



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EXPRESIÓN DE UN DOMINIO DE UNIÓN A BIOTINA MEDIANTE EL AUTOTRANSPORTADOR *Shda* EN
LA SUPERFICIE DE *Escherichia coli*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HÉCTOR DANIEL PARDAVÉ ALEJANDRE

TUTOR PRINCIPAL

DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA

Facultad de Medicina. UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS

Facultad de Medicina. UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis amados padres **María Esther** y **Héctor Daniel**, la vida no me alcanzaría para agradecerles todo lo que hasta el día de hoy han hecho por mí. El día en que me convertí en padre, pude entender el amor que sienten hacia mis hermanos y hacia a mí. Todo su esfuerzo como padres, una vez más rinde frutos el día de hoy, no es sólo un logro mío, es un logro de ustedes y para ustedes. Muchas gracias por creer en mí, por darme la vida que me dieron y enseñarme con su ejemplo diario que las cosas que valen la pena en la vida se logran con disciplina y constancia y que no existe nada más importante que la familia. ¡Los amo padres!

A mi amada esposa **Sandra Valeria**, son tantas y tantas las larga horas de paciencia, espera y escucha que me has otorgado de tu tiempo, de tu vida, acompañándome en este proyecto profesional que decidí emprender hace años. Tú y nuestros hijos, nuestra familia, son mi proyecto principal de vida, el más importante, en el cuál trabajamos juntos todos los días sin descanso, aun así, tú has sabido entender lo importante que es para mí el terminar y cerrar este ciclo de estudios de doctorado a los cuales bastante tiempo ya les he invertido y que incluso mis ausencias en todos estos años se han convertido en parte de nuestra vida diaria. Te dedico este logro nuestro, es tuyo y mío, ya que ambos hemos trabajado mucho para sacarlo adelante. ¡Te amo!

A mis amados hijos **Héctor Daniel** e **Isaac Yael**, mi par de campeones, cada noche que regreso a casa ustedes dos me hacen recordar lo afortunado que soy y lo agradecido que estoy con la vida por tenerlos a ustedes. Han sentido mis ausencias y les debo mucho tiempo el cual les regresaré. Les dedico este logro que también es de ustedes. Espero con fe, lograr ser un ejemplo de vida para ambos, que sean personas de bien, que ayuden al prójimo y que amen lo que les guste hacer sea cual sea la actividad o profesión a la que se dediquen y más allá de querer obtener el reconocimiento y el aplauso ajeno, busquen lo más importante que es, ser felices, ya que en la felicidad se basa el éxito en la vida. ¡Los amo con toda mi existencia mis hermosos muchachos!

A mis amados hermanos **Karla** e **Iván**, por acompañarme durante toda mi vida y estar conmigo en los peores y mejores momentos de la misma. Compañeros de juegos y travesuras cuando niños. Formadores y ejemplo de nuestros hijos hoy en día... una gran responsabilidad. Juntos por siempre. ¡Los amo hermanos!

A mis amados sobrinos **Amanda**, **Andrea** y **Gael**, por venir a darle a nuestras vidas otro sentido, ustedes junto con mis hijos, serán la nueva generación que se está formando bajo nuestro ejemplo. ¡Los amo mis niños!

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**, mi "*Alma mater*"

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM**.

Al personal que conforma la Coordinación del Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, (especialmente a la **Facultad de Medicina**, como entidad participante), a la **Srita. Evangelina Vargas** (Auxiliar de Servicios Escolares) y a la **Lic. Marisol Villafañez** (Responsable de Servicios Escolares).

Al **Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca **228005**.

Al **Consejo Mexiquense para la Ciencia y Tecnología** (COMECyT) por el apoyo otorgado a través de la beca **12BCD0045-I**.

Al **Instituto Mexicano del Seguro Social** (IMSS) por todo el apoyo recibido durante la realización de mi tesis doctoral.

Al **Dr. César Raúl González Bonilla**, Coordinador de Investigación en Salud en el IMSS, tutor en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM e Investigador Nivel III en el Sistema Nacional de Investigadores (SNI); quien fungió como mi tutor principal durante mis estudios de doctorado. Gracias por su dirección, apoyo, consejos, confianza, enseñanzas, regaños, tiempo y sobre todo su paciencia durante todo este periodo en el cual pude aprender y desarrollar conocimientos y habilidades necesarias para desarrollarme como un mejor profesionista. Además, le estoy infinitamente agradecido por permitirme la oportunidad de pertenecer al Instituto Mexicano del Seguro Social.

A mi **comité tutorial** conformado por:

- **Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo**, Investigadora Titular B en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- **Dr. Constantino Roberto III López Macías**, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI" IMSS.

A ambos por su tutoría, interés y su valioso tiempo otorgados para la evaluación periódica del presente trabajo.

