, C. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-Lectin affinity capture of mannosylated proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 721–733. doi: 10.1021/pr800756a
- Halliwell, C. M., Morgan, G., Ou, C. P., & Cass, A. E. (2001). Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Analytical Biochemistry*, 295(2), 257–261. doi: 10.1006/abio.2001.5182
- Harboe, M., & Wiker, H. G. (1992). The 38-kDa Protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review. *Journal of Infectious Diseases*, 166, 874–884. doi: 10.1093/infdis/166.4.874
- Hartner, F. S., & Glieder, A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories*, 5(39). doi: 10.1186/1475-2859-5-39
- Häusler, A., Ballout, L., Ballout, C. E., & Robbins, P. W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an α -1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *PNAS*, 89, 6846–6850. doi: 10.1073/pnas.89.15.6846
- Hazeu, W., & Donker, R. A. (1983). A continuous culture study of methanol and formate utilization by the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 5(6), 399–404. doi: 10.1007/BF00131280
- Herrmann, J. L., Delahay, R., Gallagher, A., Robertson, B., & Young, D. (2000). Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system. *FEBS Letters*, 473(3), 358–362. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01553-2
- Horn, C., Namane, A., Pescher, P., Rivière, M., Romain, F., Puzo, G., Bâzou, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32023–32030. doi: 10.1074/jbc.274.45.32023
- Huynh, K. K., Joshi, S. A., & Brown, E. J. (2011). A delicate dance: host response to mycobacteria. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 464–472. doi: 10.1016/j.coi.2011.06.002
- Hwang, W. H., Lee, W. K., Ryoo, S. W., Yoo, K. Y., & Tae, G. S. (2014). Expression, purification and improved antigenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PstS1 antigen for serodiagnosis. *Protein Expression and Purification*, 95, 77–83. doi: 10.1016/j.pep.2013.11.011

- Ihssen, J., Kowarik, M., Dilettoso, S., Tanner, C., Wacker, M., & Thöny-Meyer, L. (2010). Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 9(61). doi: 10.1186/1475-2859-9-61
- Inan, M., & Meagi-ier, M. M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 585–589. doi: 10.1263/jbb.92.585
- Jung, S. B., Yang, C. S., Lee, J. S., Shin, A. R., Jung, S. S., Son, J. W., Harding, C. V., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T. H., Song, C. H., & Jo, E. K. (2006). The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and Immunity*, 74(5), 2686–2696. doi: 10.1128/IAI.74.5.2686-2696.2006
- Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L. E., & Schlesinger, L. S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 987–999. doi: 10.1084/jem.20051239
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867–5881. doi: 10.1002/jcp.29583
- Kazenwadel, C., Klebensberger, J., Richter, S., Pfannstiel, J., Gerken, U., Pickel, B., Schaller, A., & Hauer, B. (2013). Optimized expression of the dirigent protein AtDIR6 in *Pichia pastoris* and impact of glycosylation on protein structure and function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7215–7227. doi: 10.1007/s00253-012-4579-x
- Kebriaei, A., Derakhshan, M., Meshkat, Z., Eidgahi, M. R. A., Rezaee, S. A., Farsiani, H., Mosavat, A., Soleimanpour, S., & Ghazvini, K. (2016). Construction and immunogenicity of a new Fc-based subunit vaccine candidate against *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, 43(9), 911–922. doi: 10.1007/s11033-016-4024-9
- Kelly, S. M., & Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), 349–384. doi: 10.2174/1389203003381315
- Khurshid, S., Afzal, M., Khalid, R., Akhtar, M. W., & Qazi, M. H. (2017). Potential of multi-component antigens for tuberculosis diagnosis. *Biologicals*, 48, 109–113. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.04.004
- Khurshid, S., Khalid, R., Afzal, M., & Akhtar, M. W. (2013). Truncation of PstS1 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* improves diagnostic efficiency. *Tuberculosis*, 93(6), 654–659. doi: 10.1016/j.tube.2013.07.005

- Kirschner, D. E., Young, D., & Flynn, J. L. (2010). Tuberculosis: global approaches to a global disease. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 524–531. doi: 10.1016/j.copbio.2010.06.002
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 252–255. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.01.005
- Kumar, Pawan. (2021). A perspective on the success and failure of BCG. *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.778028
- Kumar, Priti, Amara, R. R., Challu, V. K., Chadda, V. K., & 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. doi: 10.1128/IAI.71.4.1929-1937.2003
- Kunnath-Velayudhan, S., Salamon, H., Wang, H. Y., Davidow, A. L., Molina, D. M., Huynh, V. T., Cirillo, D. M., Michel, G., Talbot, E. A., Perkins, M. D., Felgner, P. L., Liang, X., & Gennaro, M. L. (2010). Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *PNAS*, 107(33), 14703–14708. doi: 10.1073/pnas.1009080107
- Lengeler, K. B., Tielker, D., & Ernst, J. F. (2008). Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(4), 528–544. doi: 10.1007/s00018-007-7409-z
- Li, H., Liu, L., Zhang, W., Zhang, X., Zheng, J., Li, L., Zhu, X., Yang, Q., Zhang, M., Liu, H., Chen, X., & Jin, Q. (2019). Analysis of the antigenic properties of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, 9(1), 3042. doi: 10.1038/s41598-019-39402-z
- Li, J.-L., Huang, X.-Y., Chen, H.-B., Wang, X.-J., Zhu, C.-Z., Zhao, M., Song, Q.-D., Huang, H.-Y., Xiao, L., & He, X.-Y. (2015). Simultaneous detection of IgG and IgM antibodies against a recombinant polyprotein PstS1-LEP for tuberculosis diagnosis. *Infectious Diseases*, 47(9), 643–649. doi: 10.3109/23744235.2015.1043941
- Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2010). Understanding latent tuberculosis: a moving target. *The Journal of Immunology*, 185(1), 15–22. doi: 10.4049/jimmunol.0903856
- Lin, P. L., Ford, C. B., Coleman, M. T., Myers, A. J., Gawande, R., Ioerger, T., Sacchettini, J., Fortune, S. M., & Flynn, J. L. (2014). Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nature Medicine*, 20(1), 75–79. doi: 10.1038/nm.3412
- Liu, C. F., Tonini, L., Malaga, W., Beau, M., Stella, A., Bouyssié, D., Jackson, M. C., Nigou, J., Puzo, G., Guilhot, C., Burlet-Schiltz, O., & Rivière, M. (2013). Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is

- crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS*, 110(16), 6560–6565. doi: 10.1073/pnas.1219704110
- Lönnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B. G., Dye, C., & Raviglione, M. (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. *Social Science & Medicine*, 68(12), 2240–2246. doi: 10.1016/j.socscimed.2009.03.041
- Looser, V., Lüthy, D., Straumann, M., Hecht, K., Melzoch, K., & Kovar, K. (2017). Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3163–3176. doi: 10.1007/s00253-017-8123-x
- López-Vidal, Y., De León-Rosales, S. P., Castañón-Arreola, M., Rangel-Frausto, M. S., Meléndez-Herrada, E., & Sada-Díaz, E. (2004). Response of IFN- γ and IgG to ESAT-6 and 38 kDa recombinant proteins and their peptides from *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients and asymptomatic household contacts may indicate possible early-stage infection in the latter. *Archives of Medical Research*, 35(4), 308–317. doi: 10.1016/j.arcmed.2004.04.008
- Luecke, H., & Quioco, F. A. (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature*, 347(6291), 402–406. doi: 10.1038/347402a0
- Luong, M., Lam, J. S., Chen, J., & Levitz, S. M. (2007). Effects of fungal N- and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. *Vaccine*, 25(22), 4340–4344. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.027
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Oise Bussereau, F., Jacquet, M., & Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15527–15531. doi: 10.1074/jbc.272.24.15527
- Målen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., & Wiker, H. G. (2007). Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*, 7(10), 1702–1718. doi: 10.1002/pmic.200600853
- Marino, S., & Kirschner, D. E. (2004). The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node. *Journal of Theoretical Biology*, 227(4), 463–486. doi: 10.1016/j.jtbi.2003.11.023
- Mazurek, G. H., Jereb, J., Lobue, P., Iademarco, M. F., Metchock, B., Vernon, A., & Division of Tuberculosis Elimination, N. C. for H. S. and T. P. C. for D. C. and P. (CDC). (2005). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR. Recommendations and Reports*, 54(RR-15), 49–55.

- Mori, T., Sakatani, M., Yamagishi, F., Takashima, T., Kawabe, Y., Nagao, K., Shigeto, E., Harada, N., Mitarai, S., Okada, M., Suzuki, K., Inoue, Y., Tsuyuguchi, K., Sasaki, Y., Mazurek, G. H., & Tsuyuguchi, I. (2004). Specific detection of tuberculosis infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(1), 59–64. doi: 10.1164/rccm.200402-179oc
- Mosavat, A., Soleimanpour, S., Farsiani, H., Sadeghian, H., Ghazvini, K., Sankian, M., Jamehdar, S. A., & Rezaee, S. A. (2016). Fused *Mycobacterium tuberculosis* multi-stage immunogens with an Fc-delivery system as a promising approach for the development of a tuberculosis vaccine. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 39, 163–172. doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.027
- Mustafa, A. S. (2002). Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunology*, 39, 113–119. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00048-2
- 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 Pathogens*, 9(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1003705
- Neubert, P., Halim, A., Zauser, M., Essig, A., Joshi, H. J., Zatorska, E., Larsen, I. S. B., Loibl, M., Castells-Ballester, J., Aebi, M., Clausen, H., & Strahl, S. (2016). Mapping the O-mannose glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(4), 1323–1337. doi: 10.1074/mcp.M115.057505
- Nigou, J. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*, 85(1–2), 153–166. doi: 10.1016/S0300-9084(03)00048-8
- Ohi, H., Miura, M., Hiramatsu, R., & Ohmura, T. (1994). The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Molecular & General Genetics: MGG*, 243(5), 489–499. doi: 10.1007/BF00284196
- Olsen, A. W., Van Pinxteren, L. A. H., Okkels, L. M., Rasmussen, P. B., & Andersen, P. (2001). Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Infection and Immunity*, 69(5), 2773–2778. doi: 10.1128/IAI.69.5.2773-2778.2001
- Ottenhoff, T. H. M., & Kaufmann, S. H. E. (2012). Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogens*, 8(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1002607
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrdp.2016.76

- Paulová, L., Hyka, P., Branská, B., Melzoch, K., & Kovar, K. (2012). Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut+. *Journal of Biotechnology*, *157*(1), 180–188. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.010
- Piubelli, L., Campa, M., Temporini, C., Binda, E., Mangione, F., Amicosante, M., Terreni, M., Marinelli, F., & Pollegioni, L. (2013). Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microbial Cell Factories*, *12*(115). Retrieved from <http://www.expasy.org/>
- Polanco, C., Castañón-González, J. A., Mancilla, R., Buhse, T., Samaniego, J. L., & Gimbel, A. (2015). Identification of proteins associated with *Mycobacterium tuberculosis* virulence pathway by their polar profile. *Acta Biochimica Polonica*, *62*(2), 191–196. doi: 10.18388/abp.2014_874
- Proszynski, T. J., Simons, K., & Bagnat, M. (2004). O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(4), 1533–1543. doi: 10.1091/mbc.E03-07-0511
- Pukazhvanthen, P., Anbarasu, D., Kabeer Basirudeen, S. A., Raja, A., & Singh, M. (2014). Assessing humoral immune response of 4 recombinant antigens for serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, *94*(6), 622–633. doi: 10.1016/j.tube.2014.09.006
- Quiocho, F. A., & Ledvina, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Molecular Microbiology*, *20*(1), 17–25. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02484.x
- Ragas, A., Roussel, L., Puzo, G., & Rivière, 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. doi: 10.1074/jbc.M610183200
- Rajaram, M. V. S., Ni, B., Morris, J. D., Brooks, M. N., Carlson, T. K., Bakthavachalu, B., Schoenberg, D. R., Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *PNAS*, *108*(42), 17408–17413. doi: 10.1073/pnas.1112660108
- Rao, S., Gefroh, E., & Kaltenbrunner, O. (2012). Recovery modeling of tangential flow systems. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(12), 3084–3092. doi: 10.1002/bit.24577
- Roche. (2010). *Trypsin, recombinant, proteomics grade*. Retrieved from www.roche-applied-science.com
- Roche. (2021). *Endoproteinase Lys-C Sequencing Grade from Lysobacter enzymogenes*.

- Romain, F., Horn, C., Pescher, P., Namane, A., Riviere, M., Puzo, G., Barzu, O., & Marchal, 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. doi: 10.1128/IAI.67.11.5567-5572.1999
- Romero, P. A., Lussier, M., Véronneau, S., Sdicu, A.-M., Herscovics, A., & Bussey, H. (1999). Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of α -1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*, 9(10), 1045–1051. doi: 10.1093/glycob/9.10.1045
- Sainsbury, F., Jutras, P. V., Vorster, J., Goulet, M.-C., & Michaud, D. (2016). A chimeric affinity tag for efficient expression and chromatographic purification of heterologous proteins from plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00141
- Sanchez, A., Espinosa, P., Esparza, M. A., Colon, M., Bernal, G., & Mancilla, R. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(1), 20–28. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02193.x
- Serra-Vidal, M. del M., Latorre, I., Franken, K. L. C. M., Díaz, J., de Souza-Galvão, M. L., Casas, I., Maldonado, J., Milà, C., Solsona, J., Jimenez-Fuentes, M. Á., Altet, N., Lacoma, A., Ruiz-Manzano, J., Ausina, V., Prat, C., Ottenhoff, T. H. M., & Domínguez, J. (2014). Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 5(517). doi: 10.3389/fmicb.2014.00517
- Shi, S., Yu, L., Sun, D., Liu, J., & Hickey, A. J. (2010). Rational design of multiple TB antigens TB10.4 and TB10.4-Ag85B as subunit vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmaceutical Research*, 27(2), 224–234. doi: 10.1007/s11095-009-9995-y
- Silva, V. M. C., Kanaujia, G., Gennaro, M. L., & Menzies, D. (2003). Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7(5), 478–484.
- Singh, M., Andersen, A. B., McCarthy, J. E. G., Rohde, M., Schütte, H., Sanders, E., & Timmis, K. N. (1992). The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen: overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Gene*, 117, 53–60. doi: 10.1016/0378-1119(92)90489-c
- Smith, G. T., Sweredoski, M. J., & Hess, S. (2014). O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *Journal of Proteomics*, 97, 296–306. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.011
- Soleimanpour, S., Farsiani, H., Mosavat, A., Ghazvini, K., Eydgahi, M. R. A., Sankian, M., Sadeghian, H., Meshkat, Z., & Rezaee, S. A. (2015). APC targeting enhances immunogenicity of a novel

multistage Fc-fusion tuberculosis vaccine in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10467–10480. doi: 10.1007/s00253-015-6952-z

Sousa, A. O., Henry, S., Marója, F. M., Lee, F. K., Brum, L., Singh, M., Lagrange, P. H., & Aucouturier, P. (1998). IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 111(1), 48–55. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00452.x

Steingart, K. R., Flores, L. L., Dendukuri, N., Schiller, I., Laal, S., Ramsay, A., Hopewell, P. C., & Pai, M. (2011). Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: An updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pmed.1001062

Swartz, J. R., & Cooney, C. L. (1981). Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(5), 1206–1213. doi: 10.1128/aem.41.5.1206-1213.1981

Tachioka, M., Sugimoto, N., Nakamura, A., Sunagawa, N., Ishida, T., Uchiyama, T., Igarashi, K., & Samejima, M. (2016). Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). doi: 10.1186/s13068-016-0613-z

Tallieux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., Lagrange, P. H., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 121–127. doi: 10.1084/jem.20021468

Tanyaratsrisakul, S., Malainual, N., Jirapongsananuruk, O., Smith, W. A., Thomas, W. R., & Piboonpocanun, S. (2010). Structural and IgE binding analyses of recombinant Der p 2 expressed from the hosts *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151(3), 190–198. doi: 10.1159/000242356

Teng, X., Chen, X., Zhu, K., & Xu, H. (2018). Immunogenicity of heparin-binding hemagglutinin expressed by *Pichia pastoris* GS115 strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(2), 219–224. doi: 10.22038/IJBMS.2018.24280.6064

Tiwari, D., Tiwari, R. P., Chandra, R., Bisen, P. S., & Haque, S. (2014). Efficient ELISA for diagnosis of active tuberculosis employing a cocktail of secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Folia Biologica (Praha)*, 60(1), 10–20.

- Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2010). Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. In *Tuberculosis* (Vol. 90, Issue 2, pp. 84–93). doi: 10.1016/j.tube.2010.02.003
- Trimble, R. B., Lubowski, C., Hauer, C. R., Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T. R., & Kumar, S. A. (2004). Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, *14*(3), 265–274. doi: 10.1093/glycob/cwh036
- Trujillo-Roldan, M. A., Pena, C., Ramirez, O. T., & Galindo, E. (2001). Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnology Progress*, *17*(6), 1042–1048. doi: 10.1021/bp010106d
- 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 (Chichester, England)*, *12*(6), 541–553. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6%3C541::AID-YEA935%3E3.0.CO;2-A
- Uma Devi, K. R., Ramalingam, B., Brennan, P. J., Narayanan, P. R., & Raja, A. (2001). Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, *81*(3), 249–253. doi: 10.1054/tube.2001.0293
- van Els, C. A. C. M., Corbière, V., Smits, K., van Gaans-van den Brink, J. A. M., Poelen, M. C. M., Mascart, F., Meiring, H. D., & Locht, C. (2014). Toward understanding the essence of post-translational modifications for the *Mycobacterium tuberculosis* immunoproteome. *Frontiers in Immunology*, *5*(361). doi: 10.3389/fimmu.2014.00361
- van Kooyk, Y., & Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, *9*(6), 593–601. doi: 10.1038/ni.f.203
- VanderVen, B. C., Harder, J. D., Crick, D. C., & Belisle, J. T. (2005). Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science*, *309*(5736), 941–943. doi: 10.1126/science.1114347
- Vervecken, W., Kaigorodov, V., Callewaert, N., Geysens, S., De Vusser, K., & Contreras, R. (2004). In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(5), 2639–2646. doi: 10.1128/AEM.70.5.2639-2646.2004
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, *5*. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
- Villeneuve, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., Daffe, M., Maridonneau-Parini, I., & Astarie-Dequeker, C. (2003). Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium*

- smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51291–51300. doi: 10.1074/jbc.M306554200
- Vordermeier, H.-M., Harris, D. P., Moreno, C., Singh, M., & Ivanyi, J. (1995). The nature of the immunogen determines the specificity of antibodies and T cells to selected peptides of the 38 kDa mycobacterial antigen. *International Immunology*, 7(4), 559–566. doi: 10.1093/intimm/7.4.559
- Vyas, N. K., Vyas, M. N., & Quioco, F. A. (2003). Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor. *Structure*, 11(7), 765–774. doi: 10.1016/S0969-2126(03)00109-6
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992–1000. doi: 10.1038/nbt.3040
- Wang, S., Wang, Y., Wang, P. G., Chen, M., & Kong, Y. (2018). High level expression and glycosylation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Ala-Pro-rich antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 150, 67–71. doi: 10.1016/J.PEP.2018.05.004
- Watson, A., Li, H., Ma, B., Weiss, R., Bendayan, D., Abramovitz, L., Ben-Shalom, N., Mor, M., Pinko, E., Bar Oz, M., Wang, Z., Du, F., Lu, Y., Rybniker, J., Dahan, R., Huang, H., Barkan, D., Xiang, Y., Javid, B., & Freund, N. T. (2021). Human antibodies targeting a *Mycobacterium* transporter protein mediate protection against tuberculosis. *Nature Communications*, 12(1), 602. doi: 10.1038/s41467-021-20930-0
- Wiedemann, C., Bellstedt, P., & Görlach, M. (2013). CAPITO - A web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics*, 29(14), 1750–1757. doi: 10.1093/bioinformatics/btt278
- Wilkinson, K. A., Newton, S. M., Stewart, G. R., Martineau, A. R., Patel, J., Sullivan, S. M., Herrmann, J. L., Neyrolles, O., Young, D. B., & Wilkinson, R. J. (2009). Genetic determination of the effect of post-translational modification on the innate immune response to the 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiology*, 9(93). doi: 10.1186/1471-2180-9-93
- Wilkinson, R. J., Hasløv, K., Rappuoli, R., Giovannoni, F., Narayanan, P. R., Desai, C. R., Vordermeier, H. M., Paulsen, J., Pasvol, G., Ivanyi, J., & Singh, A. M. (1997). Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 553–557. doi: 10.1128/jcm.35.3.553-557.1997
- Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J., & Strahl, S. (2003). O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), 621–630. doi: 10.1016/J.SBI.2003.09.003

- Woo, J. H., Liu, Y. Y., & Neville, D. M. (2006). Minimization of aggregation of secreted bivalent anti-human T cell immunotoxin in *Pichia pastoris* bioreactor culture by optimizing culture conditions for protein secretion. *Journal of Biotechnology*, *121*(1), 75–85. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.07.004
- Woo, M., Wood, C., Kwon, D., Park, K. H. P., Fejer, G., & Delorme, V. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* infection and innate responses in a new model of lung alveolar macrophages. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAR). doi: 10.3389/fimmu.2018.00438
- World Health Organization. (2011). An international roadmap for tuberculosis research towards a world free of tuberculosis. Retrieved from http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html
- World Health Organization. (2022). Global Tuberculosis Report 2022. Retrieved from <http://apps.who.int/bookorders>.
- Wu, J., & Filutowicz, M. (1999). Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochimica Polonica*, *46*(3), 591–599.
- Wu, X., Yang, Y., Zhang, J., Li, B., Liang, Y., Zhang, C., Dong, M., Cheng, H., & He, J. (2010). Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, *17*(3), 372–375. doi: 10.1128/CVI.00287-09
- Yamada, T., Uyeda, A., Otsu, M., Matsushima, M., Sekiguchi, K., & Kikuchi, M. (1994). Site-specific O-glycosylation of cell adhesive lysozyme in yeast. *Biochemistry*, *33*(13), 3885–3889. doi: 10.1021/bi00179a013
- Young, D., Kent, L., Rees, A., Lamb, J., & Ivanyi, J. (1986). Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, *54*(1), 177–183. doi: 10.1128/iai.54.1.177-183.1986
- Young, Y. B., Suk, A. K., Kim, J. S., Euh, H. J., Bai, G. H., Cho, S. N., & Yu, S. K. (2004). Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: Identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics*, *4*(11), 3299–3307. doi: 10.1002/pmic.200400980
- Zellweger, J. P., Sotgiu, G., Corradi, M., & Durando, P. (2020). The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB). *La Medicina Del Lavoro*, *111*(3), 170–183. doi: 10.23749/mdl.v111i3.9983
- Zhu, X., Venkataprasad, N., Thangaraj, H. S., Hill, M., Singh, M., Ivanyi, J., & Vordermeier, H. M. (1997). Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*(12), 5921–5926.

Zuñiga, J., Torres-García, D., Santos-Mendoza, T., Rodríguez-Reyna, T. S., Granados, J., & Yunis, E. J. (2012). Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. doi: 10.1155/2012/193923

Bando-Campos et al. *Microb Cell Fact* (2019) 18:11
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1059-3>

Microbial Cell Factories

RESEARCH

Open Access



Recombinant O-mannosylated protein production (PstS-1) from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a tool to study tuberculosis infection

Giroshi Bando-Campos^{1†}, Daniel Juárez-López^{1†}, Sergio A. Román-González², Antonia I. Castillo-Rodal³, Clarita Olvera⁴, Yolanda López-Vidal³, Roberto Arreguín-Espinosa⁵, Clara Espitia⁶, Mauricio A. Trujillo-Roldán⁷ and Norma A. Valdez-Cruz^{1*}

Abstract

Background: *Pichia pastoris* (syn. *Komagataella phaffii*) is one of the most highly utilized eukaryotic expression systems for the production of heterologous glycoproteins, being able to perform both N- and O-mannosylation. In this study, we present the expression in *P. pastoris* of an O-mannosylated recombinant version of the 38 kDa glycolipoprotein PstS-1 from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), that is similar in primary structure to the native secreted protein.

Results: The recombinant PstS-1 (rPstS-1) was produced without the native lipidation signal. Glycoprotein expression was under the control of the methanol-inducible promoter pAOX1, with secretion being directed by the α -mating factor secretion signal. Production of rPstS-1 was carried out in baffled shake flasks (BSFs) and controlled bioreactors. A production up to ~46 mg/L of the recombinant protein was achieved in both the BSFs and the bioreactors. The recombinant protein was recovered from the supernatant and purified in three steps, achieving a preparation with 98% electrophoretic purity. The primary and secondary structures of the recombinant protein were characterized, as well as its O-mannosylation pattern. Furthermore, a cross-reactivity analysis using serum antibodies from patients with active tuberculosis demonstrated recognition of the recombinant glycoprotein, indirectly indicating the similarity between the recombinant PstS-1 and the native protein from *Mtb*.

Conclusions: rPstS-1 (98.9% sequence identity, O-mannosylated, and without tags) was produced and secreted by *P. pastoris*, demonstrating that this yeast is a useful cell factory that could also be used to produce other glycosylated *Mtb* antigens. The rPstS-1 could be used as a tool for studying the role of this molecule during *Mtb* infection, and to develop and improve vaccines or kits based on the recombinant protein for serodiagnosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Antigen, Glycoprotein, *Pichia pastoris*, PstS-1, O-mannosylation, *Komagataella phaffii*

*Correspondence: adri@biomedicas.unam.mx

†Giroshi Bando-Campos and Daniel Juárez-López contributed equally to this work

¹ Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510 Ciudad de México, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Pulmonary tuberculosis (TB) is caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and is the second most prevalent infectious disease in the world. In 2016, the World Health Organization reported 10.4 million new TB infections, and 1.3 million deaths due to disease complications, in addition to the fact that about a quarter of the world population is suspected to be infected with the mycobacterium in a clinically latent form [1]. In the same year, it was estimated that approximately 600,000 people developed multidrug-resistance (MDR) to TB [1]. These data reflect the urgency in understanding the pathogenicity of *Mtb*, as well as the necessity to develop new therapeutic alternatives to treat or prevent the disease. The interaction of this bacillus with the host has been extensively studied for a long time, with the research effort focusing on its virulence factors, such as antigens [2–8]. The production of recombinant *Mtb* antigens is important in several aspects of *Mtb* research, for example, in studying antigen interactions and their effect in vivo and in vitro [9–13], in the designing effective vaccines against *Mtb* [14, 15], as well as in developing diagnostic tools for TB [2, 3, 8, 16, 17]. In fact, the use of recombinant antigens to detect both latent and active TB provides for a simpler and more accurate diagnosis compared to other diagnostic tests in use today, such as the purified protein derivative (PPD) skin test or the QuantiFERON®-TB test [18–21]. For these reasons, it is important to be able to produce antigens with conformations that are as similar as possible to the native antigens produced by the mycobacteria so they can be used as reagents in the development of diagnostic tools or vaccines.

Mtb produces a variety of secreted protein antigens and these can be found in culture supernatants. Some of these, such as Rv2164c, Rv3491, Rv0175, Rv1887, Rv1096, Rv2068c, Rv2744c, Rv2799, Rv3835, and Rv1860, among others, are modified by the addition of mannose residues [22–25]. This post-translational modification could contribute to virulence, colonization, and invasion of the host cell [16, 22, 26, 27]. However, the significance of the *O*-mannosylation of glycoproteins in infection and the host innate immune response is poorly understood. Previously, it has been demonstrated that the *O*-mannosylation pattern of the alanine and proline-rich protein (APA), which is an immunodominant secreted antigen from *Mtb*, determines its activity [24, 28, 29]. Native APA induces a potent, delayed-type hypersensitivity response, and stimulates the priming of T-cells in vitro and in vivo, in contrast to the non-glycosylated recombinant APA produced in *E. coli* [28, 29]. Moreover, antibodies derived from human TB patients react strongly with the *O*-glycosylated form of APA, whereas the non-glycosylated protein is unable to bind to these antibodies [30]. In

addition, it has been suggested that the protective properties of the anti-tuberculosis vaccine are related to the pattern of *O*-mannosylation generated by *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin [27–29, 31]. Other *O*-mannosylated proteins are also potent *Mtb* antigens such as PstS-1, LpqH, and LprG [23, 32, 33], in which their glycan structures have been suggested to interact with host receptors, such as DC-SIGN on human dendritic cells [34], Toll-like receptors [35], and mannose receptors [36].

The *Mtb* phosphate-binding protein PstS-1 (Rv0934, PhoS1 or PBP-1) is an antigenic glycolipoprotein that is produced and secreted by *Mtb*. This 38 kDa antigen is composed of 374 amino acids including a signal peptide that is proteolytically removed to generate a mature protein of 351 residues, which is then exported to the outer membrane surface of *Mtb* [37–39]. This antigen belongs to the ABC type phosphate transport system [40, 41] and its accumulation in the cell wall increases in response to an absence of phosphate in the culture medium [41]. Importantly, this protein induces a strong immune response and causes adaptive protective immunity in mice [42, 43] and humans [38, 44]; furthermore, it has been reported to be associated with the active form of TB [45, 46]. Although it is known that the native antigen is also *O*-mannosylated [23, 36], the exact sites of its *O*-glycosylation remain unclear. Using a predictive tool to analyze several *Mtb* glycoproteins, it has been proposed that PstS-1 has three *O*-glycosylation sites, most probably at threonines 20, 21, and 28 at the N-terminus [47]. To date, the crystallographic structure of native PstS-1 has not been determined.

