

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO DE FUSIÓN MEDIANTE INGENIERÍA DE LA TRADUCCIÓN PARA USO EN DIAGNÓSTICO DE LA TB

Data de submissão: 16/05/2023

Data de aceite: 04/07/2023

Angel Hilario Alvarez Herrera

Centro de Investigación y Asistencia en
Tecnología y diseño del Estado de Jalisco
A.C.

Unidad de Biotecnología médica
farmacéutica.

Guadalajara, Jalisco; México.

<http://orcid.org/0000-0003-3302-5493>

RESUMEN: La biología sintética y la bioingeniería han permitido acelerar la velocidad para generar biotecnológicamente nuevas moléculas con características bioactivas, plataformas que junto a la inmunoproteómica están permitiendo la generación de nuevas moléculas blanco del sistema inmunitario en el combate de las enfermedades infecciosas. Entre las proteínas antigénicas más usadas y reconocidas para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis (TB) destacan los antígenos de virulencia ESAT6 y CFP10, sin embargo, su producción usando cultivos de *M. tuberculosis* es de alto riesgo, lento y además con muy bajos rendimientos. Una de las opciones de nueva generación es utilizar una estrategia biotecnológica de ingeniería de la traducción. Al generar un gen sintético artificial codificante para

producir una proteína nativa de forma eficiente se optimizan las características fisicoquímicas de la molécula blanco para su expresión en *E. coli*. En este trabajo se obtuvo una sola proteína de fusión ESAT6:CFP10, generándose una molécula claramente soluble a partir de un cultivo bacteriano de fácil manipulación. La proteína recombinante se obtuvo después de la lisis celular de un cultivo bacteriano inducido mediante una purificación por cromatografía de afinidad. Se evaluó la capacidad inmunoestimulante en cultivos de sangre periférica de animales con una infección tuberculosa activa mediante un inmunoensayo de ELISA para detectar interferón-gamma de bovino. La molécula recombinante demostró un alto potencial para despertar la producción de interferón-gamma, aumentando la sensibilidad del diagnóstico de la infección tuberculosa animal. La generación del gen sintético de ESAT6:CFP10 para *E. coli* demuestra que la plataforma de diseño molecular utilizada para obtener un reactivo biológico complejo resulta ser una buena estrategia rentable para la producción a gran escala de estructuras multi-epítopo con propiedades antigénicas sostenidas con fines inmuno-diagnósticos.

PALABRAS CLAVE: proteína

1 | INTRODUCCIÓN

1.1 Agentes infecciosos de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es un proceso inflamatorio granulomatoso crónico que afecta principalmente al tracto respiratorio del huésped infectado. Los agentes etiológicos *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), son miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que residen en los pulmones y los ganglios linfáticos asociados. Aunque la infección por *Mtb* es principalmente una enfermedad infecciosa humana, los seres humanos son la presunta fuente de transmisión de *Mtb* al ganado, sin embargo, la diseminación de *M. bovis* del ganado al hombre es muy común (Wahdan et al., 2020). El patógeno ha sido aislado e identificado en ganado, atribuido al contacto cercano entre humanos y animales, probablemente debido a la transmisión de *Mtb* de pastores y empleados de lechería que padecen un proceso activo de TB (Adesokan et al., 2019; Lombard et al., 2021). Por otro lado, la infección bovina por *M. bovis* causa una infección generalizada en mamíferos que también ocurre en otras especies domésticas y de vida silvestre, lo que contribuye a la persistencia de la enfermedad y se propaga dentro de las poblaciones por infección cruzada entre hospedadores como TB zoonótica (zTB) particularmente en países de bajos ingresos (Kock et al., 2021). La transmisión aérea del patógeno de las vacas a los seres humanos se produce mediante la inhalación de gotitas en aerosol diseminadas por la tos, con una alta prevalencia de infección asintomática principalmente entre ganaderos, veterinarios y trabajadores de mataderos expuestos a ganado infectado (Devi et al., 2021).

1.2 Genómica de las infecciones por micobacterias

La secuencia de los genomas completos de *Mtb* y *M. bovis*, bacterias patógenas para el ser humano y animales domésticos pertenecientes al MTBC, fueron publicados desde 2003. Actualmente, se sabe que el genoma de estas micobacterias contiene un alto contenido de G+C (65.63%) que se refleja en un distintivo molecular codificante dentro de los genes específicos para este género de bacterias. El genoma de *M. bovis* contiene 3,952 genes aparentemente codificantes y 42 elementos de secuencia de inserción (IS). El genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95% de identidad con el de *Mtb*, pero su tamaño se ha reducido debido a las deleciones, a eventos únicos y unidireccionales (van Pinxteren et al., 2000).

La cepa de *M. bovis* BCG que actualmente es usada como vacuna contra la tuberculosis humana fue producida a partir de una cepa de *M. bovis* aislada de un bovino infectado y esta se logró mediante pases de atenuación realizados por Calmette y Guérin

para producir la vacuna contra la TB. Mediante análisis molecular se corroboró la delección de la región cromosomal de diferencia 1 (RD1) en todas las cepas de BCG analizadas y se identificaron polimorfismos genéticos de un nucleótido (SNPs) entre *Mtb* H37Rv y múltiples cepas de BCG. De esta manera, se explica que la pérdida de virulencia se debe a la pérdida de RD1 así como a la acumulación de delecciones genéticas adicionales del tipo SNPs (Mahairas et al., 1996). RD1 es una región de 9,505 pb que contiene importantes genes de virulencia, entre ellos destacan dos antígenos inmunoestimulantes de células T como el antígeno de secreción temprana de 6 kDa (ESAT6) y la proteína de 10 kDa del filtrado de cultivo (CFP10). Se cree que la región RD1 es la principal región que se perdió durante los 230 pases seriados de *M. bovis* por Calmette y Guérin entre 1908 y 1921; posiblemente es responsable de la principal atenuación de *M. bovis* BCG. Los genes que codifican CFP10 y ESAT6 se encuentran adyacentes en la región RD1, están orientados a la misma dirección y forman parte de un mismo operón (*Esx1*) por lo que son regulados coordinadamente y expresados durante la fase infectiva de *Mtb* y *M. bovis*.

