



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* EN *Chlamydomonas reinhardtii***

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Perla Carlos García

La Paz, Baja California Sur, Febrero 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 21 del Mes de enero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Expresión de antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Chlamydomonas reinhardtii*"

Presentada por el alumno:

Perla Carlos García

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



Dr. Carlos E. Angulo Valadez
Director de Tesis

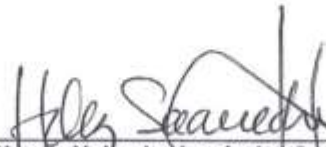
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Gracia A. Gómez Anduro
Co-Tutor



Dra. Virginie Roupie
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial

**Director de Tesis: Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.**

**Co-tutor: Dra. Gracia A. Gómez Anduro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.**

**Co-tutor: PhD. Virginie Roupie
CODA-CERVA: Veterinary and Agrochemical Research Center.**

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos E. Angulo Valadez

Dra. Gracia A. Gómez Anduro

PhD. Virginie Roupie

Jurado de Examen de Grado

Dr. Carlos E. Angulo Valadez

Dra. Gracia A. Gómez Anduro

PhD. Virginie Roupie

Suplente:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Resumen

Paratuberculosis, (Enfermedad de Johne) es una enfermedad intestinal crónica en rumiantes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). La primera generación de vacunas contra MAP, compuesta de bacterias completas (muerta o atenuada) en adyuvante de aceite, confiere solo una protección parcial, decreciendo la carga bacteriana en el intestino y retrasando la progresión de la enfermedad hacia la fase clínica. La nueva generación de vacunas debe ser desarrollada con el objetivo de obtener una mejor protección frente a la infección y de bajo costo. Las microalgas se han empleado como una eficiente biofábrica de vacunas de bajo costo y como una plataforma de administración oral para la salud animal y humana. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de antígenos multiepitópicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Chlamydomonas reinhardtii*. La disponibilidad del genoma MAP K-10 permitió realizar una selección racional de epítomos de MAP1239c con potencial inmunogénico por análisis *in silico*: sin identidad con el hospedero, alta promiscuidad y afinidad a alelos de MHC (humanos, bovinos y de ratón) y una localización subcelular expuesta. Los epítomos del antígeno Ag85B, capaces de inducir la producción de IL-2 e IFN- γ en modelo ratón, fueron seleccionados para el diseño de una vacuna multi-epitopo como control positivo. Los epítomos de MAP1239c fueron correctamente clonados dentro del vector pChlamy_4 y usados para transformar *C. reinhardtii* por el método de biobalística. La expresión de proteínas recombinantes fue determinada por ELISA usando los anticuerpos Anti-Histidina y Anti-CTB. Como conclusión, las vacunas multi-epitopo basadas en los antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fueron diseñadas y producidas en *C. reinhardtii*.

Palabras clave: Paratuberculosis, Vacuna recombinante, *Chlamydomonas reinhardtii*.



Dr. Carlos E. Angulo Valadez
Vo Bo Director de Tesis

Abstract

Paratuberculosis, (Johne's disease) is a chronic intestinal disease in ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The first generation of MAP vaccines, composed of whole mycobacteria (killed or live-attenuated) in oil adjuvant, confer only a partial protection by decreasing the bacterial load in the intestine and delaying the progression of the disease towards clinical phase. New generation of vaccines should be developed with the goal to obtain a better protection from the infection and at low cost. Microalgae have been employed as an efficient low-cost vaccine biofactory and oral delivery platform for animal and human health. Therefore, the objective of this study was to evaluate the expression of multi-epitope antigens from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *Chlamydomonas reinhardtii*. The availability MAP genome K-10 allowed a rational selection of MAP1239c epitopes with immunogenic potential: null identity-host, promiscuity and affinity to MHC alleles (human, mice and bovine) and subcellular localization exposed by *in silico* analysis. Epitopes from the Ag85B antigen, able to induce production of IL-2 and IFN- γ in mouse model, were select for multiepitopic vaccine design as positive control. Epitopes from MAP1239c correctly cloned into pChlamy_4 were use to transform *C. reinhardtii* by biolistic method. The expression of recombinant proteins (RP) were determined for ELISA using Anti-Histidine and Anti-CTB antibodies. As conclusion, Ag85B and MAP1239c derived epitopes were antigenically produced in *C. reinhardtii* microalgae.

Keywords: Paratuberculosis, Recombinant vaccine, *Chlamydomonas reinhardtii*.



Dr. Carlos E. Angulo Valadez
Vo Bo Director de Tesis

Dedicatoria

A mi Dios

A mi hermosa familia:

A mi mayor motivación, Fabiola.

Al amor de mi vida, mi esposo Aarón

A mis padres Manuel y Ángeles.

A mis hermanos

A mis sobrinas

A esas personas que Dios puso en mi camino y fueron la piedra angular que me permitió llegar hasta aquí, a mis maestros.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Biología Molecular de Plantas y Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y fue financiado por los proyectos “Identificación y Evaluación de Vacunas Comestibles en Alfalfa para Prevenir la Paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) de Rumiantes Domésticos de México SEP-CONACYT (No.151818) y “Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia una sola salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema. CONACYT-INFR-2014-01/225924”

Agradecimientos

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 565221 que permitió el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de posgrado. En particular, al personal de posgrado (Tania Núñez, Claudia Olachea, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Horacio Sandoval, Dra. Norma Hernández), que realizan su trabajo con gran desempeño y entusiasmo.

A CONACYT por el financiamiento de esta tesis a través del proyecto SEP-CONACYT (151818) y CONACYT-INF-2014-01/225924

A thanks and recognition special to Dr. Roupie by her constant support in the thesis elaboration. Thanks for your participation in the project and article.

A la Dra. Gracia A. Gómez Anduro que fue un gran apoyo en las bases moleculares. Gracias por compartir su conocimiento a través de sus clases y asesorías, por sus observaciones y comentarios en la mejora del proyecto.

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza y el Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, que fueron pieza clave en el desarrollo del proyecto. Gracias por el espacio brindado y sus enseñanzas; en especial a la M.C. Dania O. Govea Alonso y al Dr. Bernardo Bañuelos Hernández.

A la Dra. Martha Reyes Becerril del Laboratorio de Patogénesis Microbiana y al M.C. Julio A. Hernández González del Laboratorio Biología Molecular de Plantas del CIBNOR, por el apoyo técnico brindado durante la realización del presente trabajo.

Al M.C. Mario Rojas y la M.C. Beatriz Meza, que se volvieron grandes amigos y un gran apoyo durante toda trayectoria del posgrado. Gracias por los consejos y asesorías, desde la redacción del ante-proyecto de tesis hasta la obtención de resultados y el producto final. Sigamos compartiendo su conocimiento y ayudando a mejorar los proyectos.

Al Dr. Carlos E. Angulo Valadez por darme la oportunidad de realizar un posgrado bajo su tutoría, por el apoyo y la confianza para el diseño de las vacunas. Gracias por motivarnos a realizar trabajos de calidad y a compartir resultados con la comunidad científica. Gracias por creer que tenemos la misma capacidad todos sus estudiantes, desde licenciatura hasta doctorado. Gracias por la satisfacción de un artículo publicado bajo su dirección y el asesoramiento de mi comité tutorial. Gracias por apoyarme en finalizar el presente proyecto con la identificación de líneas transgénicas. En fin, gracias por su paciencia☺.

A mi Dios que en Él todo lo puedo.

A mi familia (Aarón y Fabiola) que me siguen enseñando que en casa se encuentra lo mejor.

A mis padres (Manuel y Ángeles) que me enseñaron el valor de la familia y que con sacrificio, disciplina y apoyo familiar no hay imposible en las metas compartidas.

Mis hermanos (Manuel, Rocío y Carmen) y sobrinas (Melina, Romina y Valentina) que siempre son un gran apoyo y respaldan mis metas.

A mi familia en general que junto a mi hicieron un sacrificio para cumplir este objetivo.

Contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Contenido.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
1.INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Selección de epítomos.....	4
2.2 Diseño de vacuna multi-epítomo.....	5
2.3 Sistema de expresión.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4.1 PREGUNTA CIENTÍFICA.....	11
4.2 HIPÓTESIS.....	11
5. OBJETIVOS.....	12
5.1 Objetivo General.....	12
5.2 Objetivos Particulares.....	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1. Diseño de vacunas multi-epítomo basadas en Ag85B y MAP1239c.....	13
6.1.1 Diseño de vacunas multi-epítomo.....	13
6.1.2 Construcciones plasmídicas.....	15
6.2 Determinación de la producción de una vacuna prototipo multi-epítomo de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en <i>C. reinhardtii</i>	16
6.2.1 Mantenimiento y transformación de <i>C. reinhardtii</i>	16
6.2.2 Selección de transformantes.....	16
6.2.3 Mantenimiento de colonias de <i>Chlamydomonas</i> y extracción de proteínas.....	17
6.2.4 Ensayo de Bradford (Bradford, 1996).....	17
6.2.5 Expresión de proteínas recombinantes.....	18
7. RESULTADOS.....	19
7.1. Diseño de vacunas multi-epítomo basadas en Ag85B y MAP1239c.....	19
7.1.1 Diseño de vacunas basado en epítomos.....	19

7.1.2 Construcciones plasmidicas	21
7.2 Determinación de la producción funcional de una vacuna prototipo multi-epitopo de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en <i>C. reinhardtii</i>	24
7.2.1 Mantenimiento y transformación de <i>C. reinhardtii</i>	24
7.2.2 Selección de transformantes.....	25
7.2.3 Mantenimiento de colonias de <i>C. reinhardtii</i> y extracción de proteínas.....	26
7.2.4 Ensayo de Bradford (Bradford, 1996).....	27
7.2.5 Expresión de proteínas recombinantes.....	30
8. DISCUSIÓN	33
8.1. Diseño de vacunas multi-epitopo basadas en Ag85B y MAP1239c	33
8.2 Determinación de la producción de una vacuna prototipo multi-epitopo de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en <i>C. reinhardtii</i>	36
9. CONCLUSION	39
10. RECOMENDACIONES	39
11. LITERATURA CITADA.....	40

Lista de figuras

Figura 1	Mapa del vector pChlamy_4.	14
Figura 2	Construcciones de vacunas recombinantes fusionadas y no fusionadas	15
Figura 3	Antígenos Multi-epítipo	21
Figura 4	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) de las bandas purificadas del vector y genes digeridos	23
Figura 5	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para las colonias Bam	23
Figura 6	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para la construcción LTB-ME-39c-Eco	23
Figura 7	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para la construcción LTB-ME-85B-Eco	24
Figura 8	Colonias de <i>C. reinhardtii</i> transformadas con la construcción LTB-ME-39c-Bam	24
Figura 9	Colonias de <i>C. reinhardtii</i> transformadas con la construcción LTB-ME-85B-Bam.	25
Figura 10	Colonias de <i>C. reinhardtii</i> transformadas con ambas construcciones	25
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa del análisis de PCR a colonias transformadas con construcción LTB-ME-39c-Bam.	26
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa del análisis de PCR a colonias transformadas con construcción LTB-ME-85B-Bam	27
Figura 13	Curva estándar para cuantificación de PTS por Bradford usando concentraciones de BSA.	28
Figura 14	Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-39c-Bam en <i>C. reinhardtii</i> utilizando anti-CTB.	31
Figura 15	Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-85B-Bam en <i>C. reinhardtii</i> utilizando anti-CTB.	31
Figura 16	Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-39c-Bam en <i>C. reinhardtii</i> utilizando anti-His.	32
Figura 17	Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-85B-Bam en <i>C. reinhardtii</i> utilizando anti-His	32

Lista de tablas

Tabla I	Secuencia nucleotídica de los antígenos multi-epítipo optimizados sobre el uso de codón preferencial en <i>C. reinhardtii</i>	20
Tabla II	Medidas de absorbancia para la construcción de curva estándar por Bradford.	28
Tabla III	Cuantificación de proteína total soluble de colonias LTB-ME-39c-Bam por Bradford	29
Tabla IV	Cuantificación de proteína total soluble para clonas LTB-ME-85B-Bam por Bradford	30

1. INTRODUCCIÓN

La Paratuberculosis (enfermedad de Johne) es una enfermedad crónica en rumiantes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Pillars *et al.*, 2011). La enfermedad se desarrolla en forma subclínica y clínica. La etapa subclínica puede durar varios años y los animales infectados secretan micobacterias en las heces (Bannantine *et al.*, 2008); además, los bovinos infectados no muestran evidencia de la infección durante las primeras etapas (Whitlock y Buergelt, 1996) representando un alto riesgo de propagación (Whittington *et al.*, 2012). Los signos clínicos típicos en la última etapa son la pérdida de peso y diarrea progresiva, que conduce a la caquexia y la muerte (Fiorentino *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2007). Las pérdidas económicas causadas por MAP afectan principalmente a la industria láctea mediante la reducción de la producción de leche y fertilidad, el aumento en el sacrificio prematuro e involuntario, la susceptibilidad a otras enfermedades y la mortalidad (Dorshorst *et al.*, 2006). Por otra parte, el control de esta enfermedad es también un gasto a través del mantenimiento de la higiene en granja y el diagnóstico oportuno (Chi *et al.*, 2002).