In yeasts such as *S. cerevisiae*, *O*-mannosylation is also an important post-translational protein modification, playing roles in the composition of cell walls, cellular differentiation, septation and viability in fission yeast, vesicle delivery, and virulence [48–51]. *O*-linked mannosylation in yeasts occurs through the attachment of mannose glycans to a serine or threonine residue on substrate proteins entering the ER-Golgi pathway, through a series of mannosyltransferases [52–54]. Interestingly, the *O*-mannosylation pathways between yeast organisms and actinomycetes like *M. tuberculosis* are evolutionarily conserved [53]. *O*-mannosylation in actinomycetes, occurs in a manner such that mannose residues are α -1,2-linked to serine or threonine residues on proteins residing in bacterial membranes [55–58]. Similarly, in *Pichia pastoris*, the *O*-linked glycans produced are linear chains of four to five α -1,2-linked mannose residues [56, 59], whereas *S. cerevisiae* generates α -1,2 and α -1,3-linked mannose residues [60–62] in the highly *O*-mannosylated form [53]. Hence, the methylotrophic yeast *P. pastoris* is preferred over *S. cerevisiae* as a heterologous system to produce glycoantigens from *Mtb*, because their mannose chains

are shorter [63], and mimics the modifications performed by *Mtb*. This was demonstrated during the production of the antigen rCFP32 in *P. pastoris*, which, compared with the rCFP32 produced in *E. coli*, resulting in a rCFP32 protein that was majorly immunoreactive, as assessed by in vitro antibody production and the serum titers from tuberculosis patients [64, 65]. Furthermore, the use of a heterologous system based on the methylotrophic *P. pastoris* results in a high productivity for recombinant proteins under conditions that are free from endotoxins and viral DNA [66–68]. *P. pastoris* is thereby now considered a safe organism, in which several human biopharmaceuticals have been produced [69].

Thus, with the intention of producing the glycoantigen PstS-1 with post-translational characteristics similar to that of the native antigen produced by *Mtb*, and to avoid the use of harmful *Mtb* which requires long cultivation periods, we describe here the production of a non-tagged recombinant *O*-mannosylated glycoantigen PstS-1. This work describes the production on the laboratory scale (shake flasks and bioreactors) of a recombinant form of the *O*-mannosylated glycoantigen PstS-1 (rPstS-1, 98.9% sequence identity to the native protein), its purification and characterization, some of its *O*-mannosylation modifications, and its immunological reactivity by sera from patients diagnosed with tuberculosis. The production of this glycoprotein will aid in the study of its immunological activity and will be useful as a diagnostic tool and/or as a vaccine against TB.

Results and discussion

Development of strains secreting rPstS-1

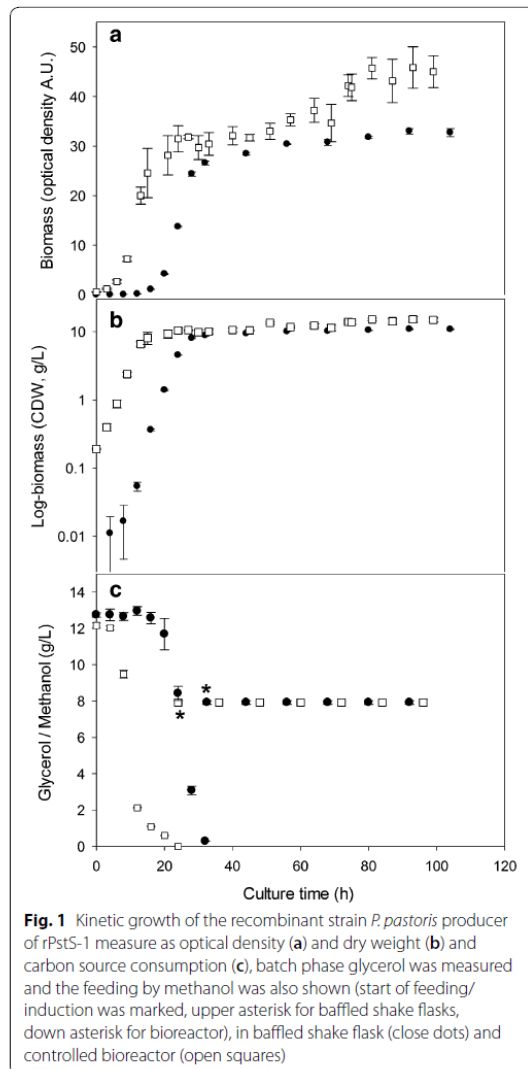
The gene sequence encoding *M. tuberculosis* PstS-1 (Rv0934) (GenBank number: P9WGU1) was synthesized, accommodating for the preferential codon usage in *P. pastoris* [70, 71]. The synthesized DNA also excluded the nucleotide sequences encoding amino acids 1–21 (MKIRLHTLLAVLTAAPLLAA) of the 23 amino acids that form the signal peptide. The two amino acids in the signal peptide that were retained were Ala-Gly (22–23). The retention of these avoids lipidation of the Cys residue (residue 24), which would normally be present at the N-terminus of the mature processed protein. Moreover, since two amino acids (N57 and N247), were predicted to be potential N-glycosylation sites (NetNGlyc 1.0.), these residues were substituted with glutamines (N55Q and N247Q) to maintain a conformation similar to that of native PstS-1 [72, 73]. The synthesized coding sequence was then cloned downstream of the α -mating factor in the vector pPICZ α B, conserving the open reading frame, and under the control of the *P. pastoris* alcohol oxidase 1 promoter (pAOX1). This promoter is tightly regulated by methanol; however, its transcriptional regulatory

mechanism has only partially been described [74]. Induction of the pAOX1 promoter requires the lack of a repressing carbon source, such as glycerol; the depletion of such a carbon source results in a slight de-repression of the promoter. In addition, methanol (the inducible carbon source) causes significant pAOX1 de-repression, normally resulting in production of the enzymes required for methanol utilization [66, 74–76]. Here, rPstS-1 was expressed without tags because these might alter the biological or physicochemical properties compared to native or unlabeled proteins [77–80]. The constructed plasmid was verified by PCR and sequencing. Since *P. pastoris* X-33 was transformed with this recombinant plasmid, *P. pastoris* X-33 was also transformed with the empty plasmid vector as a control. YPD agar medium supplemented with Zeocin™ was used to select for recombinant yeasts. The selected clones were cultured in a 50 mL BMGY culture which was then used to inoculate a 250 mL culture in BSF, and after 32 h in BMMY media and following the addition of 5, 10, or 20 mL/L of methanol, the growth and production of rPstS-1 were compared. After 60 h of culture an increase in production of approximately 15–20% was observed when adding 10 mL/L methanol, compared to 5 and 20 mL/L of methanol (data not shown). As previously reported, the methanol concentration appears to affect the productivity depending on the clone [81].

Use of baffled shake flasks and bioreactor cultures of *P. pastoris* to produce rPstS-1

The *P. pastoris* X-33 clone producing rPstS-1 was characterized with regard to its growth in 50 mL of BMGY in BSFs at 30 °C and 250 rpm. After complete glycerol consumption (32 h), all the cells were transferred to 50 mL of BMMY containing 1% methanol (10 mL/L), which was fed every 12 h, and followed until 73 h post induction. In BMGY media, the maximal biomass reached was 26.6 ± 0.4 A.U. (8.8 ± 0.2 g/L), with a pre-induction specific growth rate of 0.323 ± 0.025 /h (Fig. 1a, Table 1). In BMMY, used to induce rPstS-1 expression, the maximal biomass achieved was 32.7 ± 0.8 A.U. (10.8 ± 0.3 g/L) (Fig. 1a, Table 1), with a post-induction specific growth rate of 0.003 ± 0.001 /h (Table 1). Approximately a 23% higher level of biomass accumulated after induction. A specific glycerol consumption rate (q_g) of 0.021 ± 0.004 g_{Glyc}/g_{DCW} h and a yield of biomass per glycerol consumed of 0.69 ± 0.01 g_{DCW}/g_{glycerol} were obtained. The biomass to methanol yield was 0.051 ± 0.004 g_{DCW}/g_{methanol}.

The *P. pastoris* X-33 clone producing rPstS-1 was also characterized in bioreactor cultures. For this, a typical feeding profile for a carbon source was used; this started with a batch culture in glycerol (BMGY), and when an increase in the dissolved oxygen tension (DOT)



was observed (as a result of the exhaustion of the carbon source), the methanol fed-batch phase was started. This strategy was followed to avoid methanol accumulating to high levels, which could cause the accumulation of formaldehyde to toxic levels [82, 83]. Using glycerol as a carbon source, a maximal biomass of 10.4 ± 0.9 g/L was obtained (Fig. 1, Table 1). Glycerol depletion was observed after 24 h of culture. After consumption of the glycerol, methanol feeding (10 mL/L) was performed every 12 h to induce expression of the rPstS-1 (Fig. 1c). A maximal biomass of 15.5 ± 0.9 g/L was obtained at the

end of the culture, achieving around a 49% higher biomass level following the addition of methanol (Table 1).

A comparison between the BSFs and bioreactor cultures showed there to be similar specific growth rates during the *P. pastoris* X-33 (rPstS-1) batch growth phase in the glycerol containing culture medium, which is similar to previously reported results [84, 85]. However, during the methanol induction phase, the specific growth rate double in the bioreactors compared to the BSFs. Additionally, the maximal biomass reached in the bioreactors was higher in both BMGY and BMMY, being around 19 and 43% higher, respectively, compared to that in the BSFs (Table 1). This might be caused by the limited oxygen transfer in the BSFs compared to the bioreactor cultures [86–88], thereby affecting the post-induction specific growth rate [83]. Differences in biomass/glycerol yield were also observed, with a 17% lower in the BSFs compared to the bioreactor cultures. Moreover, the yields obtained in this study are in agreement with those reported by Chiruvolu et al. [89], who reported values between 0.70 and 0.78 g_{DCW}/g_{Glyc} for bioreactors without pH control and 0.62 g_{DCW}/g_{Glyc} in shake flasks. No significant differences were observed in glycerol consumption rate (q_s) between the bioreactor and BSF cultures.

Production of rPstS-1, its characterization by SDS-PAGE, and immunodetection

At the end of the BSFs culture, the total protein content of the supernatant was 127 ± 15 mg/L. A densitometric analysis of the secreted proteins by SDS-PAGE (Fig. 2a) showed that the rPstS-1 protein (~38 kDa) represented ~36% (46 ± 5 mg/L, Table 1) of the total secreted protein. After the induction in the BSFs, relatively low-levels of extracellular host proteins were detected (Fig. 2a, time 0 post-induction), which is one advantage of producing recombinant proteins in *P. pastoris* [66, 90].

After 72 h of induction with methanol in the bioreactor cultures, the total protein content of the supernatant was 185 ± 9 mg/L (Table 1). The level of secreted rPstS-1 in the supernatant was 46 ± 4 mg/L (Fig. 2b, Table 1). To confirm the identity of rPstS-1, the supernatant was analyzed by a western blot assay using a polyclonal antibody anti-pstS1 (Fig. 2c). The 38 kDa protein was confirmed to be rPstS-1 and interestingly, there were no apparent sign of protein degradation, nor was rPstS-1 detected in the supernatant before methanol induction (Fig. 2c).

It is important to note that although there was a 69% higher level of total protein in the supernatant produced in the bioreactors compared to the BSFs, the absolute levels of rPstS-1 were similar (46 ± 5 and 46 ± 4 mg/L, in the BSFs and bioreactor, respectively). As a result, there was a decrease in the specific production rate of rPstS-1 in the bioreactors (32% lower than the BSFs, Table 1), while

Table 1 Stoichiometric and kinetic parameters of *P. pastoris* growth and rPstS-1 production cultured in baffled shake flasks and in 1.0 L bioreactors

Parameter	Baffled shake flask	Bioreactor
Max O.D. 600 nm glycerol (A.U.)	26.5 ± 0.4	31.5 ± 2.2 ^b
Max O.D. 600 nm methanol (A.U.)	32.7 ± 0.8	47.0 ± 2.6 ^a
Max biomass glycerol (g/L)	8.8 ± 0.2 g/L	10.4 ± 0.9 ^b
Max biomass methanol (g/L)	10.8 ± 0.3 g/L	15.5 ± 0.9 ^a
μ glycerol (/h)	0.323 ± 0.025	0.286 ± 0.033
μ methanol (/h)	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.001 ^b
Y _{x/s} (g _{DCW} /g _{Glyc})	0.69 ± 0.01	0.81 ± 0.03 ^b
Y _{x/s} (g _{DCW} /g _{Meth})	0.051 ± 0.004	0.092 ± 0.004 ^a
q _s (g _{Glyc} /g _{DCW} h)	0.021 ± 0.004	0.034 ± 0.013
Supernatant total protein (mg/L)	127 ± 15	185 ± 9 ^a
Y _{STP/DCW} (mg _{STP} /g _{DCW})	11.75 ± 1.13	11.92 ± 0.59
rPstS-1 (mg/L)	46 ± 5	46 ± 4
q _{rPstS-1} (mg/L h)	0.639 ± 0.070	0.633 ± 0.054
q _{p(rPstS-1)} (mg _{rPstS-1} /g _{DCW} h)	0.059 ± 0.002	0.040 ± 0.004 ^a
Y _{rPstS-1/x} (mg _{rPstS-1} /g _{DCW})	3.3 ± 0.01	4.0 ± 0.02 ^a

The mean and standard deviation for at least three biological replicates are shown

O.D., optical density; A.U., absorbance units; μ, specific growth rate; STP, supernatant total protein; DCW, dry cell weight; Y_{x/s}, total dry cell weight yield per glycerol; Y_{x/s}, total dry cell weight yield per methanol; Y_{STP/DCW}, STP yield per DCW; q_s, specific consumption rate of glycerol per DCW; q_{rPstS-1}, volumetric productivity of rPstS-1; q_{p(rPstS-1)}, specific productivity of rPstS-1; Y_{rPstS-1/x}, rPstS-1 yield per DCW. μ was calculated in first 8 h of culture

p value was calculated using t test by comparing the results of Shake flask VS Bioreactor

^a p < 0.005; ^b p < 0.05

the volumetric production rate of rPstS-1 in both systems was the same (Table 1). The level of accumulation of the folded rPstS-1 protein in *P. pastoris* was almost three times higher per liter compared to previous published bacterial system [91].

