

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA FORMA NATIVA GLICOSILADA
DEL Ag85B DE *Mycobacterium tuberculosis* EN *Pichia pastoris***

POR:

Q.F.B. LIZETH SÁNCHEZ CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

Agosto 2022

**Producción recombinante de la forma nativa glicosilada del
Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris***

Aprobación de la tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Director de Tesis



Dr. C. Gloria María González González

Miembro de la Comisión



Dr. C. Romel Hernández Bello

Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

Producción recombinante de la forma nativa glicosilada del Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris*

El presente trabajo tuvo lugar en el laboratorio de Micobacteriología del Centro Regional de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. José Prisco Palma Nicolás, y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la convocatoria "Ciencia de Frontera 2019" con la aprobación del proyecto "Materiales biomiméticos basados en sílice: un nuevo concepto para liberación de fármacos y herramientas de diagnóstico en contra de la tuberculosis" (FORDECYT-PRONACES/53395/2020).



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta estancia como estudiante de maestría.

Al Dr. José Palma, por el gran apoyo en este proyecto, por enseñarme lo necesario para ser un buen investigador, por los cuestionamientos y conocimientos que fueron valiosos para el termino de esta etapa.

A la Dra. Gloria González, por la aceptación en el Departamento de Microbiología y el CRCEI, por los ánimos que siempre me brindó y sus enseñanzas que deja en mí.

Al Dr. Romel Hernández, por sus consejos y por siempre estar abierto para cualquier duda que pudiera surgir en la realización de este proyecto.

Al Dr. Gerardo García, por su asesoría, por la paciencia, por sus enseñanzas y el apoyo en la parte experimental, pero sobre todo por su gran amistad.

A la QBP Lizeth Pérez, por recibirme en el laboratorio y tener siempre la disponibilidad de apoyarme en la parte experimental, pero sobre todo por su gran amistad.

A todos quienes conforman al departamento y al CRCEI, les agradezco su amabilidad, su contribución en mi formación y por la obtención de muchos conocimientos.

A mis amigos y compañeros, Joan, Brenda, Oscar, Lizeth, Sergio, Bere, Ana, Gabriel y Luis, por darme su apoyo y amistad incondicional que fungieron como mi familia y nunca me sentí sola, les agradezco por sus ánimos, por su conocimientos pero sobre todo las buenas reuniones de risas y pláticas.

A mi mamá, por creer en mi en todo momento, por darme las herramientas necesarias para estar aquí, por ser mi mayor ejemplo como profesionista y mujer, por tu amor incondicional y el apoyo infinito que me brindas.

A mis hermanos, por ser siempre mis ejemplos por seguir, por siempre animarme a ser mejor y por el apoyo que me brindan.

A mi amiga Briggite, a mi novio y gran amigo Brandon por siempre hacerme sentir que estoy en casa con sus platicas, por su comprensión y por no dejarme sola.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2 Fisiología y Estructura de <i>M. tuberculosis</i>	2
1.3 Patogenia.....	3
1.4 Epidemiología.....	4
1.5 Diagnóstico de tuberculosis.....	5
1.6 Genoma y proteómica de <i>M. tuberculosis</i>	8
1.7 Proteínas de filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
ANTECEDENTES.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
4.1 Hipótesis.....	17
4.2 Objetivos.....	17
4.2.1 Objetivo general.....	17
4.2.2 Objetivos Específicos.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1 MATERIAL.....	18
5.1.1 Reactivos.....	18
5.1.2 Material biológico	19
5.2 Estrategia general de clonación del gen Rv1886c y expresión de la proteína Ag85B.....	19
5.3 Diseño y optimización de la secuencia Rv1886c.....	21
5.4 Propagación del plásmido pET100/D-TOPO.....	23
5.4.1 Preparación de células electrocompetentes de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α	23
5.4.2 Transformación del plásmido pET100/Rv1886c en células <i>E. coli</i> DH5 α electrocompetentes.....	24
5.4.3 Obtención del vector pET100/Rv1886c por el método de lisis alcalina.....	24
5.5 Amplificación del gen Rv1886c por PCR.....	26

5.5.1	Purificación del producto de PCR.....	27
5.5.2	Digestión del inserto con <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I.....	28
5.5.3	Preparación y digestión del vector de expresión pPICZ α A	28
5.5.4	Reacción de ligación de la secuencia Rv1886c y el vector pPICZ α A.....	29
5.5.5	Transformación del vector recombinante pPICZ α A-Rv1886c en <i>E. coli</i> DH5 α	30
5.5.6	Obtención del vector recombinante pPICZ α A-Ag85B por el método de lisis alcalina.	31
5.5.7	Evaluación y caracterización de las construcciones obtenidas.	31
5.6	Linearización del vector recombinante pPICZ α A-Rv1886c con <i>Sac</i> -I..	34
5.6.1	Preparación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> SMD..	34
5.7	Transformación de levaduras <i>P. pastoris</i> SMD con el vector recombinante pPICZ α A-Rv1886c.....	35
5.7.1	Extracción de ADNg de las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> SMD para la genotificación por PCR.....	35
5.7.2	Fermentación de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> SMD con 1% de MeOH.....	37
5.7.3	Diálisis del sobrenadante de cultivo.	38
5.7.4	Determinación de la concentración de proteínas.	38
5.7.5	Precipitación de proteínas totales con MetOH/cloroformo.	39
5.7.6	Análisis de la proteína Ag85B recombinante por SDS-PAGE y <i>western blot</i>	39
5.7.7	Purificación del Ag85B recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.....	41
5.7.8	Desalado de proteínas recombinantes mediante sefadex G-25....	42
5.8	Análisis de glicosilaciones en la proteína Ag85B recombinante expresada en <i>P. pastoris</i>	43
Capítulo 6	44
RESULTADOS	44
6.1	Propagación del vector pET100/Rv1886c.	44
6.1.1	Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α electrocompetentes con el vector pET100/Rv1886c.....	44

6.1.2 Obtención del vector pET100/Rv1886c por el método de lisis alcalina.	46
6.2 Amplificación del gen Rv1886 por PCR.....	46
6.3 Caracterización del vector de clonación y expresión pPICZαA.	49
6.3.1 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5α electrocompetentes con la construcción pPICZαA-Rv1886c	50
6.3.3 Obtención del vector recombinante pPICZαA-Rv1886c por el método de lisis alcalina.	51
6.3.4 Caracterización de vectores recombinantes por ensayos de restricción.	52
6.4. Obtención de las clonas en <i>P. pastoris</i> SMD 1168H.	55
6.4.1 Transformación de células <i>P. pastoris</i> SMD 1168H con el vector pPICZαA-Rv1886c.	55
6.4.2 Genotipificación de las clonas portadora del gen Rv1886c.	57
6.5 Expresión del Ag85B recombinante en <i>P. pastoris</i> SMD 1168H	59
6.5.1 Expresión de la proteína Ag85B y evaluación del crecimiento de las clonas recombinantes en <i>P. pastoris</i> en medio con MetOH.....	59
6.6 Análisis de la glicosilación en la proteína recombinante.	64
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIÓN	69
REFERENCIAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	3
Figura 2. Tasas de incidencia de TB en 2021	4
Figura 3. Perfil de inmunoreactividad de pacientes con TBP en un ELISA.....	8
Figura 4. Mapa circular del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	9
Figura 5. Consideraciones generales para la expresión génica heteróloga en <i>P. pastoris</i>	12
Figura 6. Diagrama general de clonación de Rv1886c y expresión del Ag85B recombinante en <i>P. pastoris</i>	20
Figura 7. Secuencia Rv1886c optimizada.....	21
Figura 8. Características del vector de clonación y expresión pPICZαA.....	23
Figura 9. Ligación del gen Rv1886c en el vector pPICZαA.....	29
Figura 10. Representación de la construcción pPICZαA-Rv1886c	32
Figura 11. Propagación del plásmido pET100/RV1886c.....	45
Figura 12. Electroforesis de ADN plasmídico pET100/Rv1886c	46
Figura 13. Electroforesis de las amplificaciones del gen Rv1886c.....	47
Figura 14. Electroforesis de productos de PCR del gen Rv1886c para clonación	48
Figura 15. Digestión del inserto con las enzimas <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I.....	48
Figura 16. Identificación de los sitios de restricción <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I	49
Figura 17. Clonación de la construcción pPICZαA-Rv1886c en células <i>E. coli</i> DH5α	51
Figura 18. Obtención de construcciones plasmídicas pPICZαA-Rv1886c	52
Figura 19. Reacción de digestión de las construcciones pPICZαA-Rv1886c con la enzima <i>Xho</i> -I	53
Figura 20. Reacción de digestión de las construcciones pPICZαA-Rv1886c con las enzimas <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I	54
Figura 21. Reacción de digestión de las construcciones pPICZαA-Rv1886c con <i>Eco</i> R-I	55
Figura 22. Linearización de la construcción pPICZαA-Rv1886c	56

Figura 23. Transformación de las células <i>P. pastoris</i> SMD con el vector pPICZ α A-Rv1886c	57
Figura 24. Recombinación homóloga de la construcción pPICZ α A-Rv1886c en el promotor AOX1.....	57
Figura 25. Extracción de ADNg de <i>P. pastoris</i> SMD transformada con la construcción pPICZ α A-Rv1886c	58
Figura 26. Electroforesis de PCR del genotipo AOX1/Rv1886c en <i>P. pastoris</i> SMD	59
Figura 27. Curva de crecimiento de las levaduras productoras de la proteína Ag85B.....	60
Figura 28. Curva de calibración y cuantificación de proteínas (Ag85B) en dializados de las clonas SMD-pPAg85B por el protocolo de BSA.....	61
Figura 29. Curva de calibración y cuantificación del Ag85B purificado por el protocolo de BSA	62
Figura 30. SDS-PAGE y western blot del sobrenadante de cultivo de la cepa <i>P. pastoris</i> productora de Ag85B.....	63
Figura 31. SDS-PAGE del Ag85B purificado para verificar presencia de glicosilaciones	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales antígenos de origen proteico de uso diagnóstico serológico	7
Tabla 2. Lista de antígenos de filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv con valor diagnóstico.....	10
Tabla 3. Optimización de primers para la secuencia Rv1886c.....	22
Tabla 4. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen Rv1886c	26
Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen Rv1886c..	26
Tabla 6. Condiciones de reacción para la digestión del inserto con <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I	28
Tabla 7. Condiciones de reacción para la digestión del vector con <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I	29
Tabla 8. Condiciones de reacción para la ligación del inserto Rv1886c en el vector pPICZ α A.....	30
Tabla 9. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZ α A-Rv1886c con la enzima <i>Xho</i> -I.....	32
Tabla 10. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZ α A-Rv1886c con la enzima <i>Xho</i> -I y <i>Not</i> -I.....	33
Tabla 11. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZ α A-Rv1886c con la enzima <i>Eco</i> R-I	33
Tabla 12. Condiciones de reacción de digestión para el vector recombinante con la enzima <i>Sac</i> -I.....	34
Tabla 13. Primers diseñados para la amplificación del gen AOX1	36
Tabla 14. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen AOX1 recombinante.....	37
Tabla 15. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen AOX1 recombinante.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
A ₆₀₀	Absorbancia a 600 nm.
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico.
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
β-me	β-mercaptoetanol.
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente.
BCA	Ácido bicinconínico.
BCG	Bacilo Calmette Guérin.
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex medium.</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex médium.</i>
BSA	Albumina sérica bovina.
cm	centímetros
EDTA	Etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
EtOH	Etanol.
g	Gravedad.
His	Histidina.
HRP	Peroxidasa de rábano picante.
IFN-γ	interferón gamma.
IsopOH	Isopropanol.
kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltones.
LAM	Lipoglucanos.
LB	Medio de Luria-Bertani.
M	Molaridad.
MAPc	Complejo ácido micólico-arabinogalactano-peptidoglicano.
μg	Microgramos.
μL	Microlitros.
μM	Micromolar.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
mM	Milimolar.
mm	milímetros
NaCl	Cloruro de sodio.
ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros.
°C	Grados Celsius.
OD	Densidad óptica.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PIMs	fosfatidil-mio-inositol manósidos.

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Potencial de hidrógeno.
PPD	Derivado proteico purificado.
PVDF	Polivinilideno.
PAS	Ácido periódico de Schiff.
rpm	Revolución por minuto.
SD	Desviación estándar.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.</i>
TB	Tuberculosis.
TBP	Tuberculosis pulmonar.
TDM	Trealosa dimicolato.
TMM	Trealosa monomicolato.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
TTBS	Buffer salino – Tris – Tween-20.
UV	Ultravioleta.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.
V	Volts.
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa.
Zeo	Zeocina.

RESUMEN

Q.F.B. Lizeth Sánchez Castro

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Número de páginas: 73

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica.

Área de estudio: Micobacteriología médica.

Título de estudio

Producción recombinante de la forma nativa glicosilada del Ag85B de
Mycobacterium tuberculosis en *Pichia pastoris*

El Ag85B es una de las principales proteínas secretoras de *Mycobacterium tuberculosis* tanto en vivo como in vitro, que al encontrarse en el medio extracelular participa en la activación/proliferación de células T en la producción de interferón gamma (IFN- γ), por lo que se ha considerado como blanco serológico de tuberculosis pulmonar de manera que se busca producirla en gran cantidad. **Objetivos:** Construir un sistema eucariótico que permita la expresión nativa, N-glicosilada del Antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* en la levadura *Pichia pastoris*. **Material y Métodos:** La secuencia Rv1886c optimizada que codifica la proteína secretora principal Ag85B se insertó en el vector de expresión pPICZ α A para ser clonado en *Escherichia coli* DH5 α . El plásmido recombinante pPICZ α A-Rv1886c linearizado por Sac-I se introdujo en el cromosoma de la cepa SMD 1168H de *Pichia pastoris*. Después de la confirmación por PCR de su recombinación homóloga en el locus AOX1, la cepa SMD-ppAg85B resultante se cultivó y se indujo la expresión de la proteína con metanol detectada por SDS-PAGE y *western blot*. Se purificó al Ag85B recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel y se evaluó la presencia de glicosilaciones. **Resultados:** El Ag85B recombinante presentó un peso molecular estimado 34 kDa sin evidencia de N-glicosilación. **Conclusión:** El sistema de producción de proteínas heterólogas en la levadura *Pichia pastoris* SMD 1168H fue capaz de producir la proteína recombinante Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis*. En cuanto a la glicosilación esperada del Ag85B recombinante a través del método empleando para la detección de glicosilaciones no fue posible detectar la presencia de la N-glicosilación en la asparagina 299.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*.

En 1882, Robert Koch descubrió el agente causal de la enfermedad que actualmente sigue afectando a una gran extensión de la población mundial. No obstante, este es un microorganismo que continúa siendo un objeto de estudio importante en la rama de la microbiología y como problema en salud pública mundial.

M. tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis pulmonar (TBP), considerado tan antiguo como la propia humanidad. La evolución del complejo como patógeno humano comenzó en el continente africano debido al desplazamiento y aumento que tuvo la población¹.

Dentro del género *Mycobacterium* se han identificado un poco más de 100 especies encontrando 20 especies de micobacterias que poseen una homología superior al 95% de hibridación (ADN-ADN) y teniendo secuencias idénticas en el gen 16S causantes de la tuberculosis en el humano que comprenden el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTb) componiéndose principalmente de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – *Calmette* y *Guérin* (BCG), *M. africanum*, *M. canettii* y otras especies que originan infección en los animales como *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii*².

1.2 Fisiología y Estructura de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis es un bacilo de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 12 – 24 horas en condiciones óptimas³. Es una bacteria intracelular, el macrófago es su principal célula hospedera, además se caracteriza por ser un aerobio estricto, inmóvil y no esporulado.

Esta bacteria presenta una forma de bacilo alargado, que mide aproximadamente entre 0.3 – 0.5 μm y que en una tinción de Gram reacciona como Gram positivo. La principal base tintorial de las micobacterias es la tinción de Ziehl-Neelsen debido a la decoloración que adquieren al ácido-alcohol por los componentes que existen en su pared celular⁴.

La pared celular de esta micobacteria proporciona una barrera impermeable considerablemente fuerte a compuestos nocivos, compuestos antituberculosos y diferentes condiciones ambientales, jugando un papel fundamental en la virulencia³. Actualmente y debido a los avances tecnológicos en microscopía se encontró que la micobacteria posee una membrana externa comparable a lo que se observa en bacterias Gram negativas. Los componentes exteriores que decoran son glucolípidos como trehalosa monomicolato (TMM), la trehalosa dimicolato (TDM) que forman el factor cordón y otras estructuras como los lipoglucanos (LAM) y los fosfatidilinositol manosidos (PIMs)⁵. En la pared celular se encuentra el peptidoglicano unido covalentemente al arabinogalactano y que a su vez está unido a los ácido micólicos comprendiendo el núcleo de la pared celular, el complejo mycolyl arabinogalactan-peptidoglicano (MAPc)^{5 6} (**Figura 1**).

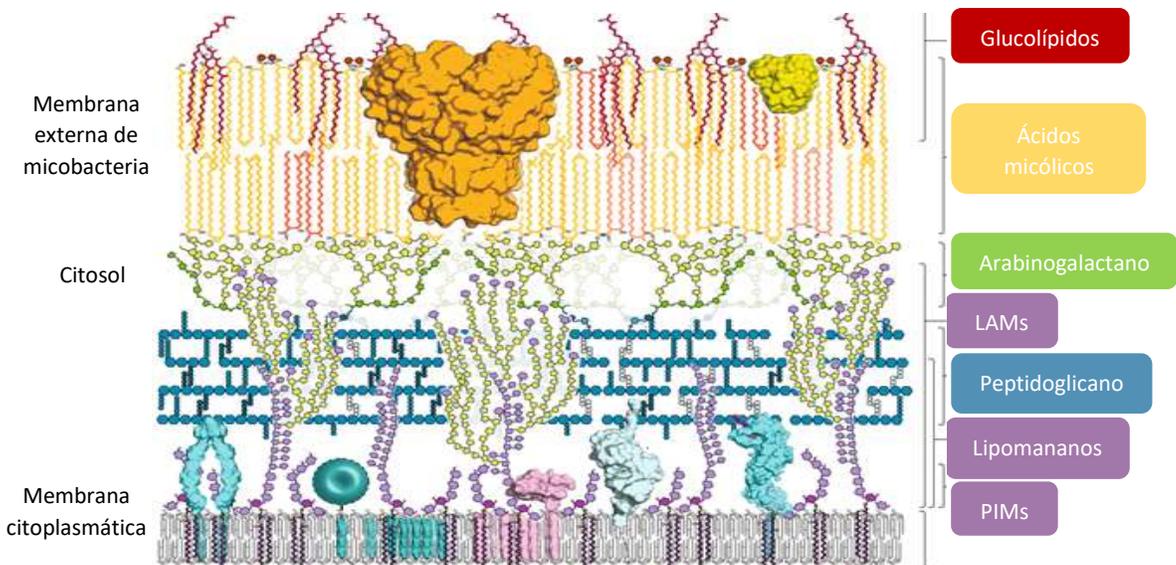


Figura 1. Esquemización de la pared celular de *M. tuberculosis*. Dulberger C. et. al. Nature. 2020

1.3 Patogenia.

La transmisión de esta enfermedad ocurre vía aérea donde un individuo infectado libera gotitas de *flügge* las cuales contienen a los bacilos que son inhalados por otros individuos sanos, desencadenándose en el organismo una respuesta inmune ⁷. Por lo tanto, los bacilos se depositan en los pulmones donde el individuo despierta una respuesta inmune innata que involucra a los macrófagos alveolares originando la activación del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ) que combaten con la infección de primera instancia, logrando eliminar algunos bacilos y mientras otros logran su establecimiento⁸. Esto se convierte en una infección pulmonar aguda (presentando tuberculosis activa), ocasionando una destrucción masiva del tejido pulmonar⁹. Al lisarse los macrófagos infectados, como eventualmente ocurre, un gran número de bacilos son liberados y pueden diseminarse por la sangre y vasos linfáticos hacia la cavidad pleural, huesos, sistema urogenital, meninges, peritoneo, piel y provocar la muerte (tuberculosis extrapulmonar)¹⁰. Sin embargo, en los individuos inmunocompetentes no se evidencia una infección aguda, ya que ésta permanece localizada y no muestra progresión clínica (presentando tuberculosis latente)⁹.