La primera generación de vacunas de MAP, compuesta de la micobacteria completa (muerta o viva-atenuada) en adyuvante de aceite, confieren solamente una protección parcial por la disminución de la carga bacteriana en el intestino y el retraso de la progresión de la enfermedad hacia la fase clínica (Huygen *et al.*, 2010). Los principales inconvenientes de estas vacunas son su interferencia en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina (Stringer *et al.*, 2011). La evolución de estrategias en el diseño de vacunas progresa

desde organismos completos a vacunas de subunidad, dirigiéndose hacia el concepto minimalista de una vacuna. La selección de la vacuna centrada en un conjunto limitado de antígenos es relevante para evitar una respuesta inmune perjudicial dentro del hospedero (Dudek *et al.*, 2010). La principal limitación con vacunas es su dependencia costosa del sistema de cadena de frío y el riesgo de reacciones adversas tales como las reacciones inherentes a la inoculación. Hay una necesidad urgente de buscar vacunas fáciles de administrar, almacenar, transportar, rentables y que posean un sistema de entrega eficiente (Kumar *et al.*, 2013).

El conocimiento experimental generado en las interacciones proteína/péptido es el fundamento en el desarrollo de métodos de diseño computacional para predecir en funciones *in vivo*. Se han propuesto estos conceptos para identificar/predecir regiones antigénicas mínimas (epítomos) responsables de la reactividad inmune en el tamizaje de antígenos proteicos candidatos (Gori *et al.*, 2013). La selección de epítomos se basa en algunas propiedades como la cobertura de antígeno, la cobertura de alelo del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), inmunogenicidad y probabilidad de ser producido durante el procesamiento de antígenos (Schubert *et al.*, 2013). Por lo tanto, los enfoques *in silico* se han desarrollado para ayudar a la selección epítomos. Actualmente, la inmunoinformática se considera una herramienta en la investigación inmunológica, que permite acelerar la selección racional de los antígenos candidatos (Seib *et al.*, 2012; Tong y Ren, 2009).

Los sistemas de expresión a base de plantas han emergido hace 25 años como una plataforma para la producción de proteínas recombinantes, específicamente las proteínas terapéuticas, aprovechando los altos rendimientos de biomasa de cultivo de plantas con potencial de creación de productos biológicos comestibles para aplicaciones tales como la vacunación (Laursen *et al.*, 2013). Las vacunas orales producidas en plantas ofrecen varias ventajas como sistema de administración, tales como potenciar la respuesta inmune local y sistémica, resistencia a enzimas intestinales, producción de bajo costo, seguras y fáciles de escalar (Azizi *et al.*, 2010; Devriendt *et al.*, 2012). Además, las microalgas han emergido más recientemente como una nueva biofábrica de vacunas y plataforma de entrega. Las microalgas ofrecen grandes perspectivas debido a sus tasas de crecimiento relativamente rápidos, no hospedan patógenos humanos, es un sistema eucariota de expresión, el tiempo de respuesta a la transformación es relativamente rápido, es de fácil contención y escalabilidad, dado que su cultivo puede establecerse a bajo costo en medios sencillos (Hempel *et al.*, 2011; Lauersen *et al.*, 2013). En la actualidad, la producción de proteínas terapéuticas en microalgas para su administración oral puede emplearse usando polvo liofilizado de algas con poca o ninguna purificación (Mayfield *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Selección de epítomos

Un análisis previo *in silico*, utilizando herramientas inmunoinformática, permitió identificar péptidos con potencial inmunogénico (Carlos *et al.*, 2015). 110 secuencias de proteínas fueron analizadas por promiscuidad y afinidad hacia alelos del MHC de humanos, ratones y bovinos; también se predijo la localización sub-celular y la posible identidad con proteínas del hospedero ratón y bovino. A partir de este análisis, la mejor proteína de MAP predicha, MAP1239c, fue seleccionada para el diseño de una vacuna multi-epítomo. Junto a ella, la proteína de MAP MAP1609 (Ag85B) fue seleccionada como control positivo, ya que induce una fuerte respuesta inmune y tiene un efecto protector en ratones ante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

La proteína MAP1239c se clasifica como proteína putativa MmpL4 que es necesaria para mantener la virulencia completa de *M. tuberculosis* en ratones infectados (Domenech *et al.*, 2005). Muchos genes de las proteínas grandes de membrana de micobacterias (MmpL) están asociados con la biosíntesis de ácidos micólicos de la pared celular (Varela *et al.*, 2012). Zhu *et al.* (2008) encontraron que MAP1239c (MmpL4) y otras proteínas de membrana (genes MmpL) fueron sobre-reguladas en los macrófagos de bovinos infectados con MAP, por lo tanto, se encuentra involucrada en la patogénesis y puede considerarse como una vacuna candidata para el ganado.

El antígeno 85B, una micolil transferasa, se ha demostrado como vacuna candidata prometedora para patógenos como *M. tuberculosis* y MAP. Rosseels *et al.* (2006) demostraron que los antígenos 85A y 85B provocan una respuesta rápida y fuerte de las

células T en ratones y ganado vacuno experimentalmente infectados con MAP. Además, los miembros del complejo Ag85 son altamente conservados entre las especies de micobacterias, e inducen respuestas inmunes de tipo Th1 que son importantes para el control de infecciones micobacterianas (Huygen *et al.*, 2010). Por lo tanto, el Ag85B puede ser considerado como una referencia para comparar un nuevo antígeno candidato a vacuna.

2.2 Diseño de vacuna multi-epítopo

Existen diversas estrategias utilizadas en el diseño de vacunas multi-epítopo en las que se incluyen, además de la selección de epítomos, el uso de enlazadores para mantener el procesamiento independiente de epítomos, un péptido señal para dirigir la producción del antígeno a una localización sub-celular específica y el uso de un adyuvante para potenciar la respuesta inmune especialmente por la administración vía mucosas.

Por lo tanto, en este estudio el diseño de vacunas contra MAP incluyó el enlazador di-Lisina para procesamiento y presentación independiente de epítomos de MAP; además del adyuvante de la mucosa subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), el péptido señal (BIP1) proveniente de una chaperona localizada en el retículo endoplasmático de la super familia de la proteína de shock térmico HSP70 y la señal de retención del retículo endoplasmático His-Asp-Glu-Leu (HDEL), ambos específicos de *C. reinhardtii*.

La razón principal para utilizar las mucosas como vía de administración de vacunas es que la mayoría de las infecciones afectan o inician en la superficie de mucosas. Sin embargo, la mayoría de las vacunas requieren el uso de un adyuvante fuerte para inducir respuesta

inmune cuando se administra por vía mucosas. En este contexto, la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) es un adyuvante de mucosa extremadamente activo. Cuando un set consenso de epítomos de virus de la influenza A (IAVE) fue genéticamente fusionado a LTB, y se evaluó en el modelo de cerdo, se demostró respuesta inmune humoral en el suero y en secreciones de la mucosa; además de una inmunidad celular específica que se evidenció por la sobre-expresión de Interleucina 8 (IL-8), IL-1 β y IL-4 en células mononucleares de sangre periférica de cerdos vacunados. Adicionalmente, los cerdos inmunizados con la vacuna LTB-IAVE mostraron una mejor protección ante un desafío patogénico (Sun *et al.*, 2013).

El concepto de la fusión LTB-antígeno ya se probó en el desarrollo de una vacuna experimental contra la tuberculosis. La vacuna LTB-ESAT-6 fue producida en *Arabidopsis thaliana* y se usó para inmunizar ratones por vía oral. La vacuna indujo una respuesta inmune específica al antígeno ESAT-6 en células CD4 + y aumentó la producción de IFN- γ , lo que indica una respuesta Th1. Además, se observó una respuesta Th2 modulada por la producción de IL-10 por células CD4 + en las placas de Peyer. ESAT-6 es una proteína importante inductora de IFN- γ en el modelo murino infectado por tuberculosis. ESAT-6 fusionado a LTB puede haber cambiado la forma en que el antígeno ESAT-6 fue presentado y detectado por el sistema inmune de la mucosa (Rigano *et al.*, 2006).

El retículo endoplásmico (RE) posee múltiples funciones que incluyen la translocación y la modificación de proteínas. Un péptido señal dirige la quimera fusionada al RE donde se llevará a cabo conformación correcta de la proteína. Además, la señal de retención permite que la quimera sea mantenida en el RE para evitar que sea secretada. Rasala *et al.* (2014)

diseñaron cinco vectores de transformación para dirigir la proteína recombinante (mCherry) a una localización sub-celular específica en *C. reinhardtii*. Los vectores pBR30 y pBR31 dirigen la proteína mCherry al retículo endoplásmico usando los péptidos señales BIP1 (Pbr30) y ARS1 (pBR31), y la señal de retención en el retículo HDEL. Las células transformadas con estos vectores muestran la localización de la proteína mCherry en el retículo usando microscopía de fluorescencia de células vivas, observándose una estructura en forma de red bajo la membrana plasmática (reminiscencia del retículo cortical que se ha caracterizado en otros eucariotas), además de la proteína mCherry localizada en una estructura que es contigua con la envoltura nuclear (observado en planos z enfocada a través del medio de las células). El retículo es un orgánulo que forma una extensa red interconectada de túbulos y apilamientos aplanados ubicados en todo el citoplasma y se continúa con la envoltura nuclear. Con base en el patrón de localización característica, tanto ARS1-mCherry-HDEL y bip1-mCherry-HDEL dirigieron exitosamente la proteína mCherry al retículo de *C. reinhardtii*.

La independencia de los epítomos es también un factor importante en el diseño de una vacuna multi-epítomo ya que promueve el procesamiento adecuado. La inclusión de la secuencia enlazadora proporciona una respuesta correcta y evita el procesamiento inmune contra cualquier nuevo epítomo formado debido a la fusión de péptidos o con el enlazador. En este caso, el enlazador di-Lisina (KK) se ha utiliza constantemente para separar epítomos de células T. Guo *et al.* (2014) diseñaron una vacuna a base de epítomos (CTB-UE) contra la infección por *Helicobacter pylori*. La vacuna CTB-UE está conformada por un adyuvante de mucosa (CTB- la subunidad B de toxina del cólera) y un péptido de múltiples

epítopos (UE) que contiene copias en tándem de epítopos de células B y Th, seleccionados de las subunidades A y B de ureasa de *H. pylori* (UE). La secuencia DPRVPSS se usó como un espaciador en el sitio de ligamiento entre CTB y UE para disminuir la interacción entre ellos. En cambio, los enlazadores (KK y GS) se usaron para conservar la competencia inmunológica de cada epítipo Th o B y evitar la generación de nuevos epítopos en los sitios de enlace entre epítopos. El enlazador KK flanquea los epítopos de células Th mientras que el enlazador GS es usado entre los epítopos de células B. La función retenida de los epítopos de células Th se demostró con una proliferación significativa de los linfocitos del bazo estimulados con péptidos sintéticos de cada epítipo Th en ratones inmunizados con CTB-UE.

En otro estudio, dos vacunas multi-epítipo diseñadas contra el virus de la hepatitis C (VHC) consistían en múltiples epítopos de las proteínas VHC NS5A, NS4B y proteínas básicas flanqueadas con enlazador di-Lisina (KK). De esta manera se asegura el procesamiento y presentación adecuada: (Vacuna 1) VAL-44: NS5A₍₁₉₉₁₋₁₉₉₄₎-KK-epítipoTh-KK-NS4B₍₁₇₉₃₋₁₈₀₁₎; (Vacuna 2) VL-20: NS5A₍₁₉₉₁₋₉₉₄₎-KK-NS4B₍₁₇₉₃₋₁₈₀₁₎. Se observó la producción de IFN- γ inducida en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes infectados por VHC expuesto a los péptidos sintéticos VAL-44 y VL-20. Ambos péptidos indujeron una respuesta inmune celular sin embargo, VAL-44 provocó una mayor actividad CTL en los esplenocitos, la producción de células T CD4 + y T CD8 + y la secreción de IFN- γ e IL-2, en comparación con VL-20 (Huang *et al.*, 2013).