Purification of rPstS-1 from supernatants

Purification of rPstS-1 from the *P. pastoris* bioreactor culture supernatant was carried out by ultrafiltration, which is often used as an alternative method to the affinity chromatography procedures used for tagged proteins and does not require any refolding steps, in comparison with other bioprocesses [91, 92]. Thus, rPstS-1 was purified in a three-step procedure: first, the culture was clarified by tangential filtration (100 kDa); then, the supernatant was subjected to another tangential filtration (10 kDa); and finally, RP-HPLC was used. The two tangential filtrations gave recoveries of 41% and 29%, respectively (Table 2). After the RP-HPLC step, a recovery of 4 mg/L of rPstS-1, with a purity of 98% was obtained, with a retention time of 20 min, eluting in H₂O:ACN:TFA (50:50:0.1) (Fig. 3c). Furthermore, the purification steps were monitored by SDS-PAGE (Fig. 3a), and the densitometric analysis

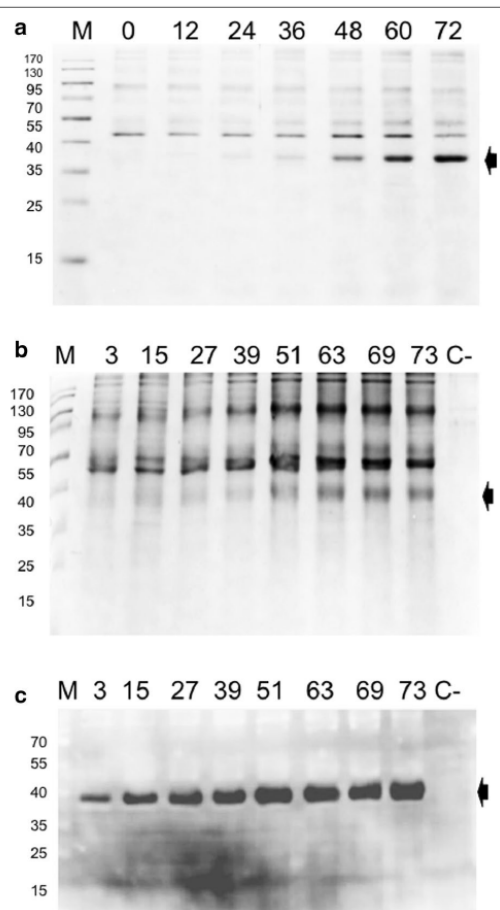


Fig. 2 Total protein analysis from culture supernatant. **a** SDS-PAGE 12% of protein obtained from baffled shake flask cultures, **b** SDS-PAGE 12% of protein obtained from bioreactor supernatants. Black arrows indicate the band corresponding to rPstS-1. **c** Immunodetection of rPstS-1 from bioreactor supernatants with the polyclonal antibody anti-PstS1, black arrows indicate the immunodetected recombinant protein. The post-induction time for each sample taken is indicated at the top of each lane. M, molecular weight; C-, negative control; supernatant sample from a wild type *P. pastoris* X-33 culture

of SDS-PAGE showed a purity of up to 90% for rPstS-1 after the final step (Fig. 3a, line 4). Also, the presence of rPstS-1 during the different purification steps was followed by western blot (Fig. 3b). This study clearly demonstrates the utility of tangential filtration technology to purify *O*-mannosylated rPstS-1 without affinity tags, from a *P. pastoris* culture supernatant. It should be noted that the technology presented here is scalable and can be applied for the large-scale production of rPstS-1 and other *Mtb* antigens produced in a similar fashion.

Table 2 Summary of purification of rPstS-1

Purification stage	Recovery of total protein (mg/L) ^a	rPstS-1 (mg/L) ^a	Recovery %	Purity %
Total protein from supernatant	185 ± 9	46 ± 4	100	25 ± 3
Ultrafiltration (> 100 kDa)	80.0 ± 2.9	18.9 ± 5.0	41.0 ± 14.9	23.5 ± 5.4
Ultrafiltration (100–10 kDa)	49.0 ± 3.4	13.2 ± 4.2	28.6 ± 7.1	26.5 ± 6.7
Reverse phase chromatography	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.2	9.1 ± 1.1	97.7 ± 0.6

^a Total supernatant protein was calculated by Bradford method. The rPstS-1 protein was calculated by densitometry in gel after each stage of purification, and each protein purification step was calculated per liter of initial cell culture volume

Structural conformation of rPstS-1

The secondary structure of rPstS-1 was determined using far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy. At both the rPstS-1 concentrations tested, the spectra obtained at 25 °C showed a maximum negative peak at 207 nm, in addition to a broad peak between 212 and 219 nm, and a positive peak at 197 nm, (Fig. 4). A molar ellipticity of $-4916.67 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$ was obtained for rPstS-1 at 0.125 mg/mL and $-4209.29 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$ for rPstS-1 at 0.250 mg/mL concentration. Analysis of the CD spectrum of rPstS-1 using CAPITO [93] showed a secondary structure consisting of 10% α -helix, 38% beta sheets, and 56% disordered structures for rPstS-1 at 0.125 mg/mL. Moreover, at 0.250 mg/mL rPstS-1 the spectrum showed 5% α -helix, 40% β -sheets, and 53% disordered structures (Fig. 4, Table 3). The high content of β -sheets is in agreement with the CD spectrum of the purified native denaturated and refolded 38 kDa protein obtained from a H37Rv culture, which showed a negative broad peak at 212 nm and a positive peak at 190 nm, suggesting a high β -sheet content [12].

On the other hand, the spectra of rPstS-1 produced in *E. coli* showed a maximum negative peak at 209 nm with a broad peak around 218 nm at both protein concentrations (Fig. 4). The rPstS-1 expressed in *E. coli* showed an increased α -helix content (16% α -helix at 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20% α -helix at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 4, Table 3).

The data obtained in this study show peaks that are similar to those in the CD spectrum obtained from the recombinant 38 kDa reference antigen from the WHO bank, which has negative peaks at 208 nm and 225 nm [12], and also the spectrum from the full length rPstS-1 expressed in *E. coli* which also shows negative peaks at 208 nm and 218 nm, in addition to a positive peak at 190 nm [92]. However, an analysis of the rPstS-1 secondary structure using CDNN software showed that rPstS-1 expressed in *E. coli* had a conformation consisting of 40% α -helices and 8.9% antiparallel and 5.6% parallel β -sheets [93]. In addition, the data obtained from the X-ray structure of rPstS-1 expressed in *E. coli* showed a composition of 34% α -helices, 18% beta sheets, and 41% disordered structures (PDB accession No. 1PC3) [94].

The CD spectrum of rPstS-1 produced in *E. coli* points to a predominant α -helix peak (208 nm), which differs from the secondary structure suggested by the spectrum of the purified, denaturated, and refolded native 38 kDa antigen from H37Rv [12]. These differences might arise due to the tags added, the purification steps used, or the refolding process used for proteins expressed in *E. coli*. The data obtained in this study suggest that the secondary structure of rPstS-1 produced in *P. pastoris* differs from that produced in bacteria. Moreover, the rPstS-1 produced here has a β -sheet conformation that agrees with that observed for the native protein [12]. This is probably related to the *O*-mannosylation of rPstS-1, which is similar to the native protein expressed in *M. tuberculosis* which has approximately a 1% carbohydrate content [36]. Moreover, the rPstS-1 produced in *P. pastoris* was in a soluble form, thereby avoiding the need for a refolding step, which is needed for many proteins produced in *E. coli*. An understanding of how *O*-mannosylation affects the protein conformation is important to establish whether this modification is an important parameter for the correct folding of a protein.

Mass spectrometry analysis of the rPstS-1 antigen

The full amino acid sequence of the PstS-1 gene product deduced from the sequence of the *Mtb* consists of 374 residues, with a theoretical MW of 38,243 Da (UniProtKB P9WGU1). The first 23 amino acid residues form a signal peptide, which directs lipidation at the N-terminus [37]. In this study, rPstS-1 was produced without the first 21 amino acids to avoid lipidation, so the recombinant protein had a predicted MW of 36,059.36 Da, and this in agreement with the peak shown in Fig. 5a. A zoomed view of the peak (Fig. 5a inset) shows a family of different isoforms, probably arising to different post-translational modifications (PTMs), that might correspond to the attachment of hexose units, along with other types of modifications. It is worth mentioning that in the native PstS-1, the *O*-mannosylation pattern sites and the number of mannose units have not been determined. A prediction program (GlycoPP v1.0) [95] for prokaryotic glycosides indicated that there were 26

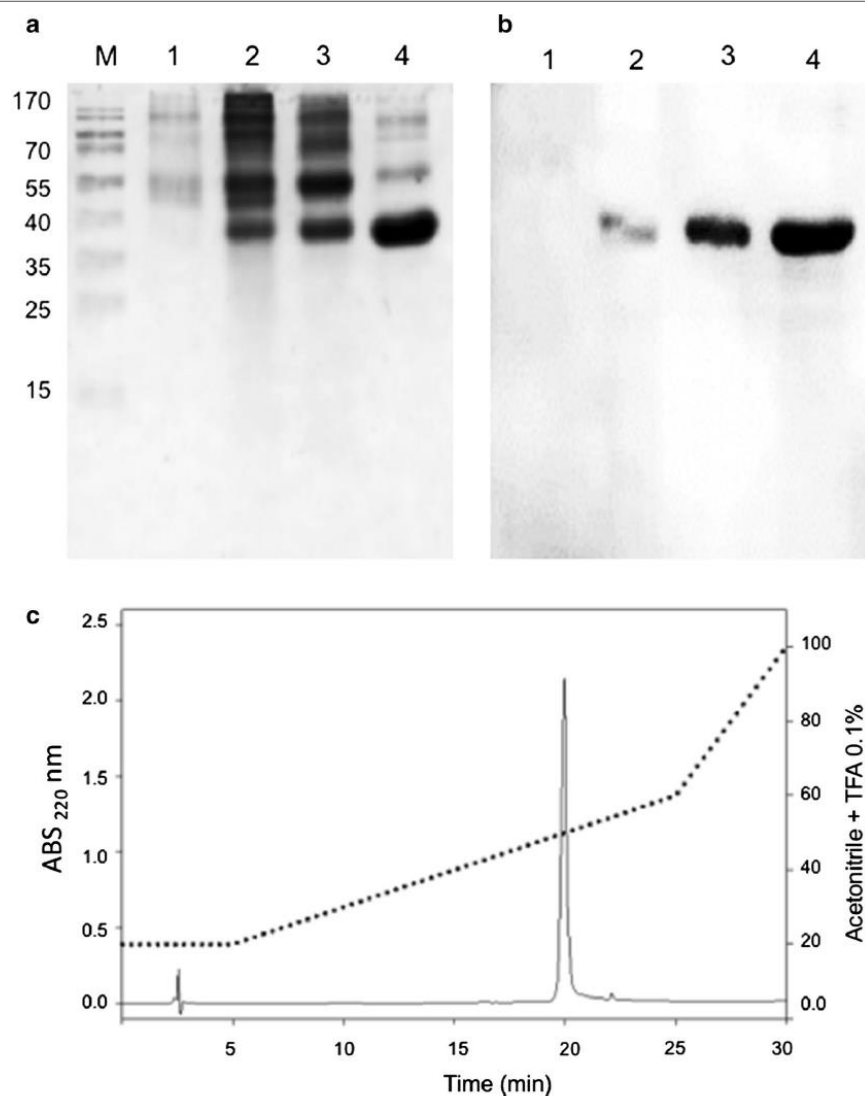


Fig. 3 Purification of rPstS-1. **a** SDS-PAGE 12% during purification process. **b** Immunodetection of protein obtained by ultrafiltration and RP-HPLC. **c** Separation of components obtained after tangential filtration in a XBridge Protein BEH C4 reverse-phase column, from which the component eluting at 20 min was shown to be homogeneous. The gradient started by 5 min at 20% of B, then separation was run from 20 to 60% solution B, over next 20 min, and the pure rPstS-1 eluted at 20.74 min. Lanes M: molecular weight marker; 1, total protein from supernatant of the 27 h growth in BMGY; 2, total protein from supernatant obtained after 72 h under induction; 3, 10–100 kDa protein cut off from tangential filtration; 4, protein purified by RP-HPLC

possible *O*-glycosylation sites in rPstS-1, with nine sites being localized at the N-terminus (in the first 25 amino acids).

In order to analyze the rPstS-1 amino acid sequence and *O*-mannosylation, rPstS-1 was digested with the

enzymes Lys-C or trypsin. The resulting peptides were analyzed by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) spectrometry. The theoretical fragment profile expected for trypsin or Lys-C digestion and the results obtained are shown in Tables 4 and

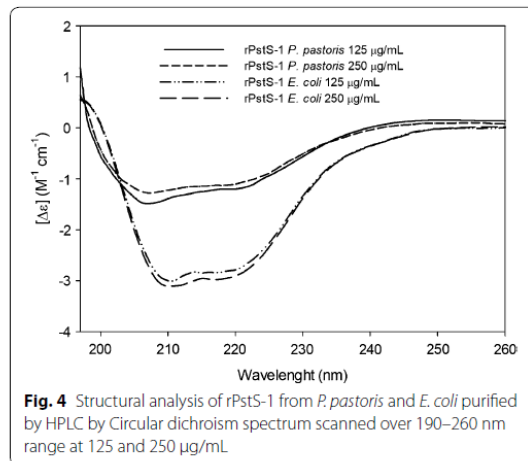


Fig. 4 Structural analysis of rPstS-1 from *P. pastoris* and *E. coli* purified by HPLC by Circular dichroism spectrum scanned over 190–260 nm range at 125 and 250 μg/mL

Table 3 Secondary structure of rPstS-1 from *P. pastoris* and *E. coli*. Comparative secondary structure content obtained by CD data analysis, NMR data and CAPITO server

	NMR [94] PDB: 1PC3	CAPITO (CD)			
		rPstS-1 from <i>E. coli</i>		rPstS-1 from <i>P. pastoris</i>	
		125 μg/ mL	250 μg/ mL	125 μg/ mL	250 μg/mL
Helix (%)	34	16	20	10	5
β-strand (%)	18	28	29	38	40
Irregular (%)	41	50	52	56	53

CAPITO CD Analysis & Plotting Tool [93], CD circular dichroism, NMR, nuclear magnetic resonance; PDB protein data bank

5, respectively. The peaks obtained from the digestions covered 83% of the sequence. These results indicate that the amino acids comprising to positions 55 to 97 and 138 to 342 were not modified by the addition of mannose residues. Around 20% of the peptide sequence obtained by MS/MS is presented in Additional file 1: Figure S1. In contrast, the N-terminal sequence formed by the first 97 amino acids (P1T) was not detected in either the peptides formed by trypsin digestion (P4T, P8T and P12T), or in those formed by Lys-C digestion (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P11, and P12) (Table 5). This could probably be due to a lack of ionization, the inherent hydrophobicity of the peptides, or the presence of hexose residues.