1.4 Epidemiología.

La tuberculosis en la actualidad continúa siendo un problema de salud mundial principalmente en países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su reporte global del 2021, especifica el número de casos activos de esta enfermedad que es de 9.9 millones durante el año 2020. En cuanto a la mortalidad se estimaron 1.3 millones de decesos de personas a causa de esta enfermedad, en los cuales se incluye un total de 214,000 infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) durante el mismo año. Cabe destacar que la tuberculosis se ha visto más afectada por la pandemia de COVID-19 en 2020 que por el VIH /SIDA ¹¹.

De los 9.9 millones de individuos enfermos por esta infección, la mayoría pertenecen a las regiones de Asia Sudoriental con 43 %, África un 25 % y el Pacífico Occidental un 18 %, con porcentajes más bajos se encuentra el Mediterráneo Oriental, América y Europa con: 8.4 %, 3.0 % y 2.3 % respectivamente. De los 30 países con alta incidencia en tuberculosis representan un 86% de los dos tercios del total mundial como es: India, China, Indonesia, Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladesh y Sudáfrica (**Figura 2**)¹¹.

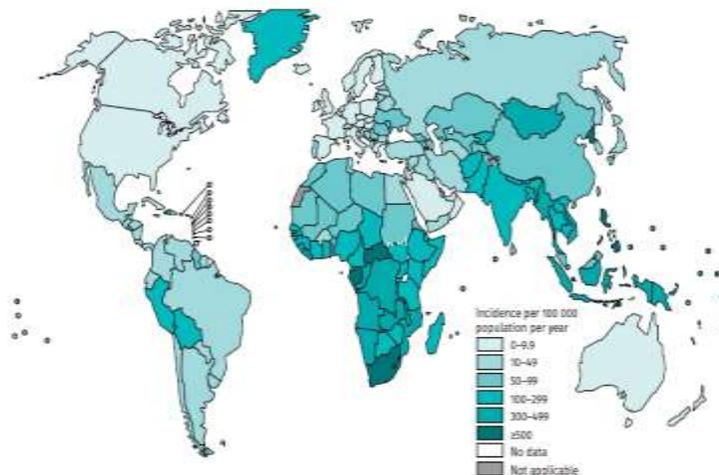


Figura 2. Tasas de incidencia de TB en 2021. WHO GLOBAL tuberculosis report 2021

Las cifras en México en el año 2021 fueron de 20 mil casos nuevos de tuberculosis respiratoria y un poco más de 4 mil casos de tuberculosis extrapulmonar. Siendo más afectado el grupo de 25 a 44 años¹².

En el estado de Nuevo León se registraron 5,600 casos y 180 defunciones predominando la forma pulmonar, seguida de la extrapulmonar donde la diabetes es la principal enfermedad asociada a la tuberculosis (TB)¹².

1.5 Diagnóstico de tuberculosis.

A la sospecha de tuberculosis pulmonar en todo paciente que desarrolla síntomas respiratorios mayor a 3 semanas es necesario observar patrones radiológicos en los pulmones que correspondan a la patogenia de la enfermedad y confirmando las manifestaciones clínicas, se considera prudente llevar a cabo el diagnóstico por medio de pruebas de laboratorio como es la baciloscopia donde se identifican bacilos ácido - alcohol resistentes (BAAR) y el cultivo para la identificación de la especie a partir de muestras de esputo¹³.

La baciloscopia resulta ser una prueba rápida y económica debido a una tinción diferencial Ziehl-Neelsen para identificar BAAR¹³. Sin embargo, tiene una sensibilidad del 50% debido a que los niveles detectables son de 5,000 – 10,000 bacilos/mL en la muestra de esputo y su especificidad es nula debido a que no solamente se puede identificar a *M. tuberculosis*, sino también, a otras micobacterias que tienden a teñirse por esta técnica¹³.

En un cultivo es necesario aislar al microorganismo para determinar la especie y posteriormente llevar a cabo los estudios de sensibilidad antimicrobiana que en conjunto son importantes para el control de tratamiento y curación de los pacientes.

El cultivo microbiológico resulta ser un método más sensible que la baciloscopia debido a que solo se requieren de 10 a 100 bacilos viables por muestra¹⁴. Siendo una desventaja, sin contar el tiempo necesario para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, que demora de entre 6 a 8 semanas afectando el

inicio del tratamiento de los pacientes¹⁴. Por otro lado, la prescripción de drogas sin la espera de los resultados origina la aparición de cepas resistentes o multi drogo resistentes¹⁴.

Existen otros métodos de diagnóstico como lo son los moleculares y serológicos. Las pruebas moleculares demuestran ventajas en la rapidez, alta sensibilidad y especificidad cuando las muestras tienen una baciloscopía positiva que permite identificar la especie o cepa responsable de la infección. Sin embargo, existen desventajas debido a que un solo gen no permite la identificación del patógeno, siendo necesario la amplificación de más regiones genómicas y resultando costoso para la identificación de la especie por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁵.

Por otro lado, los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos séricos formados contra antígenos de *M. tuberculosis*, los cuales pueden ser proteínas, lípidos y polisacáridos, etc¹⁶. Presentando ventajas debido al fácil desarrollo, accesibilidad, confiabilidad y obtención de un diagnóstico rápido¹⁶. Sin embargo, la desventaja es la falta de antígenos altamente sensibles y específicos para estas pruebas.

Se han obtenido antígenos purificados de origen proteico directamente del cultivo de *M. tuberculosis* utilizados para diagnosticar la infección, esto es conocido actualmente como la prueba de la tuberculina, en la que se emplea un derivado proteico purificado (PPD) presentando poca especificidad debido a las reacciones cruzadas originadas¹⁷.

En la siguiente **Tabla 1** se muestran los antígenos de origen proteico utilizados para el diagnóstico serológico de TB, en la cual se muestra la sensibilidad y especificidad que alcanzan los antígenos puros¹⁴.

Tabla 1. Principales antígenos de origen proteico de uso en el diagnóstico serológico. Palma J. et. al. Arch Bronconeumol. 2007

Antígenos	Sensibilidad	Especificidad	Diagnósticos
ESAT-6	27%		TB latente
CFP-10	25%	97%	TB BAAR-
16-kDa	57%		TB VIH+
30-kDa	61%	95%	TB pulmonar
38-kDa	68%	96%	TB pulmonar
	63%	90%	TB VIH+
Mtb48	44.4%	93%	TB VIH+
TB16.3	66%		TB BAAR-
	88%		TB VIH+
	98%		TB VIH -
Mtb81	70%	99%	TB VIH +
U1 (21 kDa)	87.2%		TB VIH +

Resultando ser un gran desafío debido a la necesidad de encontrar un método de diagnóstico rápido en pacientes con TBP que resultan con baciloscopia negativa e inclusive con tuberculosis extrapulmonar en donde las pruebas no son efectivas.

No obstante se ha realizado una caracterización de la respuesta inmune humoral de pacientes con TBP contra antígenos de *M. tuberculosis* por medio de pruebas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) encontrando una reactividad variable en los sueros de pacientes con TB como fuente de anticuerpos IgG contra un panel de 10 proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli* las cuales se muestran en la Figura 3¹⁸.

del genoma se les ha determinado su función, esto es, 1,756 de 4,066 genes, el resto corresponden a proteínas hipotéticas ²³.

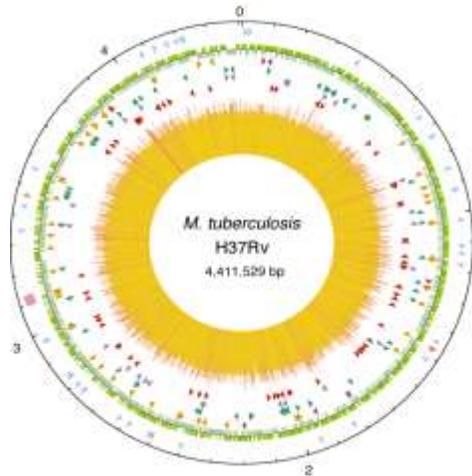


Figura 4. Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Cole S. Et. al. Nature, 1998.

El estudio del proteoma de esta bacteria es fundamental para entender las bases moleculares de su virulencia y patogenicidad²⁴, y se ha dirigido a la descripción de la función de las proteínas de su envoltura y que tienden a secretarse, a su vez está enfocado en determinar la relevancia de las especies micobacterianas que expresan dichas proteínas, pues podrían ser usadas como posibles blancos para el desarrollo de vacunas o pruebas de serodiagnóstico contra la tuberculosis¹⁶. La mayoría de los estudios de proteómica están concentrados en determinar la abundancia de varias proteínas a lo largo del desarrollo del patógeno; algunos patógenos como lo es esta bacteria al no tener estadios definidos cuando se encuentra dentro del hospedero, crea una interacción dinámica entre los dos, es decir, está en constante evasión del sistema inmune a través de diferentes proteínas de superficie con el fin de sobrevivir y continuar la infección ²⁵.

1.7 Proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* son aquellas que la bacteria libera al medio de cultivo en el que crece²⁶. Estas proteínas están caracterizadas como importantes antígenos que tienen una respuesta

moduladora en el sistema inmune²⁷. Aunque se sabe poco de la función que tienen en la pared celular y por el cual llevan el mecanismo de secreción²⁶. Al encontrarse en el medio extracelular por esta bacteria se ha reportado que estas son reconocidas por el sistema inmunitario del hospedero infectado induciendo una inmunidad protectora y una respuesta inmune con valor diagnóstico²⁸ (**Tabla 2**). La mayoría de los estudios con estas proteínas están encaminados a la identificación de blancos moleculares con utilidad potencial para el desarrollo de una prueba diagnóstica²⁹ y el desarrollo de nuevas vacunas; se cree que una de las posibles estrategias para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la tuberculosis involucra el uso de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* durante su crecimiento in vitro³⁰.

Tabla 2. Lista de antígenos de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con valor diagnóstico. Målen H.et. al. Scand. J. Immunol, 2008

Locus cepa H37Rv	Gen	Identidad proteica
Rv0040	mtc28	Proteína rica en prolina secretada
Rv0063	-	Posible oxidorreductasa
Rv0129c	fbpC	Antígeno secretado 85C (micolil transferasa)
Rv0287	esxG	Proteína similar a ESAT-6
Rv0932c	pstS2	Lipoproteína fijadora de fosfato periplasmática
Rv0934	pstS1	Lipoproteína fijadora de fosfato periplasmática
Rv1837	glcB	Posible malato sintasa
Rv1860	MPT32	Proteína antigénica secretada rica en alanina y prolina MPT32
Rv1886c	fbpB	Antígeno secretado 85B (micolil transferasa)
Rv1926c	mpt63	Proteína inmunogénica MPT63

Rv1980	mpt64	Proteína inmunogénica MPT64
Rv2878c	mpt53	Antígeno secretado soluble MPT53
Rv2911	dacB2	Posible alanil-D-alanina carboxipeptidasa
Rv3006	lppZ	Lipoproteína probablemente conservada
Rv3418c	groES	Chaperonina de 10 kDa
Rv3587c	-	Posible proteína de membrana conservada
Rv3803c	fbpD	Antígeno secretado MPT51
Rv3804c	fbpA	Antígeno secretado 85A (micolil transferasa)
Rv3874	esxB	Antígeno de filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP10)
Rv3881c	-	Proteína rica en alanina y glicina hipotética conservada

Se ha podido demostrar que las proteínas micobacterianas se secretan debido a la liberación específica en un medio extracelular circundante y como se sabe *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir y proliferar dentro de los macrófagos por el cual, el fagosoma no se ve modificado por las bacterias muertas, sino por las proteínas que son secretadas y tienen un papel en la patogénesis. Además estas proteínas secretoras se caracterizan por ser antígenos de células T que activan una inmunidad protectora contra la tuberculosis³¹. Por lo tanto, la biotecnología es una alternativa que busca producir en gran escala antígenos como son los encontrados en el filtrado de *M. tuberculosis* y que éstos se produzcan en forma recombinante en un hospedero no patógeno de crecimiento rápido.

1.8 Producción recombinante de proteínas en *Pichia pastoris*.

Komagatella phaffii también conocida como *Pichia pastoris* es una levadura inocua que permite la producción de proteínas heterólogas a una alta densidad en medios simples, permitiendo el escalamiento industrial a bajo costo³². Existiendo una variedad cepas de esta levadura para una eficiente expresión de proteínas³³. Tiene varias ventajas como: la simplicidad de las manipulaciones genéticas, marcadores de selección tanto para *P. pastoris* como para *E. coli*, un sitio donde se inserta el gen que codifica para la proteína de interés por medio de sitios de restricción específicos, las secuencias señal para la secreción de las proteínas al medio y promotores que regulan la expresión de las proteínas como es el alcohol oxidasa 1 (AOX1) que es inducible por metanol^{33 34}, su habilidad para efectuar modificaciones post-traduccionales como son las glicosilaciones, la posibilidad de operar en condiciones simples de temperaturas, pH y ambiente aeróbico³⁵, entre otros (**Figura 5**).

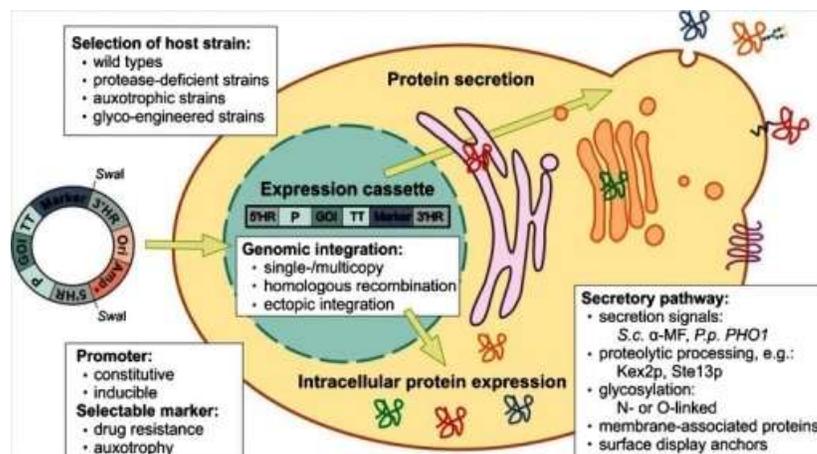


Figura 5. Consideraciones generales para la expresión génica heteróloga en *P. pastoris*. Ahmad M. et. al. Appl Microbiol Biotechnol, 2014.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin), que ha estado disponible durante más de 80 años, tiene una eficacia limitada en la prevención de la tuberculosis pulmonar, con resultados inconsistentes en los ensayos³⁶. Esto pone en la necesidad de desarrollar una vacuna mejorada contra la tuberculosis, basada en una mejor comprensión de las interacciones hospedero-patógeno y las respuestas inmunitarias durante la infección por micobacterias^{36 37}. Se ha demostrado que varios antígenos micobacterianos provocan una respuesta inmunitaria protectora³⁸ de igual forma involucrando los métodos serológicos de diagnóstico, los antígenos micobacterianos podrían usarse para el diagnóstico de laboratorio debido a que son altamente inmunogénicos y se secretan en el medio de cultivo. Los antígenos secretados que mayormente se contemplan para la detección son Mpt64 , ESAT-6, CFP-10 y el complejo Ag85³⁹ .

M. tuberculosis cuenta con proteínas que tienen una función en la pared celular y a la vez tiene un mecanismo de secreción. Particularmente, el gen Rv1886c codifica para la proteína antígeno 85B (Ag85B) que se encuentra dentro del complejo antigénico 85 (Ag85) principal constituyente de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG⁴⁰ conformada por Ag85A (31 kDa), Ag85B (30 kDa) y Ag85C (31.5 kDa)³⁹ Los análisis inmunocitoquímicos demuestran que el complejo Ag85 se expresa en monocitos humanos, que las proteínas se localizan en el espacio fagosomal y en la pared celular micobacteriana⁴¹. Por lo que la función específica es catalizar la transferencia de ácido micólico de un 6-monomicolato de trealosa a otro, dando como resultado trealosa 6,6 dimicolato confirmando hidrofobicidad e integridad de la pared celular⁴² de la micobacteria, y también permitiendo la activación/proliferación intensa de células T y la producción de interferón gamma (IFN- γ)⁴³. Específicamente el Ag85B se encuentra en una mayor

concentración en un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* de la cepa H37Rv por lo que se ha considerado potencialmente como blanco diagnóstico y como posible subunidad de vacuna⁴⁴.

Al igual que algunas otras proteínas presentes en la pared celular de las micobacterias, Ag85B es una proteína con dominios hidrofílicos-hidrofóbicos iguales, lo que permite ser compatible para residir dentro de la pared celular hidrofóbica micobacteriana⁴¹. De esta manera se ha visto que las proteínas forman inclusiones insolubles dentro de los hospederos de expresión heteróloga como sucede en *E. coli* haciendo difícil la purificación de los productos recombinantes⁴⁵. Siendo deseable preparar las proteínas en una forma soluble para que conserven sus propiedades relativamente similares a su forma nativa⁴⁶.

Con anterioridad el Ag85A, Ag85B y Ag85C se clonó, expresó y se evaluó su actividad micolil transferasa⁴⁷. Además se ha clonado con éxito toda la secuencia del Ag85B en los vectores pET28a(+), pET32a(+) y pQE-30 en el hospedero *E. coli* M15. Sin embargo, no existió expresión en pQE30-Ag85B. pET28-Ag85B y pET32a(+) tuvieron una diferencia significativa en la expresión del Ag85B recombinante debido al efecto propuesto del contenido de G+C teniendo las diferencias en el uso de codones y en la expresión eficiente de Ag85B⁴⁶. En otro estudio se expresó al Ag85B recombinante, utilizando al vector pTrcHisB y el hospedador de expresión *E. coli* TOP10. Su estudio afirma que el vector pTrcHisB supera el problema del bajo porcentaje de G + C en el genoma de *E. coli*⁴⁸.

Una investigación realizada con cobayos susceptibles a la tuberculosis pulmonar se demostró que la inmunización con la proteína de 30 kDa, sola o en combinación con otras proteínas de secreción abundantes, induce una fuerte respuesta inmune celular protectora ante a la exposición a aerosoles con bacilos de *M. tuberculosis* virulentos. La inmunoprotección se estimó por la disminución de la enfermedad clínica, a través de variables como la pérdida de peso, la mortalidad y el crecimiento de *M. tuberculosis* en los pulmones y el

bazo de los animales inmunizados, en comparación con sus controles⁴⁹. Demostrando que las principales proteínas extracelulares purificadas de *M. tuberculosis* son componentes candidatos de una vacuna de subunidades contra la tuberculosis y proporciona un apoyo convincente al concepto de que las proteínas extracelulares de los patógenos intracelulares son moléculas inmunoprotectoras clave⁴⁹.