A la **Dra. Ericka Nelly Pompa Mera**, Investigadora Asociada C en la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI" IMSS; por su valiosa y gran aportación para la realización y finalización de este proyecto. Son muchas las anécdotas que tenemos durante todos estos años de trabajo continuo hombro a hombro, muchas las charlas al respecto, muchas las horas de trabajo en el laboratorio y escribiendo frente a la computadora. Infinitamente agradecido por tu tiempo, paciencia, enseñanzas, confianza, regaños, ejemplo y por permitirme ser tu amigo.

Al **M. en C. Julio Elias Alvarado Yaah**, Encargado de Área de Laboratorio Central de Epidemiología, Centro Médico Nacional “La Raza” IMSS; por su valiosa y gran aportación para la realización y finalización de este proyecto. Muchas gracias por su amistad, enseñanzas, críticas, consejos, tiempo y paciencia. Valoro todas y cada una de las charlas que tuvimos con respecto a este proyecto para llevarlo a su conclusión.

A las Investigadoras, miembros del Jurado para examen de grado:

- **Dra. Lilian Yopez Mulia.**
- **Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser.**
- **Dra. Norma Adriana Valdez Cruz.**
- **Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera.**

Por el valioso tiempo que proporcionaron para enriquecer con sus observaciones, sugerencias, conocimientos y experiencia, al presente trabajo escrito.

A mis compañeros y amigos integrantes del **Laboratorio Central de Epidemiología** que de alguna u otra forma estuvieron presentes en las buenas y en las malas durante la realización y finalización de este proyecto y que han hecho de mi estancia en el laboratorio una experiencia más agradable: **Dra. Melisa Martinez, QFB. Bernardo Martinez, Dr. Esteban Muñoz, M. en C. Andrés Sánchez, M. en C. Nancy Cortez, M. en C. Berenice Sánchez, M. en C. Juan Vázquez, M. en C. Alicia Ocaña, M. en C. Adriana Pedraza, Dra. Ángeles Hernández, Dra. Brenda Sarquiz, M. en C. Andrea Santoscoy, M. en C. Tamara López, Lic. Alfredo Torres, MVZ. Gabriel Vega, Ing. Laura Matus, Ing. Edgar Reyes, M. en C. Iliana Palomec, QBP. Jemima González, QFB. Sergio Ramírez, Q. Iván Escobar, M. en C. Javier Ángeles, M. en C. Rubicela Hernández, M. en C. Rafael Cruz, QFB. Moises Monzon, Biol. Juana Pablo, M. en C. Larissa Matano, M. en C. Paulina Fuentes, M. en C. Allison Cazares y M. en C. Luis Uribe.**

Al **Dr. Javier Torres**, jefe de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS; por permitirme el uso de las instalaciones y equipos de la unidad de investigación. Además, agradezco a los integrantes de esta unidad: **M. en C. Jonathan Bautista, Dra. Rocio Nieto, Dr. Félix Matadamas, M. en C. Jussara Ríos** y a la **estudiante de Biología Experimental Alejandra Rivera**, por su todo su apoyo y tiempo durante mi estancia con ellos.

A la **M. en C. Martha García** y al **Dr. Guillermo Gálvez** integrantes de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS; por todo su apoyo y tiempo cuando más lo necesité en la parte experimental de este proyecto.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	4
1.1. Autodespliegue en la superficie microbiana.	5
1.1.1. Sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.	6
1.1.2. Aplicaciones de los sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.	6
1.1.3. Limitaciones de los sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.	7
1.1.4. Proteína transportadora (motivo de anclaje).	8
1.1.5. Proteína diana (proteína pasajera).	9
1.1.6. Cepa acarreadora.	10
1.1.7. Sistemas de expresión en superficie desarrollados para bacterias Gram negativas.	11
1.2. Mecanismos de secreción en bacterias Gram negativas.	15
1.2.1. El mecanismo de secreción “autotransportador”.	19
1.2.2. Aplicaciones del sistema de secreción autotransportador.	26
1.2.3. El autotransportador <i>ShdA</i> de <i>Salmonella entérica</i> .	29
1.2.4. <i>ShdA</i> como dominio translocador en la expresión de péptidos heterólogos.	31
1.2.5. Sistemas de autoexpresión <i>in trans</i> .	32
1.3. Principios y aplicaciones del sistema de unión avidina-biotina.	34
1.3.1. Características de la interacción avidina-biotina.	34
1.3.2. Estructura y propiedades físico químicas de la avidina.	35
1.3.3. Estructura y propiedades físico químicas de la biotina.	36
1.3.4. Aplicaciones de la interacción avidina-biotina en sistemas de liberación a nano escala.	36
1.3.5. Aplicaciones de los sistemas de avidina-biotina a nano escala en diagnóstico y biotecnología.	39
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	42
2. Planteamiento del problema.	43
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.	45
3. Justificación.	46
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS.	48
4. Hipótesis.	49
CAPITULO 5. OBJETIVO.	50
5.1. Objetivo general.	51