The peptide that was found to be mannosylated was P3T (aa. 98–123: GLMNIALAISAQVNYNLPGVSEHLK) which is located near the N-terminus, with 2, 4, and 5 mannose residues indicated by the addition of

162 Da per hexose (Fig. 5b, c; Tables 4, 5). In addition, P5T (aa. 128–138: VLAAMYQG**T**IK) was also found to have 6 hexose residues (Fig. 5b); whereas, P15T at the C-terminus (aa. 343–353: LSDALIA**T**ISS) was found to have 4 hexose residues attached (Fig. 5b). These three peptides contained serine or threonine residues (underlined), in accordance with them containing potential O-glycosylation sites (regions rich in S or T) as has been proposed to occur in *S. cerevisiae*. Attachment of the mannose residues appears to be performed in part by the protein-O-mannosyltransferase (PMT), which is conserved in yeasts and is similar to the enzymes found in *P. pastoris* [96, 97].

rPstS-1 sero-reactivity with human sera samples

With the intention of confirming the similarity of rPstS-1 to the 38 kDa native antigen, the sero-reactivity of rPstS-1 was assessed using an ELISA method. This was carried out using human serum samples from patients with clinically confirmed active TB, and compared with sera from subjects with both positive and negative PPD test, which did not present any clinical evidence of active TB. Thirty sera from patients with active TB (these characteristics are described in methods) showed a statistically positive response against the rPstS-1 produced in *P. pastoris*, compared with the positive and negative PPD groups (Fig. 6). To confirm the significance of the glycosylation pattern of rPstS-1 produced in *P. pastoris*, the sero-reactivity of the non-glycosylated rPstS-1 version produced by *E. coli* cultures [23] was also determined. The recognition of the rPstS-1 from *P. pastoris* by serum from IgG2 in patients with active tuberculosis were 3.2 and 3.5 -fold higher (mean values) than the PPD-negative and PPD-positive subjects, respectively (Fig. 6). Importantly, rPstS-1 produced in *P. pastoris* showed a statistically significant ($P < 0.05$) 2.0-fold (mean) higher recognition compared with the non-glycosylated His-tag-rPstS-1 produced in *E. coli* (Fig. 6). Recognition by IgG2 was used in this study, because it is known that it recognizes carbohydrates and protein antigens from bacteria [98, 99]. The recognition of *P. pastoris* rPstS-1 by sera from patients with TB suggested that the recombinant protein has a conformation close to the native protein. This might be related to the O-mannosylation of rPstS-1 that could improve recognition by TB serum compared to the recognition of the non-glycosylated rPstS-1 produced in *E. coli*. In other previously reported sero-reactivity experiments the detection of the rPstS-1 produced in *E. coli*, by antibodies derived from patients with TB varied from 36 to 77% [92, 100, 101], probably due to the lack of glycosylation of the protein.

Up until now, different diagnostic kits such as the PPD skin test or the QuantiFERON®-TB test have been

(See figure on next page.)

Fig. 5 MALDI-TOF spectra of HPLC purified rPstS-1 antigen. **a** Non-digested samples were placed on a CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) matrix and analyzed in a matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF, Bruker Microflex) equipment with a 20-Hz nitrogen laser at $\lambda = 337$ nm. Spectra was recorded in linear positive mode for the mass range 20,000 to 100,000 Da. **b** MALDI-TOF-MS analysis (linear mode) of a tryptic digest of rPstS-1, sample mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. **c** MALDI-TOF-MS analysis (linear mode) of a tryptic digest of rPstS-1, sample mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid matrices. **d** MALDI-TOF-MS analysis (linear mode) of a Lys-C digest of rPstS-1. Tryptic and Lys-C peptides marked denote mass peaks corresponding to predicted peptides shown in Tables 4 and 5, respectively. Mannose residues were detected with differences to theoretical and experimental data of 162 Da mark as Hex. All detections are presented in Table 4 and 5

developed, which are T cell based immune assays, and they do not distinguish between latent and active tuberculosis. The development of sero-diagnostic test using secreted protein antigens derived from *Mtb*, such as PstS-1, has been proposed. This is because these antigens are recognized by the TB patients' antibodies with high sensitivity and so this should aid in the development of sensitive diagnostics to distinguish between the inactive and active TB states [101–103].

To qualitatively estimate the antibody avidities for *P. pastoris* rPstS-1 and *E. coli* expressed His-tag-rPstS-1, we carried out western blot experiments [64] using a rabbit anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 polyclonal antibody and a human serum sample from a patient with clinically confirmed active TB. Additional file 2: Figure S2A shows that the anti-PstS-1 polyclonal antibody reacted strongly towards the *P. pastoris* rPstS-1 compared with the *E. coli* expressed His-Tag-rPstS-1. The relative band intensities (measured by densitometry), of 2.0 and 1.0 μg of *P. pastoris* rPstS-1 appeared to be 3.9 and 5.1 times higher than *E. coli* His-tag-rPstS-1, respectively, suggesting an increased immunoreactivity toward the *O*-mannosylated rPstS-1.

On the other hand, the relative band intensities for the human serum reactivity toward 2.0 and 1.0 μg of *P. pastoris* rPstS-1 appeared to be 2.5 and 1.2 times higher than *E. coli* His-tag-rPstS-1, respectively (note the band of around 38 kDa, Additional file 2: Figure S2B). Although, recognition of a protein with a high molecular weight in the *P. pastoris* rPstS-1 sample was observed, in the 2.0 μg *E. coli* rPstS-1 sample a protein of around 10 kDa was also detected, indicating there is low cross-reactivity between the experiments. The higher detection of *P. pastoris* rPstS-1 compared with *E. coli* rPstS-1 is probably due to posttranslational differences in the *P. pastoris* produced protein.

Conclusions

In this work, using *Pichia pastoris* as the heterologous host, we achieved the synthesis and production of an untagged recombinant *O*-mannosylated rPstS-1 antigen, containing all the predicted B-cell epitopes.

Under the BSF and bioreactor culture conditions tested, we were able to achieve an accumulation of around 46.2 ± 4.4 mg/L, which is three times more protein per liter compared to bacterial systems. Furthermore, we have shown the recovery and purification of rPstS-1 using a simple and efficient procedure, finally obtaining 4 mg/L rPstS-1 with 98% purity, after three purification steps, and without any need for a refolding step. The circular dichroism spectra of rPstS-1 produced in *P. pastoris* showed that there were differences with the structure reported for this protein produced in bacteria; the *O*-mannosylated rPstS-1 here had a high β -sheet content similar to the purified native 38 kDa PstS-1 recovered from a culture filtrate from *M. tuberculosis* H37Rv. Moreover, the conformational similarity of the *O*-mannosylated rPstS-1 produced to that of the native antigen (38 kDa), was confirmed indirectly by its ability to be recognized by antibodies derived from the sera of patients positive for tuberculosis, compared to the purified non-glycosylated version (His-tag-rPstS-1) produced in *E. coli*. The detection of *O*-mannosylated rPstS-1 by active TB serum, emphasizes the potential utility of this antigen for the development of a sensitive sero-diagnostic kit for TB detection using the *P. pastoris* recombinant system.

Methods

Reagents and strains

For culture media components, peptone, yeast extract, and agar were purchased from Difco™ (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), methanol, peptone, dextrose, and salts were from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA), and sorbitol and Triton X-100 were obtained from Merck (Billerica, MA, USA). For molecular biology reagents, Zeocin™, T4 ligase, and PCR reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), the PstI and KpnI restriction enzymes were purchased from Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany), and the plasmid purification kit Zyppy™ Plasmid Mini-prep Kit was bought from Zymo Research (Irvine, CA, USA). Protein precipitation, SDS-PAGE and western blotting reagents were purchased from Merck, and the Super Signal® West Pico Chemiluminescent substrate

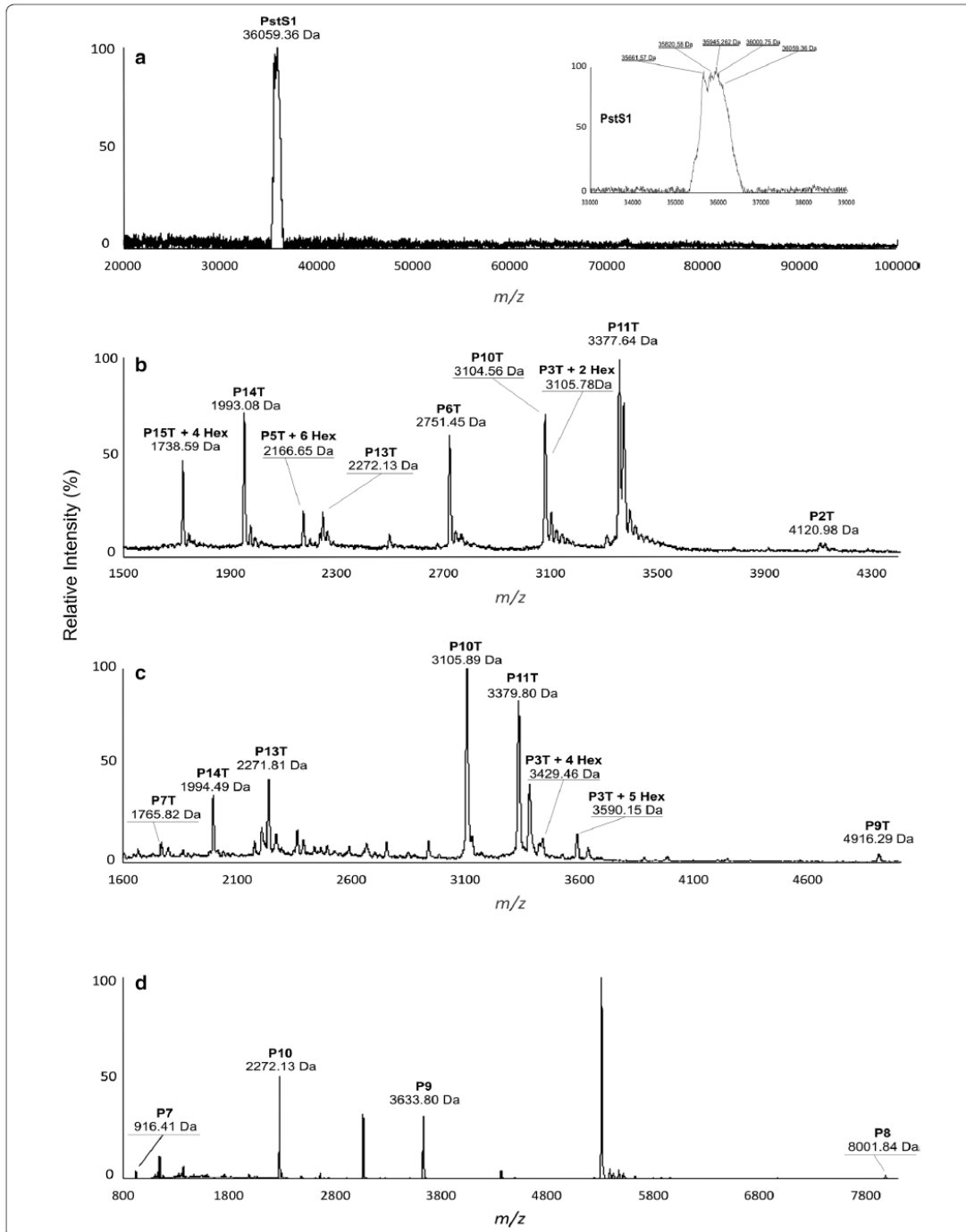


Table 4 Theoretical and obtained peptides mass generated by Trypsin digestion of rPstS-1 produced in *P. pastoris*

Peptide name	Position of cleavage site	Peptide	Length (aa)	Theoretical Peptide mass (Da)	Modification	Peptide mass (Da)
P1T	54	AGCGSKPPSGSPETGAGAGTVATTPASSPVTLA ETGSTLLYLPLNLWGPAFHER	54	5315.900		ND
P2T	97	YQVTTITAQGTGSGAGIAQAAAAGTVNIGASDAYL SEGDMAAHK	43	4122.489		B) 4120.98
P3T	123	GLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLK	26	2781.222 +2 Hex 3105.22 +4 Hex 3429.22 +5 Hex 3591.22	P3T + 2 Hex P3T + 4 Hex P3T + 5 Hex	B) 3105.78 C) 3429.46 C) 3590.15
P4T	127	LNGK	4	430.504		ND
P5T	138	VLAAMYQGTIK	11	1194.455	P5T + 6 Hex	B) 2166.65
P6T	164	TWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHR	26	2752.125		B) 2751.45
P7T	180	SDGSGDTFLFTQYLSK	16	1765.894		C) 1765.82
P8T	188	QDPEGWGK	8	915.958		ND
P9T	238	SPGFGTTVDFFAVPGALGENGNMGMTGCAE TPGCVAYIGISFLDQASQR	50	4918.459		C) 4916.29
P10T	270	GLGEAQLGQSSGNFLLPDAQSIQAAAAGFASK	32	3105.411		B) 3104.56 C) 3105.89
P11T	301	TPANQAISMIDGPAPDGYPIINYEYAVNNR	31	3378.761		B) 3377.64 C) 3379.80
P12T	303	QK	2	274.320		ND
P13T	324	DAATAQLQAFLHWAITDGNK	21	2272.502		B) 2272.13 C) 2271.81
P14T	342	ASFLDQVHFQPLPPAVVK	18	1993.336		B) 1993.08 C) 1994.49
P15T	353	LSDALIATISS	11	1090.239	P15T + 4 Hex	B) 1738.59

Mark of B) and C) referred the mass spectra from Fig. 4b and c, respectively

Hex hexose, ND no determined, T trypsin, aa amino acids

Table 5 Theoretical and obtained peptides mass generated by Lys-C digestion of rPstS-1 produced in *P. pastoris*