Al estar asociado este complejo 85 en la pared celular y por ser un conjunto de proteínas secretadas, en pacientes con tuberculosis pulmonar y en líquido cefalorraquídeo se ha demostrado que el gen que codifica Ag85B se expresa tanto en fase aguda como en la crónica de la infección⁵⁰.

Liu et.al. expresó de manera recombinante al Ag85B de *M. tuberculosis* en *P. pastoris* GS115 induciendo la producción de la proteína por metanol para posteriormente ser purificada y detectada por medio de *western blot* con la finalidad de evaluar en un ensayo de ELISA a la proteína recombinante, resultando ser reactiva contra los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar. Sin embargo, no verificaron la presencia de glicosilaciones que pudo haber producido la levadura en ella ⁵¹.

Birhanu et.al. nos presenta por espectrofotometría de masas la glicosilación de proteínas involucradas en la biogénesis de la envoltura celular encontradas en el complejo *M. tuberculosis* reportándose al Ag85B y Ag85C como glicoproteínas⁵².

Capítulo 3

JUSTIFICACIÓN

Previamente se ha identificado a la proteína Ag85B como un candidato prometedor para el desarrollo de una prueba basada en ELISA para el diagnóstico rápido de TB.

En la mayoría de los estudios serológicos la proteína se ha expresado en bacterias, por lo que carece de N-glicosilación (N299), afectando su antigenicidad.

En este trabajo se propone llevar a cabo la producción del Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) en la levadura *Pichia pastoris*, en su forma nativa glicosilada para su uso futuro en el diseño de una prueba serológica y/o y determinar la potencial N-glicosilación de la proteína recombinante, para la integración de una vacuna de subunidad contra la TB.

Capítulo 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

El uso de la cepa SMD 1168H de *Pichia pastoris*, con baja actividad de proteasas, permitirá obtener altos niveles de producción del Ag85B recombinante en su forma nativa.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general.

Construir un sistema eucariótico que permita la expresión nativa, N- glicosilada del Antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* en la levadura *Pichia pastoris*.

4.2.2 Objetivos Específicos.

1. Construir un sistema para la expresión inducible del Antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* (Rv 1886c) empleando la levadura *Pichia pastoris* SMD 1168H.
2. Determinar la presencia de N-glicosilación en la proteína recombinante secretada al medio de cultivo.

Capítulo 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en cuanto a soluciones de trabajo y solventes grado molecular fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) de igual forma los reactivos para los medios de cultivo fueron adquiridos de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA).

En lo que corresponde a los procedimientos de biología molecular con ácidos nucleicos, la Mytaq ADN polimerasa se adquirió de la casa comercial Bionline (Londres, Inglaterra, UK). Los *primers* para la PCR fueron adquiridos de Alpha ADN (Montreal, Quebec, Canadá). La Platinum SuperFi ADN polimerasa, como las enzimas de restricción *Xho-I*, *Not-I*, *Sac-I* *EcoR-I*, el antibiótico zeocina son de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Así como, la ADN ligasa T4 y el kit de *GeneJET gel extraction and DNA cleanup micro kit* de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

El sistema de purificación de proteínas por afinidad de níquel fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Por otro lado, las columnas PD-10 pertenecen a la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Con respecto a la identificación de la proteína en el inmunoensayo, el anticuerpo anti-c-myc y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP fueron adquiridos por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Con lo que respecta a la evaluación de la identificación de la glicosilación el kit Glycoprotein staining fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Meridian RD, IL, EUA).

5.1.2 Material biológico

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y *Komagatella phaffi* (*Pichia pastoris*) SMD 1168H, el vector pET100/D-TOPO y el vector clonación/expresión pPICZ α A, fueron adquiridos de la casa comercial Invitrogen (Waltham, MA, EUA).

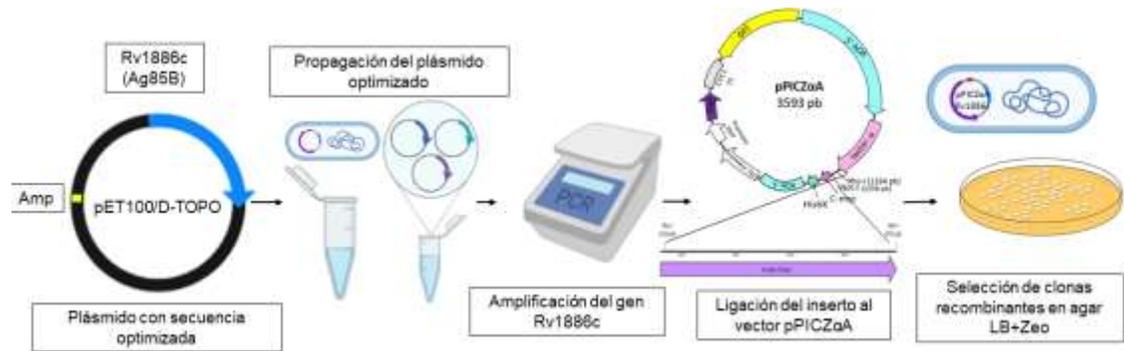
5.2 Estrategia general de clonación del gen Rv1886c y expresión de la proteína Ag85B.

Se llevó a cabo el diseño y optimización de la secuencia Rv1886c para propagar en el plásmido pET100/D-TOPO. Se amplificó el gen de interés Rv1886c por PCR utilizando los *primers* diseñados específicamente para añadir los sitios de restricción *Xho*-I y *Not*-I al inserto. Una vez añadidos los sitios de restricción al inserto y en el vector de expresión pPICZ α A, se pasó a la ligación y transformación del vector en la cepa *E. coli* DH5 α , para seleccionar la clonas construidas por la obtención de resistencia al antibiótico zeocina (**Figura 6A**).

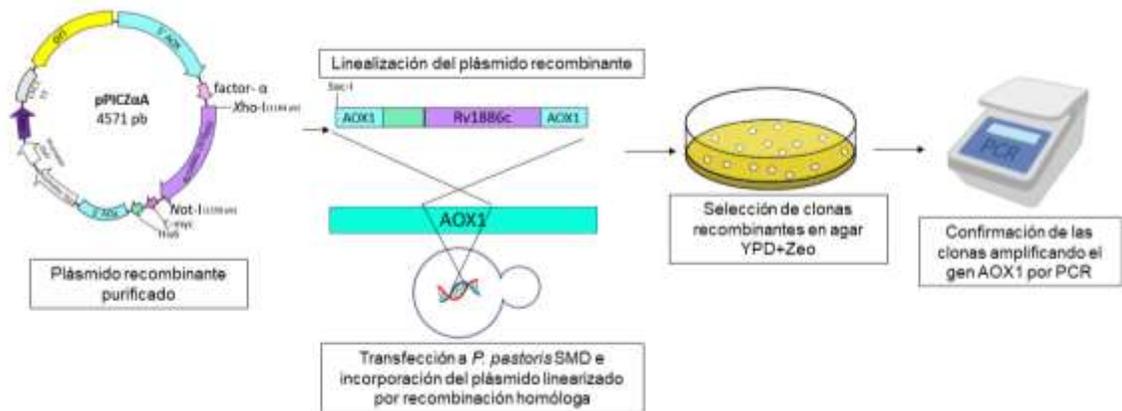
Los vectores recombinantes fueron linearizados con la enzima de restricción *Sac*-I, en este sitio se encuentra la región promotora del gen AOX1. La construcción linearizada se utilizó para transformar la cepa de levadura *P. pastoris* SMD 1168H, en donde este se integró al genoma mediante recombinación homóloga. La clona recombinante identificada por su fenotipo de resistencia a la zeocina y el genotipo de su gen AOX1 una vez modificado con el inserto, por medio de PCR (**Figura 6B**).

Las clonas recombinante en este levadura fueron cultivadas en medio BMGY para la obtención de mayor biomasa que nos permitió el pase a la inducción de la proteína por medio de MeOH (1%) en medio BMMY. El sobrenadante obtenido se dializó contra agua destilada y para la detección de la proteína Ag85B se realizó SDS-PAGE y western blot, para llevar a cabo la purificación por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 6C**).

A)



B)



C)

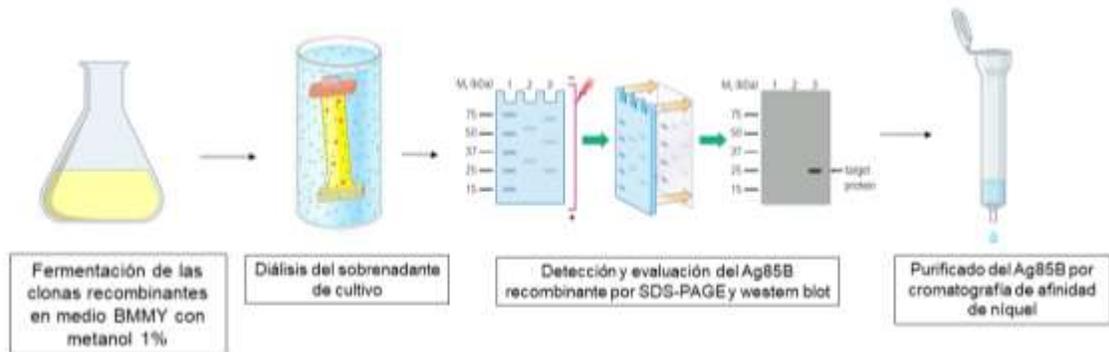


Figura 6. Diagrama general de clonación de Rv1886c y expresión del Ag85B recombinante en *P. pastoris*. Protocolos de clonación, transfección y expresión de las proteínas recombinantes.

5.3 Diseño y optimización de la secuencia Rv1886c.

La secuencia del gen Rv1886c de *M. tuberculosis* fue tomada del NCBI con el número de acceso Gen ID: 885785. La secuencia del gen de interés consta de 978 pb. La secuencia codificante para la forma del Ag85B es de 325 aminoácidos y se le retiraron los primeros 40 codones que corresponde al péptido señal (**Figura 7**) A esta secuencia se le añadió los *primers* optimizados para esta secuencia como es *Xho*-I en el extremo 5' y el *Not*-I en el extremo 3' como se observa en la **Tabla 3**.

La optimización de la secuencia se llevó a cabo mediante Thermo Fisher, el proceso de optimización consistió en incrementar el porcentaje de codones preferenciales para *P. pastoris* cambiando la tercera base del codón ajustando el contenido de guaninas y citocinas. La secuencia se recibió integrada en el plásmido pET-100/D-TOPO.

```
ATGACCCGACCTGCTCCAGAAAGATTAGAGCCTGGGGTAGAAGATTGATGATCCGCTACTGCTGCTGCCGTTGT  
TTTGCCAGCTTTGCTTGCTTTAGCTGCTGCTGCTGCTACTGCTGCTGCTTTTTCTAGACCAGGTTTGCCAG  
TTGAGTACTTGCAGGTTCCATCTCCATCTATGGGTAGAGACATCAAGGTTCCAGTCCGGTGGTAAC  
AACTCTCCAGCTGTTTACTTGTGGACGGTTTGAGAGCCCAAGACGATTACAACGGTTGGGACATTAACAC  
TCCAGCCTTCGAGTGGTACTACCAATCTGGTTTTGTCCATCGTTATGCCAGTTGGTGGTCAATCCTCTTTCT  
ACTCTGACTGGTACTCTCCTGCTTGTGGTAAGGCTGGTTGTGACACTTACAAGTGGGAGACTTTCTTGACC  
TCCGAGTTGCCACAATGGTTGTCTGCTAACAGAGCTGTTAAGCCAACTGGTTCCGCTGCTATCGGTTTGTG  
TATGGCTGGTTCTTCCGCTATGATCTTGGCTGCTTACCATCCACAGCAGTTCATCTACGCTGGATCTTTGT  
CTGCTTTGCTGGACCCATCTCAAGGTATGGGTCCATCCTTGATTGGTTTGGCTATGGGTGATGCTGGTGGT  
TACAAGGCTGCTGATATGTGGGTCCATCTTCTGATCCAGCTTGGGAAAGAAACGACCCAACTCAGCAGAT  
CCCAAAGTTGGTTGCTAACAACACCAGACTGTGGGTCTACTGTGGTAACGGTACTCCAAACGAAC TTGGTG  
GTGCAAACATTCCAGCTGAGTTCTTGGAGAACTTCGTCAGATCCTCCAACCTGAAGTTCCAGGATGCTTAT  
AACGCTGCTGGTGGACACAACGCCGTTTTTAACTTTCCACCAAACGGAACCCACTCTTGGGAATACTGGGG  
TGCTCAATTGAACGCTATGAAGGGTGACTTGCAGTCCTCTCTTGGTGCTGGTTAA
```

Secuencia señal: ATG

Secuencia codificante: (■)

Figura 7. Secuencia Rv1886c optimizada

Tabla 3. Optimización de *primers* para la secuencia Rv1886c

Iniciadores	Secuencia
ppAg85B-F-Xho	5'TATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTTTTCTAGAC CAGGTTTGCCAGTT 3'
ppAg85B-R-Not	5' CTGGCGGCCGCTTAACCAGCACCAAGAGAGGACTG 3'

El vector empleado en la estrategia de clonación fue el plásmido pPICZ α A, el cual tiene un tamaño de 3593 pb y que contiene algunos elementos para llevar a cabo la clonación del gen Rv1886c que también nos permitirá expresar la proteína en el sistema eucarionte. Este vector tiene un promotor inducible (AOX1) en presencia de MeOH; una secuencia señal de secreción (factor α de *Saccharomyces cerevisiae*) que permite la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular; el epítipo c-Myc para la identificación de la proteína por western blot, mediante un anticuerpo anti-c-Myc y la cola de histidinas (6xHis) necesaria para la purificación por cromatografía de afinidad a níquel, respectivamente; una región de terminación de la transcripción (TT) de AOX1 que permite un eficiente procesamiento de la región -3' del ARNm añadiendo una cola de poliadeninas para incrementar su estabilidad; los promotores EM7 y de eucariotas TEF1 (factor de elongación de la transcripción 1) que dirigen la transcripción del gen de resistencia a zeocina en *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente; la región de terminación de transcripción CYC1 de *S. cerevisiae* que favorece un procesamiento adecuado de la región -3' del transcrito del gen de resistencia a zeocina, finalmente, un origen de replicación pUC que mantiene la replicación del vector en *E. coli* (**Figura 8**).

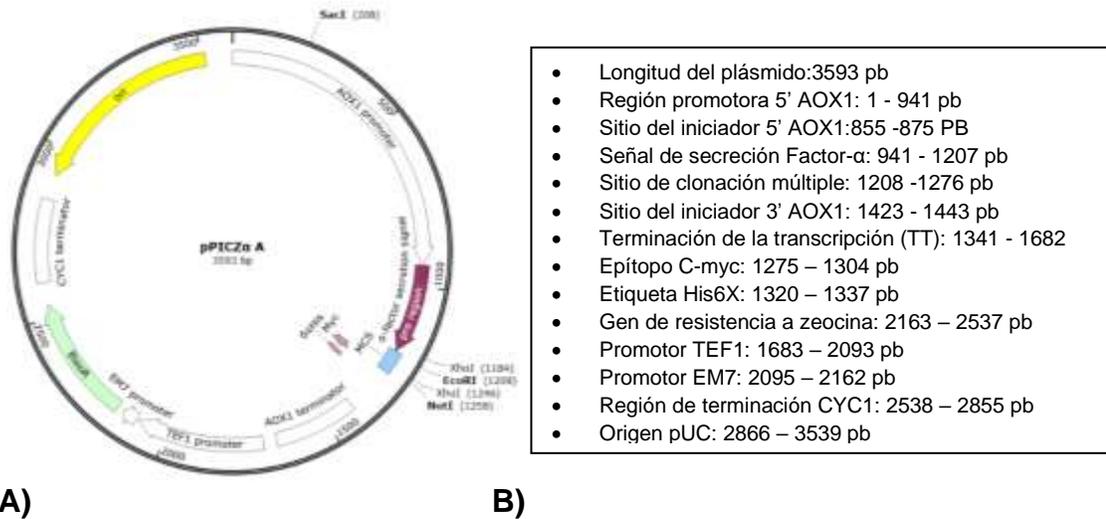


Figura 8. Características del vector de clonación y expresión pPICZ α A. A) En el mapa se señalan los sitios de *Xho*-I (1184) y *Not*-I (1258) para la clonación. B) Se detallan cada uno de los componentes del vector de expresión.

5.4 Propagación del plásmido pET100/D-TOPO.

5.4.1 Preparación de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α .

La preparación de estas células es para la transformación del plásmido pET100/D-TOPO que contiene la secuencia Rv1886c de interés. Se comenzó con la inoculación de una asada de cultivo sólido de *E. coli* DH5 α en un tubo con 4 mL de medio LB, el cual fue incubado a 37°C, 200 rpm de agitación durante 24 horas. Posteriormente, se tomaron 500 μ L del medio previamente crecido para ser inoculados a un matraz (Erlenmeyer de 250 mL) con 100 mL de caldo LB para llevar a la incubación a 37°C por 200 rpm de agitación durante un periodo de 2 - 4 horas, hasta alcanzar la fase logarítmica ($A_{600}=0.5 - 0.6$). Al término de este proceso el medio se dividió en dos partes iguales en tubos cónicos de 50 mL para ser refrigerados a 4°C durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos manteniendo la temperatura de 4°C lo que permitió empaquetar a las células para continuar con una serie de lavados a los mismos, utilizando 50 mL de agua mQ estéril y fría y homogenizando de forma cuidadosa durante tres veces, en cada uno de estos lavados se realizó centrifugaciones de 4000 rpm por 10 minutos a 4°C,

descartando el agua mQ en cada uno de estos lavados que nos permitió resuspender los pellets y mezclarlos en un solo tubo eppendorff de 1.5 mL para ser centrifugado a 4°C, 10000 rpm durante 5 minutos. Una vez empaquetadas las células se resuspendieron en una proporción 1:1 de agua (300 µL) y de glicerol al 40% (300 µL). Finalmente, las células fueron almacenadas en alícuotas de 80 µL en tubo eppendorf de 0.5 µL estériles a -70°C.

5.4.2 Transformación del plásmido pET100/Rv1886c en células *E. coli* DH5α electrocompetentes.

Para propagar el plásmido pET100/Rv1886c se emplearon las células electrocompetentes *E. coli* DH5α, previamente descrito. Se añadió 100 ng de ADN plasmídico en una alícuota de células electrocompetentes, pipeteando suavemente toda la muestra en la celda de electroporación de 0.2 cm para ser pulsadas con 1800 V (Eppendorf; Hamburgo, Alemania). Que posteriormente, se agregaron 100 µL de medio LB estéril en la celda de electroporación para la recuperación del mayor volumen posible de la células electroporadas y ser depositadas en un tubo de ensaye con un contenido de 900 µL de caldo LB e incubando a 37°C, 200 rpm de agitación por 24 horas. Empaquetando las células a 12000 rpm por 5 minutos para ser resuspendidas en 100 µL de caldo LB fresco. Dicha suspensión fue sembrada mediante dispersión con asa de vidrio en placa de agar LB suplementas con ampicilina (100 µg/mL) incubando a 37°C por 24 horas. A demás se utilizaron algunos controles que respaldan el funcionamiento de la transformación.