5.1.1. Objetivos particulares.	51
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS.	52
6.1. Tecnología del DNA recombinante.	53
6.1.1. Construcción de los plásmidos pENP-avidina, pJEAY, pJEAY-avidina.	55
6.1.2. Secuenciación nucleotídica automatizada.	56
6.1.3. Preparación de bacterias competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α .	58
6.2. Caracterización y análisis de la expresión de proteínas.	59
6.2.1. Cultivo, curvas de crecimiento y condiciones de inducción con fines de expresión.	59
6.2.2. Extracción de proteínas totales y de proteínas membrana externa de las cepas recombinantes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α .	59
6.2.3. SDS-PAGE y Western-blot.	60
6.2.4. Microscopía de inmunofluorescencia confocal y análisis de citometría de flujo de las cepas de <i>Escherichia coli</i> DH5 α .	61
6.3. Capacidad de unión a biotina.	62
6.3.1. Evaluación de la capacidad de unión a biotina de las proteínas de fusión <i>ShdA</i> -avidina.	63
CAPÍTULO 7. RESULTADOS.	64
7.1. Construcción de los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión <i>sShdA</i> -avidina y <i>wShdA</i> -avidina.	65
7.2. Expresión de <i>ShdA</i> -avidina bajo el control del promotor <i>nirB</i> .	66
7.3. Efecto del plásmido sobre la cinética de crecimiento <i>E. coli</i> DH5 α .	68
7.4. Exposición de las proteínas de fusión <i>ShdA</i> -avidina sobre la superficie celular de <i>E. coli</i> DH5 α .	69
7.5. Capacidad de unión de <i>ShdA</i> -avidina a moléculas biotiniladas en la superficie de <i>E. coli</i> DH5 α .	69
CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN.	77
8. Discusión.	78
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES.	87
9. Conclusiones.	88
CAPITULO 10. PERSPECTIVAS.	90
10. Perspectivas.	91
REFERENCIAS.	92
PUBLICACIONES.	110

FIGURAS

Figura 1.	Aplicaciones del <i>autodespliegue</i> de moléculas en la superficie celular bacteriana.	7
Figura 2.	Sistema de <i>autodespliegue</i> en la superficie celular de bacterias Gram positivas.	10
Figura 3.	Sistemas de <i>autodespliegue</i> en la superficie celular en bacterias Gram negativas.	14
Figura 4.	Dominios y estructuras autotransportadoras.	21
Figura 5.	Mecanismo de secreción de las proteínas autotransportadoras.	22
Figura 6.	Modelo para la secreción del dominio pasajero autotransportador a través de la membrana externa.	25
Figura 7.	Autotransportadores como portadores para la secreción o exposición de secuencias de proteínas heterólogas.	28
Figura 8.	Regiones y dominios encontrados en <i>ShdA</i> .	30
Figura 9.	Diseño experimental del presente estudio.	53
Figura 10.	Representación esquemática de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina.	57
Figura 11.	Análisis electroforético en geles de agarosa al 1.0 %, de los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina.	65
Figura 12.	Expresión de las proteínas de fusión que contienen avidina monomérica recombinante en lisados de células completas y en fracción de membrana externa de <i>E. coli</i> DH5 α .	67
Figura 13.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.	68
Figura 14.	Exposición de la avidina monomérica recombinante sobre la superficie celular de las cepas de <i>E. coli</i> revelada por microscopia inmunofluorescencia confocal.	71
Figura 15.	Determinación de la concentración de biotina-4-fluoresceína unida a avidina monomérica recombinante presentada por <i>E. coli</i> DH5 α .	72
Figura 16.	Capacidad de unión a biotina de avidina monomérica recombinante en la superficie de <i>E. coli</i> DH5 α transformada con diferentes plásmidos.	75

Figura 17.	Determinación de la unión de moléculas biotiniladas a la avidina recombinante presentada en la superficie de <i>E. coli</i> DH5a mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA).	76
------------	---	----

TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.	54
Tabla 2.	Características particulares de cada uno de los plásmidos utilizados.	55
Tabla 3.	Lista de oligonucleótidos utilizados en la construcción de pENP-avidina; pJEAY; pJEAY-avidina.	58
Tabla 4.	Porcentaje de células bacterianas que unieron biotina-4-fluoreceína a diferentes concentraciones sobre la superficie celular de <i>E. coli</i> DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.	70
Tabla 5.	Porcentaje de células bacterianas que unieron biotina-4-fluoreceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M sobre la superficie celular de <i>E. coli</i> DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.	74