Peptide name	Position of cleavage site	Peptide	Length (aa)	Theoretical Peptide mass (Da)	Modification	Peptide mass (Da)
P1	6	AGCGSK	6	521.589		ND
P2	97	PPSGSPETGAGAGTVATTPASSPVTLAETGSTL LYPLFNLWGPAFHERYQVTTITAQGTGSGAGIA QAAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHK	91	8916.801		ND
P3	123	GLMNIALAISAQQVNYNLPGVSEHLK	26	2781.222		ND
P4	127	LNGK	4	430.504		ND
P5	138	VLAAMYQGTIK	11	1194.455		ND
P6	180	TWDDPQIAALNPGVNLPGTAVVPLHRSDGSGD TFLFTQYLSK	42	4500.004		ND
P7	188	QDPEGWGK	8	915.958		D) 916.41
P8	270	SPGFGTTVDFFAVPGALGENGNMGMTGCAE TPGCVAYIGISFLDQASQRGLGEAQLGQSSGN FLLPDAQSIQAAAAGFASK	82	8005.854		D) 8001.84
P9	303	TPANQAISMIDGPAPDGYPIINYEYAVNNRQK	33	3635.065		D) 3633.80
P10	324	DAATAQLQAFLHWAITDGNK	21	2272.502		D) 2272.13
P11	342	ASFLDQVHFQPLPPAVVK	18	1993.336		ND
P12	353	LSDALIATISS	11	1090.239		ND

Mark of D) referred the mass spectrum from Fig. 4d

Hex hexose, ND no determined

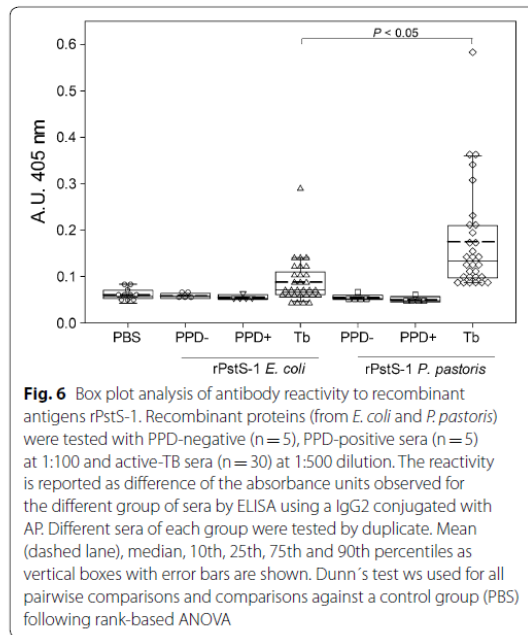


Fig. 6 Box plot analysis of antibody reactivity to recombinant antigens rPstS-1. Recombinant proteins (from *E. coli* and *P. pastoris*) were tested with PPD-negative ($n = 5$), PPD-positive sera ($n = 5$) at 1:100 and active-TB sera ($n = 30$) at 1:500 dilution. The reactivity is reported as difference of the absorbance units observed for the different group of sera by ELISA using a IgG2 conjugated with AP. Different sera of each group were tested by duplicate. Mean (dashed line), median, 10th, 25th, 75th and 90th percentiles as vertical boxes with error bars are shown. Dunn's test was used for all pairwise comparisons and comparisons against a control group (PBS) following rank-based ANOVA

was purchased from ThermoFisher Scientific. The HPLC grade reagents acetonitrile and trifluoroacetic acid were purchased from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Plasmid propagation and subcloning steps were carried out in One Shot™ TOP 10 chemically competent *E. coli* purchased from ThermoFisher Scientific and cultured in Luria–Bertani medium (Merck). The expression of rPstS-1 was carried out in *Pichia pastoris* X-33 using the pPICZαB vector (ThermoFisher Scientific). *E. coli* His-tagged-rPstS-1 was expressed as previously described [23].

Vector construction: pPICZαB-PstS1

The gene sequence encoding PstS1 (Rv0934) was obtained from GenBank ID No. 885724. This nucleotide sequence was then modified to create the preferential codon usage for *P. pastoris* [70, 71]. To avoid N-glycosylation, the asparagines at residues 57 and 247 were substituted with glutamines [79]. The optimized sequence was chemically synthesized and cloned into the pUC57 plasmid by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The recombinant vector pPICZαB-PstS-1 was obtained from ligation of the chemically synthesized gene, previously digested with PstI and KpnI, to the pPICZαB vector using T4 DNA ligase. The fragment was inserted into pPICZαB downstream of the α-mating factor secretion signal and under the control of the AOX1 (alcohol oxidase 1) promoter. A stop codon

(TAA) was incorporated at the 3' end of the sequence. The recombinant plasmid pPICZαB-PstS-1 containing the coding sequence for the non-tagged PstS-1 was then propagated using One Shot™ TOP 10 chemically competent *E. coli* cultured in Luria–Bertani medium containing 25 μg/mL Zeocin™. The plasmid was purified and the sequence of the insert determined. The resulting pPICZαB-PstS-1 plasmid was linearized and used to transform electro-competent *P. pastoris* X-33 suspended in 1 M sorbitol, at a setting of 1.5 kV, 25 μF, and 186 ohms for the BTX Electroporation System (Genetronics, San Diego, CA, USA). Transformed cells were selected using YPD agar (yeast extract 10 g/L, dextrose 20 g/L, peptone 20 g/L, 1 M sorbitol, and agar 20 g/L) supplemented with Zeocin™ (100 μg/mL) at 30 °C. Positive clones were then stored in 1.0 mL cryovials at –80 °C in 20% glycerol. The clones producing the highest protein expression levels of rPstS-1 were selected using SDS-PAGE.

Analytical methods

Pichia pastoris growth was determined by measuring the OD₆₀₀ (Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Scientific). Biomass was evaluated by measuring dry weight; 5 mL of culture was filtered through a 0.45 μm pore size membrane (Merck-Millipore, Billerica, MA, USA), and washed once with one volume of distilled water. The biomass obtained was dried for 24 h in an oven at 65 °C, then placed for 1 h in a desiccator, and weighed thereafter. The supernatant was used to measure glycerol consumption using a colorimetric method previously described by Müller et al. [104]. Methanol consumption was determined using the Biochemistry Analyzer YSI 2900 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA).

Production of *P. pastoris* rPstS-1 in shaker flasks and bioreactors

Baffled shake flasks (BSF, 250 mL, Duran® Erlenmeyer flask, narrow neck, Borosilicate Glass, Mainz, Germany) containing 50 mL of BMGY media (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glycerol 10 mL/L, and 100 mM potassium phosphate, initial pH of 6.0) were inoculated with 200 μL of culture from cryovials of the selected clone. After the glycerol was depleted, the cells were harvested by centrifugation at 6300×g for 15 min and the resulting pellet was resuspended in 50 mL of BMMY (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, methanol 10 mL/L, and 100 mM potassium phosphate, pH 6.0). All cultures were incubated at 30 °C in an orbital shaker at 250 rpm (New Brunswick Scientific C251, Eppendorf Inc., Enfield, CT, USA).

For bioreactor experiments (containing 1.0 L of BMGY medium, Applikon Biotechnology, Netherlands), the medium was inoculated with BSF cultures at an initial OD₆₀₀ of 0.5 AU. The BSF inoculum was derived by

inoculating 50 mL of YPD with one vial of the selected clone and incubating at 30 °C and 250 rpm for 24 h. Bioreactor cultures were carried out at 29 °C, without pH control and the dissolved oxygen tension (DOT) was set at 35% (with respect to air saturation) and controlled by cascade, changing the agitation speed (between 200 and 1000 rpm), maintaining an airflow of 1.0 L/min (1 vvm) using a proportional-integral-derivative (PID) control strategy [105]. DOT, temperature, agitation and pH values were acquired and controlled by the ADI-1010 and BioXpert® software (Applikon Biotechnology). The total consumption of glycerol (12.6 g/L) was assumed to have occurred when 95% of the DOT was reached, at which point the induction phase was started by the addition of methanol (7.9 g/L). Each time the DOT reached above 80%, the feeding of methanol (7.9 g/L) was done. Samples were collected every 6 h (1.0 mL), the supernatants were obtained by centrifugation at 8000×g, and frozen for further analysis. All cultures were grown as three independent replicates and the results are expressed as the mean ± standard deviation.

Production of *E. coli* rPstS-1 in bioreactors

The *Escherichia coli* (strain DE3) used to produce rPstS-1 was grown in a bioreactor (1.0 L Luria-Bertani culture medium, Applikon Biotechnology). The bioreactor cultures were carried out at 37 °C, without pH control, and the DOT was set at 35% (with respect to air saturation) and controlled by cascade changing the agitation speed (between 200 and 1000 rpm), maintaining an airflow of 1.0 L/min (1 vvm) using a proportional-integral-derivative (PID) control strategy [105]. After 4 h of growth (OD_{600} near 1.5 A.U.) the induction phase was started by the addition of 0.1 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). After 4 h of induction ($O.D._{600}$ of 5.9 AU), the biomass was recovered by centrifugation. The cell suspension was sonicated in lysis buffer containing 0.5% (v/v) Triton X-100 and the samples were centrifuged (10,000×g for 10 min). The recombinant PstS-1 was produced in inclusion bodies, which were solubilized using a denaturation buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl, pH 8).

Total protein quantification, SDS-PAGE, and western blotting

The concentration of total soluble proteins in the supernatants was determined using a Bradford protein assay (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA) following the supplier's recommendations. Calibration curves were prepared using bovine serum albumin. Samples and standards were prepared as triplicates and absorbances measured at 595 nm using a plate reader (Stat Fax 4200, Awareness Technology, Palm City, FL, USA). Total protein from

500 μ L of supernatant was precipitated with 1 volume of trichloroacetic acid (30%) in cold acetone. Precipitation was carried out overnight at -20 °C followed by centrifugation at 14,000×g for 25 min. Pellets were washed with acetone (80%), dried at 60 °C for 5 min, and then were suspended in 20 μ L of Milli-Q water. The precipitated samples were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE gels [106]. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 the stained gels imaged using Image-Lab™ software and the Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad Inc, USA). A pre-stained protein ladder PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to assess molecular mass.

To detect recombinant proteins by western blot, the proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon-P™ membrane. The transblotted membranes were blocked with skimmed milk (5%) in phosphate-buffered saline (PBS) containing Tween-20 (0.05%). After three washes with PBS-Tween-20, the membranes were incubated with an anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 polyclonal antibody (ArtNr: OACA02044. Aviva System Biology Co., San Diego, CA, USA; diluted to 1/2000) for 1 h at room temperature. After incubation, the membranes were washed twice with PBS-Tween 20 and incubated with peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin G antibodies diluted 1/2000, at room temperature for 30 min. Membranes were again washed twice with PBS-Tween, and the immunoreactive bands revealed by chemiluminescence (Thermo Scientific, SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate). The bands were visualized using a C-digital scanner (LICOR, NE, USA).

For a comparative study of the ability of the antigens to be recognized by an antibody, western blot experiments were performed [64] using three different amounts (2, 1, and 0.5 μ g) of rPstS-1 produced in either *P. pastoris* or *E. coli*. The membrane was incubated with a rabbit anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 polyclonal antibody (ArtNr: OACA02044. Aviva System Biology Co. USA; diluted 1/2000) for 1 h at room temperature, or with a human serum sample (diluted 1/300 in TBS) from a patient with clinically confirmed active TB, and incubated overnight at 4 °C. The bound antibodies were detected using HRP conjugated a goat anti-human IgG-Fc (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA, Cat. No. A80-104P-92) at 1/12,000 dilution in TBS for 2 h at room temperature. The purified rPstS-1 proteins from *P. pastoris* and *E. coli* were quantified using a Bradford protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) following the supplier's recommendations. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (Thermo Scientific, SuperSignal®

West Pico Chemiluminescent Substrate), and band visualization was performed using a C-digital scanner (LICOR, NE, USA). Densitometric analysis was performed using Image Lab™ Software 6.0.1 (Bio-Rad).

Purification of rPstS-1

After 73 h of cultivation of the recombinant *P. pastoris* in the presence of methanol in the bioreactor, biomass clarification was carried out by tangential filtration (Sartojet pump, loaned by Sartorius Stedim, Gotinga, Germany), using a membrane with a 100 kDa cut off (Sartojet, Sartorius); phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSE, Merck) was added to the filtrate to a final concentration of 0.1 mM. Following this, a membrane with a 10 kDa cut-off was used to concentrate the previous filtrate. The retained fraction (10–100 kDa) was concentrated by lyophilization of up to 90% of the initial volume, and then filtered using a 0.2 µm polypropylene filter (Minisart Sryinge filter, Sartorius). Finally, rPstS-1 was purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan). The samples were separated using a PROTO300 Semi-Prep C4 column (10 µm, 250 × 10 mm) and XBridge Protein BEH C4 column (300 Å, 3.5 mm, 4.6 mm × 150 mm). The composition of the solvents used to equilibrate the columns was as follows: buffer A contained Milli Q water with 0.1% trifluoroacetic acid and buffer B contained acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid. The recombinant protein was eluted with a gradient of acetonitrile. The separation started with 20% of buffer B solution for 5 min, then a gradient of buffer B from 20% to 60% was applied for the next 20 min. Elution was monitored by measuring the absorbances at 280 and 220 nm. Purity was evaluated from the chromatogram obtained from each run by analyzing the representative area of each peak.

The purification of *E. coli* rPstS-1 was carried out by affinity chromatography of the His-tagged-rPstS-1 using an FPLC system (Econo System, Bio-Rad Richmond, CA, USA) using a Ni-NTA Agarose (Qiagen, Venlo, Netherlands). The rPstS-1 was eluted with 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 8 M urea, 250 mM imidazole, pH 5.9. The rPstS-1 was then further purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan), using a PROTO300 Semi-Prep C4 column (10 µm, 250 × 10 mm) and the XBridge Protein BEH C4 column (300 Å, 3.5 mm, 4.6 mm × 150 mm). The recombinant protein was eluted with a gradient of 0% to 60% of acetonitrile, using buffer A (Milli Q water containing 0.1% trifluoroacetic acid) and buffer B (acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid). Elution was monitored by measuring absorbances at 280 and 220 nm.

Circular dichroism spectroscopy

The secondary structure of both forms of rPstS-1 (from *P. pastoris* and *E. coli*) were determined by far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Inc., MD, USA). The CD spectra were obtained from samples dissolved in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 12 mM CaCl₂ at pH 8, with protein concentrations of 125 and 250 µg/mL. Spectra were recorded from 190 to 260 nm at a scan speed of 20 nm/min and a response time of 1 s, with each spectrum representing the sum of four accumulations. All spectra were acquired at 25 °C in a 1-mm path length cell. The CD data were analyzed using the CAPITO CD Analysis & Plotting Tool (<http://capito.nmr.leibniz-fl.de/index.php>) to provide estimates of the secondary structure content [93]. The mean residue ellipticity ([Θ] in grad.cm².dmol⁻¹) was calculated in accordance with the equation [107]: [Θ] = MRW Θ /10*d.c* where MRW is the mean residue weight, Θ is the observed ellipticity (millidegrees), *d* is the pathlength (cm), and *c* is the concentration (mg/mL).