5.4.3 Obtención del vector pET100/Rv1886c por el método de lisis alcalina.

Una vez incubadas las placas de agar LB previamente inoculadas con células electroporadas con el plásmido que contiene la secuencia de interés, se prosiguió a observar la presencia de colonias, estas fueron respaldadas en una placa de agar LB con zeocina [100 µg/mL] previamente cuadrículada de esta forma cada una de las colonias se inocularon de manera independiente en un

tubo de 4 mL de caldo LB con zeocina [100 µg/mL]. Los tubos y las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y los tubos en agitación a 200 rpm.

De los tubos se tomaron 2 mL de cultivo con las presuntas clonas para colocar en tubos de eppendorff de 2 mL y empaquetar las células por centrifugación a 6000 rpm por 5 minutos y por medio del método de extracción de ADNp basado en las lisis de células en estado alcalino. El pellet se resuspendió en 100 µL de la solución I (glucosa [50 mM]; Tris-HCL [25 mM]; pH= 8.0; EDTA [10 mM], pH=8.0) fría, que se agitaron en vórtex Genie 2 G-560 (Scientific Industries; Bohemia, NY, EUA) por 1 minuto e incubándose a 4 °C por 5 minutos. Posterior, se adicionó 200 µL de la solución II (NaOH [0.2 N]; SDS [1%] recién preparada, mezclando rápidamente por inversión e incubando a 4 °C por 5 minutos. Finalmente, se agregaron 150 µL de la solución III (acetato de amonio [7.5 M] fría, mezclando por inversión e incubando a 4 °C por 5 minutos. Una vez concluido se pasó a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos, recogieron 450 µL de cada fase líquida del tubo para pasarlos a un nuevo tubo de 2 mL y se realizó una extracción con fenol-cloroformo, para después mezclar en vórtex por 30 segundos y centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. transfiriendo 400 µL de fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y precipitando el ADNp agregando 2.5 volúmenes (1 mL) de EtOH [100%] frío, para ser incubado a -20 °C toda la noche.

Al término de la precipitación, el tubo se centrifugó a 14000 rpm por 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla con ADNp se lavó con 500 µL de EtOH [70%], para centrifugar de nuevo a 12000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, la pastilla se dejó secando a temperatura ambiente para eliminar residuos de EtOH y finalmente se resuspendió en 30 µL de agua mQ estéril con RNasa (Sigma Aldrich; St Louis, MO, EUA). Se tomó 1 µL del plásmido purificado para determinar la concentración por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de 260 nm con el Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para el aseguramiento de la integridad del ADNp se utilizaron 3 µL y por medio de

electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 v, 45 minutos) se visualizó un corrimiento electroforético poniendo en evidencia mediante la tinción con Bromuro de Etidio (2 µg/mL) con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). El ADNp fue almacenado hasta su uso a -20°C.

5.5 Amplificación del gen Rv1886c por PCR.

La obtención del inserto se realizó primeramente amplificando el gen Rv1886c de *M. tuberculosis* realizando 5 reacciones de PCR. En la **Tabla 5.2** se muestran los elementos que constituyen la PCR y en la **Tabla 5.3** se muestran las condiciones específicas en el termociclador para llevar a cabo la amplificación del producto.

Tabla 4. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen Rv1886c.

	1X	[Final]
dNTPs [10 mM]	1 µL	[200 µM]
ADNg	1 µL	
SuperFi ADN pol [2 U/µL]	0.5 µL	[0.05 U/µL]
Primer F [10 µM]	2.5 µL	[0.5 µM]
Primer R [10 µM]	2.5 µL	[0.5 µM]
Buffer 5X	10 µL	[1x]
H ₂ O	32.5 µL	
Vol. final	50 µL	

Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen Rv1886c.

Temperatura	Tiempo
98 °C	30 segundos
98 °C	10 segundos
55 °C	10 segundos
72 °C	20 segundos
72 °C	5 minutos
4 °C	∞

Se utilizó la enzima Platinum SuperFi II DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) lo que nos permitió amplificar nuestro inserto, la cual genera síntesis evitando menos errores en las amplificaciones.

Después de la obtención de las amplificaciones se resolvieron en un gel de agarosa 1% (100 V, 40 minutos) poniéndose como evidencia mediante la tinción con bromuro de etidio (2 µg/mL). Donde se obtuvo el patrón de bandas visualizadas con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) y se tomó 1 µL para la cuantificación del producto obtenido mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm UV-Vis Nano Drop 2000.

5.5.1 Purificación del producto de PCR.

Es necesario obtener un producto limpio y óptimo para el protocolo de clonación, es de esta forma que se utilizó un kit de purificación de PCR Thermo Scientific GeneJET utilizando las instrucciones del fabricante.

A partir de las 5 reacciones de PCR se formó un pool en tubo eppendorff teniendo un total de 200 µL para realizar la purificación del ADN, a esto se le agregó 100 µL de binding buffer con 300 µL de EtOH (100 %) y se mezclaron. Toda esta mezcla se transfirió en la columna de purificación con un tubo colector para posterior realizar una centrifugación a 14000 g por 45 segundos descartando lo del tubo colector. Se añadió 700 µL de buffer de lavado realizando una centrifugación a 14000 g por 45 segundos con otra repetición de este paso y remover el exceso de buffer de lavado. Posteriormente la columna se colocó en un nuevo tubo colector y específicamente en el centro del filtro de la columna se añadió 10 µL de agua mQ estéril para dejar reposar por 5 minutos y centrifugar a 14000 g por 1 minuto. Finalmente se retiró la columna del tubo colector y del volumen del producto purificado se tomó 1 µL para cuantificar la concentración y se tomaron 2 µL para evidenciar su integridad en un gel de agarosa 1% (100 V, 40 minutos).

5.5.2 Digestión del inserto con *Xho*-I y *Not*-I.

Se realizó la digestión del inserto, utilizando de manera simultánea las enzimas *Xho*-I y *Not*-I, en la **Tabla 6** se muestra los elementos que se utilizaron para estas reacciones.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la digestión del inserto con *Xho*-I y *Not*-I.

	1x	[Final]
H ₂ O mQ	Volumen necesario	
Buffer anza 10x	2 µL	1x
ADN (inserto)	Volumen necesario	
<i>Xho</i> -I [20 U/µL]	1 µL	[20 U/Rxn]
<i>Not</i> -I [20 U/µL]	1 µL	[20 U/Rxn]
Volumen final	20 µL	

El volumen de la reacción dependió de la concentración del ADN que se obtuvo después de la purificación, se debe considerar un exceso de enzima en cuanto la concentración del ADN.

Estas reacciones de digestión fueron incubadas a 37° C por una 4 horas en la incubadora. Para ser almacenadas a 4° C para su posterior uso en la clonación.

5.5.3 Preparación y digestión del vector de expresión pPICZαA

El vector pPICZαA se utilizó para la clonación del gen de interés y fue extraído de *E. coli* DH5α utilizando el método de extracción de ADNp por la técnica de lisis alcalina como se realizó en el 5.4.3. Posteriormente, fue digerido con las enzimas de *Xho*-I y *Not*-I y finalmente se purificó por el método de *GeneJET gel extraction and DNA cleanup micro kit* ya antes descrito en el 5.5.1, esto para obtener únicamente el ADN purificado y de esta manera no existieran interferencias en el momento de la transformación.

Con base en la concentración obtenida del ADNp, se realizó la digestión con las enzimas *Xho-I* y *Not-I*, como lo muestra la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones de reacción para la digestión del vector con *Xho-I* y *Not-I*.

	1x	[Final]
H ₂ O mQ	Volumen necesario	
Buffer anza 10x	5 µL	1x
ADN (vector)	Volumen necesario	
<i>Xho-I</i> [20 U/µL]	1 µL	[20 U/Rxn]
<i>Not-I</i> [20 U/µL]	1 µL	[20 U/Rxn]
Volumen final	50 µL	

Una vez ya purificado el vector linearizado con las respectivas enzimas de restricción, se utilizó 1 µL para realizar la cuantificación por espectrofotometría y 3 µL para verificar su integridad en una electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V, 40 minutos).

5.5.4 Reacción de ligación de la secuencia Rv1886c y el vector pPICZαA.

Para la construcción del vector recombinante pPICZαA-Rv1886c fue necesario realizar la digestión tanto de vector como del inserto con las enzimas de restricción *Xho-I* y *Not-I* (**Figura 9**), generando cortes cohesivos para esta manera favorecer la clonación en la dirección correcta.

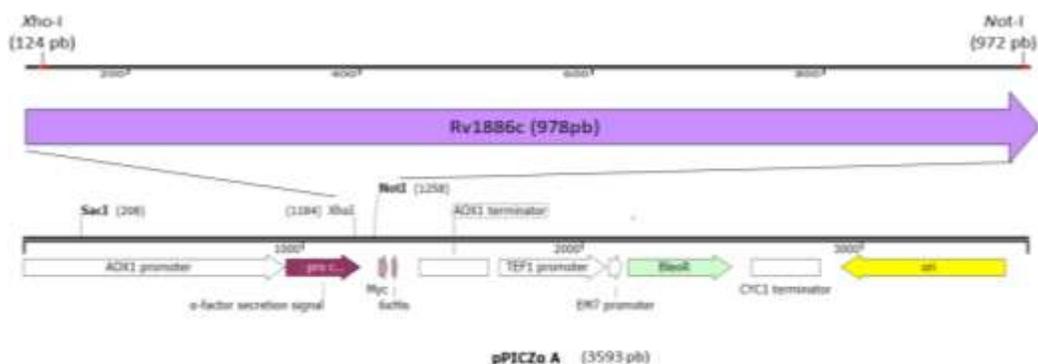


Figura 9. Ligación del gen Rv1886c en el vector pPICZαA. Representación de la secuencia del gen Rv1886c para ubicación en el vector pPICZαA en los sitios *Xho-I* y *Not-I*.

Se utilizó la enzima ADN ligasa T4 (Sigma-Aldrich) lo que nos permitió catalizar la reacción para unir el inserto y en el vector linealizado, con las siguientes condiciones indicadas en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones de reacción para la ligación del inserto Rv1886c en el vector pPICZαA.

	1x	[Final]
H₂O mQ	Volumen necesario	
Buffer Ligasa 10X	3	1x
pPICZαA	Volumen necesario	500 ng/rxn
Ag85B	Volumen necesario	864 ng/rxn
ADN ligasa T4	2	1 U/Rxn
Volumen final	30 µl	

En las reacciones de ligación se mantuvo una relación molar vector:inserto 1:6 que posteriormente la reacción de ligación se incubó a 16°C por 16 horas. Concluida la reacción se conservó a -20 °C hasta su uso.

5.5.5 Transformación del vector recombinante pPICZαA-Rv1886c en *E. coli* DH5α.

Para realizar la transformación del vector recombinante pPICZαA-Ag85B del producto que se obtuvo de la reacción de ligación en el anterior paso, se precipitó con 5 volúmenes de IsopOH [100%] a -20°C por 16 horas. Posteriormente, la reacción fue concentrada a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C con un lavado con EtOH [70%] y una centrifugación a 14000 rpm por 20 minutos a 4 °C; se descartó el sobrenadante de EtOH y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente continuando con la resuspensión con 5 µL de agua mQ estéril.

Previamente se prepararon las células *E. coli* DH5α electrocompetentes como se presentó en el 5.4.1 lo que nos permitió llevar a cabo el protocolo de

transformación que consistió en usar 5 μ L del producto de ligación que se mezclaron en una alícuota de células electrocompetentes y se transformaron como se ha descrito en el 5.4.2. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de caldo LB fresco, donde 900 μ L del volumen se utilizaron para plaquear el agar LB+Zeo [100 μ g/mL] y los 100 μ L restantes en otra placa de igual forma. Se utilizaron algunos controles que fueron útiles para verificar el funcionamiento del protocolo de transformación. Estas cajas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas.

5.5.6 Obtención del vector recombinante pPICZ α A-Ag85B por el método de lisis alcalina.

La presencia de colonias en las placas de agar LB+Zeo [100 μ g/mL] al término de la incubación fueron respaldadas independientemente en una placa de agar LB+Zeo [100 μ g/mL] previamente cuadrículada para inocular cada colonia de manera independiente en tubos con 4 mL de caldo LB+Zeo [100 μ g/mL] que fueron incubados a 37°C con agitación de 200 rpm. Por lo que, se continuó con el método de lisis alcalina ya antes mencionado.

Los ADN plasmídicos se resolvieron en un gel de agarosa 1% (100 V, 40 minutos) poniéndose como evidencia mediante la tinción con Bromuro de Etidio (2 μ g/mL) y utilizando 1 μ L del ADNp purificado para cuantificar por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de 260 nm con el Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Los plásmidos obtenidos de las clonas recombinantes fueron almacenados hasta su uso a -20°C.

5.5.7 Evaluación y caracterización de las construcciones obtenidas.

Para evidenciar la formación del vector recombinante pPICZ α A-Rv1886c el ADNp fue expuesto a diferentes enzimas de restricción con la finalidad de la caracterización entre el vector recombinante y vector vacío como se muestra en la **Figura 10**.

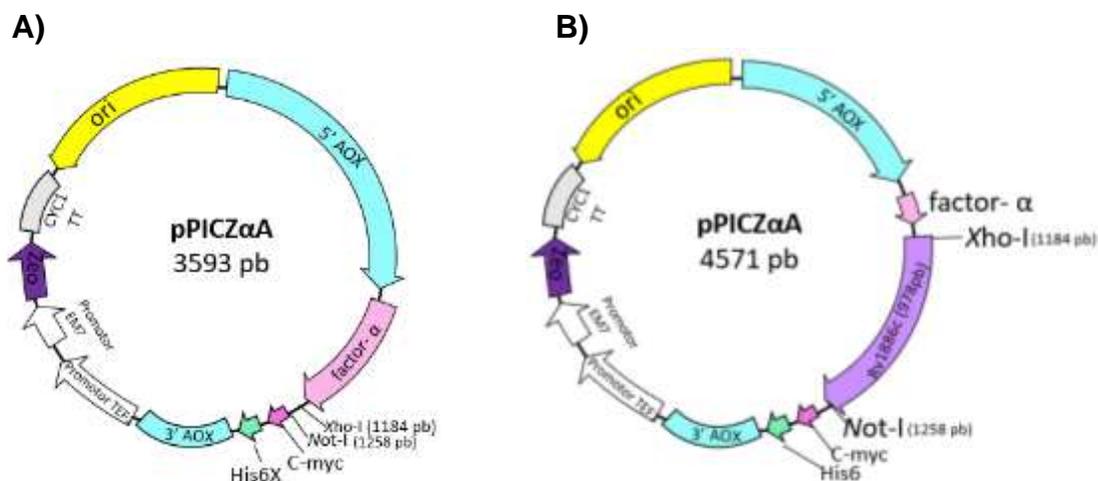


Figura 10. Representación de la construcción pPICZαA-Rv1886c. A) Vector pPICZαA y B) Integración del gen Rv1886c en el vector pPICZαA.

Primeramente se realizó una linearización del vector recombinante y del vector vacío con la enzima *Xho*-I utilizando las siguientes condiciones según la **Tabla 9**.

Tabla 9. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZαA-Rv1886c con la enzima *Xho*-I.

	1x	[Final]
H₂O mQ	Volumen necesario	
Buffer Anza 10X	2 μL	1x
ADNp [1 μg]	Volumen necesario	200 [ng/μL]
<i>Xho</i>-I [20 U/μL]	1 μL	20 [U/Rxn]
Volumen final	20 μL	

La reacción de digestión fue incubada a 37 °C por 1 hora. Posteriormente el producto de la digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

Después se realizó la reacción de digestión con *Xho*-I y *Not*-I en el vector recombinante y el vector vacío. Según las condiciones en la siguiente **Tabla 10**.

Tabla 10. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZαA-Rv1886c con la enzima *Xho*-I y *Not*-I.

	1x	[Final]
H₂O mQ	Volumen necesario	
Buffer Anza 10X	2 µL	1x
ADNp [1 µg]	Volumen necesario	200 [ng/µL]
<i>Xho</i>-I [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
<i>Not</i>-I [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
Volumen final	20 µL	

La reacción de digestión fue incubada a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, el producto de la digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

Finalmente, se realizó una digestión en el sitio de restricción *Eco*R-I para la confirmación de la unión correcta al sitio *Xho*-I en el vector recombinante. Según las condiciones en la siguiente **Tabla 11**.

Tabla 11. Condiciones de reacción de digestión para el vector pPICZαA-Rv1886c con la enzima *Eco*R-I.

	1x	[Final]
H₂O mQ	Volumen necesario	
Buffer Anza 10X	2 µL	1x
ADNp [1 µg]	Volumen necesario	200 [ng/µL]
<i>Eco</i>R-I [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
Volumen final	20 µL	

La reacción de digestión fue incubada a 37 °C por 1 hora. Posteriormente el producto de la digestión fue resuelta en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

5.6 Linearización del vector recombinante pPICZ α A-Rv1886c con Sac-I.

Con base en la evidencia de los ensayos de restricción se seleccionaron las clonas de vectores recombinantes. Una clona fue preparada para su transfección en el genoma de la levadura metilotrónica *P. pastoris* SMD 1168H. El vector recombinante fue linearizado con la enzima Sac-I (**Tabla 12**) y fue incubada a 37 °C por 1 hora en el termociclador y se tomaron 3 μ L del producto de la reacción para resolver mediante un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (100 V, 40 minutos). Posteriormente, se precipitó el ADN linearizado añadiendo 500 μ L de IsopOH durante 1 hora a -60 °C para precipitar a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C seguido de un lavado con 500 μ L de EtOH [70%] a las mismas revoluciones y tiempo. Por último, la pastilla obtenida se resuspendió con 10 μ L de agua mQ y fue almacenada a -20 °C hasta su uso en el protocolo de transfección.

Tabla 12. Condiciones de reacción de digestión para el vector recombinante con la enzima Sac-I.

	1x	[Final]
H ₂ O mQ	Volumen necesario	
Buffer Anza 10X	2	1x
DNAp [3 μ g]	Volumen necesario	[600 ng/ μ L]
Sac-I [20 U/ μ L]	1.5	20 [U/Rxn]
Volumen final	20 μL	

5.6.1 Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris* SMD.

Las levaduras electrocompetentes fueron previamente preparadas inoculando un tubo de 4 mL de caldo YPD a 30°C por 24 horas para inocular 500 μ L del caldo previamente crecido en un matraz (Erlenmeyer) con 100 mL de medio YPD. Posteriormente se dejó crecer durante 18 horas en agitación a 200 rpm, 30 °C para alcanzar una fase logarítmica (A_{600} = 1.3 – 1.5) se dividió el cultivo en

partes iguales en tubos cónicos de 50 mL y se incubaron a 4 °C por 15 minutos para centrifugar en frío a 1500 g por 5 minutos decantando el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 20 mL de agua mQ estéril fría centrifugando a 1500 g por 5 minutos y descartando el sobrenadante. Por último, se resuspendió en 20 mL de sorbitol 1 M estéril frío y se centrifugó a las mismas revoluciones y tiempo para decantar y resuspender el pellet en 1 mL de sorbitol estéril frío para alicuotar 80 µL en tubos eppendorf. Las células fueron utilizadas el mismo día de su preparación.