ABREVIATURAS

ABBS	Sistema de unión avidina-biotina (Avidin-Biotin Binding System).
Ag30	Péptido de 30 aminoácidos derivado la glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> .
AIDA	Adhesina involucrada en la adherencia difusa (Adhesin Involved in Diffuse Adherence).
Avi	Avidina.
Bam	Máquina de ensamblaje del β -barril (β -barrel assembly machine).
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumine).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid).
D.O.	Densidad óptica.
EM	Microscopia electrónica.
FLAG	Péptido bandera para detectar la expresión de la proteína de fusión.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
gp43	Glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> .
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
K_d	Constante de disociación.
LTB	Secuencia señal de tráfico de la subunidad B de la toxina termolábil de <i>E. coli</i> .
miRNA	Micro-ARN (microRNA).
nirB	Promotor nirB de la nitrato reductasa.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución amortiguadora ó buffer salino de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pI	Punto isoeléctrico.
OMP	Proteína de membrana externa (Outer Membrane Protein).
OVA	Ovoalbúmina.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
<i>ShdA</i>	Autotransportador <i>ShdA</i> , su nombre proviene de Shedding, que significa eliminar.
siRNA	ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA).
<i>sShdA</i>	Versión corta de <i>ShdA</i> (aminoácidos 1721-2035).
<i>wShdA</i>	Versión completa de <i>ShdA</i> (aminoácidos 1560-2035).

RESUMEN

La exposición de proteínas heterólogas en la superficie de enterobacterias mediante ingeniería genética tiene varias aplicaciones biotecnológicas, entre las cuales destaca el desarrollo de vacunas que se conocen como de acarreadores bacterianos. El sistema denominado *autodespliegue* (del inglés *autodisplay*) indica la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana a través del sistema de secreción tipo V (autotransportadores) de las bacterias Gram negativas, en las cuales se sustituye el dominio que forma el poro de translocación por la proteína pasajera, lo cual se conoce como expresión en *cis*. En este trabajo se propone un sistema en *trans* porque la bacteria se acopla a biomoléculas que no produce. Para ello, se utilizó el autotransportador *ShdA* de *Salmonella entérica*. Se construyeron dos proteínas de fusión *ShdA*-avidina con actividad de unión a biotina; la proteína *sShdA*-avidina (short) contiene 314 aminoácidos del autotransportador, mientras que la denominada *wShdA*-avidina (whole) contiene 476. Los ensayos de Western-blot revelados con anti-FLAG mostraron que la forma completa de *ShdA* (*wShdA*-avidina) se autodespliega mejor que la forma corta (*sShdA*-avidina) en la superficie de *E. coli DH5α*. Esto se corroboró mediante citometría de flujo; si bien no fue del todo eficiente pues sólo en una proporción de la población bacteriana expresó la avidina, la proporción fue mayor con *wShdA*-avidina (64%), en comparación con la *sShdA*-avidina (60.1%). Posiblemente la proteína de fusión *sShdA*-avidina es menos eficiente porque contiene una región *linker* más corta impidiendo un mejor autodespliegue. Aunque los plásmidos que codifican para las proteínas *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina pueden representar posiblemente una carga metabólica para la bacteria, se demostró que la avidina recombinante es funcional, ya que *E. coli* DH5α transformada con cualquiera de las dos formas de *ShdA* fue capaz de unir en su superficie biotina-FITC a una concentración de 2.5×10^{-4} M. Finalmente, mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró que la proteína de fusión *wShdA*-avidina es capaz de unir OVA-biotinilada. Este estudio puede contribuir al desarrollo de nuevas herramientas para la exposición en *trans* de biomoléculas heterólogas biotiniladas en la superficie de *E. coli*.

ABSTRACT

The exposure of heterologous proteins on the surface of enterobacteria by genetic engineering has several biotechnological applications, among which the development of vaccines that are found as bacterial carriers. The system called autodisplay indicates the expression of heterologous proteins on the bacterial surface through the type V secretion system (autotransporters) of Gram negative bacteria, in which the domain that forms the translocation pore is replaced by the transient protein, which is known as *in cis* expression. This paper proposes a system *in trans* because the bacterium is coupled to biomolecules that it does not produce. For this, the ShdA autotransporter of *Salmonella* enteric is found. Two ShdA avidin fusion proteins with biotin binding activity were constructed; the *sShdA*-avidin protein (brief) contains 314 amino acids of the autotransporter, while the specified *wShdA*-avidin (complete) contains 476. Westernblot assays revealed with anti-FLAG contain that the complete form of *ShdA* (*wShdA*-avidin) is expressed better than the short form (*sShdA*-avidin) on the surface of *E. coli* DH5 α . This was corroborated by flow cytometry; although it was not entirely efficient because only in a proportion of the bacterial population expressed avidin, the proportion was higher with *wShdA*-avidin (64%), compared to *sShdA*-avidin (60.1%). Possibly the *sShdA*-avidin fusion protein is less efficient because it contains a shorter *linker* region preventing better self-deployment. Although the plasmids encoding the *sShdA*-avidin and *wShdA*-avidin proteins can possibly identify a metabolic load for the bacteria, the recombinant avidin was shown to be functional, since *E. coli* DH5 α is transformed with either of two forms of *ShdA* it was able to bind on its surface biotin-FITC at a concentration of 2.5×10^{-4} M. Finally, by indirect immunofluorescent it was demonstrated that fusion protein *wShdA*-avidin is capable of binding biotinylated OVA. This study may contribute to the development of new tools for *in trans* exposure of biotinylated heterologous biomolecules on the surface of *E. coli*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Autodespliegue en la superficie microbiana.