Del mismo modo, Shresta *et al.* (2014) probaron la capacidad de tres vacunas multi-epítopo para la inhibición de la fertilidad: TT-KK-ZP3-GGG-Iz (~ 32 kDa), TT-KK.ZP3 (~ 22 kDa) y bRNase-KK -iz (~ 11kDa), que comprenden un epítopo promiscuo de células T del toxoide tetánico (TT), el enlazador di-Lisina (KK), un fragmento de glicoproteína-3 de zona pelúcida de perro (ZP3), el espaciador tri-glicina (GGG), un fragmento de Izumo de perro (Iz) y un epítopo promiscuo de células T de ARNasa bovina (bRNase). Los anticuerpos producidos contra el TT-KK-ZP3-GGG-Iz y TT-KK.ZP3 reconocieron la zona pelúcida de ratón y perro; además, anticuerpos producidos contra TT-KK-ZP3-GGG-Iz y bRNase-KK-Iz reaccionaron contra el acromosoma de espermatozoides (Iz) en ratón y perro. La inmunización de ratones con la vacuna anterior condujo a una reducción significativa de la fertilidad *in vitro*. Los autores argumentan que el enlazador KK proporciona un sitio de escisión para la enzima catepsina proteasomal, lo que ayuda en el procesamiento adecuado de epítomos en la respuesta inmune de tipo MHC II, y evita la respuesta frente a cualquier nuevo epítopo formado debido a la fusión de péptidos con el enlazador.

2.3 Sistema de expresión

La producción de proteínas terapéuticas en las microalgas es una fuente potencial para la administración oral como un polvo liofilizado de algas con poca o ninguna purificación (Mayfield *et al.*, 2007). Además, las microalgas transgénicas son adecuadas para crecer en biorreactores, reduciendo el riesgo de contaminación del sistema de producción y escape del transgen al medio ambiente (Gong *et al.*, 2011). La microalga *C. reinhardtii* es una importante plataforma para expresión de proteínas recombinantes, más de 20 proteínas

terapéuticamente importantes se han expresado con éxito principalmente en esta microalga (Specht *et al.*, 2010).

Gregory *et al.* (2012) produjeron una vacuna potencial contra la malaria en esta microalga. La producción de proteínas de la superficie, Pfs25 y Pfs28, en *C. reinhardtii* son similares a la estructura de la proteína nativa. Los anticuerpos Anti-Pfs25 y Anti-Pfs28 interrumpen el desarrollo sexual de los parásitos en el intestino medio del mosquito, evitando así la transmisión de la malaria de un hospedero humano. Posteriormente, la proteína Pfs25 se fusionó a CTB y se produjo en *C. reinhardtii* para estudiarla como una vacuna oral. Los ratones vacunados con la alga transformada liofilizada, produjeron anticuerpos IgG específicos para CTB en el suero y secretan anticuerpos IgA específicos para CTB y Pfs25 (Gregory *et al.*, 2013).

Otro ejemplo de vacunas orales expresada en *C. reinhardtii* es la vacuna CTB-D2 que indujo una respuesta inmune específica en mucosa y sistémica en los ratones vacunados. La vacuna producida en el alga fue estable durante más de 1,5 años a temperatura ambiente; además, la producción de vacunas se escaló a 1 y 10 L (Dreesen *et al.*, 2010).

Entre los productos expresados en *C. reinhardtii* se incluye una vacuna micobacteriana del antígeno de células T inmunodominante 10 kDa (expresada por el gen *esxH*). Los eventos de transformación se confirmaron mediante amplificación por PCR usando cebadores específicos para el gen de resistencia a Higromicina *hpt*, el gen reportero β -glucuronidasa (GUS) y el gen del antígeno *esxH*. Además, la expresión del gen *esxH* fue confirmada por RT-PCR (Pratheesh y Kurup, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Cinco epítomos de la proteína MAP1239c fueron seleccionados *in silico* por características inmunogénicas predichas similares a epítomos inductores de IFN- γ e IL-2 del antígeno 85B, esenciales para combatir las infecciones por micobacterias. Además, se especula que los componentes de la pared celular de *C. reinhardtii* pueden poseer compuestos adyuvantes y que tienen capacidad de inducir una respuesta inmune citotóxica. Por lo tanto, la microalga *C. reinhardtii* puede ser implementada como plataforma de producción de vacunas multi-epítomo funcionales, además de reducir los costos de producción y almacenamiento.

4.1 PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Puede la microalga *C. reinhardtii* expresar correctamente una vacuna basada en antígenos de MAP?

4.2 HIPÓTESIS

Si *C. reinhardtii* es una plataforma eficiente para producir vacunas recombinantes, entonces, el diseño y la producción de una vacuna multi-epítomo basada en antígenos de MAP será posible en esta microalga.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de antígenos multiepitópicos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en *C. reinhardtii*.

5.2 Objetivos Particulares

- Diseñar vacunas multi-epítipo basadas en el Ag85B y la proteína MAP1239c de MAP.
- Determinar la producción funcional de una vacuna prototipo multi-epítipo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en *C. reinhardtii*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño de vacunas multi-epítipo basadas en Ag85B y MAP1239c

6.1.1 Diseño de vacunas multi-epítipo

Entre promisorios y nuevos antígenos, se seleccionaron dos antígenos para poner a prueba nuestra hipótesis. Se seleccionó la proteína 39c (MAP1239c) mediante análisis *in silico* (Carlos *et al.*, 2015). La proteína MAP1609c/Ag85B pertenece a la familia del complejo Ag85, uno de los más prometedores antígenos candidatos para vacunas micobacterianas; por lo tanto el Ag85B fue seleccionado como control positivo. La disponibilidad del genoma MAP k-10 permitió realizar una selección racional de epítomos de la proteína MAP1239c con potencial inmunogénico predicho mediante análisis *in silico*: ninguna similitud con proteínas del hospedero, alta promiscuidad y afinidad hacia los alelos de MHC (humanos, ratones y bovino) y una localización subcelular expuesta. Se seleccionaron fragmentos inmunogénicos con epítomos predichos y traslapados para MHC I (de ratón y bovino) y MHC II (de ratón) en el diseño de la vacuna multiepitópica 39c (ME-39c). Los epítomos de la proteína 85B de MAP seleccionados *in silico* y traslapados con fragmentos inmunogénicos del complejo Ag85 (55-100, 180-198, 240-279) (inductores de IFN- γ e IL-2 y similar entre especies de micobacterias) fueron utilizados para el diseño de la vacuna multi-epítipo 85B (ME-85B) (D'Souza *et al.*, 2003; Huygen *et al.*, 2014; Rosseels *et al.*, 2006). Los epítomos fueron flanqueados por el enlazador di-lisina (KK) para evitar la formación de nuevos epítomos. El enlazador fue seleccionado por revisión de literatura (Huang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2014). El diseño de la vacuna

recombinante comprende el péptido señal del retículo endoplásmico (BIP1), la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) como adyuvante, un fragmento de múltiples epítomos (39c o 85B) y la señal de retención en el retículo endoplásmico (HDEL) (Rigano *et al.*, 2006; Rasala *et al.*, 2014). Estas construcciones fueron nombradas LTB-ME-39c y LTB-ME-85B, respectivamente. Utilizando la tabla de uso de codones preferencial de *C. reinhardtii*, se optimizó la secuencia nucleotídica de cada gen. Los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* se incluyeron en el extremo 5' y el sitio *PstI* en el extremo 3' para facilitar la inclusión en el vector pChlamy_4 (Invitrogen, Fig. 1). Los genes *ltb-me-39c* y *ltb-me-85B* fueron sintetizando por GenScript, Inc. (Piscataway, NJ; EE.UU.). La digestión de los genes con las enzimas *BamHI* y *PstI* se usó para fusionar la vacuna recombinante con las etiquetas de poli-histidina y el epítipo V5 (6x His-V5-VR) dentro del vector; mientras que, el gen digerido con *EcoRI* y *PstI* permitió la producción de las proteínas no fusionadas con las etiquetas (Fig. 2).

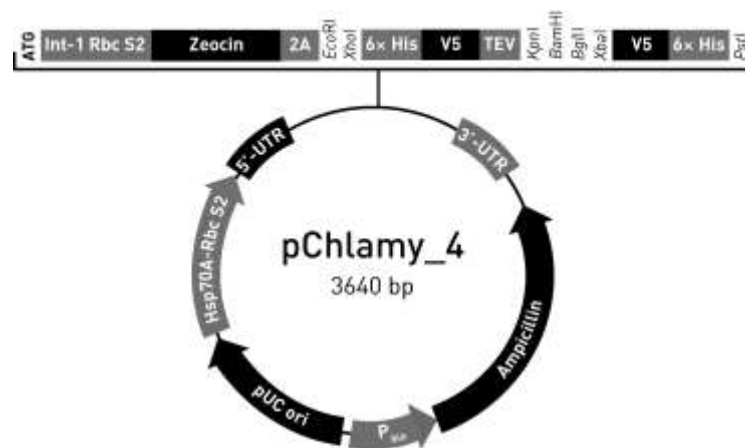


Figura 1. Mapa del vector pChlamy_4.

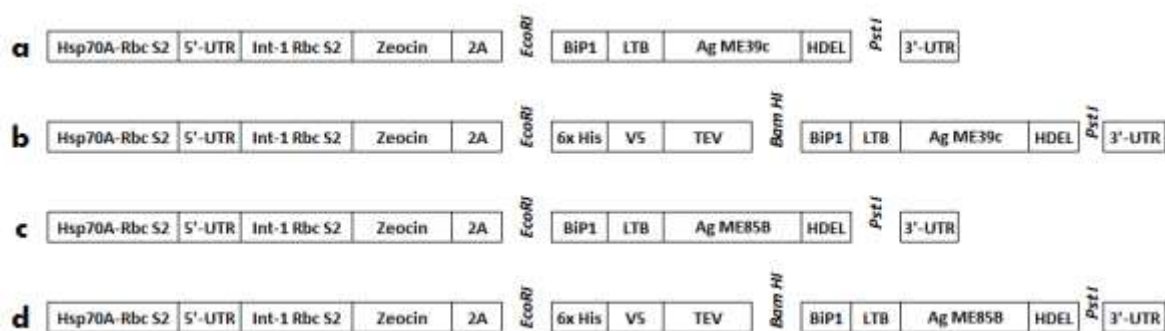


Figura 2. Construcciones de vacunas recombinantes fusionadas y no fusionadas con las etiquetas 6xHis y V5. *C. reinhardtii* fue transformada con las construcciones plasmídicas para la producción de las vacunas múlti-epítipo recombinantes (LTB-ME-39c y LTB-ME-85B). (a, c) Las proteínas no fusionadas con las etiquetas contiene secuencia nucleotídica con codones optimizados para LTB-ME-39c y LTB-ME-85B río-abajo del gen 2A. Este gen interviene en una reacción auto-división, asociado a la expresión independiente del transgén. (b, d) la proteína fusionadas contiene la secuencia nucleotídica optimizada para un gen (*ltb-me-39c* o *ltb-me-85B*) ligadas al vector en un marco de lectura abierto que se encuentra río-bajo del sitio de proteasa TEV (Tobacco Etch Virus, del inglés) y el epítipo V5.

6.1.2 Construcciones plasmídicas

Los genes fueron clonados en el vector pUC57 y se digirieron utilizando las enzimas que flanquean los genes *ltb-me-39c* y *ltb-me-85b*. Posteriormente, los genes digeridos fueron ligados al vector pChlamy_4 y se transfirieron a *E. coli* TOP 10 químicamente competentes a través del método de congelación-descongelación. *E. coli* fue crecida en medio LB que contenía ampicilina (100µg/ml) y se incubó a 37 °C en agitación (190 rpm). 50-200µl de cada cultivo transformado fue inoculado sobre placas con medio selectivo, LB-ampicilina [100µg/ml], e incubado durante la noche a 37 °C. Las colonias se recuperaron para aislar el plásmido. Los plásmidos se analizaron por digestión enzimática para confirmar la presencia del inserto. Primero, se digirieron los sitios de restricción que flanquean los insertos (*EcoRI* o *BamHI* y *PstI*). En una segunda digestión, se utilizó la enzima *XmnI* que genera un corte sobre el inserto y otro sobre el vector, liberando una banda de 1200 pb para el gen *ltb-me-*

39c y una banda de 1400 pb para el gen *ltb-me-85B*. El análisis de digestión se observó en un gel de agarosa al 1.5% diluido en buffer TAE (Tris-Acetato EDTA) teñido con Bromuro de Etidio (TAE-BrEt). Además, se confirmó la presencia de los genes dentro del plásmido por secuenciación, antes de transformar la microalga *C. reinhardtii*.