1.3 Diagnóstico complementario diferencial de la tuberculosis

En los últimos años ha habido un significativo progreso en la identificación de algunas proteínas antigénicas del complejo *M. tuberculosis*, en un intento por identificar aquellas que sean más específicas que las del reactivo purificado de proteínas PPD. Se ha avanzado considerablemente en la identificación y utilización de los denominados antígenos de diferenciación DIVA (del inglés: *differentiation of infected and vaccinated individuals*). Los antígenos de diagnóstico diferencial DIVA incluyen a CFP10 y ESAT6 que están codificados por genes localizados en la región RD1 del genoma y que están ausentes en la cepa vacunal BCG, motivo por el cual estos dos antígenos en la actualidad son extensamente considerados para el diagnóstico de los casos positivos de la infección micobacteriana. Así, estos antígenos han sido utilizados para diferenciar sujetos infectados de los vacunados con muy buenos resultados. Los casos de TB humana debidos a *M. bovis* son igualmente propensos a la misma gravedad que los casos debidos a *Mtb*, los cuales son clínicamente indistinguibles a menos que se utilicen pruebas moleculares mediante genotipado y análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la identificación a nivel de especie después del aislamiento por cultivo del patógeno (Rodwell et al., 2010).

Por otro lado, la prueba más utilizada para el diagnóstico de la TB es la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada al reactivo denominado PPD (Derivado Proteico Purificado), también conocida como la prueba de la tuberculina (TST), es el principal método utilizado para identificar la exposición a *Mtb*. Los avances en el campo de la genómica y las técnicas de inmunodetección han permitido el desarrollo de sistemas de diagnóstico basados en la producción de interferón-gamma (IFN- γ) por células T estimuladas con ESAT6 y CFP10. Los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs del inglés: *IFN- γ release*

assays) han surgido como una alternativa para la detección de TB. Actualmente existen versiones comerciales como el QuantiFERON-TB Gold y el T-SPOT.TB, que consisten en la cuantificación del IFN- γ producido por leucocitos de sangre total estimulados con los antígenos PPD, ESAT6, CFP10 y TB7.7 en el kit QuantiFERON-IT de tercera generación. Estas pruebas de diagnóstico tienen mayor especificidad, especialmente en población vacunada con BCG (Barrios-Payán et al., 2010).

1.4 Biología sintética para la sobreexpresión de proteínas recombinantes

Las fábricas de células se han convertido en un actor establecido en la producción sostenible de productos biológicos probados con un valor de cientos de miles de millones de USD/año en los mercados mundiales (Davy et al., 2017). Un aspecto común en el desarrollo de tales fábricas de células es la búsqueda continua de una mayor productividad a través de métodos de ingeniería genética dirigidos o basados en la selección. Se puede lograr una alta actividad enzimática mediante la optimización de la transcripción, la traducción, las modificaciones postraduccionales y las condiciones del proceso (Liu et al., 2013). Una estrategia común es emplear promotores fuertes para sobre expresar genes de biosíntesis de productos. Los promotores altamente activos logran mayores tasas de producción de proteínas al aumentar los respectivos niveles de ARNm en la célula. Se pueden distinguir dos enfoques centrados en la traducción que tienen como objetivo optimizar la traducción en lugar de la transcripción. Con este fin, el primer enfoque intenta estabilizar el ARNm, mientras que el segundo busca aumentar la eficiencia de traducción.

El sistema de expresión de *E. coli* es una herramienta generalizada para obtener proteínas heterólogas recombinantes, incluidas las de origen micobacteriano mediante mejoras biotecnológicas (Kulshrestha et al., 2005, Restrepo-Pineda et al., 2019). Las secuencias codificantes de genes de micobacterias tienden a contener un mayor contenido de citosina y guanina que el genoma de *E. coli* con alrededor del 65% de G + C en secuencias genómicas (Andersson y Sharp, 1996), además la sobreexpresión de antígenos micobacterianos en *E. coli* puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión.

La ingeniería de la traducción y expresión de proteínas a escala en *E. coli* se puede lograr mediante un diseño basado en tecnología genética que puede alterar las secuencias de genes tanto naturales como recombinantes mediante optimización del uso de codones (Hatfield y Roth, 2007). Muchos algoritmos de optimización de codones se han desarrollado con distintas tasas de éxito (Nieuwkoop et al., 2019). Mediante esta estrategia biotecnológica se obtuvieron artificialmente los dos principales antígenos micobacterianos ESAT6 y CFP10 como una sola proteína híbrida por un uso ajustado de codones de las secuencias genéticas codificantes. La molécula recombinante resultante demostró una fuerte conservación antigénica para el diagnóstico de la TB, lo que confirma que las moléculas híbridas diseñadas por optimización de codones puede ser una herramienta

viable y rentable para la obtención de biomarcadores de la infección humana y animal.