La capacidad de producir proteínas recombinantes, con propiedades mejoradas, que incluyen mayor afinidad de unión, estabilidad y actividad catalítica, ha tenido un impacto significativo en la medicina, la investigación y la biotecnología (Cherf y Cochran, 2015). De hecho, en los últimos veinte años la expresión de péptidos o proteínas heterólogas, fusionadas a proteínas de anclaje a la membrana celular, ha ganado una atención creciente en la investigación básica y aplicada para la expresión de proteínas en la superficie celular bacteriana y de levaduras. Diversos microorganismos como bacterias y levaduras, representan excelentes células hospederas para la producción y expresión de proteínas recombinantes mostradas en la superficie celular (Cherf y Cochran, 2015; van et al., 2011).

El proceso de presentación de una proteína o péptido heterólogo (con funciones distintas en la célula hospedera), en la superficie celular, es conocido como *autodespliegue*. Este proceso, presenta ventajas considerables para muchas aplicaciones biotecnológicas. La molécula que se muestra en la superficie celular, es de libre acceso para el sustrato o ligando de unión (Jose y Meyer, 2007).

A pesar de tener una mejor comprensión de la química de proteínas y el plegamiento de las mismas, el diseño de estas, a partir de los principios elementales de ingeniería genética, sigue siendo todo un desafío (Jose y Meyer, 2007).

A través del uso de una amplia variedad de péptidos heterólogos, se han expresado un amplio espectro de proteínas transportadoras disponibles. A este respecto, ciertos sistemas de secreción a nivel de membrana celular externa de bacterias Gram negativas, involucran la vía de secreción de proteínas llamada *autotransportadores*, los cuales tienen un gran potencial para la expresión, exposición de proteínas en la superficie, con diversas aplicaciones biotecnológicas (Wernerus y Stahl, 2004).

1.1.1. Sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.

El primer sistema de expresión de moléculas en superficie fue desarrollado por George P. Smith en la década de los ochentas. Este sistema expresó en la superficie de bacteriófagos, pequeños péptidos fusionados con la proteína pIII del fago filamentosos. Como consecuencia, estos fagos pueden enriquecerse 1000 veces más que un fago normal gracias a la afinidad de un anticuerpo dirigido contra los péptidos fusionados a la proteína pIII (Smith, 1985). Desde entonces, se han desarrollado diversos sistemas para expresar proteínas heterólogas en la superficie de células bacterianas. Sin embargo, el tamaño de la proteína pasajera representó una dificultad que limitó en muchas ocasiones la eficiencia del sistema de expresión en la superficie del fago (Li, 2000). Para resolver este problema, se diseñó el sistema acarreador y de exposición de moléculas en la superficie bacteriana de *autodespliegue*, el cual consiste en expresar un péptido o proteína heteróloga de interés, como una proteína de fusión con varios motivos de anclaje, que normalmente son proteínas de la superficie celular o sus fragmentos (Lee et al., 2003).

1.1.2. Aplicaciones de los sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.

El *autodespliegue* de moléculas en la superficie de la célula bacteriana tiene una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo: producción de anticuerpos mediante la expresión de antígenos de superficie para obtener anticuerpos policlonales en animales (Martineau et al., 1991); bioadsorbente para la eliminación de productos químicos nocivos y metales pesados (Bae et al., 2000; Bae et al., 2002; Sousa et al., 1998; Xu y Lee, 1999); desarrollo de biosensores mediante el anclaje de proteínas, receptores u otros componentes sensibles a la señal con fines de diagnóstico, industriales o ambientales (Dhillon et al., 1999; Shibasaki et al., 2001); detección de cambios de aminoácidos individuales en péptidos diana después de mutagénesis aleatoria (Aoki et al., 2002); y desarrollo de vacunas vivas con células bacterianas patógenas atenuadas para obtener una respuesta protectora humoral de anticuerpos antígeno-específica y/o celular al exponer epítopos heterólogos al inmunizar un huésped (Westerlund-Wikstrom et al., 1997) (Fig. 1).