6.2 Determinación de la producción de una vacuna prototipo multi-epítipo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en *C. reinhardtii*.

6.2.1 Mantenimiento y transformación de *C. reinhardtii*

La microalga *C. reinhardtii* CC-137c (mt+) se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio Tris-acetato-fosfato (TAP). La biomasa fue cosechada por centrifugación a 800 g durante 5 min y se cultivó sobre placas de medio TAP-agar. La transformación de *Chlamydomonas* se realizó mediante biobalística cubriendo las partículas de oro con un diámetro de 0.6µm y bombardeando a una presión de 900 PSI. Los cultivos de microalgas bombardeadas se mantuvieron bajo luz fluorescente en ciclos de 16h luz/8h oscuridad a 25 ° C. Después de tres días, los cultivos se pasaron a medio selectivo, TAP-agar-zeocina (5µg/ml) y, después de 15 días, las colonias resistentes a zeocina se cultivaron en medio TAP líquido, y se usaron para el análisis molecular.

6.2.2 Selección de transformantes

La inclusión del vector en la microalga fue determinada por PCR. Las colonias que crecieron pronunciadamente en medio sólido selectivo (TAP-agar-zeocina) y en medio líquido (TAP) fueron seleccionadas para extracción de ADN y amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para cada gen. La amplificación se observó en un gel de agarosa al 1.5% diluido en buffer TAE teñido con SYBR Safe (TAE-SYBER Safe).

6.2.3 Mantenimiento de colonias de *Chlamydomonas* y extracción de proteínas

Las colonias de *C. reinhardtii* se mantuvieron individualmente en medio selectivo, TAP-agar-Zeocina (5µg/ml), en ciclos de 16h luz/8h oscuridad a 28 ° C. Después de 40 días, las colonias que crecieron en medio selectivo se cultivaron en tubos Falcon de 50 ml con 15 ml de medio líquido TAP durante 15 días. La extracción de proteínas se llevó a cabo por sonicación (24% de amplificaciones, 4-4 minutos), usando 25 mg de cultivo fresco de *C. reinhardtii* transformada y silvestre (WT) en 500µl de buffer. Se utilizaron 2 buffers de extracción para seleccionar el mejor para análisis posteriores: el buffer 1 contenía 750mM Tris-HCl pH 8,8, 10% sacarosa y 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); mientras, que el buffer 2 contenía 200mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 10mM EDTA y 1mM de PMSF. Después de sonicar, las muestras fueron centrifugadas a 800 g durante 5 min a 4°C. Al final de pruebas preliminares, el sobrenadante obtenido con el buffer 1 se utilizó para ensayo de ELISA; debido a que el buffer 1 interfirió con el reactivo de Bradford, se utilizó el buffer 2 para obtener una aproximación de la concentración de proteína.

6.2.4 Ensayo de Bradford (Bradford, 1996)

La concentración de proteína total soluble (PTS) fue estimada por el ensayo de Bradford en las líneas transformadas y la línea silvestre (WT, por sus siglas en inglés). La curva estándar fue realizada con diferentes concentraciones [0, 10, 20, 40 y 80µg/ml] de la proteína albúmina de suero bovino (BSA; Life Sciences Sera Care inc.) diluida en el buffer de extracción 2. Brevemente, 160µl de cada dilución se depositó en el pozo de una microplaca (96 pocillos) por triplicado. Después se añadieron 40µl de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) y se mezcló. Después de 15 min, la absorbancia se midió a 495nm.

Finalmente, después de conseguir una curva estándar con $R^2 = 0.9997$, se midieron las muestras usando el mismo protocolo.

6.2.5 Expresión de proteínas recombinantes

Se realizó un ensayo de ELISA para identificar la expresión de las vacunas recombinantes LTB-ME-39c y LTB-ME-85B. Una microplaca de 96 pocillos se recubrió con 100µl de buffer de carbonatos (pH 9.6) en cada pozo. Se tomaron 50 µl del extracto proteico de WT y las líneas transformadas. Subsecuentemente, se realizaron hasta 6 diluciones seriadas de cada extracto. Además, se realizaron dos curvas estándar. La primera usando la proteína purificada del antígeno 6x-histidina en una concentración conocida (0.1 a 50 µg/ml). La segunda curva se realizó con el péptido de la subunidad B de la toxina del cólera (0.625 a 10 µg/ml) y el anticuerpo anti-CT de ratones inmunizados, que tiene reacción cruzada con LTB. Esto se utilizó para la cuantificación de la etiqueta de histidina y LTB de las vacunas recombinantes expresada en *C. reinhardtii*.

La placa recubierta con los antígenos se incubó a 4°C toda la noche. Los pozos se lavaron con PBS-T (0.001 M fosfatos, 0.15M cloruro de sodio, pH7.2 y 0.5% Tween 20), y posteriormente se bloquearon con 200µl de una solución de leche descremada al 5% y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente. Después, los pozos se lavaron con PBS-T y luego se recubrieron con 100µl del anticuerpo anti-His diluido en PBS 1:1000. Se incubó la placa a 37°C por 1.5 horas. Se realizó el tercer lavado con PBS-T y se adicionó el anticuerpo Anti-IgG de ratón ligado a una peroxidasa (horseradishperoxidase, HRP; SIGMA, A9044-2ml) diluido 1:1000 en PBS (1.5 horas de incubación a 37°C). La presencia de las proteínas recombinantes se detectaron usando la solución de sustrato de

tetrametilbenzidina (TMB; Sigma-Aldrich) a una absorbancia de 450nm. Además, se realizó un segundo ELISA usando el anticuerpo anti-CT de ratones inmunizados como anticuerpo primario (1:1000) tal como se describió anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1. Diseño de vacunas multi-epítipo basadas en Ag85B y MAP1239c

7.1.1 Diseño de vacunas basado en epítipos.

Como muestran la fig. 3-a, se seleccionaron tres fragmentos inmunogénicos de la proteína Ag85B de *M. tuberculosis*, debido a que estas secuencias se traslapan con epítipos MHC predichos a la proteína Ag85B de MAP. Estos fragmentos inmunogénicos de 85B de MAP son regiones conservadas en el complejo Ag85 (55-100, 180-198, 240-279) que inducen la producción de IFN- γ e IL-2 y son similares entre las especies de micobacterias. Para la proteína LTB-ME-39c, se seleccionaron péptidos que traslapan la mayor cantidad de epítipos predichos con alta afinidad y promiscuidad a alelos de MHC (Fig. 3-b). En ambas proteínas, LTB-ME-85B y LTB-ME-39c, los epítipos se separaron con el enlazador dilisina (KK) para evitar el reconocimiento de epítipos no previstos. El enlazador KK se seleccionó por revisión de la literatura en donde se menciona a este enlazador como el más apropiado para vacunas multiepitópicas. La evaluación de las secuencias nucleotídicas optimizadas de los antígenos tuvo un índice de adaptación de codón esperado de 0.914 y 0.934 para LTB-ME-39c-Bam y LTB-ME-85B-Bam, respectivamente, que son necesarios para su síntesis y expresión correcta en *C. reinhardtii* (Tabla I).

Tabla I. Secuencia nucleotídica de los antígenos multi-epítipo optimizados sobre el uso de codón preferencial para *C. reinhardtii*

Proteína	Secuencia de aminoacídica	Secuencia nucleotídica optimizada para <i>C. reinhardtii</i> con sitios de restricción	Índice de adaptación de codón. (eCAI; P0.01)
LTB-ME-39c (235aa) (726pb)	MAQWKA AVLLALACA SYGFGVWAE EEEKLGTVI GAPQSITELCSEYRNTQI YTINDKILSYTESMAGK REMVIIITFKSGATFQVEV PGSQHIDSQKKA IERMK DTLRIAYLTETKIDKLCV WNNKTPNSIAAISMENK K PGLNAYVTGPAALFS DMQLKKLFVYRSVTTVV L LLLTKKSEDMLRMMLT NHSTMKKWQYIFGIQLY WMVLPiKKNAGLVFAF TMA SMVVSDLHDEL	GAATTCGGATCCATGGCCCAGTGGAAAGGCCGCGGTGCT GCTGCTGGCCCTGGCGTGCGCCAGCTACGGCTTCGGCGT GTGGGCGGAGGAGGAGAAGCTGGGCACCGTGATCGGCG CTCCCCAGTCCATCACGGAGCTGTGCAGCGAGTACCGCA ACACCCAGATCTACACGATCAACGACAAGATCCTGAGCT ACACCGAGTCGATGGCGGGAAGCGCGAGATGGTGATC ATCACCTTCAAGAGCGGCGCCACGTTCCAGGTGGAGGTG CCGGGCTCCAGCACATCGACTCCCAGAAGAAGGCGAT CGAGCGCATGAAGGACACCCTGCGCATCGCTACCTGAC CGAGACGAAGATCGACAAGCTGTGCGTGTGGAACAACA AGACGCCGAACAGCATCGCCGCGATCTCGATGAGAAC AAGAAGCCTGGCCTGAACGCGTACGTGACCGGCCCGC TGCCCTGTTCGGACATGCAGCTGAAGAAGCTGTTCGT GTACCGCTCCCGTGACCAGGTGGTGTGCTGCTGTGAC CAAGAAGAGCGAGGACATGTGCGCATGATGCTGACCA ACCACTCGACGATGAAGAAGTGGCAGTACATCTCGGC ATCCAGCTGTACTGGATGGTGTGCGCATGAAGAAGAA CGCCGGCCTGGTGTTCGCGTTCACCATGGCCTCCATGGT CGTGAGCGACCTGCACGACGAGCTGTAGCTGCAG	0.914
LTB-ME-85B (252aa) (777pb)	MAQWKA AVLLALACA SYGFGVWAE EEEKLGTVI GAPQSITELCSEYRNTQI YTINDKILSYTESMAGK REMVIIITFKSGATFQVEV PGSQHIDSQKKA IERMK DTLRIAYLTETKIDKLCV WNNKTPNSIAAISMENK KTPAFEWYYSGLSV IMPVGGQSSFYADWYQP ACGKAGCSTYK WETFK KWGPSSDPAWQRNDPSL HIPKFKFDAYNAAGGHN AVFNFNANGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQHDEL	GAATTCGGATCCATGGCCCAGTGGAAAGGCCGCGGTGCT GCTGCTGGCCCTGGCGTGCGCCTCGTACGGCTTCGGCGT GTGGGCGGAGGAGGAGAAGCTGGGCACCGTGATCGGCG CTCCCCAGAGCATCACGGAGCTGTGCTCGGAGTACCGCA ACACCCAGATCTACACGATCAACGACAAGATCCTGAGCT ACACCGAGTCGATGGCGGGAAGCGCGAGATGGTGATC ATCACCTTCAAGAGCGGCGCCACGTTCCAGGTGGAGGTG CCGGGCTCCAGCACATCGACAGCCAGAAGAAGGCGAT CGAGCGCATGAAGGACACCCTGCGCATCGCTACCTGAC CGAGACGAAGATCGACAAGCTGTGCGTGTGGAACAACA AGACCCCAACTCGATCGCCGCGATCCTCATGGAGAACA AGAAGACGCCGCGTTCGAGTGGTACTACCAGTCGGGC CTGTCCGTGATCATGCCCGTGGGCGGCCAGAGCAGCTTC TACGCCGACTGGTACCAGCCGCGGTGCGGCAAGGCCGG CTGCTCCACCTACAAGTGGGAGACGTTCAAGAAGTGGG GCCCTCCAGCGACCCGGCGTGGCAGCGCAACGACCCC AGCCTGCACATCCCAAGAAGTTCAGGACGCTACAA CGCTGCCGCGGCCACAACGCGGTGTTCAACTTCAACGC CAACGGCACCCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCGCAGC TGAACGCCATGAAGCCGACCTCCAGCACGACGAGCTG TAGCTGCAG	0.934

*Las letras en **negrita** es la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima *Eco RI*.

*Las letras en *cursiva* es la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima *Bam HI*.

*Letras subrayadas son la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima *PstI*.