2 | METODOLOGÍA

2.1 Obtención de un gen sintético codificante de ESAT6:CFP10

El gen optimizado de la proteína de fusión ESAT6:CFP10 se obtuvo mediante un servicio externo de optimización de secuencias para expresión, generando un plásmido pUC57 recombinante con un gen inserto a diseño para expresar las proteínas nativas obtenidas de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (claves de acceso P0A565 y P0A567) correspondientes a la cepa de *M. bovis* AF2122/97. El diseño incluyó un enlazador repetido de glicina-serina que añadió una secuencia de quince residuos adicionales para un linker de unión de GS largo el extremo C-terminal de ESAT6 para unir los dos dominios de la proteína fusionada (Tabla 1). A la secuencia sintética se le adicionaron los sitios de restricción reconocidos por las enzimas *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, a fin de usar los sitios de restricción para subclonar la secuencia completa en el vector de expresión bacteriano pET28a.

El plásmido pUC57-ESAT6:CFP10 se transformó a la cepa electrocompetente de *E. coli* TOP10 seleccionando la cepa transformante en placas de agar LB con ampicilina como agente de selección. Una de las cepas transformantes se inoculó en 4 mL de medio líquido LB incubándose a 37°C en agitación durante 20 h. Se obtuvo la pastilla celular del cultivo centrifugando a 6,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el paquete celular obtenido se procesó con un kit Plasmid Miniprep para extracción de DNA plasmídico. El DNA se cuantificó con un espectrofotómetro Nano Drop NT-1000 a una absorbancia de 260 nm. Una alícuota de 10 µL de DNA plasmídico obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con SYBR Safe y se visualizó con luz ultravioleta usando un analizador de imágenes GelDoc XR usando el software Quantity One para confirmar la presencia del plásmido. El plásmido recombinante se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.2 Subclonación de la secuencia ESAT6:CFP10 en plásmido pET28a

Para la subclonación del gen híbrido, se digirió una alícuota del plásmido pUC57 con las enzimas *NcoI* y *XhoI* y los fragmentos de digestión se obtuvieron a partir de un gel de agarosa usando el kit Gen Elute gel extraction. Se realizó la ligación del fragmento de gen híbrido digerido con un fragmento linearizado del vector pET28a digerido con las mismas enzimas de restricción mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa por incubación a 16°C durante 18 h. La mezcla de ligación con el plásmido recombinante pET28-ESAT6:CFP10 se transformó de la misma forma anteriormente descrita a células electrocompetentes de *E. coli* TOP10, y posteriormente se recuperaron

los plásmidos a partir de cultivos que fueron seleccionados de placas con agar kanamicina de la forma descrita. El plásmido pET28-ESAT6:CFP10 se obtuvo de una de las cepas de *E. coli* TOP10 seleccionadas mediante un cultivo líquido y aislamiento de plásmidos de la forma descrita con el kit de Miniprep y se procedió a introducirlos por transformación a un cultivo electrocompetente de la cepa *E. coli* BL21 mezclando con 1 µL del plásmido recombinante. Finalmente, las células BL21 transformantes se obtuvieron en medio sólido LB con kanamicina para seleccionar las transformantes.

Tabla 1. Gen optimizado para la expresión de ESAT6:CFP10 en *E. coli*.

^a <u>CCATGGGC</u> ACG GAA CAA CAG TGG AAC TTT GCG GGC ATC GAA GCG GCG GCA
M G T E Q Q W N F A G I E A A A
TCA GCG ATT CAG GGT AAC GTC ACG AGC ATT CAT AGC CTG CTG GAT GAA GGC
^b S A I Q G N V T S I H S L L D E G
AAA CAG TCC CTG ACC AAA CTG GCC GCG GCA TGG GGC GGT AGC GGT TCT GAA
K Q S L T K L A A A W G G S G S E
GCC TAT CAG GGT GTC CAG CAA AAA TGG GAC GCC ACC GCA ACG GAA CTG AAC
A Y Q G V Q Q K W D A T A T E L N
AAT GCT CTG CAG AAC CTG GCA CGT ACC ATT TCT GAA GCG GGT CAA GCT ATG
N A L Q N L A R T I S E A G Q A M
GCG AGT ACC GAA GGC AAT GTG ACG GGC ATG TTT GCC <u>GGC GGT GGC GGT TCA</u>
A S T E G N V T G M F A G G G G S
<u>GGC GGT GGC GGT TCG GGC GGT GGC GGT AGC</u> ATG GCA GAA ATG AAA ACC GAT
G G G G S G G G G S M A E M K T D
GCT GCG ACG CTG GCC CAG GAA GCA GGC AAC TTC GAA CGC ATT TCA GGT GAT
A A T L A Q E A G N F E R I S G D
CTG AAA ACC CAG ATC GAC CAA GTT GAA AGT ACC GCC GGT TCC CTG CAG GGT
L K T Q I D Q V E S T A G S L Q G
CAA TGG CGT GGC GCC GCA GGT ACC GCT GCC CAG GCG GCA GTG GTT CGT TTT
Q W R G A A G T A A Q A V V R F
CAA GAA GCT GCG AAC AAA CAG AAA CAA GAA CTG GAC GAA ATT AGC ACG AAT
Q E A A N K Q K Q E L D E I S T N
ATC CGT CAG GCG GGC GTC CAG TAT TCC CGT GCT GAT GAA GAA CAA CAA CAG
I R Q A G V Q Y S R A D E E Q Q Q
GCG CTG AGT AGC CAG ATG GGT TTC <u>CTCGAG</u>
A L S S Q M G F

^a Secuencia de codones optimizada a partir de los genes nativos de la base de datos de *M. bovis* AF2122/97 (<http://genolist.pasteur.fr/BovList>). Negritas y subrayadas: sitios de restricción para *NcoI* y *XhoI*; secuencia codificante del linker GS.