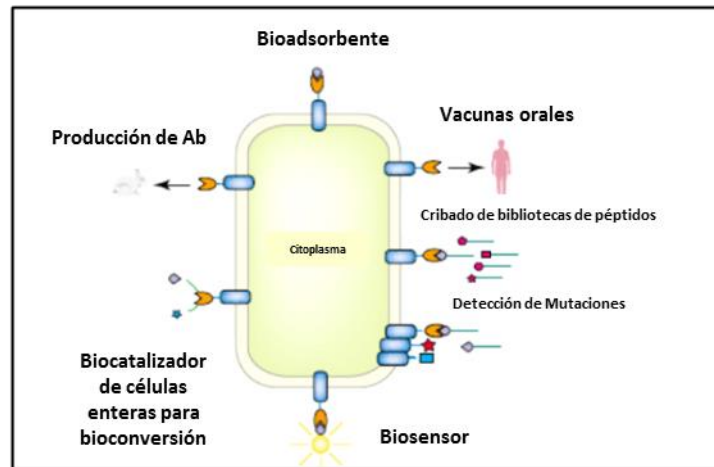


Figura 1. Aplicaciones del *autodespliegue* de moléculas en la superficie celular bacteriana. Modificado de: Lee et al., (2003).

1.1.3. Limitaciones de los sistemas bacterianos productores de proteínas recombinantes.

Se han desarrollado muchos sistemas acarreadores de *autodespliegue* de proteínas en superficie. Como consecuencia, se han observado diferentes efectos fisiológicos sobre las células huésped. Por ejemplo, el uso de proteínas que son esenciales para funciones celulares o estructurales, tales como proteínas de membrana externa, puede conducir a defectos de crecimiento y desestabilización de la integridad de la envoltura celular. Un sistema acarreador debe cumplir cuatro requisitos esenciales: 1. Debe tener un péptido señal o señal de transporte eficaz que permita a la proteína de fusión recién sintetizada pasar a través de la membrana interna; 2. Debe tener una fuerte estructura de anclaje para mantener a las proteínas de fusión sobre la superficie celular sin que éstas se desprendan; 3. La célula acarreadora no debe volverse inestable por la inserción o fusión de secuencias heterólogas; 4. Debe ser resistente al ataque de las proteasas presentes en el espacio o medio periplásmico. Cada tipo de acarreador tiene diferentes características y por lo tanto podría ser útil para aplicaciones específicas. Por ejemplo, las fimbrias bacterianas, las proteínas de la capa S y algunas proteínas de la membrana externa (tales como en *E. coli TraT*) son acarreadores eficaces para propósitos de inmunestimulación y por lo tanto son particularmente útiles para desarrollar vacunas recombinantes.

1.1.4. Proteína transportadora (motivo de anclaje).

La localización en el acarreador para la inserción o fusión de la proteína o péptido que se busca *autodesplegar* es importante porque influye en la eficacia de inmovilización, estabilidad, actividad específica y en la modificación post-traducciona de la proteína de fusión (Lee et al., 2003). Por ejemplo, en fimbrias de varias cepas de *E. coli* se examinaron cuatro posiciones en la FimA (aminoácidos en las posiciones 25, 45, 80 y 105) como sitios de fusión para insertar epítomos neutralizantes de la cadena B de la toxina del cólera. Tres posiciones (aminoácidos en las posiciones 25, 45 y 80) eran compatibles, pero una de ellas (aminoácidos en la posición 105) no lo era. Sus datos demuestran que el epítomo de la toxina del cólera insertado se presentó en una configuración antigénica que imitaba la de la toxina y se expuso en la superficie de los huéspedes bacterianos. El segmento CTB fue reconocido en el contexto de proteínas FimA quiméricas por dos métodos independientes, microscopía de fluorescencia y microscopía de electrónica, en la superficie de los huéspedes bacterianos (Stentebjerg-Olesen et al., 1997).

Debido a que la proteína que se va a *autodesplegar* debe estar orientada hacia el medio circundante, es importante identificar las regiones de la proteína acarreadora que están expuestas fuera de la célula. Por ejemplo, la molécula de OmpC de *E. coli* consta de 16 hebras β antiparalelas transmembrana, que producen una estructura de barril β que rodea un canal grande y están conectadas por siete bucles internos y ocho bucles externos. En general, las secuencias de aminoácidos de los bucles externos son menos conservadas y pueden ser relativamente tolerantes a la inserción y eliminación. Este enfoque se utilizó para identificar ocho bucles externos de OmpC de *E. coli* y uno de ellos se utilizó con éxito para lograr el *autodespliegue* en la superficie celular de péptidos de poli-histidina (Xu y Lee, 1999).