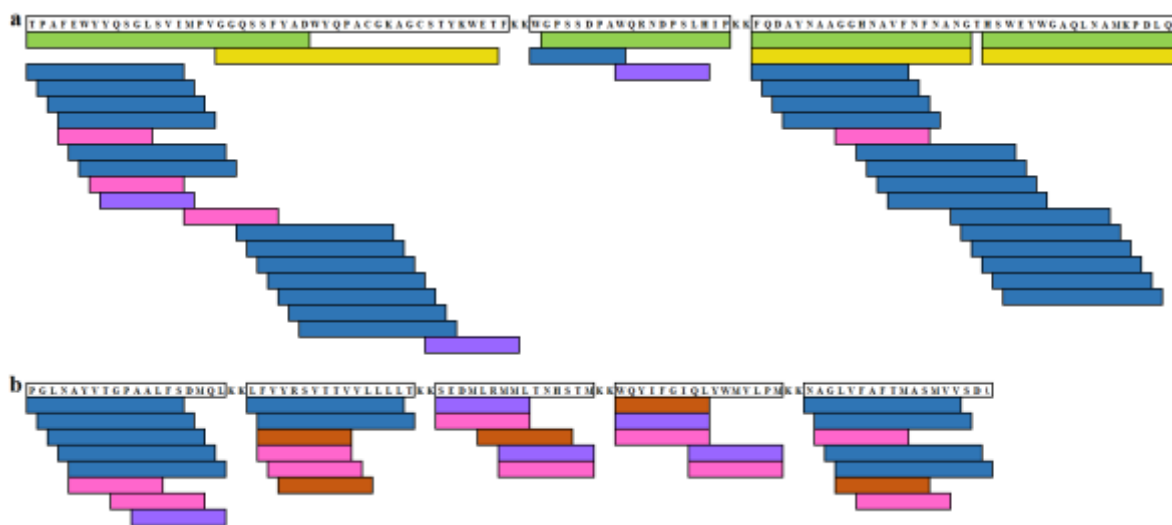


Figura 3. Antígenos Multi-epítipo. a) El antígeno LTB-ME-85B contiene epítipos de Ag85B inductores de INF- γ (verde) e IL-2 (amarillo) en ratón reportados por D'Souza *et al.* (2003) traslapados con epítipos predichos para MHC I bovino (morado), MHC I murino (rosa) y MHC II murino (azul). b) El antígeno LTB-ME-39c contiene fragmentos de péptidos inmunogénicos predichos que se traslapan para MHC II humano (naranja), MHC I bovino (morado), MHC I murino (rosa) y MHC II murino (azul). Los fragmentos inmunogénicos son separados con el enlazador KK.

7.1.2 Construcciones plasmidicas

El vector pChlamy_4 y los genes digeridos con las enzimas *EcoRI*, *BamHI*, y *PstI* se observaron en un gel de agarosa al 1% (datos no mostrados). Las bandas de tamaño esperado obtenidas fueron cortadas del gel, purificadas y posteriormente observadas en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 4). El vector digerido con *EcoRI-PstI* generó una banda esperada de 3440 pb y la digestión con *BamHI-PstI* generó una banda esperada de 3540 pb.

El plásmido aislado de colonias de *E. coli* crecidas en un medio selectivo se analizó mediante digestión enzimática para confirmar la presencia de nuestra inserción. Se analizaron veintidós colonias de la construcción LTB-ME-39c flanqueada con *BamHI* (LTB-ME-39cBam) y 27 para la construcción LTB-ME-85B flanqueada con *BamHI*

(LTB-ME-85BBam). Sólo una colonia fue identificada con inserto para cada construcción: la colonia-19 (C-19) para LTB-ME-39c-Bam y la colonia 27 para LTB-ME-85B-Bam (C-27). Ambas colonias fueron analizadas por dos digestiones, utilizando *Bam HI* y *Pst I* en doble digestión y *Xmn I* en una digestión sencilla. Las digestiones se observaron en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 5). El plásmido de las colonias C-19 (LTB-ME-39c-Bam) y C-27 (LTB-ME-85B-Bam) fueron seleccionados para la transformación de *C. reinhardtii* por biobalística.

Se analizaron veinte clonas para la construcción LTB-ME-39c flanqueada con *Eco RI* (LTB-ME-39c-Eco). Tres colonias (C-14, 16 y 17) mostraron la presencia del inserto mediante una digestión con las enzimas *Eco RI* y *Pst I* (Fig. 6). La colonia 17 (C-17) mostró una digestión completa y fue seleccionada para la transformación de algas.

Para la construcción LTB-ME-85B-Eco, nueve colonias se analizaron por digestión utilizando la enzima *XmnI*. El perfil de la digestión de los cuatro colonias (C5-8) sugiere la presencia de inserto (Fig. 7); sin embargo, el perfil de C-7 presentan la banda esperada de aproximadamente 1250pb. El plásmido de la colonia C-17 (LTB-ME-39c-Eco) y la colonia C-7 (LTB-ME-85B-Eco) se seleccionaron para la transformación por biobalística en *C. reinhardtii*.

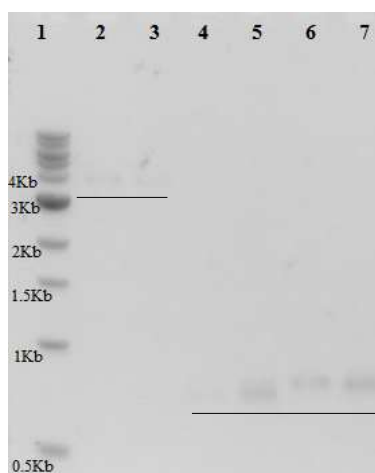


Figura 4. Bandas purificadas correspondientes al vector y genes digeridos, en gel de agarosa al 1.5% (TAE-BrEt). Las bandas correspondientes al vector y los genes digeridos se purificaron y corrieron en un gel de agarosa para observar la calidad antes de la ligación. Carril 1, Marcador de peso molecular 1kb; carril 2, vector digerido con *BamHI-PstI*; carril 3, vector digerido con *EcoRI-PstI*; carril 4, gen *ltb-me-39c* digerido con *BamHI-PstI*; carril 5, gen *ltb-me-39c* digerido con *EcoRI-PstI*; carril 6, gen *ltb-me-85B* digerido con *BamHI-PstI*; carril 7, gen *ltb-me-85B* digerido con *EcoRI-PstI*.

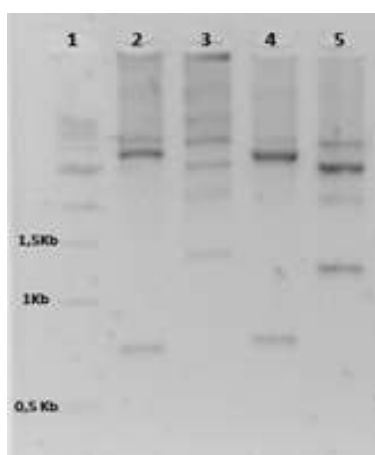


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para las colonias Bam. La digestión de colonias presentó el perfil correspondiente a la presencia del inserto en C-19 (*ltb-me-39c-Bam*) y C-27 (*ltb-me-85B-Bam*) con dos digestiones. Carril 1, marcador 1 kb; carril 2, plásmido de C-19 digerido con *BamHI-PstI*; carril 3, plásmido de C-19 digerido con *XmnI*; carril 4, plásmido C-27 digerido con *BamHI-PstI*; carril 5, C-27 plásmido digerido con *XmnI*.

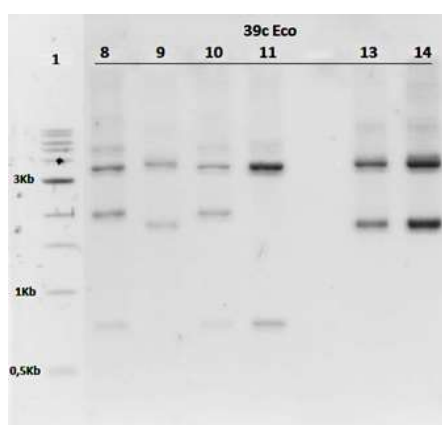


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para la construcción LTB-ME-39c-Eco. La digestión de las colonias LTB-ME-39c-Eco presenta el perfil correspondiente a la presencia del inserto en el plásmido de tres colonias: C-14, C-16 y C-17. Carril 1, Marcador 1kb; carril 8, plásmido de C-14 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 9, plásmido de C-15 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 10, plásmido de C-16 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 11, plásmido de C-17 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 13, plásmido de C-20 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 14, plásmido de C-21 digerido con *EcoRI-PstI*.

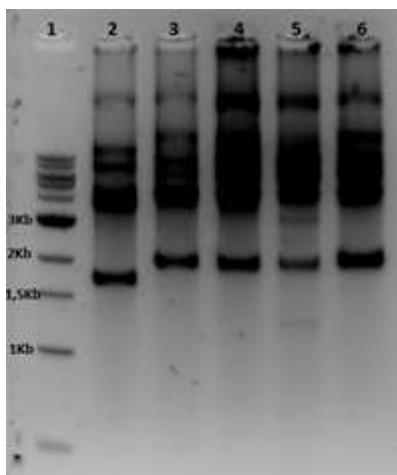


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-BrEt) del perfil de digestión para la construcción LTB-ME-85B-Eco. La digestión de las colonias LTB-ME-85B-Eco presenta el perfil correspondiente a la presencia del inserto en el plásmido de tres colonias; sin embargo, el perfil de una sola (C-7) mostró la liberación de la banda esperada. Carril 1, Marcador 1kb; carril 2, plásmido C-4 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 3, C5 plásmido digerido con *EcoRI-PstI*; carril 4, plásmido C-6 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 5, plásmido C-7 digerido con *EcoRI-PstI*; carril 6, plásmido C-8 digerido con *EcoRI-PstI*.

7.2 Determinación de la producción funcional de una vacuna prototipo multi-epítopo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en *C. reinhardtii*.

7.2.1 Mantenimiento y transformación de *C. reinhardtii*

Después de 2 semanas en medio selectivo, quince colonias de *Chlamydomonas* de las construcciones Bam (LTB-ME-39c-Bam y LTB-ME-85B-Bam) con resistencia a zeocina se seleccionaron para crecer de forma individual en placas de medio TAP-agar-Zeocina (Figs. 8, 9) y con medio TAP líquido (Fig. 10). Para la construcción 39c, siete colonias cultivadas individualmente crecieron en medio selectivo y diez en medio líquido. Mientras que, para la construcción ME-85B ocho colonias fueron cultivadas individualmente en medio selectivo y diez en medio TAP líquido.



Figura 8. Colonias de *C. reinhardtii* transformadas con la construcción LTB-ME-39c-Bam. Crecimiento individual de las colonias 9 a la 15 de la construcción LTB-ME-39c-Bam en cajas con medio selectivo TAP-agar (2%)-Zeocina. Clones resaltados en asterisco tuvieron un crecimiento notable



Figura 9. Colonias de *C. reinhardtii* transformadas con la construcción LTB-ME-85B-Bam. Crecimiento individual de las colonias 1 a la 8 de la construcción LTB-ME-85B-Bam en cajas con medio selectivo (TAP-agar 2%-Zeocina). Clones resaltados en asterisco tuvieron un crecimiento notable.



Figura 10. Colonias de *C. reinhardtii* transformadas con ambas construcciones. Crecimiento individual de colonias transformadas con ambas construcciones Bam (LTB-ME-39c y LTB-ME-85B) en medio TAP líquido.

7.2.2 Selección de transformantes

El ADN extraído de las colonias de *C. reinhardtii* que crecieron en medio TAP líquido se analizó por PCR para confirmar la presencia de nuestra inserción. Se analizaron diez colonias para cada construcción. Sólo una, C-12 fue identificada con la construcción LTB-ME-39c-Bam (Fig. 11). Mientras que para la construcción LTB-ME-85B-Bam, cinco colonias se identificaron con el inserto, C-1, C-3, C-8, C-11 y C-14 (Fig. 12). Las amplificaciones obtenidas por PCR se observaron en gel de agarosa al 1%. Las colonias confirmadas con inserto fueron seleccionadas para el análisis de expresión de las vacunas recombinantes.