5.7 Transformación de levaduras *P. pastoris* SMD con el vector recombinante pPICZαA-Rv1886c.

El vector recombinante digerido fue transformado en *P. pastoris* SMD 1168H mediante electroporación. 10 µL del plásmido digerido fueron resuspendidos en una alícuota de levaduras electrocompetentes. Las cuales, fueron transferidas a una celda de electroporación de 0.4 cm y pulsadas 1500 V en un electroporador eppendorf 2510. Tras el pulso, se tomó 1 mL de sorbitol 1 M frío para recuperar las células de la celda y pasarlas a un tubo cónico de 15 mL que se incubó a 30°C por 1 hora sin agitación. Después se añadió 1 mL de YPD fresco al tubo para incubar las células a 30°C por 3 horas a 180 rpm. Concentrando las células por centrifugación a 1500 g por 5 minutos a 4°C y descartando 1 mL del sobrenadante. Se pasó a resuspender el pellet con el resto del volumen. Dicha suspensión fue plaqueada en 3 cajas de agar YPD+Zeo [100 µg/mL] dos con 200 µL y una con 600 µL se incubaron a 30°C por 3 días.

5.7.1 Extracción de ADNg de las clonas recombinantes de *P. pastoris* SMD para la genotificación por PCR.

Las clonas de *P. pastoris* SMD 1168H recombinantes fueron respaldadas en placas de YPD+ Zeo [100 µg/mL] y se inoculó cada clona en 4 mL de medio YPD incubando a 30°C por 24 a 28 horas con una agitación de 200 rpm. Posteriormente se realizó una extracción de ADN genómico de las clonas mediante la técnica de TSNT. Esta extracción de ADN consistió en transferir

2 mL del cultivo previamente crecido de las clonas de *P. pastoris* SMD recombinantes a un tubo eppendorf de 2 mL del medio el cual fue empaquetado por centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto para posteriormente descartar el sobrenadante. Donde se agregó 200 µL de buffer TSNT y se aplicó vórtex por 30 segundos. Como siguiente paso se agregó 200 µL de fenol-sevag y se mezcló en vórtex por 5 minutos. Añadiendo 300 µL de buffer TE 1X y mezclando por vórtex 30 segundos. Se centrifugó la mezcla a 13000 rpm durante 7 minutos. Se transfirió la fase acuosa (400 µL) a un tubo de 1.5 mL y se agregó 1 mL de etanol absoluto frío dejando a -80°C toda la noche. Esto se precipitó a 13000 rpm por 15 minutos para decantar el sobrenadante y se agregaron 500 µL de etanol al 70% y se mezcló por inversión y se centrifugó a la misma velocidad tiempo. Por último la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió con 30 µL de agua mQ con RNasas. Este producto genómico obtenido fue cuantificado en el Multiskan SkyHigh y se verificó la integridad del ADN corriendo un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (100 V, 40 minutos). Para poner en evidencia las construcciones de las clonas recombinantes de *P. pastoris* SMD se amplificó el gen AOX1 por PCR, empleando los *primers* AOX1-F y AOX1-R. Los cuales se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Primers diseñados para la amplificación del gen AOX1.

Primer	Secuencia (5' – 3')
AOX1-F	5' -GACTGGTTCCAATTGACAAGC – 3'
AOX1-R	5' -GCAAATGGCATTCTGACATCC – 3'

La enzima AOX en *P. pastoris* SMD 1168H codifica para la alcohol oxidasa; enzima encargada de catalizar la descomposición del MeOH en formaldehído y peróxido de hidrógeno. Se presentan las siguientes condiciones de PCR para la síntesis de los genes de AOX1 se muestran en la **Tabla 14** y condiciones de amplificación en la **Tabla 15**.

Tabla 14. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen AOX1 recombinante.

	1X	[Final]
H ₂ O mQ	16.75	
Buffer 5X	5	1X
Primer F [10 µM]	1	[0.4 µM]
Primer R [10 µM]	1	[0.4 µM]
ADNg	1	
MyTaq polimerasa [5 U/µL]	0.25	[0.05 U/µL]
Volumen final	25 µL	

Tabla 15. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen AOX1 recombinante.

Temperatura	Tiempo
95 °C	1 minuto
95 °C	15 segundos
58 °C	15 segundos
72 °C	90 segundos
72 °C	3 minutos
4 °C	∞

Los productos obtenidos fueron resueltos en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (100 V, 1 hora).

5.7.2 Fermentación de las cepas recombinantes de *P. pastoris* SMD con 1% de MeOH.

Una vez evaluadas las clonas recombinantes en *P. pastoris* se prosiguió a inducir la producción de proteínas recombinantes, se inoculó una asada del cultivo sólido en tubos cónicos de 15 mL con 4 mL de caldo YPD incubando a 30°C por 24 horas con una agitación de 200 rpm. Una vez que se produjo suficiente biomasa, el cultivo fue centrifugado a 5000 g por 5 minutos. Se decantó el medio y se resuspendió el pellet en 100 µL de medio YPD fresco. De la suspensión se tomaron 10 µL para agregar en cada tubo cónico (4 tubos) de 50 mL con 5 mL de medio BMGY para ser incubados a 30°C con 230 rpm de agitación durante un periodo de 48 horas, donde se obtuvo un cantidad considerable de biomasa. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 5000 g por 5 minutos para decantar el medio y resuspender con 4 mL de medio BMMY a cada tubo y se centrifugaron nuevamente a la misma velocidad y tiempo. Esto

permitió decantar el medio y por medio del remanente se resuspendieron para transferir las biomasas a un matraz (Erlenmeyer) de 500 mL con 50 mL de medio BMMY incubando a 30°C por 5 días con una agitación de 200 rpm añadiendo el 1% (500 µL) de metanol cada 24 horas.

Al finalizar el periodo de inducción se recuperaron los medios de cultivo por centrifugación a 5000 g por 5 minutos para obtener el sobrenadante y ser conservado a 4 °C hasta su utilización.

5.7.3 Diálisis del sobrenadante de cultivo.

Para retirar sales, algunas proteínas pequeñas y solutos, se continuó con la diálisis del sobrenadante obtenido por medio de una membrana de celulosa de un poro 7 kDa y de un corte de diámetro de 22 mm (Thermo Scientific™ SnakeSkin™). Las diálisis se llevaron a cabo en un recipiente con 4 litros de agua destilada a 4 °C, con agitación constante por 24 horas, haciendo un cambio de agua a las 12 horas. El sobrenadante dializado obtenido fue almacenado a 4°C hasta sus análisis proteico.

5.7.4 Determinación de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteínas después de la fermentación, se utilizó el método de cuantificación de proteínas de Pierce, y que tiene como fundamento la reducción del ión Cu^{2+} al Cu^{1+} debido a las proteínas que se encuentran en un medio alcalino y la posterior quelación de Cu^{1+} por dos moléculas de BSA, formando una reacción hidrosoluble de color púrpura cuya absorbancia se detecta a 562 nm y es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

Se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ASB), como proteína estándar, en un rango lineal de 15.6 a 1000 µg/mL debido al rango lineal del método 20 a 2000 µg/mL. Seguido de la preparación del reactivo de trabajo que fue una solución mezclando 50 partes de la solución A con 1 de la solución B (50:1 v/v). Posteriormente, en una placa de 96 pozos

(Corning; Corning, NY, EUA) se depositó 25 μ L de cada muestra problema, estándares y blanco de reactivo, por duplicado y se mezcló con 200 μ L de reactivo de trabajo. La placa se incubó a 37 °C por 30 minutos, para después realizar las lecturas de absorbancia en el lector de placas Multiskan SkyHigh y a una longitud de 562 nm. Para la obtención de la concentración fue realizando cálculos con la ecuación de la recta $Y=mx+b$

5.7.5 Precipitación de proteínas totales con MetOH/cloroformo.

Una vez obtenida la cuantificación de proteínas, aproximadamente 3.6 mg del dializado (3 mL) fueron transferidos a un tubo cónico de 15 mL, se precipitaron agregando 1.5 volúmenes de MetOH [100%] y un volumen de cloroformo para mezclarse por inversión varias veces. El tubo se centrifugó a 12000 rpm por 90 segundos a temperatura ambiente. Una vez centrifugado se descartó la fase orgánica que fue la parte superior tratando de no alterar la interfaz de proteínas y añadiendo un volumen de MetOH [100%]. Las proteínas resuspendidas en MetOH se concentraron en tubos de 1.5 mL por centrifugación a 14000 rpm por 3 minutos y a 4 °C hasta obtener una pastilla. Esta pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ L de buffer de carga 2x [Tris-HCl pH 6.8 0.5 M, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol] y β -ME el 10% del volumen final. Por último, se calentaron las muestras a 95 – 100 °C por 5 minutos en el termoblock. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su empleo.

5.7.6 Análisis de la proteína Ag85B recombinante por SDS-PAGE y *western blot*.

Es de suma importancia evidenciar la proteína de interés en el sobrenadante obtenido del cultivo de la levadura. De manera que se realizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) que permite la separación de la proteína de interés con base a su peso molecular y además se utiliza para hacer inmunomarcaje por *western blot* en base a la presencia del antígeno c-myc con el cual fue construida.

En este ensayo se cargaron 1.5 mg de proteína en dos geles de poliacrilamida [15%], para ser resueltos a 150 V por 1 hora 25 minutos en frío. También se utilizó un control negativo de proteínas de sobrenadante de cultivo de la cepa silvestre SMD 1168H de *P. pastoris*. Al término de la electroforesis un gel fue retirado y sumergido en buffer de tinción de azul de Coomassie (azul de Coomassie R250 [0.5%]; MetOH: ácido acético: agua 50:10:40) en agitación hasta el contraste deseado y desteñido (MetOH: ácido acético: agua 40:10:50) en agitación por una hora o hasta obtener el contraste deseado. Observando la banda de la proteína recombinante.

Empleando un segundo gel teñido con azul de Coomassie, el cual fue equilibrado en agitación por 30 minutos en buffer de transferencia para cámara semiseca (Tris-HCL [25 mM], pH 8.3; glicina [192 mM]; MetOH [20%]), junto con una membrana de PVDF y 4 almohadillas de papel filtro, todo eso a una medida de 5.5X8.5 cm. Se inició colocando dos almohadillas de papel filtro, seguido de la membrana PVDF y encima el gel, para ser cubiertas con otras dos almohadillas de papel filtro armando un “sándwich” en la cámara semiseca. La transferencia de proteínas se realizó en un Trans-Blot SD para transferencia semi-seca (Bio-Rad; Hercules, CA, EUA) empleando 20 V por 20 minutos.

La transferencia de las proteínas fue verificada revisando la presencia del marcador de peso molecular en la membrana de PVDF, la cual fue posteriormente equilibrada en buffer TTBS (Tris-HCL [20 mM], pH 7.5; NaCl [500 mM]; Tween-20 [0.1%] en agitación por 20 minutos y después se incubó por 30 minutos en buffer de bloqueo (leche [5%]/TTBS, g/v). La membrana fue expuesta al anticuerpo primario anti-c-myc en una dilución 1:3000 (v/v), manteniendo la agitación toda la noche a temperatura ambiente.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados de la membrana con TTBS en agitación por 5 minutos cada uno, para continuar con una incubación de dos horas en presencia del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (Sigma Aldrich) en una dilución 1:5000 (v/v) y finalmente se realizaron cinco lavados con TTBS.

Para verificar que la banda de la proteína de interés se encuentra en la membrana marcada por un complejo de anticuerpo anti-c-myc/anti-ratón-HRP, se utilizó el sustrato quimioluminiscente luminol, el cual al entrar en contacto con la peroxidasa se oxida y resulta en una emisión de luz. La membrana se expuso al sustrato luminol (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) cubriendo toda la membrana por 1 minuto, para colocarla en el cassette de revelado entre dos hojas de papel acetato. El revelado de la señal fue realizada en un cuarto oscuro, y con el apoyo de una luz roja, empleando películas radiográficas (X-OMATS LS Film; Carestream; Rochester, NY, EUA) las cuales se expusieron sobre la membrana en un periodo de tiempo de entre 30 segundos a 2 minutos y posteriormente sumergidas en una solución de revelado y retirando el exceso en agua, pasando a la solución fijadora (Carestream; Rochester, NY, EUA) y el exceso del fijador se retiró con agua. Una vez concluido el protocolo se llevaron las películas a analizar y se compararon con los geles teñidos con azul de Coomassie para evidenciar el peso molecular al que correspondió la señal detectada en el *western blot*.

5.7.7 Purificación del Ag85B recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.

Una vez que se evidenció la clona productora del Ag85B recombinante en el ensayo del *western blot* procedió a su purificación. Este método es cromatografía de afinidad a níquel que consiste en la elusión del sobrenadante dializado a través de la resina revestida con iones de níquel que interaccionan con la región rica en residuos de histidina, por lo que la proteína recombinante (6XHis) se acopla para retener la proteína de interés y ocurra la elusión de componentes del sobrenadante menos importantes.

El proceso de purificación consistió en medir 2 mL de resina de níquel ProBond (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) donde se agregaron en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 800 g por 1 minuto para separar el sobrenadante de la resina. Posteriormente, se realizó un lavado con agua

destilada estéril para resuspender la resina y sedimentarla a través de la misma centrifugación antes mencionada. Continuando con dos lavados adicionales con el buffer de interacción en condiciones nativa (NaH_2PO_4 [50 mM], pH 8.0; NaCl [500 mM], homogenizando la resina y retirando el buffer tras la sedimentación.

De esta manera la resina quedó equilibrada y el sobrenadante dializado de 50 mL se colocó para la interacción con la resina de níquel en el tubo cónico de 50 mL para posteriormente, dejar incubando el tubo incubando en agitación en frío por 4 horas para permitir la mayor retención posible de la proteína. Concluida la incubación se pasó a centrifugar el tubo a 800 g por 1 minuto para resguardar el sobrenadante. La resina se colocó en una columna de polipropileno vacía (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) para continuar con una serie de cinco lavados con 8 ml de buffer de lavado (imidazol [20 mM], pH 8.0) y finalmente la liberación de la proteína con 1 mL de buffer de elusión (imidazol [500 mM], pH 8,0) para obtener toda la fracción en tubo de 1.5 mL repitiendo esta misma parte para obtener 7 fracciones totales de 1 mL.

5.7.8 Desalado de proteínas recombinantes mediante sefadex G-25.

Es importante retirar los solutos como son el imidazol, NaCl y otras sales del medio de fermentación en la muestra purificada en el protocolo de cromatografía de afinidad a níquel. El método de desalado de proteínas con columna de sefadex G-25, el cual consistió en que la resina de filtración en gel de microperlas porosas en las que los compuestos menores a 5 kDa fueron retenidos.

El protocolo de limpieza de la proteína recombinante se realizó en una columna PD-10 con sefadex G-25 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA) se adaptó en un tubo colector (tubo cónico de 50 mL) y se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril para equilibrar la columna y terminar con una centrifugación a 1000 g por 2 minutos. Posteriormente, se tomaron 1.8 mL del purificado (suma de la dos primeras fracciones) los cuales fueron cargados. Finalizando con una

centrifugación para la recuperación de la elusión en un tubo de 50 mL de la muestra desalada.

De la muestra desalada se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por la técnica de Lowry como en lo descrito 5.5.6 y un análisis por SDS-PAGE y *western blot* para evidenciar la presencia de la proteína en ese punto.

5.8 Análisis de glicosilaciones en la proteína Ag85B recombinante expresada en *P. pastoris*.

Pichia pastoris lleva a cabo mecanismos post-traduccionales como es la glicosilación de proteínas y lo hace añadiendo cadenas cortas de manosa en residuos de asparagina (N-glicosilaciones). Para poder identificar la glicosilación en la proteína recombinante se utilizó un Kit de tinción para glicosilaciones que se fundamenta en el método de ácido periódico Schiff (PAS) detectando específicamente a las proteínas separadas que por medio de una solución de periodato, el cual oxida los grupos cis-diol de los carbohidratos de la glicoproteína. Los grupos aldehídos resultantes se detectan mediante la formación de enlaces a una base de Schiff con un reactivo que produce bandas. Después de correr un SDS-PAGE el gel se sumergió en metanol al 50% durante 30 minutos para después pasarlo a una solución de ácido acético al 3% en agitación por 10 minutos. Posteriormente se transfirió a la solución oxidante para dejarlo en agitación por 15 minutos. Luego, se lavó el gel en ácido acético al 3% durante 15 minutos y después se sumergirlo en el colorante de tinción por 15 minutos. Por último, se transfirió a la solución reductora durante 5 minutos y se resguardó en ácido acético al 3% para observar la banda magenta.

Capítulo 6

RESULTADOS

6.1 Propagación del vector pET100/Rv1886c.

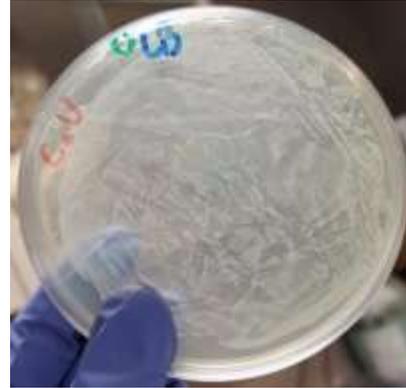
6.1.1 Transformación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes con el vector pET100/Rv1886c.

La secuencia optimizada (Rv1886c) se recibió en el vector conformado como pET100/Rv1886c. Se tomó una cantidad de 100 ng los cuales se transformaron en células *E. coli* DH5 α electrocompetentes para ser inoculadas en placas de agar LB+Amp (ampicilina) el cual fungió como marcador de selección de las colonias positivas con el plásmido. De esta manera se aseguró obtener una gran cantidad de copias de este vector.

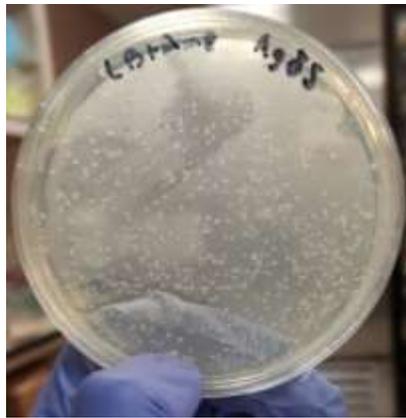
Los resultados se validaron mediante el control antibiótico y el control viabilidad donde como primer caso las células *E. coli* DH5 α electrocompetentes recibieron el pulso con el vector las cuales fueron plaqueadas en agar LB+Amp (control antibiótico). Como segundo caso se evaluó la proporción de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes que recibieron un pulso sin el vector las cuales fueron plaqueadas en el agar LB (control viabilidad) (**Figura 11**). Con respecto a la electroporación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes transformadas con el plásmido pET100/Rv1886c se obtuvieron colonias con base a la concentración que se estableció.



A Control de antibiótico



B Control de viabilidad



C Plásmido pET100/Rv1886c

Figura 11. Propagación del plásmido pET100/RV1886c. (A y B) controles del protocolo, colonias de *E. coli* DH5 α electrocompetentes transformadas con C) plásmido pET100/Rv1886c.

6.1.2 Obtención del vector pET100/Rv1886c por el método de lisis alcalina.

Para corroborar que las colonias seleccionadas hayan adquirido el vector que corresponde al pET100/D-Rv1886c, fue realizando la técnica de lisis de alcalina para la obtención del ADNp de 10 colonias evaluadas (**Figura 12**).