Mass spectrometry analysis

The molecular mass of *P. pastoris* rPstS-1 was determined by MALDI-TOF, using a Bruker Microflex instrument equipped with a 20-Hz nitrogen laser at $\lambda = 337$ nm. Approximately 500 fmol of rPstS-1 and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/mL) solutions were mixed (1:1 v/v) and spotted onto stainless steel plates. Samples were analyzed in the positive ion detection and linear mode; 70 laser shots were integrated into a single mass spectrum.

Sequence identification of the *P. pastoris* rPstS-1 purified by RP-HPLC was carried out as previously described [108]. Briefly, 50 µg of rPstS-1 was reduced with 10 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ for 5 min at room temperature and then alkylated with 54 mM iodoacetamide in 100 mM NH₄HCO₃ at room temperature for 15 min in dark. After reduction and alkylation, the protein was digested with trypsin (recombinant proteomics grade, Roche, Cat. No. 03708985001) dissolved in 100 mM Tris, pH 8.5 and 1 mM CaCl₂ at a 1/50 ratio of enzyme to protein weight. The enzymatic reaction was performed for 18 h at 37 °C. On the other hand, a second treated sample (reduced and alkylated) containing 50 µg of purified protein was digested with the proteolytic enzyme Lys-C (Roche, Switzerland) in digestion buffer (25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5,) at a 1/100 ratio of enzyme to protein weight. The enzymatic reaction was performed for 16 h at 37 °C. Mass spectrometry analyses of the digested peptides were performed with 1 µL of the enzymatic reaction mixed with 5 µL of 30% acetonitrile (ACN), 70% water, 0.1% trifluoroacetic acid

(TFA) saturated with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Following this, 1 μ L of this solution was analyzed in a matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight analyzer (MALDI-TOF, Bruker Microflex) equipped with a 20-Hz nitrogen laser at $\lambda = 337$ nm. Spectra were recorded in the linear positive mode for the mass range 1000 to 13,000 Da.

The identification of the sequence of tryptic peptides was performed using a MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MS/MS experiments were carried out at 1 kV with collision-induced dissociation using air as the collision gas. Digested peptides were reconstituted in a solution of H₂O:ACN:TFA (50:50:0.1) at nanomolar concentrations. In order to crystallize the peptides, 0.5 μ L of the sample was mixed with 1.0 μ L of the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as also with 1.0 μ L of the matrices 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Both preparations were done in micromolar concentrations and deposited on stainless steel plates at room temperature until complete evaporation and simultaneous crystal formation. To ionize samples, laser pulses using a nitrogen source and a 355 nm wavelength were used. The duration, intensity, and number of pulses were adjusted depending on the matrix used and the ease of ionization of the sample, which is directly related to the chemical structure of the molecules. The detected signals were stored and analyzed with the ProteinPilot 1.4 program coupled to the system.

Sero-reactivity experiments by ELISA

A 96-well microplate (Nunc-ImmunoPlate, Maxisorp Surface, Thermo Fisher) was coated with 100 μ L/well of the recombinant protein (5 μ g/mL) in bicarbonate buffer solution (PBS) and incubated overnight at 4 °C, then washed three times for 1 min each with PBS, blocked with 150 μ L of BSA (0.25%) in PBS for 1.5 h at 37 °C, and then washed five times with PBS. Following this, 100 μ L of each serum, diluted in blocking solution (at two dilutions; 1:100 and 1:500), was added to the appropriate well and incubated for 1.5 h at 37 °C and then washed three times with 250 μ L of Tween 20 (0.05%) in PBS. The wells were then incubated with 100 μ L of secondary antibody mouse anti-human IgG2 (1:500 PBS/Tween 0.05%) coupled to alkaline phosphatase (Thermo Fisher Scientific), for 1.5 h at 37 °C in the dark and washed four times with 250 μ L of Tween 20 (0.05%) in PBS. To measure the alkaline phosphatase activity, SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets were used as a substrate (Merck, Billerica, MA, USA). The diluted substrate (75 μ L) was added to each well followed by incubation for 30 min in the dark at room temperature. After the incubation period, the absorbance was measured at 405 nm in a plate reader

(Synergy|HTX, Biotek, Winooski, VT, USA). Each serum analysis was performed in duplicate. The sera from TB patients ($n = 30$) were randomly selected from the National Institute of Respiratory Diseases (INER, Mexico City, Mexico). Active pulmonary TB in all patients was confirmed by a clinically positive sputum smear, microscopy, culture in medium Middlebrook 7H10, and identification by molecular methods and resistance to rifampicin using the GeneXpert test. All sera were collected before starting the antibiotic treatment, after the confirmation of the acute phase of the disease. Additionally, the sera from subjects with positive ($n = 5$) and negative ($n = 5$) PPD tests were selected from a screening to evaluate mycobacterial infections in people from the State of Mexico, Mexico. These subjects did not present any clinical evidence of active tuberculosis.

Statistical analyses

All the data for kinetic parameters are represented as the mean of triplicates \pm standard deviation. Statistical significance between groups in the antibody reactivity assay was determined using the mean of 30 sera from patients with active TB compared with PBS as the control, and positive and negative PPD groups ($n = 5$, each). Dunn's test was used for all pairwise comparisons and comparisons against a control group (PBS) following rank-based ANOVA, based in the treatment of unequal group sizes. Differences were considered statistically significant if the $P < 0.05$.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Peptide sequencing by MS/MS. **A)** Shows a sequence corresponding to the peptide detected at m/z 1765.82 in the MALDI peptide mass map (Fig. 4C) revealed the sequence of P7T (Table 4). **B)** Presents a sequence corresponding to the peptide detected at m/z 4916.29 in the MALDI peptide mass map (Fig. 4C) revealed the sequence of P9T (Table 4). **C)** A sequence corresponding to the peptide detected at m/z 2272.13 and 2271.81 in the MALDI peptide mass map (Figure 4B, C) revealed the sequence of P13T (Table 4). **D)** Present the sequence corresponding to the peptide detected at m/z 1993.08 and 1994.49 in the MALDI peptide mass map (Fig. 4B, C) revealed the sequence of P14T (Table 4).

Additional file 2: Figure S2. Comparison of antibody recognition of *P. pastoris* rPstS-1 and *E. coli* expressed His-tag-rPstS-1. Western blotting performed of rPstS-1 produced in *P. pastoris* (lanes 1, 2 and 3, using 2.0, 1.0 and 0.5 μ g of rPstS-1, respectively) or *E. coli* (lanes 4, 5 and 6, using 2.0, 1.0 and 0.5 μ g of rPstS-1, respectively), incubated with **A)** a rabbit anti-*Mycobacterium tuberculosis*-PstS-1 polyclonal antibody and **B)** a human serum sample from patient clinically confirmed active TB. For each blot, molecular mass markers (kDa) are indicated on the right.

Authors' contributions

GBC, DJL and NAVC performed the majority of the experiments. AIC, GBC and YLV executed the rPstS-1 sero-reactivity with human sera experiments. SARG, DJL, GBC and NAVC performed the mass spectrometry runs and the analysis of the rPstS-1 antigens. DJL and NAVC designed and developed the clones

used. CO contributed by supplying *P. pastoris* X-33, reagents, and the laccase protein. CE, provided the *E. coli* capable of producing the non-mannosylated rPstS-1, and the protocols required for its production. CO, AIC, YLV, MATR, NACV and RA, provided reagents and materials. GBC, DJL, AIC, YLV, SARG, RA, CO, MATR and NAVC analyzed all the data and prepared the figures. GBC, DJL, MATR and NAVC prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510 Ciudad de México, Mexico. ² Unidad de Proteómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Periférico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Tlalpan, C.P. 14610 Ciudad de México, Mexico. ³ Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Ciudad de México, Mexico. ⁴ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico. ⁵ Departamento de Química de Biomoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Apdo, Postal 70250, C.P. 04510 México City, Mexico. ⁶ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. ⁷ Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510 Ciudad de México, Mexico.

Acknowledgements

CGBC and DJL thank the scholarship from CONACYT-México (CGBC 366135; DJL 388590/288329). We also thank Eng. Abel Blancas-Cabrera, Biotech. Bach. Diego Rosiles, Biol. Lorena López-Griego, Dr. Angelica B. Vargas-Castillo, and M. Sc. Ramses Gamboa-Suasnavart for technical assistance in the cultures. We are also grateful to Sartorius Stedim for the loan of the Sartojet pump and technical support for the protein purification. We also thank "Unidad de Síntesis y Secuenciación" of the Biotechnology institute of UNAM (Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional Autónoma de México) for sequencing and primers synthesis. We are also grateful to Dr. Martha Torres Rojas, Subdirector de Investigación Biomédicas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER, Mexico city, México) for sera collection. We also wish to thank Editage (<http://www.editage.com>) for English Language editing. This project was developed under the Institutional Program of the "Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM": "La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos".

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its additional files.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

This work was supported by Program for Research Projects and Technological Innovation, National Autonomous University of Mexico UNAM-PAPIIT (IN 208415; IN-209113). This work was partially funded by the National Council for Science and Technology (CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 247473, 220795).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 4 September 2018 Accepted: 10 January 2019

Published online: 19 January 2019

References

- WHO World Health Organization. 2017. Global tuberculosis report. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed 15 Aug 2018.
- Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN, Kim YS. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics*. 2004;11:3299–307. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400980>.
- Bekmurzayeva A, Sypabekova M, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2013;4:381–8. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.003>.
- López-Vidal Y, de León-Rosales SP, Castañón-Arreola M, Rangel-Frausto MS, Meléndez-Herrada E, Sada-Díaz E. Response of IFN-gamma and IgG to ESAT-6 and 38 kDa recombinant proteins and their peptides from *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients and asymptomatic household contacts may indicate possible early-stage infection in the latter. *Arch Med Res*. 2004;35(4):308–17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmac.2004.04.008>.
- Polanco C, Castañón-González JA, Mancilla R, Buhse T, Samaniego JL, Gimbel A. Identification of proteins associated with *Mycobacterium tuberculosis* virulence pathway by their polar profile. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(2):191–6. https://doi.org/10.18388/abp.2014_874.
- Pukazhvanthen P, Anbarasu D, Basirudeen SA, Raja A, Singh M. Assessing humoral immune response of 4 recombinant antigens for serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*. 2014;94(6):622–33. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.09.006>.
- Serra-Vidal MM, Latorre I, Franken KL, Díaz J, de Souza-Galvão ML, Casas I, Maldonado J, Milà C, Solsona J, Jimenez-Fuentes MÁ, Altet N, Lacoma A, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Prat C, Ottenhoff TH, Domínguez J. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2014;5:517. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00517>.
- Tiwari D, Tiwari RP, Chandra R, Bisen PS, Haque S. Efficient ELISA for diagnosis of active tuberculosis employing a cocktail of secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Folia Biol*. 2014;60(1):10–20.
- Ihssen J, Kowarik M, Diletto S, Tanner C, Wacker M, Thöny-Meyer L. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2010;9:61. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-61>.
- Shi S, Yu L, Sun D, Liu J, Hickey AJ. Rational design of multiple TB antigens TB10.4 and TB10.4-Ag85B as subunit vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharm Res*. 2009;27:224–34. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9995-y>.
- Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, Vordermeier HM. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 1997;158(12):5921–6.
- Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan PR, Raja A. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38 kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2001;81:249–53. <https://doi.org/10.1054/tube.2001.0293>.
- Mustafa AS. Biotechnology in the development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Curr Pharmaceut Biotechnol*. 2001;2:157–73.
- Olsen AW, van Pinxteren LA, Okkels LM, Rasmussen PB, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Infect Immun*. 2001;69(5):2773–8. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2773-2778.2001>.
- Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002607. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002607>.
- Flores LL, Steingart KR, Dendukuri N, Schiller I, Minion J, Pai M, Ramsay A, Henry M, Laal S. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18:1616–27. <https://doi.org/10.1128/CVI.05205-11>.

17. Kunath-Velayudhan S, Salamon H, Wang HY, Davidow AL, Molina DM, Huynh VT, Cirillo DM, Michel G, Talbot EA, Perkins MD, Felgner PL, Liang X, Gennaro ML. Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(33):14703–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009080107>.
18. WHO: An International roadmap for tuberculosis research. Geneva: WHO; 2011. <http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/technical/tbresearchroadmap.pdf>. Accessed 16 Aug 2018.
19. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon- γ -based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(1):59–64. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-1790C>.
20. Mazurek GH. Division of tuberculosis elimination, national center for HIV, STD, and TB prevention, centers for disease control and prevention (CDC) Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep*. 2005;54:49–55.
21. Dorman SE, Belknap R, Graviss EA, Reves R, Schluger N, Weinfurter P, Wang Y, Cronin W, Hirsch-Moverman Y, Teeter LD, Parker M, Garrett DO, Daley CL, Tuberculosis Epidemiologic Studies Consortium. Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(1):77–87. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0365oc>.
22. Ragas A, Roussel L, Puzo G, Rivière M. The *M. tuberculosis* cell surface glycoprotein Apa as a potential adhesion to target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin SP-A. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5133–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.m610183200>.
23. González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, Bigi F, Espitia C. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannoseylated proteins. *J Proteome Res*. 2009;8(2):721–33. <https://doi.org/10.1021/pr800756a>.
24. Nandakumar S, Kannanganat S, Dobos KM, Lucas M, Spencer JS, Fang S, McDonald MA, Pohl J, Birkness K, Chamcha V, Ramirez MV, Plikaytis BB, Posey JE, Amara RR, Sable SB. O-mannosylation of the *Mycobacterium tuberculosis* adhesin Apa is crucial for T cell antigenicity during infection but is expendable for protection. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003705. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003705>.
25. Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *J Proteomics*. 2014;97:296–306. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2013.05.011>.
26. Villeneuve C, Etienne G, Abadie V, Montrozier H, Bordier C, Laval F, Daffe M, Maridonneau-Parini I, Astarie-Dequeker C. Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51291–300. <https://doi.org/10.1074/jbc.m306554200>.
27. Liu CF, Tonini L, Malaga W, Beau M, Stella A, Bouyssié D, Jackson MC, Nigou J, Puzo G, Guilhot C, Burlet-Schiltz O, Rivière M. Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(16):6560–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219704110>.
28. Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Rivière M, Puzo G, Barzu O, Marchal G. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect Immun*. 1999;67(11):5567–72.
29. Horn C, Namane A, Pescher P, Rivière M, Romain F, Puzo G, Bärzu O, Marchal G. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32023–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32023>.
30. Lara M, Servin-González L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C. Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *App Environ Microbiol*. 2004;70(2):679–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.679-685.2004>.
31. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. 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. *Infect Immun*. 2003;71(4):1929–37. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1929-1937.2003>.
32. Malen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*. 2007;7(10):1702–18. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600853>.
33. van Els CA, Corbière V, Smits K, van Gaans-van den Brink J, Poelen M, Mascart F, Meiring HD, Loch C. Toward understanding the essence of post-translational modifications for the *Mycobacterium tuberculosis* immunoproteome. *Front Immunol*. 2014;5:361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00361>.
34. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197(1):121–7. <https://doi.org/10.1084/jem.20021468>.
35. Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scand J Immunol*. 2009;69:20–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02193.x>.
36. Esparza M, Palomares B, García T, Espinosa P, Zenteno E, Mancilla R. PstS-1, the 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scand J Immunol*. 2015;81(1):46–55. <https://doi.org/10.1111/sji.12249>.
37. Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1989;57(8):2481–8.
38. Harboe M, Wiker HG. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis*. 1992;166(4):874–84.
39. Vordermeier HM, Harris DP, Moreno C, Singh M, Ivanyi J. The nature of the immunogen determines the specificity of antibodies and T cells to selected peptides of the 38 kDa mycobacterial antigen. *Int Immunol*. 1995;7(4):559–66.
40. Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *Microbiology*. 1990;136(3):477–80.
41. Espitia C, Elinos M, Hernandez-Pando R, Mancilla R. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun*. 1992;60:2998–3001.
42. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun*. 1994;62(6):2536–44.
43. Harboe M. The significance of proteins actively secreted by *Mycobacterium tuberculosis* in relation to immunity and complications of mycobacterial diseases. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1992;60(3):470–6.
44. Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun*. 2001;69(8):4839–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4839-4845.2001>.
45. Bothamley GH, Beck JS, Potts RC, Grange JM, Kardjito T, Ivanyi J. Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *J Infect Dis*. 1992;166(1):182–6.
46. Silva VM, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D. Factors associated with humoral response to Rv3875, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7(5):478–84.
47. Herrmann JL, Delahay R, Gallagher A, Robertson B, Young D. Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system. *FEBS Lett*. 2000;473(3):358–62. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01553-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01553-2).
48. Lengeler KB, Tielker D, Ernst JF. Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(4):528. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7409-z>.
49. Proszynski TJ, Simons K, Bagnat M. O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell*. 2004;15(4):1533–43. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0511>.
50. Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13(5):621–30. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.003>.