^b Código de aminoácidos de una sola letra de la traducción para la proteína de fusión ESAT6:CFP10.

2.3 Producción de la proteína ESAT6:CFP10 en *E. coli*

Se realizó la inducción de la producción de la proteína ESAT6:CFP10 inoculando 5 mL de medio líquido LB, el que después de 18 h de cultivo a 37°C se agregó a 500 mL de medio líquido LB en un matraz Erlenmeyer de 1 L, incubándose posteriormente a 30°C/250 rpm hasta una DO a 600 nm de 0.5-0.8. En ese punto, se indujo la expresión agregando al cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. Las células se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm/15 min/4°C después de 4 h de la adición del IPTG. Se usó el pellet celular y se descartó el medio de cultivo

sobrenadante. Para la confirmación de la presencia de la proteína recombinante de fusión ESAT6:CFP10. El pellet celular se resuspendió en 10% del volumen de cultivo con buffer PBS con Tritón X-100 al 0.1% y se lisó mediante sonicación. Se separaron las fracciones solubles por centrifugación a 5,000 rpm/20 min/4°C descartando el pellet y conservando el sobrenadante rico en proteína intracelular.

La comprobación de la producción de la proteína recombinante ESAT6:CFP10 se realizó a usando 20 µL de la fracción soluble del lisado celular tratada con buffer de Laemmli 2X y sometida a una electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% durante 1 h a 120 V. El gel se tiñó por tinción de Coomassie para comprobar la presencia de la banda de 23 kDa correspondiente a la molécula ESAT6:CFP10. De igual forma otro gel se corrió y se le realizó una electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa con una cámara para transferencia para comprobar la identidad de la banda de 23 kDa mediante un Western blot con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His6x de acuerdo a una cola de 6 histidinas presente en la proteína recombinante, y rebelando la membrana con un anticuerpo secundario de chivo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

2.4 Purificación de la proteína ESAT6:CFP10 por cromatografía de afinidad

La purificación se realizó mediante el método estándar por cromatografía de afinidad a níquel en columnas Bio-Scale mini IMAC de 5X5 mL. La fracción celular de la fase soluble rica en proteína ESAT6:CFP10 se pasó por la columna con la ayuda de una jeringa, se dejó reposando la columna en hielo por 15 a 30 min, y después se procedió a hacer el lavado buffer de lavado A (imidazol 50 mM, NaCl 250 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH=8.0) y después con buffer de lavado B (imidazol 70 mM, NaCl 250 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH=8.0). Finalmente, la proteína ESAT6:CFP10 se eluyó de la columna con buffer de elución (imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH=8.0) en fracciones de 5 mL. Las fracciones recolectadas en cada paso se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% a fin de detectar la proteína de interés en las fracciones de elución.

Las fracciones de elución elegidas por contener la proteína recombinante se colocaron en un tubo de membrana para diálisis con un punto de corte de 11 kDa y se dializaron contra buffer de diálisis (HEPES 15 mM, NaCl 10 mM, glicerol 1%, pH=7.5), sumergiendo la membrana en 200 mL del buffer y dejando en agitación regular a 4°C por 4 h, haciendo 4 cambios y al final se recuperó la proteína y se colocó en viales de criopreservación para su congelación a -70°C hasta su uso en las pruebas de antigenicidad. La concentración de proteína se cuantificó en una alícuota de cada fracción de purificación dializada mediante el método de Bradford adaptado en microplaca de 96 pozos, haciendo una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA).

2.5 Evaluación de la antigenicidad de la proteína ESAT6:CFP10

Para la determinación de la capacidad inmunoestimulante de la proteína de fusión mediante la inducción de la producción de IFN- γ por las células T-CD4⁺ en sangre periférica fresca de bovinos procedentes de hatos ganaderos en los que se ha comprobado la prevalencia de la infección mediante las pruebas de la tuberculina (TST) en campo de hipersensibilidad retardada en pliegue caudal y cervical comparativa como lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Se obtuvieron 48 muestras de sangre bovina de una zona detectada con una alta prevalencia de la infección y 60 muestras de una zona de baja prevalencia en tubos con heparina de litio de 10 mL y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio en un periodo máximo de 8 hr.

Cada muestra de sangre correspondiente a un animal, se distribuyó en 2 alícuotas de 0.75 mL en una placa de 24 pozos y se agregaron las mezclas antigénicas siguientes en cada pozo en el orden siguiente: PPDB (PPD de *M. bovis*), PPDA (PPD de *M. avium*) y ESAT6:CFP10 (antígenos de virulencia de *M. bovis*). La antigenicidad se midió mediante la medición indirecta de la producción de IFN- γ de acuerdo al procedimiento del kit Bovigam™ (Prionics) para el diagnóstico de la TB bovina en sangre, el cual contempla el uso de los antígenos PPDB y PPDA (a la concentración de 0.3 mg/mL). El antígeno ESAT6:CFP10 se usó individualmente a una concentración de 2 μ g/mL de sangre. Después de la incubación para la estimulación antigénica, el plasma se obtuvo por centrifugación de las placas de cultivo celular a 2,500 rpm durante 15 min. El plasma se almacenó a -20°C hasta realizar el ensayo de ELISA con el mismo kit de Bovigam™. La producción del IFN- γ se calculó directamente mediante la lectura de la absorbancia de cada muestra estimulada mediante un lector para placas de ELISA a 450 nm registrando los valores de absorbancia que fueron utilizados para estimar y graficar los niveles de IFN- γ producidos.