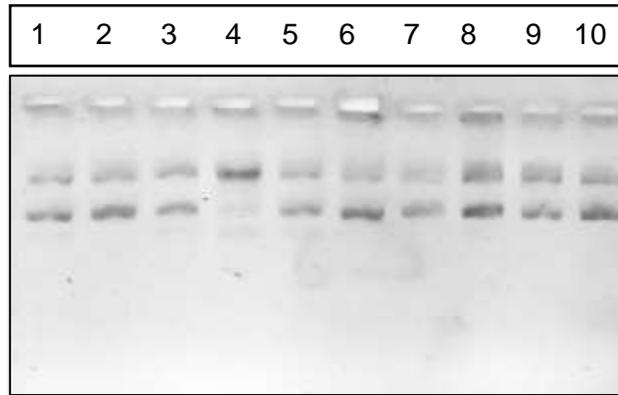


Figura 12. Electroforesis de ADN plasmídico pET100/Rv1886c. Los 10 carriles muestran un patrón de bandeo que corresponde a plásmidos cerrados en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

6.2 Amplificación del gen Rv1886 por PCR.

La secuencia optimizada Rv1886c ligada al plásmido pET100/Rv1886c (5.6 kb) se amplificó empleando el juego de *primers* (ppAg85B-F-Xho y ppAg85B-R-Not) y se estandarizaron las condiciones ideales para la amplificación de este gen de interés el cual sería empleado como inserto para el proceso de clonación en el vector de expresión pPICZαA. Previo a la amplificación se cuantificó el ADNp de 3.9 µg/µL. Se probaron los dos parámetros de temperaturas de alineamiento las cuales fueron 55 °C y 65 °C. En la **Figura 13** se muestran amplicones obtenidos a una temperatura de alineamiento de 55 °C (carril **2**) y a 65 °C (carril **3**). Estas temperaturas amplificaron un producto de PCR de aproximadamente de 978 pb que corresponde al tamaño teórico esperado para el gen Rv1886c en ambas temperaturas.

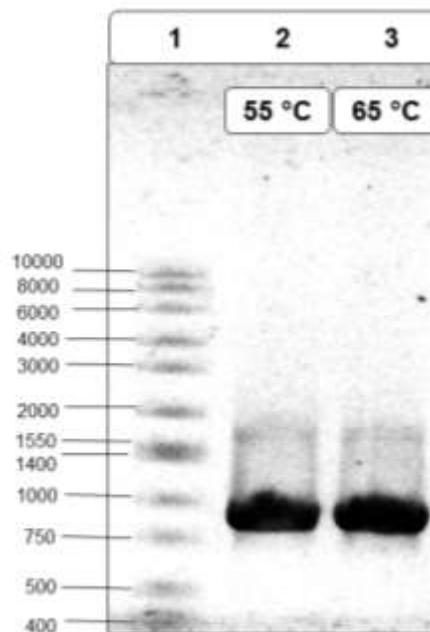


Figura 13. Electroforesis de las amplificaciones del gen Rv1886c. En el gel de agarosa al 1% se observó. (1) marcador de peso molecular de ADN 10000 – 50 pb, (2) amplicon del gen Rv1886c con una temperatura de alineamiento de 55°C (978 pb), (3) amplicón del gen RV1886c con una temperatura de alineamiento de 65°C (978 pb).

Definida la temperatura de alineamiento de 55°C para posteriores amplificaciones que favorecieron la unión específica de los *primers* para franquear el fragmento del gen de interés Rv1886c. Se realizaron 5 amplificaciones empleadas para el protocolo de clonación y fueron resueltas en un gel de agarosa para su posterior purificación (**Figura 14**).

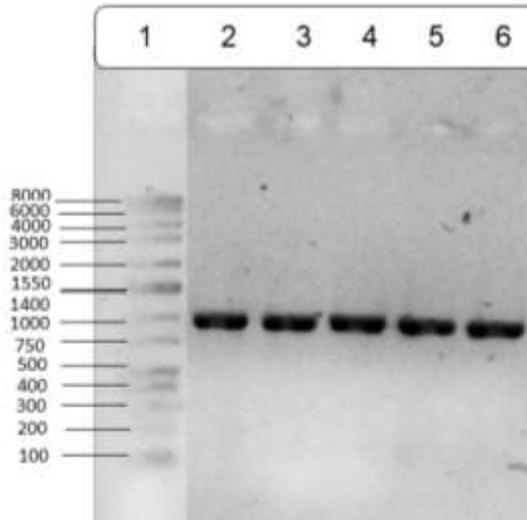


Figura 14. Electroforesis de productos de PCR del gen Rv1886c para clonación.

En el gel de agarosa al 1% se mostró. (1) marcador de peso molecular de ADN 10000- 50 pb (2-6) corresponde 5 amplificaciones del amplicon de (978pb) tomando la temperatura de alineamiento de 55°C.

Se realizó previamente una purificación del templado obteniendo una cuantificación de 64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, llevando a cabo la digestión con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Not*-I en el inserto y resolviéndolo en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se observó un tamaño de 978 pb (**Figura 15**).

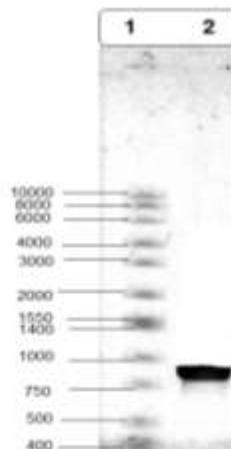


Figura 15. Digestión del inserto con las enzimas *Xho*-I y *Not*-I. El gel de agarosa al 1% se mostró (1) marcador de peso molecular 10000 – 50 pb (2) inserto digerido con *Xho*-I y *Not*-I con un peso molecular de 978 pb.

6.3 Caracterización del vector de clonación y expresión pPICZαA.

Se llevó a cabo la digestión del vector de clonación y expresión pPICZαA. De esta manera se realizó la reacción de digestión con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Not*-I los cuales fueron los sitios de interés para la clonación. El vector pPICZαA se cortó con ambas enzimas de restricción como se muestra en el carril **3** en comparación al vector pPICZαA sin digerir en el carril **2** y la digestión individual del vector con las enzimas de restricción con la enzima *Xho*-I y *Not*-I en los carriles **6** y **7** respectivamente en comparación al vector sin digerir en el carril **5** con el propósito de confirmar que en ambas tenían una actividad de corte en el vector. El peso molecular del vector digerido fue aproximadamente de 3.6 kb. Además se purificó y cuantificó obteniendo 64.6 µg/µL para la reacción de ligación (**Figura 16**).

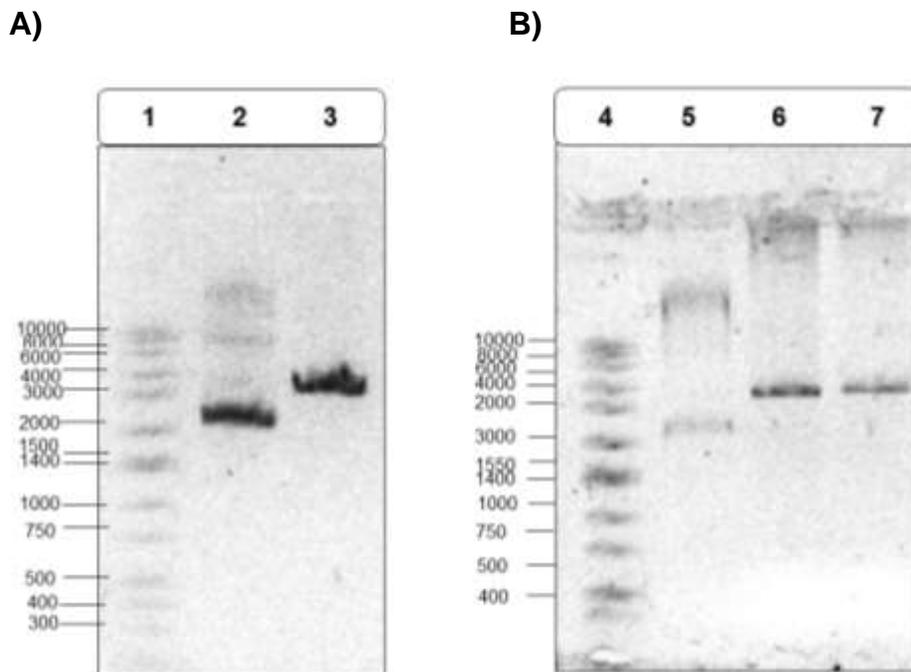


Figura 16. Identificación de los sitios de restricción *Xho*-I y *Not*-I. Los gels de agarosa al 1% nos mostraron **A** (1) marcador de peso molecular 10000 – 50 pb, (2) pPICZα sin digerir, (3) pPICZα linearizado (*Xho*-I y *Not*-I) con un peso esperado de 3.6 kpb **B** (1) marcador de peso molecular 10000 – 50 pb, (2) pPICZα sin digerir, (3) pPICZα linearizado con *Xho*-I, (4) pPICZα linearizado con *Not*-I con un peso esperado de 3.6 kb.

6.3.1 Transformación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes con la construcción pPICZ α A-Rv1886c

Previamente el vector pPICZ α A y el templado fueron digeridos en una reacción simultánea con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Not*-I para generar sitios que favorecieran la unión entre ambos. La clonación sitio dirigida del vector y el respectivo inserto fueron dispuestos en relación molar 1:6 para la reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa. De la reacción de ligación que fue transformada en células *E. coli* DH5 α electrocompetentes fue el resultado de construcciones pPICZ α A-Rv1886c donde pPICZ α A contiene el gen de zeocina el cual posee un amplio espectro de eliminación de bacterias y hongos cuya función es desestabilizar el ADN, por estas características fue empleado como marcador de selección de construcciones. Por lo tanto, las bacterias que lograron introducir la construcción a través del pulso eléctrico ganaron la propiedad de resistencia a la zeocina.

Se utilizaron controles para validar el protocolo de electroporación. Para esto se incluyó la actividad del antibiótico contra células *E. coli* DH5 α electrocompetentes no electroporadas con el vector pPICZ α A (control de antibiótico), el control de digestión consistió en confirmar la actividad de nucleasa por parte de las enzimas *Xho*-I y *Not*-I debido a que el vector linearizado al ser transformado no tiene la propiedad de resistencia al antibiótico zeocina (**Figura 17**). El resultado de la electroporación fueron las construcciones pPICZ α A-Rv1886c comprobándose la proporción 1:6 obteniendo un número aproximadamente de 70 colonias.



A Control de antibiótico **B** Control de digestión **C** Clonas pPICZαA-Rv1886c

Figura 17. Clonación de la construcción pPICZαA-Rv1886c en células *E. coli* DH5α. Observación de colonias en *E. coli* DH5α transformadas con (A y B) controles de electroporación y (C) clonas pPICZαA-Rv1886c 1:6.

6.3.3 Obtención del vector recombinante pPICZαA-Rv1886c por el método de lisis alcalina.

De las colonias obtenidas por medio del protocolo de electroporación 12 clonas fueron analizadas para la búsqueda de construcciones por medio del método de lisis alcalina. El vector pPICZαA fue utilizado como referencia para diferenciar el patrón de bandeo obtenido en las construcciones, los cuales debieron de presentar un retardo en el corrimiento en la electroforesis debido al incremento de peso por la integración del inserto. Dos colonias presentaron un retardo en su corrimiento (carriles **6** y **9**), las cuales fueron resguardadas a -80 °C para su posterior evaluación (**Figura 18**).

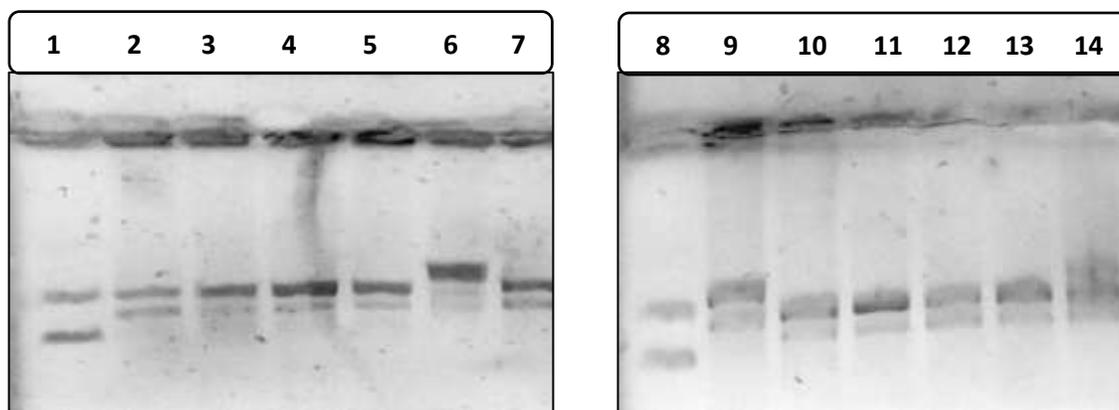


Figura 18. Obtención de construcciones plasmídicas pPICZαA-Rv1886c. Gel de agarosa al 1% en el que muestra (1 y 8) pPICZαA, (6 y 9) presuntas construcciones pPICZαA-Rv1886c, (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14) plásmidos con corrimiento electroforético igual a pPICZαA.

6.3.4 Caracterización de vectores recombinantes por ensayos de restricción.

Para evidenciar que los vectores corresponden a las construcciones pPICZαA-Rv1886c, se realizaron ensayos con la enzimas de restricción para diferenciar las clonas positivas de las negativas.

Primeramente se demostró si el vector ligó el gen de interés Rv1886c, para esto se linearizó el vector recombinante con la enzima *Xho*-I y se confirmaron las clonas debido a la incorporación del inserto teniendo un peso de 4.5 kb (carriles **3 y 4**); ya identificadas tuvieron un retraso electroforético en comparación al pPICZαA presentando un peso de 3.6 kb (carril **2**) y los vectores no recombinantes (carril **5,6,7 y 8**) (**Figura 19**).

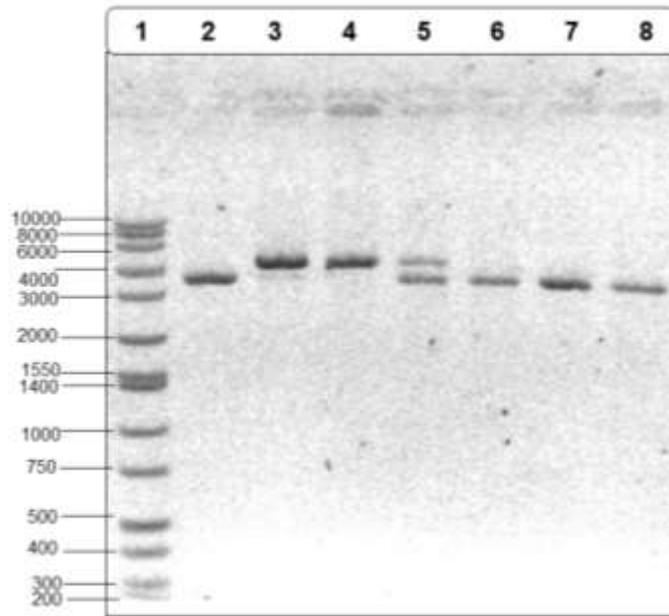


Figura 19.Reacción de digestión de las construcciones pPICZ α -Rv1886c con la enzima *Xho*-I. En el gel de agarosa al 1% se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZ α linearizado (3.6 kb), (3,4) pPICZ α -Rv1886c linearizados (4.5 kb), (5,6,7,8) vectores no recombinantes (3.6 kb).

Otra forma de evidenciar la correcta ligación del inserto en el vector fue digiriendo con *Xho*-I y *Not*-I permitiendo liberar el fragmento de 978 pb que corresponden al gen Rv1886c en el vector recombinante que se observó en ambas una banda inferior (carriles **3** y **4**) en comparación al vector vacío que presentó un peso correspondiente a 3.6 kb (carril **2**) y los vectores no recombinantes (carriles **5,6,7** y **8**). (**Figura 20**).

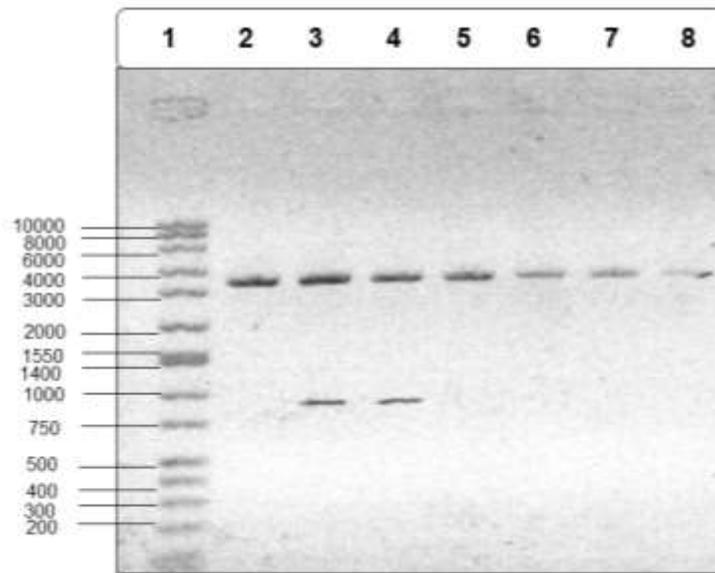


Figura 20. Reacción de digestión de las construcciones pPICZαA-Rv1886c con las enzimas *Xho*-I y *Not*-I. En el gel de agarosa al 1% se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZαA linealizado (3.6 kb), (3,4) pPICZαA-Rv1886c liberación de fragmento (978 pb), (5,6,7,8) vectores no recombinante (3.6 kb).

Para la correcta inserción de la secuencia en la clonación, se confirmó la posición del inserto entre el sitio *Xho*-I (1184) y el sitio *Not*-I (1258), perdiendo el sitio *Eco*R-I y un segundo sitio *Xho*-I (1246). La presencia de un segundo sitio *Xho*-I representó la posibilidad de que el inserto pudiese quedar incorrectamente orientado en el vector y generar clonas falsas positivas cuya secuencia del gen Rv1886c se produjera como una secuencia indeseable. Se discriminaron entre vectores recombinantes donde el inserto se ligó al segundo sitio de *Xho*-I esto nos indica que conserva el sitio *Eco*R-I, las clonas linealizadas con esta enzima de restricción fueron descartadas (carriles **5**, **6** y **7**). Por lo tanto, las dos clonas evaluadas (carril **3** y **4**) fueron correctamente insertadas en el vector (**Figura 21**).

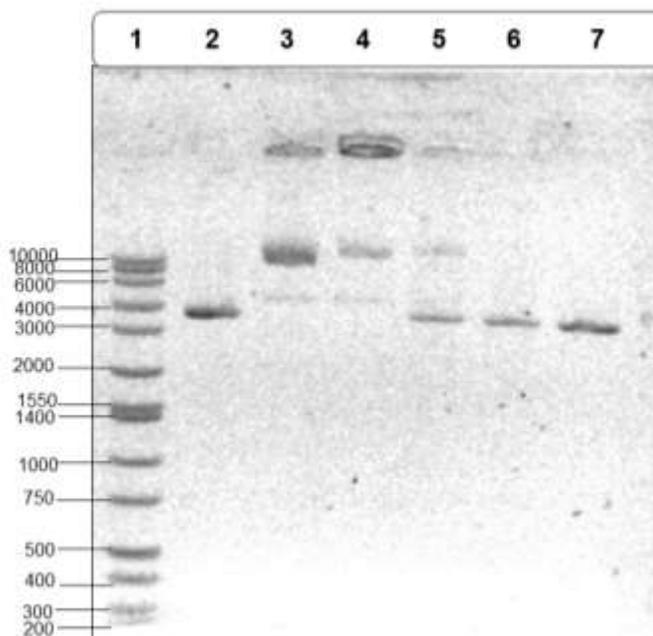


Figura 21. Reacción de digestión de las construcciones pPICZαA-Rv1886c con *EcoR*-I. En el gel de agarosa al 1% se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZαA con *EcoR*-I linearizado (3.6 kb), (3,4) construcciones pPICZαA sin *EcoR*-I, (5,6,7) vectores no recombinantes con *EcoR*-I linearizados (3.6 kb).