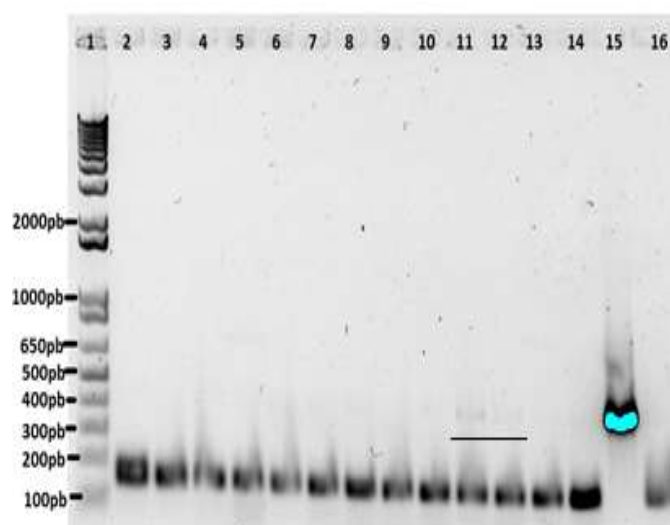


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-SYBER Safe) del análisis de PCR a colonias transformadas con construcción LTB-ME-39c-Bam. La identificación de inserto en las colonias transformadas con LTB-ME-39c-BAM por PCR utilizando cebadores específicos se muestra en un gel de agarosa. Carril 1, Marcador 1Kb plus; Carril 2, amplificación C-1; carril 3, amplificación de C-3; carril 4, amplificación de C-4; carril 5, amplificación de C-5; carril 6, amplificación de C-6; carril 7, amplificación de C-15; carril 8, amplificación de C-7; carril 9, amplificación de C-13; Carril 10, amplificación de C-11; carril 11, amplificación de C-12 (1); carril 12, amplificación de C-12 (2); carril 13, amplificación de C-14; carril 14, amplificación de control (H_2O/MQ); carril 15, amplificación de plásmido de *E. coli* con construcción (C +); carril 16, amplificación de WT *C.r.*(C-).

7.2.3 Mantenimiento de colonias de *C. reinhardtii* y extracción de proteínas

Después de 40 días en medio selectivo, 21 colonias de *C. reinhardtii* transformadas con la construcción LTB-ME-39c-Bam y 16 colonias con LTB-ME-85B-Bam fueron mantenidas individualmente en tubos Falcon de 50 ml de con 15 ml de medio TAP líquido durante 15 días. Se observó amplia variabilidad en la biomasa obtenida para cada colonia.



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (TAE-SYBER Safe) del análisis de PCR a colonias transformadas con construcción LTB-ME-85B-Bam. La identificación de inserción en clones transformados con la construcción 85B mediante PCR utilizando cebadores específicos se muestran en gel de agarosa. Carril 1, Marcador 1Kb; Carril 2, ADN amplificación de C-1; carril 3, ADN amplificación de C-3; carril 4, ADN amplificación de C-8; carril 5, ADN amplificación de C-11; carril 6, ADN amplificación de C-14; carril 7, ADN amplificación de WT (C-); carril 8, ADN amplificación del plásmido de *E. coli* con la construcción (C+).

7.2.4 Ensayo de Bradford (Bradford, 1996)

Curva estándar. Aunque hubo variabilidad entre las réplicas de absorbancia obtenidas, el valor promedio de absorbancia permitió obtener una $R^2 = 0,9997$ (Fig. 13) para la curva estándar de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) (LifeSciencesSeraCare inc.). La absorbancia y los datos de concentración se muestran en la Tabla II.

Cuantificación de la proteína total soluble (PTS): El valor de X, que representa la concentración de proteína en la curva estándar, se despejó y se obtuvo la absorbancia usando tres réplicas para cada colonia en una dilución 1:10. Después, la concentración final fue calculada para cada colonia en un volumen final de 500 μ L. La concentración de PTS para colonias de las construcciones LTB-ME-39c-Bam y LTB-ME-85B-Bam se reportan en las Tablas III y IV, respectivamente.

Tabla II. Medidas de absorbancia para la construcción de curva estándar por Bradford.

BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Absorbancia			Abs. promedio (\bar{X})	\bar{X} -Control
	X 1	X 2	X 3		
80	1.828	2.155	2.838	2.274	1.792
40	1.310	1.529	1.255	1.365	0.883
20	0.875	0.900	0.948	0.908	0.426
10	0.640	0.737	0.763	0.713	0.232
0	0.481	0.479	0.484	0.481	0.000

Mediciones de absorbancia y concentración resaltadas en negro fueron utilizados para la construcción curva estándar.

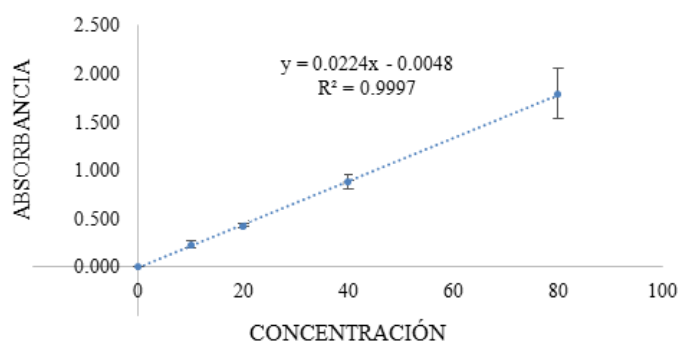
**Figura 13.** Curva estándar para cuantificación de PTS por Bradford usando concentraciones de BSA.

Tabla III. Cuantificación de proteína total soluble de colonias LTB-ME-39c-Bam por Bradford (Bradford, 1996).

Clona	Abs.			Abs. Promedio		Conc. 01:10	Conc. Final µg/mL
	X1	X2	X3	\bar{X}	\bar{X} -Control		
15(1)	1.372	1.467	1.459	1.433	0.980	43.9	439.49
13(1)	1.349	1.461	1.425	1.412	0.959	43.0	430.12
12(1)	1.096	1.183	1.666	1.315	0.862	38.7	386.96
63	1.13	1.127	1.125	1.127	0.674	30.3	303.18
4(2)	1.568	1.686	1.588	1.614	1.161	52.0	520.45
14(2)	1.76	1.728	1.688	1.725	1.272	57.0	570.15
42	0.934	0.996	0.987	0.972	0.519	23.4	233.99
43	1.197	1.193	1.227	1.206	0.753	33.8	338.15
44	1.413	1.444	1.549	1.469	1.016	45.6	455.57
45	1.29	1.254	1.331	1.292	0.839	37.7	376.55
46	1.431	1.307	1.375	1.371	0.918	41.2	411.96
48	1.223	1.149	1.174	1.182	0.729	32.8	327.59
49	1.946	1.905	1.859	1.903	1.450	65.0	649.61
50	0.764	0.75	0.736	0.750	0.297	13.5	134.73
51	1.736	1.688	1.633	1.686	1.233	55.2	552.44
52	1.617	1.671	1.622	1.637	1.184	53.1	530.57
53	1.589	1.709	1.672	1.657	1.204	53.9	539.49
54	1.358	1.395	1.396	1.383	0.930	41.7	417.32
58	1.599	1.676	1.66	1.645	1.192	53.4	534.29
61	1.197	1.219	1.227	1.214	0.761	34.2	342.02
62	1.597	1.621	1.624	1.614	1.161	52.0	520.45
WT	1.989	1.953	2.029	1.990	1.537	68.8	688.45

Tabla IV. Cuantificación de proteína total soluble para clonas LTB-ME-85B-Bam por Bradford (Bradford, 1996).

Clona	Abs.			Abs. Promedio		Conc. 01:10	Conc. Final $\mu\text{g/mL}$
	X1	X2	X3	\bar{X}	\bar{X} -Control		
1(1)	1.403	1.508	1.301	1.404	0.935	41.970	419.702
2(1)	0.900	1.034	0.823	0.919	0.450	20.318	203.185
3(1)	1.460	1.623	1.382	1.488	1.020	45.735	457.351
4(1)	1.473	1.551	1.304	1.443	0.974	43.696	436.964
6(1)	1.583	1.851	1.533	1.656	1.187	53.205	532.054
12(1)	1.362	1.370	1.313	1.348	0.880	39.485	394.851
1(2)	1.980	2.008	1.752	1.913	1.445	64.708	647.083
3(2)	1.312	1.387	1.307	1.335	0.867	38.905	389.048
5(2)	1.071	1.073	1.020	1.055	0.586	26.375	263.750
16	1.488	1.470	1.369	1.442	0.974	43.682	436.815
18	1.560	1.544	1.528	1.544	1.075	48.220	482.202
22	1.300	1.450	1.246	1.332	0.863	38.756	387.560
23	1.591	1.546	1.520	1.552	1.084	48.592	485.923
34	1.486	1.501	1.420	1.469	1.000	44.872	448.720
19	1.630	1.665	1.569	1.621	1.153	51.673	516.726
20	0.823	0.828	0.797	0.816	0.347	15.720	157.202

7.2.5 Expresión de proteínas recombinantes

Después de dos semanas sobre medio líquido selectivo, las líneas transgénicas con mayor concentración de biomasa fueron analizadas por ELISA utilizando los anticuerpos anti-His y anti-CTB. Las líneas 12, 51, 52, 53 y 54 de LTB-ME-39c-Bam y las líneas 5 (2), 16 y 34 de LTB-ME-85B-Bam presentaron mayor absorbancia sobre el control (WT) en ELISA utilizando el anticuerpo anti-CTB (Figs. 14, 15). En una segunda ELISA, la producción de vacunas se confirmó en las líneas 12, 51, 53, y 54 de LTB-ME-39c-Bam y 5(2) y 34 de LTB-ME-85B-Bam usando el anticuerpo anti-His. Además, las líneas 1 y 15 de LTB-ME-85B-Bam y 61 de LTB-ME-39c-Bam se identificaron por la producción de antígenos usando el anticuerpo anti-His en comparación con WT (Figs. 16, 17). Los datos de ELISA

utilizando extractos de proteínas del buffer de extracción 2 no mostraron diferencias respecto al control (WT) (datos no mostrados).

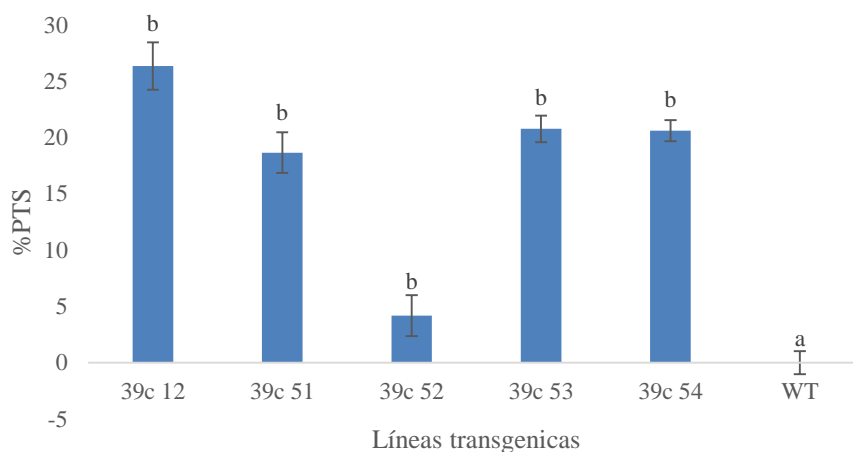


Figura 14. Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-39c-Bam en *C. reinhardtii* utilizando anti-CTB. La expresión de la vacuna LTB-ME-39c-Bam fue determinada comparando los valores de absorbancia de las líneas transgénicas contra la línea WT por ELISA usando el anticuerpo anti-CTB.

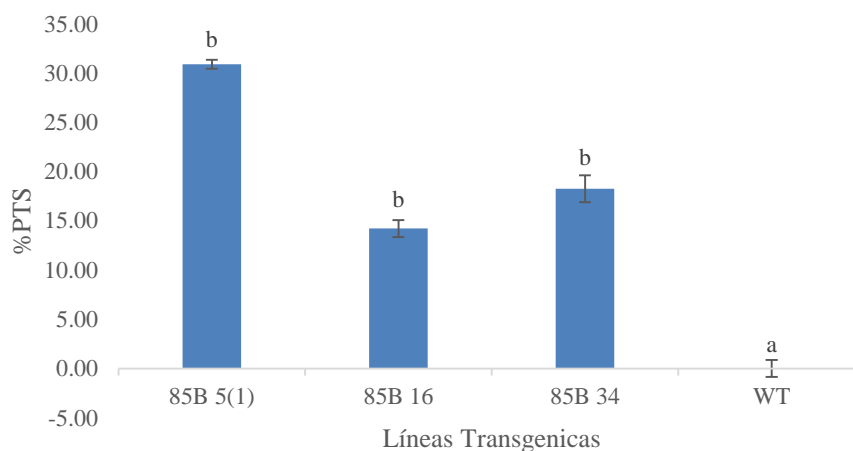


Figura 15. Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-85B-Bam en *C. reinhardtii* utilizando anti-CTB. La expresión de la vacuna LTB-ME-85B-Bam fue determinada comparando los valores de absorbancia de las líneas transgénicas contra la línea WT por ELISA utilizando el anticuerpo anti-CTB.