3 | RESULTADOS

Se recibió en el plásmido pUC57 el gen híbrido *esxA:esxB* (ESAT6:CFP10) cuyo marco de lectura se optimizó para ser expresado en *E. coli*. Primero se transformó a la cepa de *E. coli* TOP10 para replicarlo y posteriormente se aisló para liberarlo del vector mediante corte con las enzimas *Xho*I y *Nco*I. Después de la subclonación mediante ligación del gen híbrido *esxA:esxB* en pET28a y posterior transformación a *E. coli* TOP10, se confirmó la inserción del fragmento codificante del gen híbrido en el vector de expresión mediante corte enzimático con *Nco*I y *Xho*I.

Posterior a la comprobación de la construcción en el plásmido recombinante pET28-ESAT6:CFP10, este fue transformado a la cepa de *E. coli* BL21 para su expresión, habiendo obtenido clones bacterianos de esta cepa en medio de cultivo con kanamicina. Se realizó la comprobación de la presencia del plásmido recombinante en una de las clones

bacterianas seleccionadas mediante aislamiento de plásmidos y una restricción enzimática con las enzimas usadas para su inserción demostrando tener la cepa el plásmido con el gen híbrido integrado (Figura 1). Posteriormente, se procedería a realizar la inducción de la expresión de la proteína de fusión ESAT6:CFP10 en la cepa *E. coli* BL21.

La expresión de la proteína resultó de forma óptima demostrando que la construcción del gen híbrido que se diseñó de acuerdo al uso de codones preferencial para *E. coli* permitió una síntesis de proteína celular mayor a pesar de tratarse de una proteína heteróloga (de origen micobacteriano). Cabe destacar que la proteína se obtuvo en la fracción soluble del cultivo inducido a pesar de la gran cantidad de proteína producida, y no en cuerpos de inclusión los cuales son muy comunes en sistemas de expresión de proteínas heterólogas en bacterias. Además, se comprobó si la proteína de fusión sintetizada y observada en el cultivo inducido correspondía a la proteína recombinante mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta de His6x de la proteína (Figura 2). Se observó que la proteína total obtenida del cultivo inducido muestra un reconocimiento específico por el anticuerpo anti-His6x a la misma altura (23 kDa) de la banda mayoritaria de la proteína detectada por tinción de Coomassie presente en el cultivo inducido, comprobando así que la proteína observada en efecto corresponde a la proteína de fusión ESAT6:CFP10 codificada por el plásmido recombinante pET28a.

Después de la inducción en 500 mL de cultivo se obtuvo una fracción soluble abundante del lisado celular con una proteína recombinante de ESAT6:CFP10 mayoritaria. La proteína producida en este cultivo se purificó mediante cromatografía de afinidad a etiquetas de His6x utilizando la fracción soluble obtenida. Después de limpiar la fracción de elución con la proteína enriquecida por equilibrio mediante diálisis en HEPES y tratamiento con Triton X-114 para eliminar las endotoxinas, la proteína permaneció como una suspensión soluble con una pureza estimada en alrededor del 95%. Según la concentración calculada de ESAT6:CFP10, el rendimiento de la proteína recombinante, solo en la fracción soluble, se estimó en 67 mg/L de cultivo bacteriano, almacenándose a -70°C hasta su uso para la inducción de respuestas de inducción de la respuesta inmune celular en sangre de bovino.

La evaluación de la antigenicidad de la proteína híbrida ESAT6:CFP10 de *M. bovis* se evaluó utilizando sangre de bovino con infección bacteriana confirmada por la prueba de la tuberculina TST. La antigenicidad se midió directamente por la producción de la interleucina IFN- γ , la cual es indicadora de una respuesta inmune activa y de memoria de tipo celular contra los antígenos de *M. bovis* si hubo contacto previo con este agente infeccioso, por lo que la magnitud de la densidad óptica obtenida por la prueba de ELISA Bovigam™ para el diagnóstico de la TB bovina es directamente proporcional a la identificación de un contacto previo con el agente infeccioso de la TB bovina y por ende a la positividad de la prueba. De 48 muestras de sangre de una zona de alta prevalencia, 47 desarrollaron una DO mostraron una magnitud de producción de IFN- γ muy alta (>0.5) al ser tratadas sólo con la proteína de fusión ESAT6:CFP10 pura, casi comparada con aquella provocada por la mezcla de

antígenos micobacterianos PPDB del propio kit de diagnóstico, lo cual demuestra que esta proteína de fusión conserva la antigenicidad de los dos antígenos que ya ha sido reportada y más que