6.4. Obtención de las clonas en *P. pastoris* SMD 1168H.

6.4.1 Transformación de células *P. pastoris* SMD 1168H con el vector pPICZαA-Rv1886c.

El vector pPICZαA cuenta con un sitio *Sac*-I que se encuentra en la secuencia promotora AOX1, que de esta forma es posible ser integrado por el genoma de la levadura metilotrófica *P. pastoris* SMD mediante recombinación homóloga. De las construcciones que fueron previamente analizadas, se seleccionó la construcción identificada como C5 para ser linearizada con la enzima *Sac*-I y mediante un gel de agarosa en el carril 2 se observó una banda aproximadamente de 4.5 kb que corresponde a la construcción linearizada (**Figura 22**) que posteriormente esto permitió realizar la electroporación en las células de *P. pastoris*.

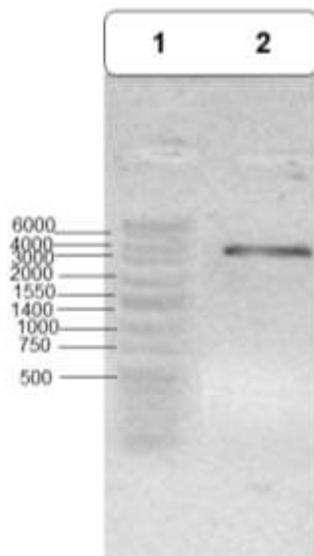


Figura 22. Linearización de la construcción pPICZ α A-Rv1886c. En gel de agarosa 1% se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) construcción pPICZ α A-Rv1886c linearizada con un tamaño de 4.5 kb.

Las células electrocompetentes de *P. pastoris* SMD fueron transformadas con la construcción linearizada de pPICZ α A-Rv1886c. Posteriormente, se inocularon en placas de YPD+Zeo [100 μ g/mL], utilizando el antibiótico como marcador de selección para la identificación de clonas positivas que integraron el *cassete* al cromosoma de la levadura. En una primera transformación se obtuvo una clona positiva (**A**) y se denominó como SMD-pPAg85B **C5.1**. A pesar de que las placas de YPD+Zeo [100 μ g/mL] tuvieron un tiempo de incubación de 30 °C por 48 horas, sólo se observó la aparición de una colonia, lo que representó un número muy escaso pero demostró ser una construcción correctamente funcional. Esta fue debidamente respaldada y analizada. En una segunda transformación se obtuvieron otras 4 clonas (**B**) y se denominaron como SMD-pPAg85B **C5.2**, **C5.7**, **C5.8** y **C5.9** que fueron evaluadas y resguardadas. (**Figura 23**).

A)



B)



Figura 23. Transformación de las células *P. pastoris* SMD con el vector pPICZαA-Rv1886c. (A) Obtención de colonia de *P. pastoris* SMD transformada (SMD-pPICZαA-Ag85B (C5.1) y (B) colonias transformadas en *P. pastoris* SMD (SMD-pPICZαA-Ag85B (C5.2, C5.7, C5.8 y C5.9).

6.4.2 Genotipificación de las clonas portadora del gen Rv1886c.

El análisis de las clonas en *P. pastoris* portadoras del gen Rv1886c se identificó mediante PCR empleando los primers AOX1-F y AOX1-R, dado que la secuencia de interés debió de posicionarse entre los elementos de la región promotora del gen AOX1 (**Figura 24**).

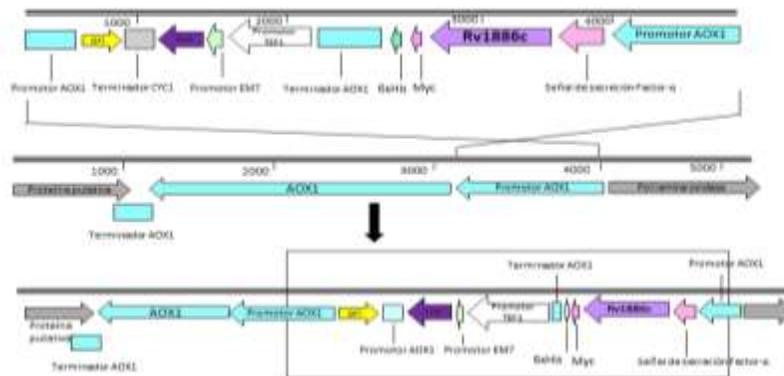


Figura 24. Recombinación homóloga de la construcción pPICZαA-Rv1886c en el promotor AOX1 . Secuencia linealizada integrada al promotor del gen AOX1 de *P. pastoris* por recombinación homóloga, añadiendo todo el cassette para la obtención de la proteína recombinante.

Las clonas fueron inoculadas en medio YPD para la posterior extracción de ADNg de las levaduras mediante la técnica de TSNT. Se obtuvieron 5 extracciones de ADNg de las clonas SMD-pPAg85B C5.1 (carril 2), C5.2 (carril 3), C5.7 (carril 4), C5.8 (carril 5) y C5.9 (carril 6) en la **Figura 25**.

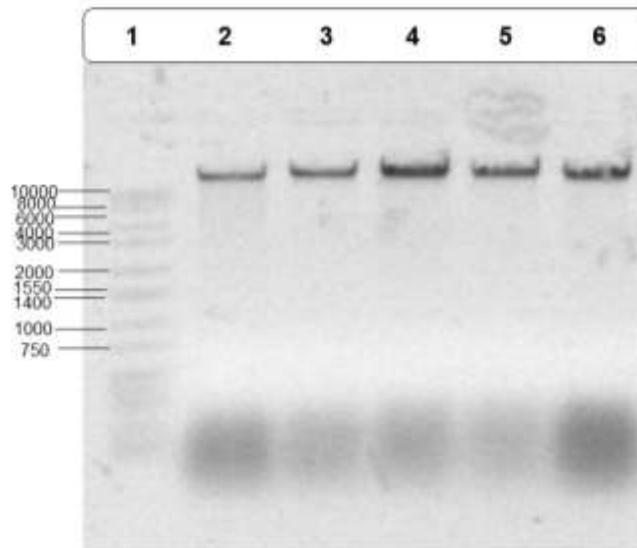


Figura 25. Extracción de ADNg de *P. pastoris* SMD transformada con la construcción pPICZαA-Rv1886c. El gel de agarosa 1% muestra (1) marcador de peso molecular (2-6) ADNg de *P. pastoris* SMD y las extracciones de ADNg de las transfectantes con pPICZαA-Rv1886c.

El material genético se cuantificó y se verificó la integridad en el gel de agarosa, lo que permitió continuar con la PCR. En la **Figura 26** se muestran las amplificaciones obtenidas. En el gel **A** se amplificó en el carril 2 los *primers* de AOX1 generaron un amplicón de 2.2 kb correspondiente al gen endógeno de AOX1 en *P. pastoris*, en el carril 3 se observó la banda que correspondió al gen endógeno de AOX1 en la levadura y un segundo amplicón de 1.5 kb correspondiente a la integración de la construcción de pPICZαA-Rv1886c que corresponde a la clona SMD-pPAg85B C5.1. En el gel **B** se amplificaron de la misma forma las clonas SMD-pPAg85B C5.2 (carril 5), C5.7(carril 6), C5.8 (carril 7) y C5.9 (carril 9).

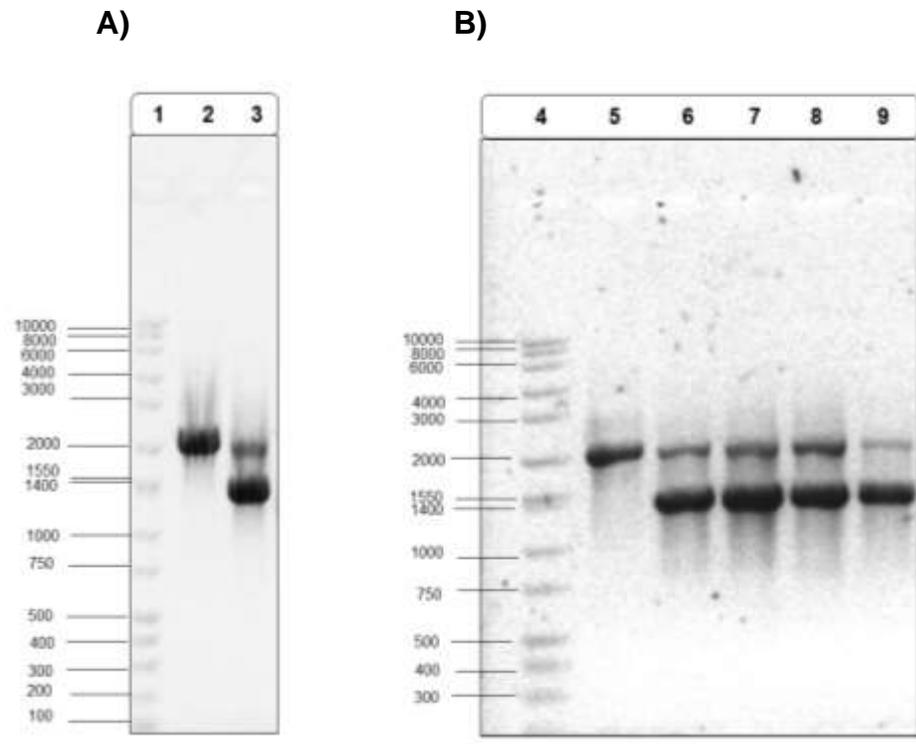


Figura 26. Electroforesis de PCR del genotipo AOX1/Rv1886c en *P. pastoris* SMD.

En el gel de agarosa al 1% (A) se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) amplificación del gen AOX1 en *P. pastoris* SMD (3) amplicon del gen AOX1/Rv1886c (SMD-pPAg85B C5.1). Por otro lado se observa (4) marcador de peso molecular y los amplicones del gen AOX1/Rv1886c (SMD-pPAg85B C5.2, C5.7, C5.8 y C5.9) del (5 – 9).

6.5 Expresión del Ag85B recombinante en *P. pastoris* SMD 1168H

6.5.1 Expresión de la proteína Ag85B y evaluación del crecimiento de las clonas recombinantes en *P. pastoris* en medio con MetOH.

Las clonas recombinantes en *P. pastoris* corresponden al genotipo Rv1886c, estas cepas mostraron por PCR la presencia de su *cassete* de expresión, por lo que fueron seleccionadas como candidatas a la evaluación de la producción de la proteína recombinante Ag85B. Estas clonas fueron inoculadas en el medio BMMY para inducir la producción de proteínas con metanol 1% en condiciones estándar por un periodo de cinco días. El crecimiento de las clonas recombinantes fue monitoreado haciendo una lectura de densidad óptica a 600 nm cada 24 horas hasta el término de la fermentación, observando un

crecimiento exponencial hasta las 120 horas con ninguna diferencia con respecto a la cepa silvestre SMD como control de crecimiento de la levadura (**Figura 27**).

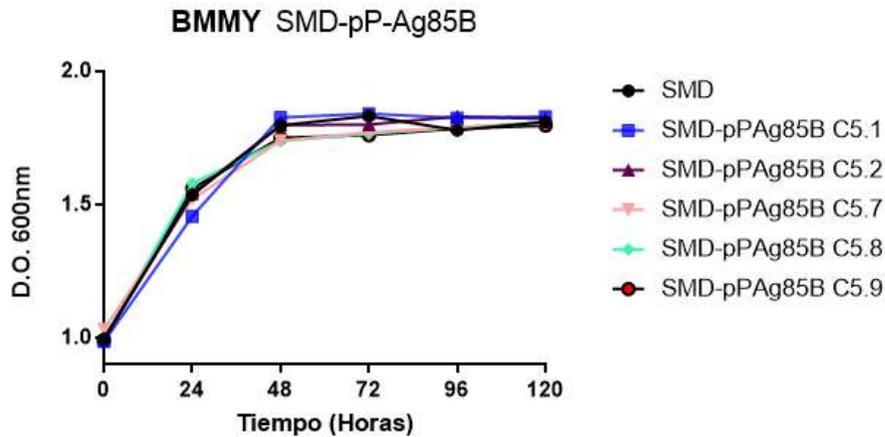
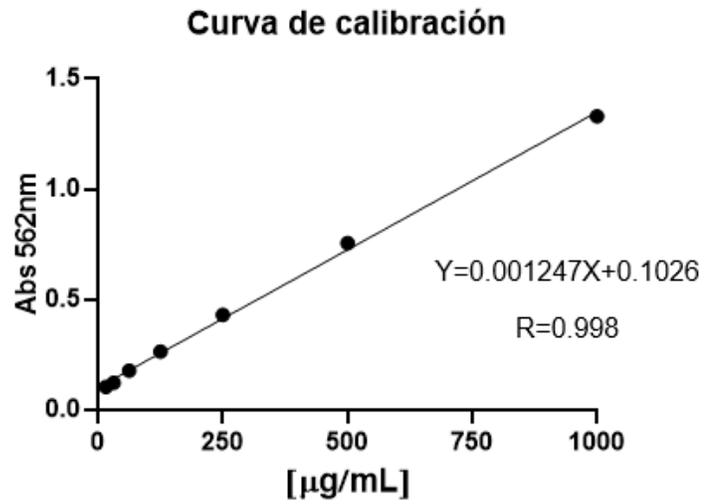


Figura 27. Curva de crecimiento de las levaduras productoras de la proteína Ag85B. Cinética de crecimiento de las cepas *P. pastoris* SMD (negro), La cepa productora de Ag85B recombinante C5.1 (azul), C5.2 (morado), C5.7 (rosa), C5.8 (verde), C5.9 (rojo).

Una vez finalizadas las fermentaciones se dializó el sobrenadante de los cultivos para cuantificar la proteína secretada por medio de la técnica de Lowry usando el método de espectrofotometría UV-Vis a 562 nm (**Figura 28**) obteniendo que en la clona SMD-pPAg85B C5.1 presentó una concentración 1,260 $\mu\text{g/mL}$ (figura **B**) que se obtuvo a través de ecuación de la recta de la curva de calibración (figura **A**), superando la concentración de proteína en la cepa salvaje y demás clonas. Cabe mencionar que un dializado tiene una cantidad menor de proteínas que salieron con base al gradiente de concentración y el poro de membrana, aun así, el dializado corresponde un conjunto donde se encuentran proteínas de la levadura, compuestos del medio y la proteína de interés.

A)



B)

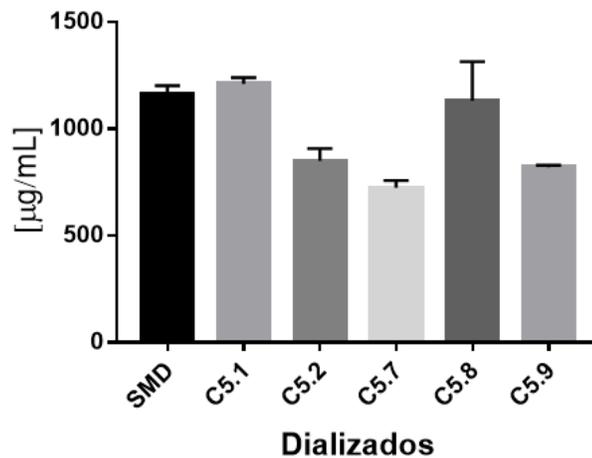
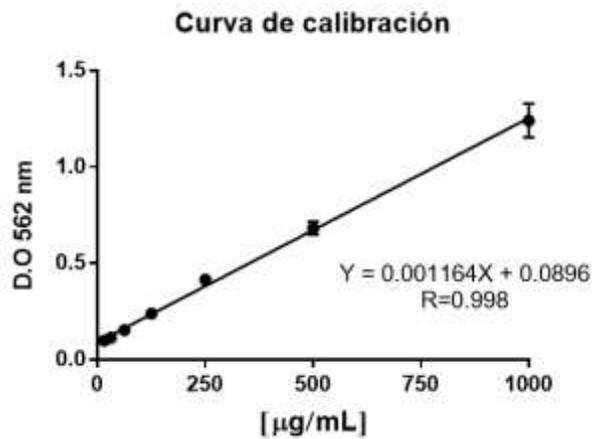


Figura 28. Curva de calibración y cuantificación de proteínas (Ag85B) en dializados de las clonas SMD-pPAg85B por el protocolo de BSA. (A) curva de calibración de 15.6 – 1000 µg/mL B) concentración de proteínas de la cepa SMD (1,080 µg/mL) y clonas C5.1 (1,260 µg/mL), C5.7 (750 µg/mL), C5.8 (1,100 µg/mL) y C5.9 (830 µg/mL).

Por la cantidad de proteína en los dializados se eligió el de la clona SMD-PpAg85B C5.1 para ser purificado por cromatografía de afinidad a níquel y por la columna de sefadex, posteriormente se realizó la cuantificación del Ag85B por medio de la técnica de Lowry usando el método de espectrofotometría UV-Vis a 562 nm y realizando la respectiva ecuación de la recta de la curva de calibración (Figura A). Obteniendo una concentración de aproximadamente 97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del Ag85B purificado en la figura B (Figura 29).

A)



B)

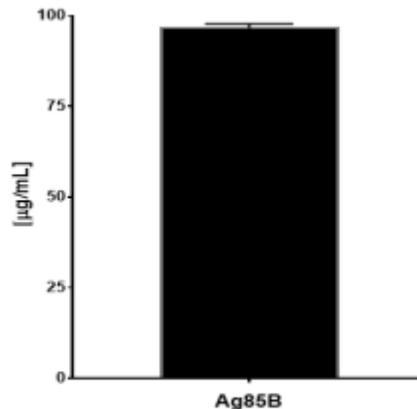


Figura 29. Curva de calibración y cuantificación del Ag85B purificado por el protocolo de BSA. (A) curva de calibración de 15.6 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (B) Concentración del Ag85B purificado [97 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

El dializado y purificado del Ag85B fueron analizados por SDS-PAGE y *western blot*. Como se observa en la **Figura 30** en el carril **3** corresponde al dializado del cultivo del Ag85B que fue cargado aproximadamente por 1.5 mg presentando un perfil de bandas y predominando una banda cercana a los 38 kDa en comparación con la cepa silvestre (carril **2**). Por otro lado, en el carril **5** se cargó aproximadamente 9.7 μ g mostrando a la proteína purificada (Ag85B) en un peso aproximado de 34 kDa siendo que en el carril **6** se muestra la comparación de un bandeado de un dializado de la cepa silvestre. Por último, se realizó un marcaje específico con el anti c-myc en el *western blot* en el carril **7** donde se observó una señal positiva de la cepa productora Ag85B, encontrando una banda de aproximadamente 34 kDa teóricamente coincidió, aunque se identificaron una serie de agregaciones de mayor peso molecular.