51. Garfoot AL, Goughenour KD, Wüthrich M, Rajaram MV, Schlesinger LS, Klein BS, Rappleye CA. O-mannosylation of proteins enables histoplasma yeast survival at mammalian body temperatures. *mBio*. 2018;9(1):e02121–217. <https://doi.org/10.1128/mbio.02121-17>.
52. Lussier M, Sdicu AM, Bussereau F, Jacquet M, Bussey H. The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15527–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15527>.
53. Gentsch M, Tanner W. Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*. 1997;7:481–6.
54. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a013201.
55. Dobos K, Khoo K, Swiderek K, Brennan P, Belisle J. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1996;178(9):2498–506.
56. Duman JG, Miele RG, Liang H, Grella DK, Sim KL, Castellino FJ, Bretthauer RK. O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins. *Biotechnol Appl Biochem*. 1998;28(Pt 1):39–45.
57. Akasaka-Manyu K, Manyu H, Hayashi M, Endo T. Different roles of the two components of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;411(4):721–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.012>.
58. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(12):5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.
59. Trimble RB, Lubowski C, Hauer CR 3rd, Stack R, McNaughton L, Gemmill TR, Kumar SA. Characterization of N- and O linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*. 2004;14:265–74.
60. Häusler A, Ballou L, Ballou CE, Robbins PW. Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an α -1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:6846–50.
61. Yamada T, Uyeda A, Otsu M, Matsushima M, Sekiguchi K, Kikuchi M. Site-specific O-glycosylation of cell adhesive lysozyme in yeast. *Biochemistry*. 1994;33(13):3885–9.
62. Romero PA, Lussier M, Veronneau S, Sdicu AM, Herscovics A, Bussey H. Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of α -1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology*. 1999;9(10):1045–51.
63. VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science*. 2005;309(5736):941–3. <https://doi.org/10.1126/science.1114347>.
64. Benabdessellem C, Fathallah DM, Huard RC, Zhu H, Jarboui MA, Dellagi K, Ho JL, Barbouche R. 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. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3086–93. <https://doi.org/10.1128/JCM.02672-05>.
65. Benabdessellem C, Barbouche MR, Jarboui MA, Dellagi K, Ho JL, Fathallah DM. High level expression of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein CFP32 in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*. 2007;35(1):41–9.
66. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(1):45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.
67. Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(1):31–9. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>.
68. Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, van der Klei I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Axula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*—a comparison. *FEMS Yeast Res*. 2005;5(11):1079–96. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.06.004>.
69. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol*. 2014;32(10):992–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt.3040>.
70. De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Ruzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*. 2009;27(6):561–6. <https://doi.org/10.1038/nbt.1544>.
71. Bai J, Swartz D, Protasevich I, Brouillette C, Harrell P, Hildebrandt E, Gasser B, Mattanovich D, Ward A, Chang G, Urbatsch I. A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e22577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022577>.
72. Yadava A, Ockenhouse F. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect Immun*. 2003;71(9):4961–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4961-4969.2003>.
73. Tsujikawa M, Okabayashi K, Morita M, Tanabe T. 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*. 1996;12:541–53.
74. Hartner FS, Glieder A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*. 2006;5:39. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-39>.
75. Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*. 2001;92(6):585–9. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80321-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80321-2).
76. Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, Ohmura T. The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol Gen Genet*. 1994;243(5):489–99.
77. Wu J, Filutowicz M. Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol*. 1999;46(3):591–9.
78. Sainsbury F, Philippe VJ, Vorster J, Goulet MC, Michaud D. A chimeric affinity tag for efficient expression and chromatographic purification of heterologous proteins from plants. *Front Plant Sci*. 2016;15(7):141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00141>.
79. Halliwell CM, Morgan G, Ou CP, Cass AE. Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Anal Biochem*. 2001;295(2):257–61.
80. Fonda I, Kenig M, Gaberc-Porekar V, Pristovsek P, Menart V. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor- α drastically changes its properties. *Sci World J*. 2002;15(2):1312–25. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.215>.
81. Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2002;79(4):438–49. <https://doi.org/10.1002/bit.10297>.
82. Hazeu W, Donker RA. A continuous culture study of methanol and formate utilization by the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 1983;5:399–404.
83. Swartz JR, Cooney CL. Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Appl Environ Microb*. 1981;41(5):1206–13.
84. Looser V, Lüthy D, Straumann M, Hecht K, Melzoch K, Kovar K. Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterisation of a novel promoter. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101(8):3163–76. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8123-x>.
85. Paulová L, Hyka P, Branská B, Melzoch K, Kovar K. Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut+. *J Biotechnol*. 2012;157(1):180–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.010>.
86. Woo JH, Liu YY, Neville DM Jr. Minimization of aggregation of secreted bivalent anti-human T cell immunotoxin in *Pichia pastoris* bioreactor culture by optimizing culture conditions for protein secretion. *J Biotechnol*. 2006;121(1):75–85.
87. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*. 2008;100:177–83. <https://doi.org/10.1002/bit.21763>.
88. Çalik P, İnankur B, Soyslan E, Şahin M, Taşpınar H, AÇik E, Bayraktar E. Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010;85:226–33. <https://doi.org/10.1002/jctb.2292>.
89. Chiruvolu V, Eskridge K, Cregg J, Meagher M. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Appl*

- Biochem Biotechnol. 1998;75:163–73. <https://doi.org/10.1007/BF02787771>.
90. Lopes M, Oliveira C, Domingues L, Mota M, Belo I. Enhanced heterologous protein production in *Pichia pastoris* under increased air pressure. *Biotechnol Prog*. 2014;30:1040–7. <https://doi.org/10.1002/btpr.1964>.
 91. Singh M, Andersen AB, McCarthy JE, Rohde M, Schütte H, Sanders E, Timmis KN. The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen: overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Gene*. 1992;117(1):53–60.
 92. Khurshid S, Khalid R, Afzal M, Akhtar MW. Truncation of PstS1 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* improves diagnostic efficiency. *Tuberculosis*. 2013;93(6):654–9. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.07.005>.
 93. Wiedemann C, Bellstedt P, Görlach M. CAPITO—a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics*. 2013;29(14):1750–7.
 94. Vyas NK, Vyas MN, Quijcho FA. Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure*. 2003;11(7):765–74. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00109-6](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00109-6).
 95. Chauhan JS, Bhat AH, Raghava GPS, Rao A. GlycoPP: a webserver for prediction of N- and O-glycosites in prokaryotic protein sequences. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040155>.
 96. Neubert P, Halim A, Zausner M, Essig A, Joshi HJ, Zatorska E, Larsen ISB, Castells-Ballester J, Aebi M, Clausen H, Strahl S. Mapping the O-mannose glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(4):1323–37. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.057505>.
 97. Nett JH, Cook WJ, Chen MT, Davidson RC, Bobrowicz P, Kett W, Brevnova E, Potgieter TI, Mellon MT, Prinz B, Choi BK, Zha D, Burnina I, Bukowski JT, Du M, Wildt S, Hamilton SR. Characterization of the *Pichia pastoris* protein-O-mannosyltransferase gene family. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068325>.
 98. Sousa AO, Henry S, Marója FM, Lee FK, Brum L, Singh M, Lagrange PH, Aucouturier P. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*. 1998;111(1):48–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00452.x>.
 99. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
 100. Wilkinson RJ, Haslov K, Rappuoli R, Giovannoni F, Narayanan PR, Desai CR, Vordermeier HM, Paulsen J, Pasvol G, Ivanyi J, Singh M. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol*. 1997;35:553–7.
 101. Wu X, Yang Y, Zhang J, Li B, Liang Y, Zhang C, Dong M, Cheng H, He J. Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-Kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:372e5. <https://doi.org/10.1128/cvi.00287-09>.
 102. Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, Kaviar J, Guo X, Sung N, Kaplan G, Menzies D, Gennaro ML. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun*. 2005;73(10):6846–51. <https://doi.org/10.1128/AI.73.10.6846-6851.2005>.
 103. Araujo LS, Mello FC, Silva Nde B, Leung JA, Machado SM, Sardella IG, Maciel Rde M, Saad MH. Evaluation of gamma interferon immune response elicited by the newly constructed PstS-1 (285-374): CFP10 fusion protein to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(4):552–60. <https://doi.org/10.1128/CVI.00726-13>.
 104. Müller H, Salzig D, Czernak P. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electron J Biotechnol*. 2015;18(3):252–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.005>.
 105. Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog*. 2001;17(6):1042–8. <https://doi.org/10.1021/bp010106d>.
 106. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
 107. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*. 2000;1(4):349–84.
 108. Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Cordova-Davalos L, Martínez-Sotelo J, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán M. 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. *Microb Cell Fact*. 2011;10:110. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-110>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Figure S1.

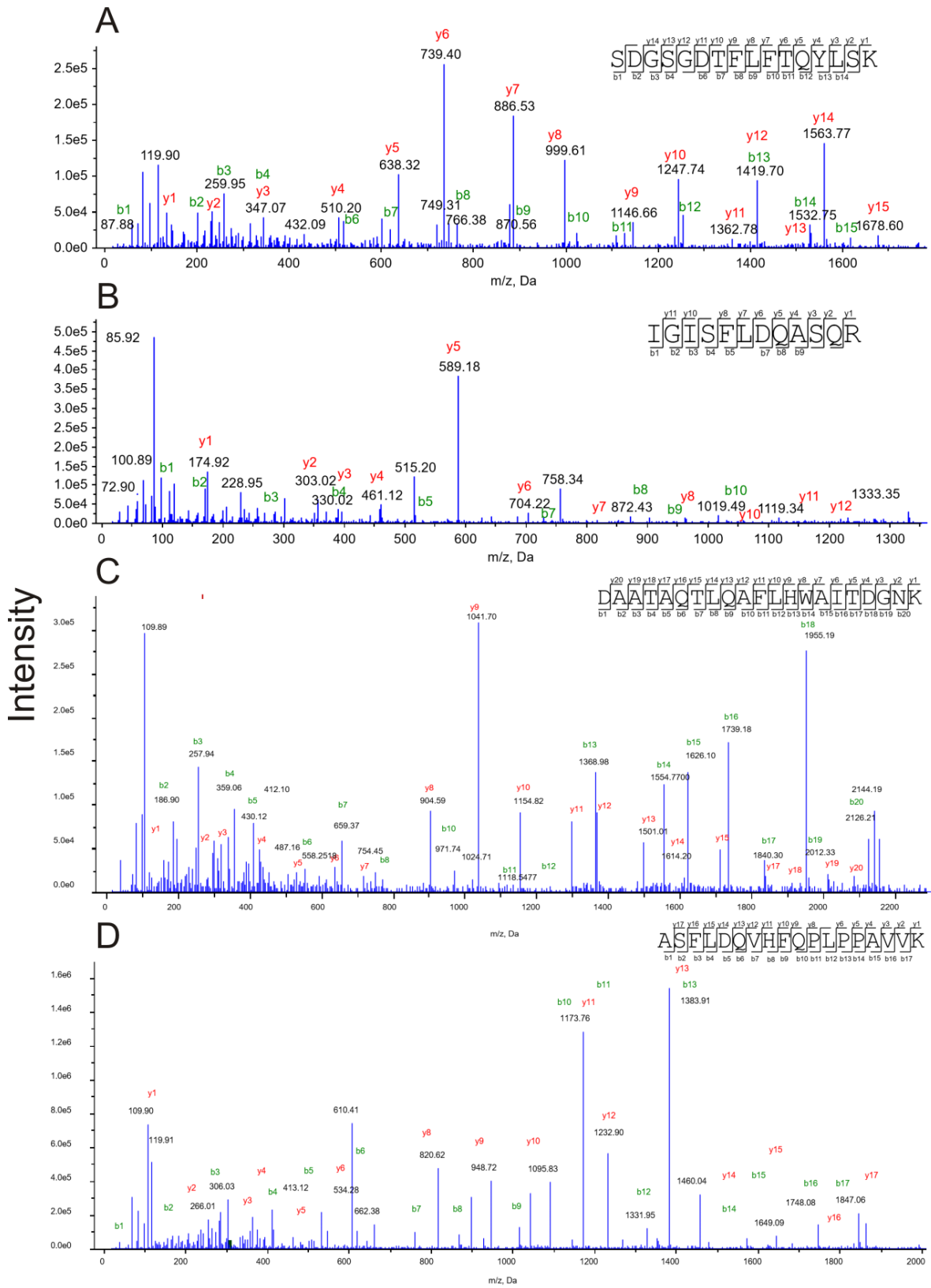


Figure S2.