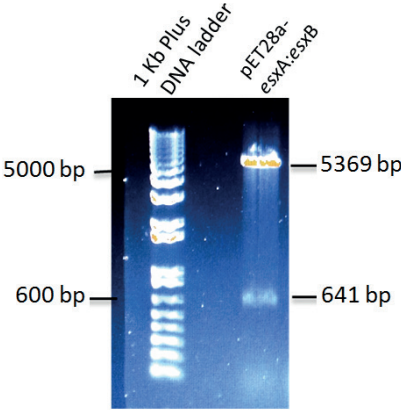


Fig. 1. Comprobación de la clonación de *esxA:esxB*. El fragmento de ADN híbrido *esxA:esxB* de 641 pb se confirmó mediante una restricción enzimática con *Nco*I y *Xho*I a partir de pET28a-ESAT6:CFP10 recombinante obtenido de una sola clona positiva de *E. coli* TOP 10 (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

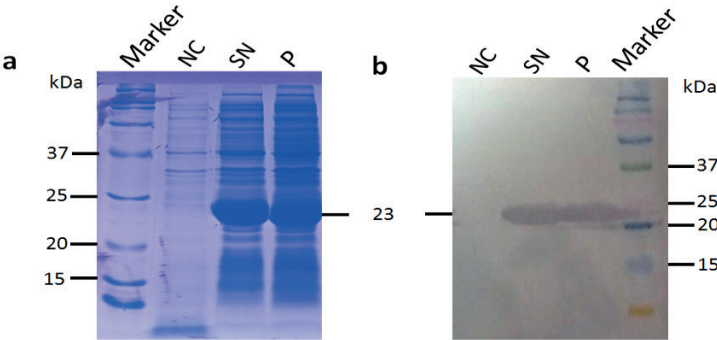


Fig. 2. Comprobación de la expresión inducible de ESAT6:CFP10 por SDS-PAGE y Western blot en un lisado de cultivo de *E. coli* BL21. Se analizaron fracciones tanto solubles del sobrenadante (SN) como insolubles de la pastilla celular (P) y se compararon con un control negativo (NC) sin inducción con IPTG. (a) Proteína total vista por tinción de Coomassie; (b) proteína total analizada por Western blot en membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal anti-His6x (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

demostrada en diversos estudios para validar estos dos antígenos para el diagnóstico de la TB bovina y humana. En 16 muestras no se despertó la misma respuesta a pesar de que la intensidad de producción de IFN- γ fue muy evidente debida al estímulo por el reactivo PPDB; sin embargo, la media de la DO obtenida por el estímulo con la proteína de fusión pura fue de 1.4 (Figura 3A), lo cual demuestra que esta proteína por si sola logra

mantener una buena sensibilidad para detectar una buena proporción de animales con una infección por *M. bovis*, lo que nos indica que podría incluirse aditivamente la proteína de ESAT6:CFP10 al reactivo PPDB para lograr un aumento considerable de la sensibilidad de la prueba de diagnóstico *in vitro* de la TB bovina tal y como ya se hace en los kits de segunda generación para el diagnóstico de la TB en humanos y bovinos usando péptidos derivados de estos dos antígenos.

Por otro lado, de 60 muestras de sangre bovina analizadas provenientes de una zona de baja prevalencia, solo 2 muestras (3%) mostraron una alta producción de IFN- γ provocada por el antígeno de fusión ESAT6:CFP10 (Figura 3B). Siete muestras tuvieron una alta intensidad de producción de IFN- γ provocada por PPDB y alrededor de 12 muestras por PPDA, lo cual sugiere que en este hato puede haber un predominio de infecciones por micobacterias ambientales como *M. avium* y muy probablemente la mayoría de los casos observados como altos productores de IFN- γ por PPDB en realidad se deban a un resultado atribuible a una respuesta de reacción cruzada por la semejanza de los antígenos PPDA y PPDB. Sin embargo, sólo 2 animales mostraron una fuerte producción de IFN- γ por uso de ESAT6:CFP10 lo que podría indicar la alta probabilidad de detectar animales realmente infectados por *M. bovis* por los antígenos ESAT6:CFP10 demostrando su especificidad aún en zonas de baja prevalencia.

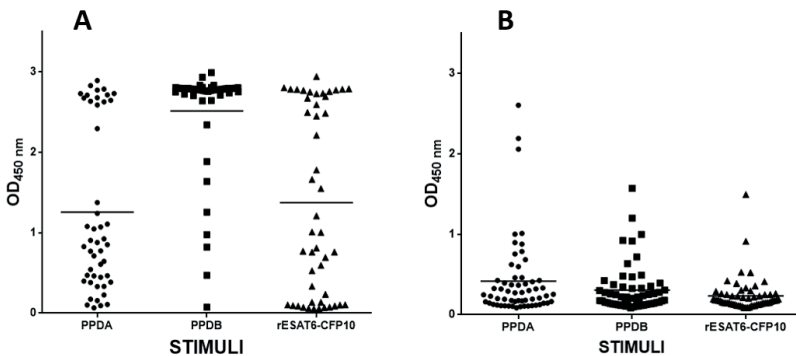


Fig. 3. Medición de la estimulación de IFN- γ en cultivos de sangre de bovino. Se obtuvieron muestras de sangre de ganado de la vena caudal y se estimularon durante 18 h con PPDB, PPDA o ESAT6:CFP10 recombinante de forma independiente. Se midió la producción de IFN- γ bovino por su absorbancia mediante la prueba de ELISA. (A) Muestras de animales de rebaños con una alta prevalencia de infección (>20%), y (B) con una baja prevalencia de infección (<2%) (tomada de Gutiérrez-Ortega et al., 2021).