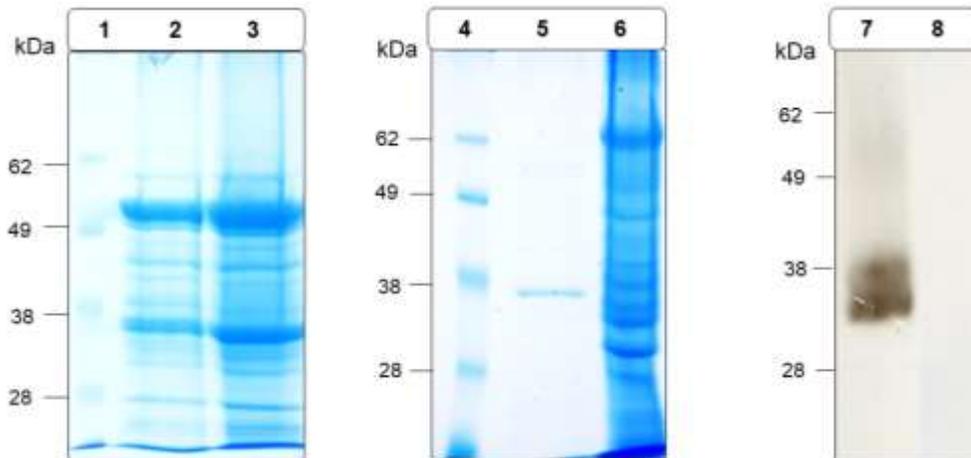


Figura 30. SDS-PAGE y *western blot* del sobrenadante de cultivo de la cepa *P. pastoris* productora de Ag85B. Representación de un gel de poliacrilamida al 15% en el que se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) la cepa SMD, (3) Ag85B. También se presenta un gel de poliacrilamida al 15% mostrando (4) marcador de peso molecular, (5) Ag85B purificado, (6) la cepa SMD. En el western blot se muestra (7) Ag85B y (8) cepa SMD.

6.6 Análisis de la glicosilación en la proteína recombinante.

Una vez se obtuvo al Ag85B purificado se corrió un SDS-PAGE para identificar la posible presencia de glicosilación en la proteína recombinante. En el carril 2 se cargó 10 μg del Ag85B purificado y no se observó al Ag85B glicosilado en comparación con el carril 3 que corresponde a la enzima peroxidasa de rábano picante como control positivo glicosilado y el inhibidor de la tripsina de soja como control negativo en el carril 4 que no presentó glicosilación. En contraste se tiñó con azul de Coomassie un gel con la misma cantidad de proteína y observamos en el carril 6 al Ag85B purificado en el peso de 34 kDa, en el carril 7 al control positivo con una banda cercana a los 34 kDa y en el carril 8 el control negativo visualizando un banda cercana a los 28 kDa como se muestra en la **Figura 31**.

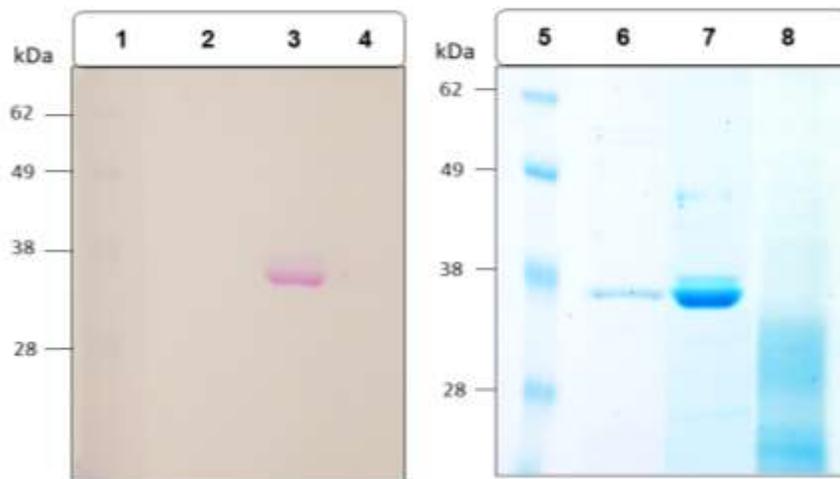


Figura 31. SDS-PAGE del Ag85B purificado para verificar presencia de glicosilaciones. Representación de geles de poliacrilamida al 15% en uno de ellos nos muestra (1) el marcador de peso molecular, (2) Ag85B no glicosilado, (3) peroxidasa de rábano picante como control positivo, (4) inhibidor de la tripsina como control negativo. El segundo gel se encuentra teñido con azul de Coomassie en el cual se muestra (5) marcador de peso molecular, (6) Ag85B purificado, (7) control positivo y (8) control negativo.

Capítulo 7

DISCUSIÓN

El Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis* fue expresado de manera recombinante en un sistema de producción heterólogo en la levadura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), ya que ofrece ventajas para la producción de proteínas micobacterianas, como la obtención de grandes cantidades de proteína, utilización de codones preferenciales y la producción de modificaciones postraduccionales⁵³.

Anteriormente el Ag85B se ha expresado de manera recombinante en *Escherichia coli* obteniendo una proteína con un plegamiento incompleto a la falta de chaperonas encontrándose dentro de cuerpos de inclusión y por tal motivo no permite que la proteína se obtenga de manera similar a la nativa⁵⁴.

Para expresar al Ag85B, se partió de una secuencia optimizada debido a que si un gen contiene codones que son raramente usados por el hospedero, su nivel de expresión se vería afectado, siendo una limitación importante en la traducción de la proteína de interés⁵⁵. Bajo esta consideración, en este trabajo se empleó el gen Rv1886c optimizado para el uso de codones en *Pichia pastoris* modificándose el tercer codón que codifica para el mismo aminoácido, en base a lo que se ha encontrado en la optimización de algunos codones de antígenos micobacterianos como es en el Ag85B donde se obtuvo una mayor inmunogenicidad en vacunas de ADN contra *M. tuberculosis*⁵⁶ y no obstante se ha reportado numerosos casos donde se ha visto una mejora en la expresión de las proteínas recombinantes de diversos orígenes gracias a la optimización de codones⁵⁷.

El uso del vector de expresión pPICZαA fue considerado como un plásmido capaz de integrar al gen Rv1886c y clonarlo en *Escherichia coli* DH5α que tiene una mutación en recA1 para mantener la estabilidad del ADN clonado y una

mutación en *endA* para evitar la degradación del mismo⁵⁸. En estudios anteriores, se ha clonado el Ag85B en el vector pHBM905A que se construyó a partir de pPIC9K que es también inducible por metanol⁵¹ y el gen CFP-32 antes se ha expresado en pPICZαA obteniendo una buena producción de proteína⁵³.

Lo que nos llevó a transformarlos en el cromosoma de *Pichia pastoris* generando una biomasa necesaria tanto a nivel tubo de ensaye como de matraz. Esto gracias al uso del plásmido pPICZαA y la cepa SMD 1168H para la obtención de las clonas recombinantes en medios sencillos de bajo costo. Además, el promotor AOX1 de pPICZαA resultó ser regulatorio en la expresión de la proteína recombinante gracias al metanol que fue la fuente de carbono que indujo la expresión de la proteína y que evitó contaminaciones externos. Cabe mencionar que las cepas obtenidas fueron verificadas mediante genotipificación con la amplificación del gen AOX y la integración del *cassete* por medio de PCR . Obteniendo un fenotipo positivo (MUT⁺) que en las clonas corresponde a un crecimiento rápido tras las inducción por metanol obteniendo la proteína secretada al medio. Por otra parte, la cepa SMD 1168H de *P. pastoris* se utilizó debido a la deficiencia a la proteasa A (HIS4⁺) lo que evitó la degradación de la proteína de interés para optimizar la producción de esta misma³³.

La obtención del Ag85B recombinante se detectó por medio de *western blot* por medio de la etiqueta c-myc integrada en el extremo N-terminal para ser detectada por un anti c-myc, en un dializado se confirmó la producción de la proteína, presentando un peso aproximado de 34 kDa, considerando los elementos añadidos durante su clonación. La proteína tiene un peso mayor al teórico lo que indica que fue modificada post-traduccionalmente por el sistema de la levadura.

Una parte importante de producir una proteína recombinante en *Pichia pastoris* fue verificar la presencia de glicosilaciones siempre y cuando la proteína nativa las presente. Para esta determinación se utilizó un método cualitativo que tiende a variar su sensibilidad debido a la cantidad de carbohidratos que llegan

a oxidarse para formar aldehídos vecinales que se unen al colorante de Schiff lo que permite formar un complejo coloreado. Sin embargo, por medio de este método no fue posible detectar la glicosilación en el Ag85B recombinante. Para esto se sabe que *M. tuberculosis* produce modificaciones post-traduccionales como son principalmente las acilaciones y las glicosilaciones predominando la O-glicosilaciones; sin embargo, muy recientemente, Birhanu et al. investigó 2944 eventos de glicosilación descubiertos en 1325 proteínas e informó que aproximadamente el 17% de los sitios de glicosilación estaban N-glicosilados. Siendo el primer informe que reporta glicoproteínas unidas a N de *M. tuberculosis*; entre las glicoproteínas se encuentran el Ag85B y Ag85C⁵². Se ha predicho un sitio potencial N-glicosilado en la posición de la Asparagina 299 (Asn 299) en NetNGlyc 1.0. En teoría en un sistema eucarionte como es la levadura; la proteína recombinante tendría la unión de oligosacáridos a los residuos de asparagina específicos dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr⁵⁹.

Un mecanismo post-traduccionales en *Pichia pastoris* mejor conocido debido a que la N-glicosilación comienza con la transferencia del oligosacárido Glc3Man9GlcNAc2 unido al dolicolpifosfato al residuo de Asn en la cadena polipeptídica ocurriendo la síntesis en el retículo endoplasmático rugoso donde participan enzimas que permiten que se lleve a cabo este proceso para que las proteínas bien plegadas se dirijan al aparato de Golgi donde los glicanos se someten a un proceso adicional para conformar toda la estructura por medio de enzimas que son necesarias para obtener la adición completa del oligosacárido en la proteína⁶⁰. Mientras tanto, en *M. tuberculosis* tiene una limitación en conocer la forma como lleva este tipo de modificación post-traduccionales por lo que algunos componentes de la envoltura se reportan como glicosilados y serían algunas enzimas participes que pudieran estar glicosilando al complejo Ag85B⁶¹. La única evidencia de una proteína N-glicosilada del complejo Ag85 es el Ag85A expresada en una planta que pertenece a un sistema eucariótico teniendo una estructura y función similar al Ag85B⁶².

Los niveles de producción de la proteína recombinante fueron alrededor de 97 mg/L, comparando una proteasa recombinante MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en *Pichia pastoris* con 45 mg/L que corresponde un poco menos de la mitad de producción⁶³. Se ha reportado, el Ag85B recombinante en *E. coli* tiene una producción mínima de 2 mg/L⁶⁴. Una gran parte de la obtención de estos niveles de producción del Ag85B puede deberse a la optimización de codones preferenciales para *P. pastoris*.

Capítulo 8

CONCLUSIÓN

El sistema de producción de proteínas heterólogas en la levadura *Pichia pastoris* SMD 1168H fue capaz de producir la proteína recombinante Ag85B de *Mycobacterium tuberculosis*. En cuanto a la glicosilación esperada del Ag85B recombinante a través del método empleado para la detección de glicosilaciones no fue posible ver la presencia de la N-glicosilación en la asparagina 299.

REFERENCIAS

1. Garza-Velasco, R., Ávila-de Jesús, J. & Perea-Mejía, L. M. Tuberculosis pulmonar: la epidemia mundial continúa y la enseñanza de este tema resulta crucial y compleja. *Educ. Quim.* **28**, 38–43 (2017).
2. Herrera-León, L. *et al.* Differentiation of species within the Mycobacterium tuberculosis complex by molecular techniques. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **27**, 496–502 (2009).
3. Delogu, G., Sali, M. & Fadda, G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **5**, (2013).
4. Lawn, S. D. & Zumla, A. I. Tuberculosis. *Lancet* **378**, 57–72 (2011).
5. Dulberger, C. L., Rubin, E. J. & Boutte, C. C. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 47–59 (2020).
6. Brennan, P. & Crick, D. The Cell-Wall Core of Mycobacterium tuberculosis in the Context of Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 475–488 (2007).
7. Haro, G., Sant, N. & Lozano, J. A. Tuberculosis . Patogenia . OFFARM. 21, 102-110 (2002)
8. Pai, M. *et al.* Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, (2016).
9. Cardona, P. J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **36**, 38–46 (2018).
10. Fanlo, P. & Tiberio López, G. Tuberculosis extrapulmonar. *An. Sist. Sanit. Navar.* **30**, 143–162 (2007).
11. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021. Global Tuberculosis Report* vol. 1999 (2021).
12. CENTRO NACIONAL DE PROGRAMAS PREVENTIVOS Y CONTROL (CENAPRECE). Situación epidemiológica México 2021. (2022).
13. González-Martín, J. *et al.* Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **28**, (2010).
14. Palma-Nicolás, J. P. & Bocanegra-García, V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch. Bronconeumol.* **43**, 225–232 (2007).
15. Ortiz, D. & Aristizabal, B. Métodos diagnósticos moleculares en tuberculosis. *Med. U.P.B.* **32**, 144–150 (2013).
16. Araujo, Z. *et al.* Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. *Invest. Clin.* **49**, 411–441 (2008).
17. Cascante, J. A., Pascal, I., Eguía, V. M. & Hueto, J. Diagnóstico de la infección tuberculosa. *An. Sist. Sanit. Navar.* **30**, 49–65 (2007).
18. Lyashchenko, K. *et al.* Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun.* **66**, 3936–3940 (1998).
19. Cole, S. *et al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).

20. Camus, J. C., Pryor, M. J., Médigue, C. & Cole, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **148**, 2967–2973 (2002).
21. Maulén, N. P. [Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*]. *Rev. Med. Chil.* **139**, 1605–10 (2011).
22. Gagneux, S. & Small, P. M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 328–337 (2007).
23. Iøerger, T. R. *et al.* Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *J. Bacteriol.* **192**, 3645–3653 (2010).
24. Gu, S. *et al.* Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1284–1296 (2003).
25. Rao, P. K. & Li, Q. Protein turnover in mycobacterial proteomics. *Molecules* **14**, 3237–3258 (2009).
26. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 463–496 (2003).
27. Wolfe, L. M., Mahaffey, S. B., Kruh, N. A. & Dobos, K. M. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Proteome Res.* **9**, 5816–5826 (2010).
28. Målen, H., Søfteland, T. & Wiker, H. G. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scand. J. Immunol.* **67**, 245–252 (2008).
29. Samanich, K., Belisle, J. T. & Laal, S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect. Immun.* **69**, 4600–4609 (2001).
30. Attanasio, R., Pehler, K. & McClure, H. M. Immunogenicity and safety of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins non-human primates. *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 84–91 (2000).
31. Mattow, J. *et al.* Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* **24**, 3405–3420 (2003).
32. Karbalaeei, M., Rezaee, S. A. & Farsiani, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J. Cell. Physiol.* **235**, 5867–5881 (2020).
33. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. & Schwab, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317 (2014).
34. Kuruti, K., Vittaladevaram, V., Uurity, S. V., Palaniappan, P. & Bhaskar, R. U. Evolution of *Pichia pastoris* as a model organism for vaccines production in healthcare industry. *Gene Reports* **21**, 100937 (2020).
35. García-Suárez, J., Zumalacárregui-De Cardenas, L. & Santana-Vázquez, Z. Usos de la levadura *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes. *Vaccimonitor* **30**, 153–163 (2021).
36. Kaufmann, S. H. E. Vaccine Development Against Tuberculosis Over the Last 140 Years: Failure as Part of Success. *Front. Microbiol.* **12**, 1–15 (2021).
37. Yuk, J.-M. & Jo, E.-K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **3**, 155 (2014).

38. Ireton, G. C. *et al.* Identification of Mycobacterium tuberculosis antigens of high serodiagnostic value. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1539–1547 (2010).
39. Karbalaee Zadeh Babaki, M., Soleimanpour, S. & Rezaee, S. A. Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb. Pathog.* **112**, 20–29 (2017).
40. Content, J. *et al.* The genes coding for the antigen 85 complexes of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG are members of a gene family: Cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of M. tuberculosis. *Infect. Immun.* **59**, 3205–3212 (1991).
41. Harth, G., Lee, B. Y., Wang, J., Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* **64**, 3038–3047 (1996).
42. Chiaradia, L. *et al.* Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
43. Fihiruddin, Artama, W. T., Wibawa, T. & Mertaniasih, N. M. Expression of immunoglobulin, granzyme-B and perforin against Ag85A and Ag85B proteins of mycobacterium tuberculosis in Balb/c mice. *African J. Infect. Dis.* **13**, 13–20 (2019).
44. Armitige, L. Y., Jagannath, C., Wanger, A. R. & Norris, S. J. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: Effect on growth in culture and in macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 767–778 (2000).
45. Korepanova, A. *et al.* Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli. *Protein Sci.* **14**, 148–158 (2009).
46. Aghababa, H. *et al.* A comparative approach to strategies for cloning, expression, and purification of Mycobacterium tuberculosis mycolyl transferase 85B and evaluation of immune responses in BALB/c mice. *Mol. Biotechnol.* **56**, 487–497 (2014).
47. Kremer, L., Maughan, W. N., Wilson, R. A., Dover, L. G. & Besra, G. S. The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 233–237 (2002).
48. Lakey, D. L. *et al.* Enhanced production of recombinant Mycobacterium tuberculosis antigens in Escherichia coli by replacement of low-usage codons. *Infect. Immun.* **68**, 233–238 (2000).
49. Horwitz, M. A., Lee, B. W. E., Dillon, B. J. & Harth, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1530–1534 (1995).
50. Cerqueira-Rodrigues, B., Mendes, A., Correia-Neves, M. & Nobrega, C. Ag85-focused T-cell immune response controls Mycobacterium avium chronic infection. *PLoS One* **13**, 1–15 (2018).
51. Liu, Y. *et al.* Heterologous expression of Mycobacterium tuberculosis Ag85B in Pichia pastoris. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* **10**, 602–606 (2005).
52. Birhanu, A. G. *et al.* Ample glycosylation in membrane and cell envelope proteins may explain the phenotypic diversity and virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Sci. Rep.* **9**, 1–15 (2019).
53. Benabdeselem, C. *et al.* High level expression of recombinant Mycobacterium tuberculosis culture filtrate protein CFP32 in Pichia pastoris. *Mol. Biotechnol.* **35**, 41–49 (2007).

54. Aghababa, H., Mobarez, A. M., Behmanesh, M., Khoramabadi, N. & Mobarhan, M. Production and purification of mycolyl transferase B of mycobacterium tuberculosis. *Tanaffos* **10**, 23–30 (2011).
55. Puigbò, P., Guzmán, E., Romeu, A. & Garcia-Vallvé, S. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **35**, 126–131 (2007).
56. Ko, H. J. *et al.* Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding mycobacterial antigen Ag85B. *Infect. Immun.* **73**, 5666–5674 (2005).
57. Bai, J. *et al.* A gene optimization strategy that enhances production of fully functional P-Glycoprotein in *Pichia pastoris*. *PLoS One* **6**, (2011).
58. Jung, S. C. *et al.* Restoration of growth phenotypes of *Escherichia coli* DH5 α in minimal media through reversal of a point mutation in *purB*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6307–6309 (2010).
59. De Schutter, K. *et al.* Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **27**, 561–566 (2009).
60. Jacobs, P. P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R. & Callewaert, N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.* **4**, 58–70 (2009).
61. Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I. & Lascrain, R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **18**, 142–153 (2005).
62. Kim, H. *et al.* Plant-produced N-glycosylated Ag85A exhibits enhanced vaccine efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* HN878 through balanced multifunctional Th1 T cell immunity. *Vaccines* **8**, (2020).
63. García-González, G., Ascacio-Martínez, J. Á., Hernández-Bello, R., González, G. M. & Palma-Nicolás, J. P. Expression of recombinant protease MarP from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* and its effect on human monocytes. *Biotechnol. Lett.* **43**, 1787–1798 (2021).
64. Zarif, R. *et al.* Cloning and expression of *Mycobacterium tuberculosis* major secreted protein antigen 85B (Ag85B) in *Escherichia coli*. *Jundishapur J. Microbiol.* **6**, 112–116 (2013).