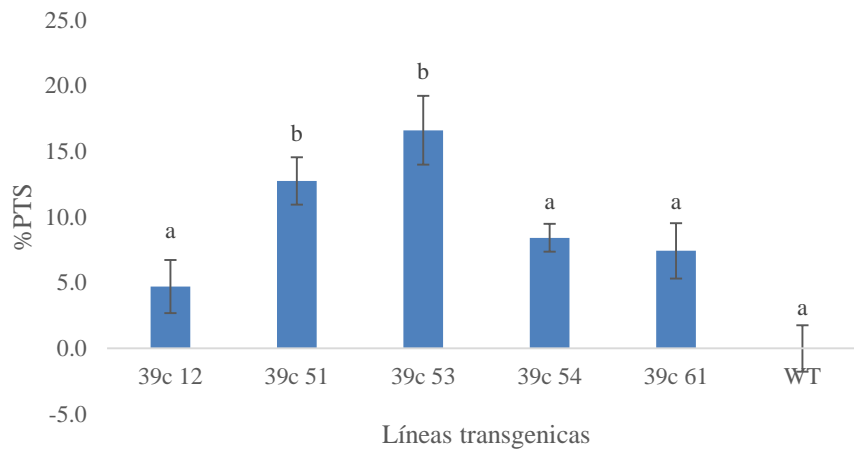


Figura 16. Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-39c-Bam en *C. reinhardtii* utilizando anti-His. La expresión de la vacuna LTB-ME-39c-Bam fue determinada comparando los valores de absorbancia de las líneas transgénicas contra la línea WT por ELISA usando el anticuerpo anti-histidina.

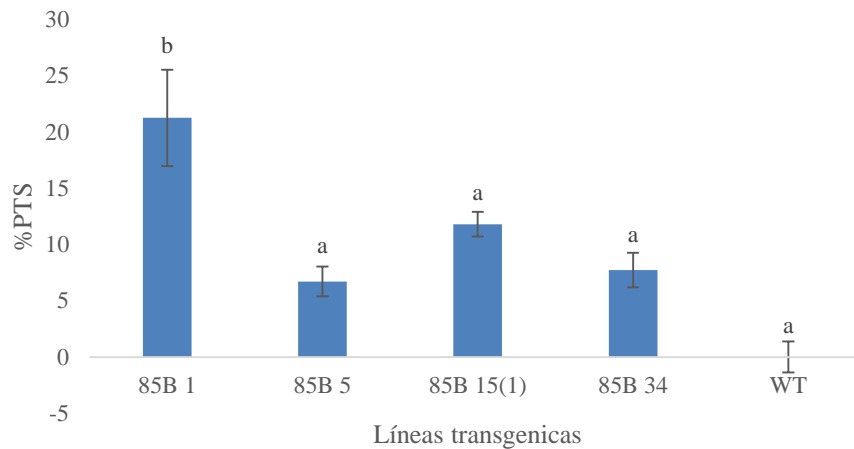


Figura 17. Ensayo ELISA para identificar la expresión de la vacuna recombinante LTB-ME-85B-Bam en *C. reinhardtii* utilizando anti-His. La expresión de la vacuna LTB-ME-85B-Bam fue determinada comparando los valores de absorbancia de las líneas transgénicas contra la línea de WT por ELISA usando el anticuerpo anti-histidina.

8. DISCUSIÓN

8.1. Diseño de vacunas multi-epítopo basadas en Ag85B y MAP1239c

Las vacunas comerciales actuales contra la paratuberculosis tienen algunas limitaciones sustanciales, incluyendo sólo una protección parcial (Huygen *et al.*, 2010) y su interferencia en la prueba de diagnóstico de tuberculosis bovina (Stringer *et al.*, 2011). Además, dado las crecientes demandas de seguridad en las vacunas tradicionales (atenuadas o microorganismos inactivos), el campo de investigación de vacunas se está centrando en el desarrollo de vacunas de subunidades (Gori *et al.*, 2013). El diseño de vacunas basadas en un conjunto limitado de antígenos usando el enfoque minimalista es relevante para evitar una respuesta inmune perjudicial dentro del hospedero (Dudek *et al.*, 2010). En este sentido, un epítopo es el péptido más pequeño capaz de activar el sistema inmune y su selección es crucial sobre el diseño de vacunas. Sorprendentemente, las herramientas inmunoinformáticas permiten la selección racional y rápida de epítopo para la identificación exitosa de candidatos a vacuna contra patógenos (Seib *et al.*, 2012). Por lo tanto, en este trabajo, una vacuna multi-epítopo candidata contra paratuberculosis producida en microalga es generada para el desarrollo de una vacuna potencial de bajo costo. La vacuna diseñada incluye enlazadores di-lisina, además del adyuvante de mucosa LTB, el péptido señal BIP1 y la señal de retención HDEL.

La selección de epítopos sobre la proteína MAP1239c se basa en el traslape de secuencias de péptidos reconocidos por MHC (clase I y II), así como características inmunogénicas deseables tales como ninguna similitud con proteínas del hospederos, promiscuidad y

afinidad a los alelos de MHC (humanos, murinos y bovinos), una localización sub-celular expuesta y nula identidad con huésped (Carlos *et al.*, 2015).

Las células T citotóxicas (CD8 +) son activadas por el complejo MHC clase I para atacar a células infectadas; mientras que las células T cooperadoras (CD4 +) estimuladas por MHC clase II polarizan la respuestas inmunes adaptativas (Th1 y Th2) (De Franco *et al.*, 2007). En consecuencia, los péptidos promiscuos (unión a mayor cantidad de alelos) tienen una ventaja sobre la inmunodominancia de péptidos de células T (Eisen *et al.*, 2012). La respuesta Th1, también llamada inmunidad medida por células (IMC), juegan un rol clave en la limitación de la propagación de la infección (Roussey *et al.*, 2014). Las citosinas interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) son los principales marcadores inmunes relacionados con la respuesta Th1, necesarias para eliminar los patógenos intracelulares (Thakur *et al.*, 2012) como MAP. Interesantemente, algunos epítomos Th1 inmunodominantes (Inductores de L-2 e IFN- γ) pertenecientes al complejo Ag85 se identificaron en ratones BALB/c y C57BL/6 (D'Souza *et al.*, 2003; Rosseles *et al.*, 2006). Por otra parte, el complejo Ag85 es altamente conservado en las especies micobacterianas e induce una respuesta inmunes de tipo Th1, que es importante para el control de infecciones micobacterianas (Huygen *et al.*, 2010). Por lo tanto, fragmentos inmunogénicos del complejo Ag85 traslapados con epítomos de85B de MAP predichos *in silico* se seleccionaron para el diseño de la vacuna multi-epítomo 85B como control.

Mantener la interdependencia de epítomos es un aspecto importante en el diseño de vacunas multi-epítomo. El ambiente alrededor del epítomo puede jugar un papel crucial sobre la inmunodominancia del mismo (Ghosh *et al.*, 2013). Una de las estrategias más utilizadas en

las vacunas multi-epítopo es el uso de enlazadores con el fin de mejorar y optimizar el correcto procesamiento del epítopo y evitar la generación de nuevos epítopos indeseables (Almeida *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014.). El enlazador di-Lisina (KK) se utilizó en varias vacunas múlti-epítopo para asegurar el adecuado procesamiento y presentación de epítopos de células T (Huang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2014). KK proporciona un sitio de escisión para la proteasa lisosomal cathepsina que conduce a una respuesta inmune de tipo MHC II contra los epítopos seleccionados y evita la generación de nuevos epítopos (Shrestha *et al.*, 2014). Por lo tanto, el enlazador KK se usó entre los epítopos para inducir el procesamiento independiente y la presentación adecuada de epítopos de células Th de las vacunas multi-epítopo contra MAP.

MAP causa una infección crónica del intestino delgado de los rumiantes, la vacuna de la mucosa puede tener ventaja para inducir una respuesta inmune protectora. La mayoría de las vacunas requieren el uso de un fuerte adyuvante en los sistemas de suministro eficientes, con el fin de mejorar la respuesta inmune. La subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) es un adyuvante de la mucosa extremadamente activo. Algunos estudios encontraron que la actividad adyuvante de LTB mejora mucho cuando está ligado al antígenos (Rhee *et al.*, 2012) y puede duplicarla respuesta inmune (Lundgren *et al.*, 2014). Además, vacunas basadas en LTB fusionado a epítopos de células B y/o T pueden estimular las respuestas inmune Th1 y Th2 por administración en la mucosa (Sun *et al.*, 2013). Esto último es importante en el desarrollo de vacunas de administración oral utilizando microalgas. Por ejemplo, la administración oral de LTB ligada a proteínas micobacterianas pueden promover una respuesta inmune Th1 específica del antígeno

(Rigano *et al.*, 2006). Por lo tanto, en el presente estudio la vacuna multi-epítipo contra MAP se fusionó con el adyuvante de LTB.

La estructura correcta de LTB es un punto esencial en la producción de vacunas porque LTB debe unirse al receptor GM1-glycoside correctamente modulando la respuesta inmune (Ledeen y Wu, 2015). Para direccionar la estructura correcta en una vacuna fusionada, LTB debe estar situado en N- o C-terminal de la vacuna multiepitópica. Por otra parte, el retículo endoplasmático (ER) realiza múltiples funciones incluyendo la translocación y modificación de proteínas. Por lo tanto, un péptido señal de ER (BIP1) y señal de retención de ER (HDEL) específicas de la microalga pueden bio-encapsular la expresión de la vacuna recombinante (Rasala *et al.*, 2014) y también asegurar la estructura correcta de LTB para ser funcional. En consecuencia, el péptido señal BIP1 y la señal de retención HDEL se incluyeron en el diseño de ambas vacunas en este trabajo.

8.2 Determinación de la producción de una vacuna prototipo multi-epítipo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en *C. reinhardtii*.

Las microalgas, además de realizar fotosíntesis y modificaciones post-traduccionales, tienen un crecimiento rápido y es de fácil de cultivo (Xu *et al.*, 2012). Adicionalmente, las microalgas transgénicas son adecuadas para crecer en biorreactores, reduciendo el riesgo de contaminación del sistema de producción y protegiendo el medio ambiente del escape de transgenes (Gong *et al.*, 2011). De esta manera, la producción de proteínas terapéuticas en

microalgas es una fuente potencial para la administración oral como un polvo liofilizado de algas con poca o ninguna purificación (Mayfield *et al.*, 2007). Actualmente, *C. reinhardtii* es una plataforma importante para la expresión de proteínas recombinantes ya que más de 20 proteínas bio-farmacéuticas se han expresado con éxito en esta microalga (Gong *et al.*, 2011; Specht *et al.*, 2010).

La transformación mediada con el sistema biobalístico permitió el desarrollo de varias posibles líneas de *Chlamydomonas* transgénicas productoras de las vacunas multi-epítopo basado en epítomos identificados por análisis *in silico* (Carlos *et al.*, 2015). Entre ellas, de diez líneas de cada construcción seleccionadas para su posterior análisis molecular, sólo una colonia (C-12) para la construcción LTB-ME-39c-Bam y cinco (C-1, C-3; C8; C-11; C-14) para construcción LTB-ME-85B-Bam fueron identificadas por PCR. Aunque la técnica de PCR puede identificar colonias transformadas, es necesario verificar la producción de las vacunas recombinantes. *Chlamydomonas* posee la maquinaria para el silenciamiento de genes y es un muy probable que la expresión de la vacuna recombinante se pueda reducir a través de uno de los varios mecanismos de silenciamiento génico (Kumar *et al.*, 2013; Rosales *et al.*, 2011).

Durante el mantenimiento de líneas en medio selectivo algunas clonas se perdieron. Sin embargo, las líneas de C-12 (LTB-ME-39c-Bam) y C-1 (LTB-ME-85B), ambos positivos por PCR, son líneas transgénicas prometedoras para la producción de las vacunas recombinantes debido a los resultados observados en el ensayo de ELISA. Además, se ha logrado la producción de una vacuna estable durante más de 1,5 años a temperatura ambiente en esta plataforma (Dreesen *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013). Aunque muchas

líneas continúan en crecimiento en medios selectivos, solamente algunas líneas mostraron señal significativa respecto a la WT. El ensayo de ELISA utilizando anticuerpos anti-histidina y anti-CTB identificó siete líneas de LTB-ME-39c y cinco líneas de la construcción LTB-ME-85B. Por lo tanto, las líneas identificadas por ELISA son las candidatas seleccionadas para su posterior caracterización antigénica.