1.1.5. Proteína diana (proteína pasajera).

Se sabe que las características de las proteínas pasajeras (proteínas de fusión) afectan significativamente el proceso de transporte. La estructura plegable de la proteína pasajera (tal como la formación de puentes disulfuro) en el lado periplásmico de la membrana externa puede afectar su translocación (Jose et al., 1996; Maurer et al., 1997). Además, en la inserción de secuencias de aminoácidos que contienen muchos residuos hidrofóbicos se ha demostrado una secreción ineficiente en bacterias (Sjolander et al., 1993). Por ejemplo, en *S. xyloso*, un bacilo Gram positivo que se ha utilizado para la expresión superficial de una región de 101 aminoácidos, denominada G cys, derivada de la proteína G del virus respiratorio sincitial humano (VRS); se demostró por ensayos de receptores híbridos, que contiene esta región de la proteína G del VRS, la cual no podía dirigirse a la pared celular de las células huésped de *S. xyloso*, dado que esta región de la proteína G del VRS contenía una región de cuatro residuos de fenilalanina hidrófoba. La proteína pudo ser *autodesplegada* exitosamente cuando se generaron mediante mutagénesis dos variantes de esta región en la proteína VRS G. Una versión denominada G_{sub}, en la cual los cuatro residuos de fenilalanina agrupados fueron sustituidos por residuos de serina y en una segunda variante denominada G_{del}, en la cual se eliminaron nueve aminoácidos de fenilalanina (Nguyen et al., 1995). Por otro lado, cuando se usa esta estrategia de cambio de secuencias de aminoácidos, es posible que la alteración de la función biológica de la proteína pasajera sea un nuevo problema.

1.1.6. Cepa acarreadora.

La selección de una cepa acarreadora para el *autodespliegue* de proteínas en la superficie es un factor importante. Un buen acarreador debe ser compatible con la proteína que se va a *autodesplegar* y debe ser fácil de cultivar sin provocar lisis celular. Además, la cepa debe tener baja actividad de proteasas extracelulares y asociadas a la pared celular (Maurer et al., 1997).

La bacteria Gram positiva *Saccharomyces cerevisiae* es un buen candidato para *autodesplegar* proteínas y presenta varias ventajas sobre otras bacterias. En primer lugar, permite su uso en alimentos y aplicaciones farmacéuticas. En segundo lugar, sus mecanismos de plegamiento y secreción de proteínas son similares a los de las células de los mamíferos, lo que permite el *autodespliegue* de proteínas de mamíferos mejor que un sistema bacteriano. En tercer lugar, las proteínas pasajeras se pueden *autodesplegar* enlazadas a la pared celular a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Lee et al., 2003) (Fig. 2).

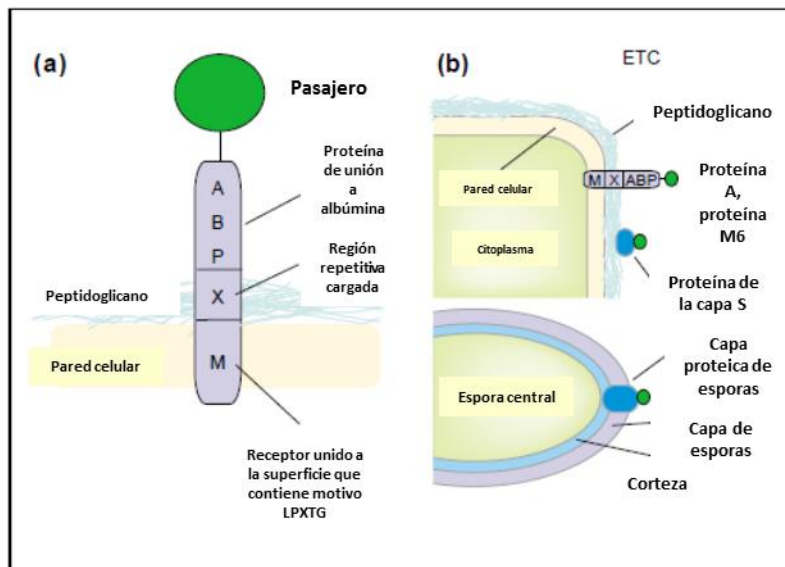


Figura 2. Sistema de *autodespliegue* en la superficie celular de bacterias Gram positivas. Los círculos verdes representan proteínas pasajeras heterólogas. (a) Sistema de *autodespliegue* en la superficie celular usando la proteína A de estafilococos como ejemplo representativo del método de fusión N-terminal (b) Ilustración esquemática del sistema de *autodespliegue* en la superficie celular construido en bacterias Gram positivas. Existen varias patentes disponibles para usar la proteína A como un motivo de anclaje. Modificado de: Lee et al., (2003).

1.1.7. Sistemas de expresión en superficie desarrollados para bacterias Gram negativas.

Las bacterias Gram negativas poseen una compleja estructura de envoltura celular que consta de membrana citoplasmática, periplasma y membrana externa. Esto significa que el motivo de anclaje superficial, fusionado con la proteína a *autodesplegar*, debe pasar a través de la membrana citoplasmática, el periplasma y la membrana externa. Los mecanismos de direccionamiento y anclaje de las proteínas acarreadoras varían entre las diferentes proteínas de superficie, es por eso que se han utilizado diferentes enfoques para desarrollar sistemas exitosos de *autodespliegue* (Lee et al., 2003).