4 | DISCUSIÓN

La ingeniería de traducción y la bioinformática han permitido acelerar la velocidad a la que se pueden generar nuevas moléculas con fines diagnósticos usando proteínas híbridas multi-epitopo. Entre las proteínas antigénicas más reconocidas para mejorar el diagnóstico

de la TB destacan las proteínas ESAT6 y CFP10, sin embargo, su producción usando cultivos de micobacterias es de alto riesgo, lento y además con muy bajos rendimientos debido a que sólo se producen durante la etapa infecciosa de *M. tuberculosis*.

Mediante las nuevas técnicas genómicas y biotecnológicas innovadoras se ha logrado un significativo progreso en el diseño y desarrollo más eficiente de nuevos antígenos contra la TB debido al conocimiento del genoma completo de *Mtb*. Estas herramientas han demostrado el potencial para identificar nuevos biomarcadores de la infección tuberculosa, acelerando la selección de las mejores mezclas antigénicas con el mayor potencial para la caracterización de la respuesta inmune asociada a la infección del huésped con fines diagnósticos e inmunizantes (Coppola y Ottenhoff, 2018). Algunos de los nuevos reactivos biológicos contemplan proteínas individuales o mezclas de ellas, complejos de proteínas multi-epitopo o fragmentos de proteínas como péptidos antigénicos, los cuales se han analizado mediante las pruebas de diagnóstico de rutina como la prueba intradérmica TST y la prueba complementaria basada en ELISA para la medición del IFN- γ para tratar de aumentar su sensibilidad de la prueba de la TB. En este sentido, se ha llegado a prestar una especial atención en las proteínas ESAT6, CFP10, EspC, MPB70 y MPB83 tanto en pruebas serológicas para detectar anticuerpos específicos o en ensayos de inducción de la respuesta inmune de tipo celular como la prueba ELISA del IFN- γ .

El sistema de expresión de *E. coli* es una herramienta muy utilizada para obtener proteínas heterólogas recombinantes seleccionadas y modificadas para fines de diagnóstico, incluidas las de origen micobacteriano. Las proteínas ESAT6 y CFP10 recombinantes tienden a agregarse debido a su naturaleza hidrofóbica por su alto contenido de estructuras secundarias de alfa hélice, por lo que se ha tratado de optimizar su producción en *E. coli* mediante nuevas plataformas de síntesis artificial. Algunas estrategias biotecnológicas para mejorar la expresión genética en *E. coli* incluyen inserciones de promotores con tediosos pasos de clonación. La ingeniería de traducción y la sobreexpresión de proteínas a escala en *E. coli* se pueden lograr mediante el diseño basado en tecnología genética que puede alterar las secuencias de genes recombinantes mediante la optimización del uso de codones.

En este trabajo, logramos obtener un método molecular de obtención artificial de los dos principales antígenos micobacterianos ESAT6 y CFP10 mediante una sola proteína híbrida usando un algoritmo de optimización de codones de la secuencia genética. Se obtuvo una proteína con buenos rendimientos conservando sus propiedades antigénicas y de diagnóstico favoreciendo su solubilidad, lo que confirma que la generación de secuencias genéticas sintéticas con la optimización de codones, puede ser una herramienta viable y rentable para la obtención de biomarcadores de procesos infecciosos. Los resultados obtenidos confirman que la molécula híbrida ESAT6:CFP10 tiene un fuerte potencial como reactivo biológico de diagnóstico de la TB como lo han propuesto otros grupos de investigación usando las proteínas nativas de forma individual (van Pinxteren et al., 2000).

Además, demostramos en el modelo natural de la infección tuberculosa en animales que la molécula sintética de ESAT6:CFP10 es en estructura y función compatible con el reconocimiento de la respuesta inmune adaptativa de los individuos con una infección activa, como se ha observado en otros estudios en modelos de laboratorio usando moléculas sintéticas a diseño para el rastreo de la TB (Tsolaki et al., 2013), y donde se utilizó a *Mycobacterium smegmatis* como biofábrica con menores rendimientos de la proteína (5 mg/L), muy inferiores a los logrados utilizando la plataforma optimizada en *E. coli*. Otro sistema de expresión recombinante más sofisticado para los antígenos de fusión del complejo *M. tuberculosis* se reportó usando hojas de *Nicotiana* (Saba et al., 2019), sin embargo, el sistema de transformación y manipulación de células vegetales coloca en mucha desventaja estratégica este sistema de producción masiva de biológicos de interés biotecnológico. Por lo tanto, utilizando la plataforma de optimización de codones para cambiar los parámetros que son fundamentales para mejorar la eficiencia de la expresión, traducción y producción de ESAT6:CFP10 en *E. coli*, junto con los bajos costos del método de purificación utilizado en este sistema bacteriano, los rendimientos obtenidos a un costo muy bajo lo hace una elección muy atractiva para aumentar la producción de esta y otras moléculas antigénicas híbridas con fines inmunológicos, lo que representa una opción muy rentable para desarrollar biológicos de próxima generación. Los antígenos de fusión también se han utilizado para generar anticuerpos policlonales multivalentes para detectar a los sospechosos con una infección mediante pruebas serológicas (Dai et al., 2017).