Además, algunos efectos inmunomoduladores son atribuidos a los metabolitos de la microalga *Chlamydomonas* (Rosales, 2013). Aunque no existe un análisis detallado sobre este tema en la literatura actual, varias vacunas orales expresadas en *C. reinhardtii* inducen inmunidad sistémica y específica de la mucosa en ratones vacunados (Dreesen *et al.*, 2010; Gregory *et al.*, 2013). Finalmente, son necesarios estudios para evaluar la inmunogenicidad y el efecto inmunoprotector de estas candidatas como vacunas orales. Las vacunas múltiepitopos a base de algas que se describen en este estudio ofrecen un nuevo aporte en el desarrollo de una vacuna de bajo costo contra la paratuberculosis.

9. CONCLUSION

La microalga *C. reinhardtii* puede expresar correctamente una vacuna basada en antígenos de MAP.

C. reinhardtii es una plataforma eficiente para producir vacunas recombinantes. El diseño y la producción de una vacuna multi-epítipo basada en antígenos de MAP fue posible en esta microalga.

Las vacunas múlti-epítipo basadas en antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fueron diseñadas y producidas en *Chlamydomonas reinhardtii*.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la caracterización *in vitro* que incluya ensayos de biodisponibilidad y estabilidad de los antígenos producidos en *C. reinhardtii*.
- Se necesita la caracterización *in vivo* de las respuestas inmunes locales y sistémicas (perfil de citocinas y producción de anticuerpos específicos) en ratones inmunizados por vía oral con antígenos recombinantes producidos en *C. reinhardtii*

11. LITERATURA CITADA

- Almaraz-Delgado, A.L., J. Flores-Uribe, V.H. Pérez-España, E. Salgado-Manjarrez, J.A. Badillo-Corona. 2014. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express*. 4 (57): 1-9
- Almeida, A.P., M.O. Dias, C.A. Vieira, C. Chávez-Olórtegui, R.T. Gazzineli, M.M. Rodrigues, R.T. Fujiwara, O. Bruna-Romero. 2014. Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the *Plasmodium vivax circumsporozoite* protein. *Vaccine*. 32(19): 2181–87
- Azizi, A., A. Kumar, F. Diaz-Mitoma, J. Mestecky. 2010. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog*. 6(11):e1001147.
- Bannantine, J.P., D.O. Bayles, W.R. Waters, M.V. Palmer, J.R. Stabel, M.L. Paustian. 2008. Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Proteome Sci*. 6(5) doi: 10.1186
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2): 248–54
- Carlos, P., V. Roupie, S. Holbert, F. Ascencio, K. Huygen, G. Gomez-Anduro, M. Branger, M. Reyes-Becerril, C. Angulo. 2015. *In silico* epitope analysis of unique and membrane associated proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* for immunogenicity and vaccine evaluation. *J Theor Biol*. 384:1-9.
- Chi, J., J.A. VanLeeuwen, A. Weersink, G.P. Keefe. 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neosporacanthium*. *Prev Vet Med*. 55(2) 137-53.
- DeFranco, A., R. Locksley, M. Robertson. 2007. *Immunity: The Immune Response to Infectious and Inflammatory Disease*. New Science Press, London. 387p.
- Devriendt, B., B.G. De Geest, B.M. Goddeeris, E. Cox. 2012. Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery. *J Control Release*. 160(3): 431–9
- Dorshorst, N.C., M.T. Collins, J.E. Lombard. 2006. Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev Vet Med*. 75(1-2): 92–122

- Dreesen, I.A., G. Charpin-El Hamri, M. Fussenegger. 2010. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol* 145(3): 273–80
- D'Souza, S., V. Rosseels, M. Romano, A. Tanghe, O. Denis, F. Jurion, N. Castiglione, A. Vanonckelen, K. Palfliet, K. Huygen. 2003. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 71(1): 483–93
- Dudek, N.L., P. Perlmutter, M.I. Aguilar, N.P. Croft, A.W. Purcell. 2010. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des*. 16(28): 3149-57
- Eisen, H.N., X.H. Hou, C. Shen, K. Wang, V.K. Tanguturi, C. Smith, K. Kozyrytska, L. Nambiar, C.A. McKinley, J. Chen, R.J. Cohen. 2012. Promiscuous binding of extracellular peptides to cell surface class I MHC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(12): 4580–5.
- Fiorentino, M.A., A. Gioffré, K. Cirone, C. Morsella, B. Alonso, F. Delgado, F. Paolicchi. 2012. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a dairy goat in Argentina: Pathology and molecular characterization. *Small Ruminant Res*. 108: 133–6
- Ghosh, M., A.K. Solanki, K. Roy, R.R. Dhoke, Ashish, S. Roy. 2013. Carrier protein influences immunodominance of a known epitope: implication in peptide vaccine design. *Vaccine*. 31(41): 4682– 88
- Gong, Y., H. Hu, Y. Gao, X. Xu, H. Gao. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38(12):1879–90
- Gori, A., R. Longhi, C. Peri, G. Colombo. 2013. Peptides for immunological purposes: design, strategies and applications. *Amino Acids*. 45(2): 257–68
- Guo, L., R. Yin, K. Liu, X. Lv, Y. Li, X. Duan, Y. Chu, T. Xi, Y. Xing. 2014. Immunological features and efficacy of a multi-epitope vaccine CTB-UE against *H. pylori* in BALB/c mice model. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(8): 3495-507.
- Hempel, F., J. Lau, A. Klingl, U.G. Maier. 2011. Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS One*. 6 (12): e28424

- Huang, X.J., X. Lü, Y.F. Lei, J. Yang, M. Yao, H.Y. Lan, J.M. Zhang, Z.S. Jia, W. Yin, Z.K. Xu. 2013. Cellular immunogenicity of a multi-epitope peptide vaccine candidate based on hepatitis C virus NS5A, NS4B and core proteins in HHD-2 mice. *J Virol Methods*. 189(1):47-52
- Huygen, K., T. Bull, D.M. Collins. 2010. Development of New Paratuberculosis Vaccines. En: Behr, M.A., and D.M. Collins (eds). *Paratuberculosis, organism disease control*. Editorial CABI. Primera Edición. U.K., Oxfordshire. 375p.
- Huygen, K. 2014. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*. *Front Immunol*. 5: doi: 10.3389
- Kumar, A., V.R. Falcao, R.T. Sayre. 2013. Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*. 2(4): 321–332
- Kumar, B.V., T.K. Raja, M.R. Wani, S.A. Sheikh, M.A. Lone, G. Nabi, M.M. Azooz, M. Younis, M. Sarwat, M.R. Ahmad. 2013. Review: Transgenic plants as green factories for vaccine production. *Afr. J. Biotechnol*. 12(43): 6147-58
- Lauersen, K.J., H. Berger, J.H. Mussgnug, O. Kruse. 2013. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*. 167(2):101-10
- Lavelle, E.C. y D.T. O'Hagan. 2006. Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*. 3(6):747-62.
- Ledeen, R.W. y G. Wu. 2015. The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends Biochem Sci*. 40(7):407-18.
- Li, X., Y. Xing, L. Guo, X. Lv, H. Song, T. Xi. 2014. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* delivering a multi-epitope antigen CTB-UE attenuates *Helicobacter pylori* infection in mice. *Pathog Dis*. 72 (1): 78–86.
- Lundgren, A., L. Bourgeois, N. Carlin, J. Clements, B. Gustafsson, M. Hartford, J. Holmgren, M. Petzold, R. Walker, A.M. Svennerholm. 2014. Safety and immunogenicity of an improved oral inactivated multivalent enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine administered alone and together with dmLT adjuvant in a double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I study. *Vaccine*. 32(52):7077-84
- Mayfield, S.P., A.L. Manuel, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto, J. Marin-Navarro. 2007. *C. reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol*; 18(2):126-33.

- Pillars, R.B., D.L. Grooms, J.C. Gardiner, J.B. Kaneene. 2011. Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev Vet Med.* 98(1): 10–18
- Pratheesh, P.T. y G.M. Kurup. 2013. Molecular cloning and expression of TB antigen protein in microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Indian J Biotechnol.* 12: 350-55
- Rasala, B.A., S. Chao, M. Pier, D.J. Barrera, S.P. Mayfield . 2014. Enhanced Genetic Tools for Engineering Multigene Traits into Green Algae. *PLoS One.* 9(4): e94028
- Rhee, J.H., S.E. Lee, S.Y. Kim. 2012. Mucosal vaccine adjuvants update. *Clin Exp Vaccine Res.* 1(1):50-63
- Rigano, M.M., S. Dreitz, A.P. Kipnis, A.A. Izzo, A.M. Walmsley. 2006. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine.* 24(5):691-5.
- Rosales-Mendoza, S., L.M. Paz-Maldonado, R.E. Soria-Guerra. 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep.* 31(3):479–494
- Rosales-Mendoza, S., R.E. Soria-Guerra, L. Moreno-Fierros, Y. Han, A.G. Alpuche-Solís, S.S. Korban. 2011. Transgenic carrot tap roots expressing an immunogenic F1-V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice. *J Plant Physiol.* 168(2):174-80
- Rosales-Mendoza S. 2013. Future directions for the development of *Chlamydomonas*-based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 12(9):1011-9.
- Rosseels, V., S. Marché, V. Roupie, M. Govaerts, J. Godfroid, K. Walravens, K. Huygen, 2006. Members of the 30- to 32-Kilodalton Mycolyl Transferase Family (Ag85) from Culture Filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Are Immunodominant Th1-Type Antigens Recognized Early upon Infection in Mice and Cattle. *Infect Immun.* 74(1): 202-12.
- Roussey, J.A., J.P. Steibel, P.M. Coussens. 2014. Regulatory T Cell Activity and Signs of T Cell Unresponsiveness in Bovine Paratuberculosis. *Front Vet Sci.* 1(20). doi: 10.3389
- Schubert, B., L. Lund, M. Nielsen. 2013. Evaluation of peptide selection approaches for epitope-based vaccine design. *Tissue Antigens.* 82(4): 243–51
- Seib, K.L., X. Zhao, R. Rappuoli. 2012. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect.* 18: 109-116

- Shrestha, A., N. Wadhwa, S.K. Gupta. 2014. Evaluation of recombinant fusion protein comprising dog zona pellucida glycoprotein-3 and Izumo and individual fragments as immunogens for contraception. *Vaccine*. 32(5): 564– 571
- Soria-Guerra, R.E., J.I. Ramírez-Alonso, A. Ibáñez-Salazar, D.O. Govea-Alonso, L.M.T. Paz-Maldonado, B. Bañuelos-Hernández, S. Korban, S. Rosales-Mendoza. 2014. Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in *Chlamydomonas reinhardtii* as a candidate hypertension vaccine. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.116(2): 133–9
- Specht, E., S. Miyake-Stoner, S. Mayfield. 2010. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*. 32(10): 1373–83.
- Stringer, .L.A., P.R. Wilson, C. Heuer, J.C. Hunnam, C.G. Mackintosh. 2011. Effect of vaccination and natural infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on specificity of diagnostic tests for bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J*. 59(5): 218-24.
- Sun, Z., S. Lawson, R. Langenhorst, K.L. McCormick, C. Brunick, T. Opriessnig, R. Baker, K.J. Yoon, W. Zhang, V.C. Huber, Y. Fang. 2013. Construction and immunogenicity evaluation of an epitope-based antigen against swine influenza A virus using *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit as a carrier-adjuvant. *Vet Microbiol*. 164(3-4): 229-38
- Thakur, A., L.E. Pedersen, G. Jungersen. 2012. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 30(33): 4907–20.
- Tong, J.C. y E.C. Ren. 2009. Immunoinformatics: current trends and future directions. *Drug Discov Today*. 14(13-14):684-9.
- Whitlock, R.H. y C. Buergelt.1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*.12, 345-56.
- Whittington, R.J., D.J. Begg, K. De Silva, K.M. Plain, A.C. Purdie. 2012. Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148: 29– 47
- Wu, C.W., M. Livesey, S.K. Schmoller, E.J. Manning, H. Steinberg, W.C. Davis, M.J. Hamilton, A.M. Talaat. 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect Immun*. 75(5): 2110-9.

Xu, J., M.C. Dolan, G. Medrano, C.L. Cramer, P.J. Weathers. 2012. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv.* 30(5):1171-84