CONCLUSIÓN

La proteína de fusión ESAT6:CFP10 lograda a diseño molecular después de un ajuste para optimizar el uso de codones se obtuvo de forma muy eficiente como un antígeno soluble para ser evaluado como una molécula inmunoestimulante en cultivos de sangre completa de individuos infectados. Los resultados indicaron que la proteína de fusión es una molécula inmunocompetente que podría complementar y potenciar el diagnóstico de las infecciones por el grupo de bacterias del complejo *Mtb* incluyendo los patógenos humanos y bovinos dada la gran similitud de las respuestas inmunes contra la infección tuberculosa en ambos huéspedes. Además, la proteína de fusión ESAT6:CFP10 podría ser muy útil para complementar protocolos de inmunización molecular en esquemas de vacunación de nueva generación, muy probablemente como una molécula subunitaria de refuerzo, abriendo toda una línea de investigación aplicada en el campo biofarmacéutico.

REFERENCIAS

Adesokan, H.K., Akinseye, V.O., Streicher, E.M., Van Helden, P., Warren, R.M., Cadmus, S.I., 2019. Reverse zoonotic tuberculosis transmission from an emerging Uganda I strain between pastoralists and cattle in South-Eastern Nigeria. *BMC Vet. Res.* 15, 437.

Andersson, S.G.E., Sharp, P.M., 1996. Codon usage in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 142, 915–925.

Barrios-Payán, J.A., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdez, M.A., Hernández-Pando, R., 2010. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *Sal. Pub. Mex.* 52, 70–78.

Coppola, M., Ottenhoff, T.H.M., 2018. Genome wide approaches discover novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens as correlates of infection, disease, immunity and targets for vaccination. *Semin. Immunol.* 39, 88–101.

Dai, Z., Liu, Z., Xiu, B., Yang, X., Zhao, P., Zhang, X., Duan, C., Que, H., Zhang, H., Feng, X., 2017. A multiple-antigen detection assay for tuberculosis diagnosis based on broadly reactive polyclonal antibodies. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 20, 360–367.

Davy, A.M., Kildegaard, H.F., Andersen, M.R., 2017. Cell factory engineering. *Cell. Syst.* 4, 262–275.

Devi, K.R., Lee, L.J., Yan, L.T., Syafinaz, A.N., Rosnah, I., Chin, V.K., 2021. Occupational exposure and challenges in tackling *M. bovis* at human-animal interface: a narrative review. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2021, 1–25.

Gutiérrez-Ortega, A., Moreno, D.A., Ferrari, S.A., Espinosa-Andrews, H., Ortiz, E.P., Milián-Suazo, F., Alvarez, A.H., 2021. High-yield production of a major T-cell ESAT6-CFP10 fusion antigen of *M. tuberculosis* complex employing codon-optimized synthetic gene. *Int. J. Biol. Macromol.* 171, 82–88.

Hatfield, G.W., Roth, D.A., Optimizing scaleup yield for protein production: computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering. *Biotechnol. Ann. Rev.* 13, 27–42.

Kock, R., Michel, A.L., Yeboah-Manu, D., Azhar, E.I., Torrelles, J.B., Cadmus, S.I., Brunton, L., Chakaya, J.M., Marais, B., Mboera, L., Rahim, Z., Haider, N., Zumla, A., 2021. Zoonotic Tuberculosis - The changing landscape. *Int. J. Infect. Dis.* S1201-9712(21)00177-6.

Kulshrestha, A., Gupta, A., Verma, N., Sharma, S.K., Tyagi, A.K., Chaudhary, V.K., 2005. Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. *Protein Expr. Purif.* 44, 75–85.

Liu, L., Yang, H., Shin, H.D., Chen, R.R., Li, J., Du, G., et al. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered* 4, 212–223.

Lombard, J.E., Patton, E.A., Gibbons-Burgener, S.N., Klos, R.F., Tans-Kersten, J.L., Carlson, B.W., Keller, S.J., Pritschet, D.J., Rollo, S., Dutcher, T.V., Young, C.A., Hench, W.C., Thacker, T.C., Perea, C., Lehmkühl, A.D., Robbe-Austerman, S., 2021. Human-to-cattle *Mycobacterium tuberculosis* complex transmission in the United States. *Front. Vet. Sci.* 8, 691192.

Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178, 1274–128.

Nieuwkoop, T., Claassens, N.J., van der Oost, J., 2019. Improved protein production and codon optimization analysis in *Escherichia coli* by bicistronic design. *Microb. Biotechnol.* 12, 173–179.

- Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C.G., Valdez-Cruz, N.A., Trujillo-Roldán, M.A., 2019. Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies, *Cell Stress Chaperones* 24, 777–792.
- Rodwell, T.C., Kapasi, A.J., Moore, M., Milian-Suazo, F., Harris, B., Guerrero, L.P., Moser, K., Strathdee, S.A., Garfein, R.S., 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int. J. Infect. Dis.* 3, e129-35.
- Saba, K., Gottschamel, J., Younus, I., Syed, T., Gull, K., Günter Lössl, A., Mirza, B., Tahir Waheed, M., 2019. Chloroplast-based inducible expression of ESAT-6 antigen for development of a plant-based vaccine against tuberculosis. *J. Biotechnol.* 305, 1–10.
- Tsolaki, A.G., Nagy, J., Laiva, S., Kishore, U., Rosenkrands, I., Robertson, B.D., 2013. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B and ESAT-6 expressed as a recombinant fusion protein in *Mycobacterium smegmatis* elicits cell-mediated immune response in a murine vaccination model. *Mol. Immunol.* 54, 278–283.
- van Pinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., Andersen, P., 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 155-160.
- Wahdan, A., Riad, E.M., Enany, S., 2020. Genetic differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cattle and human sources in, Egypt (Suez Canal area). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 73, 101553.