El sistema de *autodespliegue* de proteínas recombinantes sobre la membrana de las formas L de *E. coli* y *Proteus mirabilis* mostró varios motivos de anclaje que han sido usados para el *autodespliegue* de proteínas en otras bacterias Gram negativas (Hoischen et al., 2002). (Fig. 3a). Existen diversas estrategias de fusión de genes en bacterias Gram negativas. El enfoque de fusionar la porción N-terminal es adecuado cuando la proteína transportadora posee una secuencia señal y un dominio de anclaje fusionado a su porción C-terminal. El peptidoglicano asociado a lipoproteína es un acarreador típico de proteínas de este tipo. La lipoproteína se une a la capa de peptidoglicano con su porción C-terminal y a la membrana externa con su cisteína N-terminal modificada por la fracción lipídica (Dhillon et al., 1999). En el caso de los miembros de la familia de proteasas de la inmunoglobulina A (IgA), estos contienen estructuras de autotransportador C-terminal que promueven la translocación de los dominios pasajeros unidos al N-terminal a través de la membrana externa (Jose et al., 1996). El dominio C-terminal forma canales de barril- β similares a porinas en la membrana externa para facilitar el transporte del dominio pasajero N-terminal. La proteína de adhesión de *E. coli* AIDA-I se usó como un motivo de anclaje para *autodesplegar* la adrenodoxina bovina dimérica (Adx) en la superficie celular. Este sistema puede usarse para la bioconversión de esteroides de células completas (Jose et al., 2002). Cuando la subunidad B de la toxina de cólera (CtxB) fue *autodesplegada* utilizando este sistema, el dominio pasajero fue liberado de la superficie celular por la acción de proteasas en el espacio enlazador (*linker*) (Maurer et al., 1997). Otro caso es la proteína VirG de *Shigella*, que es responsable de la deposición de actina filamentosa, la que ha sido utilizada como un motivo de anclaje para *autodesplegar* PhoA y MalE sobre la superficie de *E. coli* (Suzuki et al., 1995).

Varias proteínas de membrana externa llevan secuencias de direccionamiento en sus extremos N-terminal. Estas proteínas se pueden usar como proteínas transportadoras para construir sistemas de *autodespliegue* mediante el método de fusión a su C-terminal. El híbrido Lpp-OmpA es un buen ejemplo de este tipo. La Lpp es necesaria para la localización en la membrana externa; la OmpA es responsable del transporte de proteínas fusionadas al extremo C-terminal a través de la membrana externa (Bae et al., 2000; Richins et al., 1997).

La proteína de nucleación de hielo (INP) de *Pseudomonas syringae* es otro motivo de anclaje que ha sido usado exitosamente para *autodesplegar* varias proteínas por fusión al C-terminal, incluida la levansucrasa (LevU) de *Zymomonas mobilis* (Jung et al., 1998a), la carboximetilcelulosa (CMCase) de *Bacillus subtilis* (Jung et al., 1998b), la salmobin de *Agkistrodon halys* (Jeong et al., 2001) y la organofosforohidrolasa (OPH) una enzima bacteriana capaz de degradar un amplio rango de agentes neurotóxicos sintetizada por *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium* sp. (Cho et al., 2002). La INP es una proteína de membrana externa que se encuentra en *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Sus repeticiones internas la convierten en una región ajustable en cuanto a su longitud (Jung et al., 1998a; Jung et al., 1998b). Por lo tanto, es posible mostrar péptidos o proteínas usando motivos de INP de diferentes longitudes, lo que aumenta la probabilidad de evitar el impedimento estérico potencial entre las proteínas *autodesplegadas*. Mientras que la mayoría de los sistemas de exposición en la superficie celular están limitados por el tamaño de la proteína heteróloga a expresar, el sistema basado en INP puede expresar proteínas de hasta 60 kDa (Fig. 3b).

La enzima extracelular pululanasa de *Klebsiella pneumoniae*, permanece en la superficie de la célula temporalmente por medio del ácido graso unido a su cisteína N-terminal y se libera gradualmente en el medio (Kornacker y Pugsley, 1990). La β -lactamasa y la fosfatasa alcalina se han mostrado mediante el método de fusión C-terminal usando pululanasa como motivo de anclaje. Sin embargo, la pululanasa parece ser inadecuada como proteína transportadora en la mayoría de los casos, a menos que se pueda prevenir su liberación de la superficie celular (Lee et al., 2003).

La fusión *sandwich* es la estrategia más comúnmente utilizada para la exposición de proteínas en la superficie de bacterias Gram negativas. Se han usado tres clases de proteínas como proteínas transportadoras: proteínas de membrana externa (PME), proteínas de subunidades de apéndices extracelulares y proteínas de capa S. Las PME forman β -barriles transmembranales en la membrana externa. Los β -barriles están compuestos por pares antiparalelos de hebras- β conectadas por bucles

cortos en el lado periplásmico y por bucles largos en el lado externo. Los bucles externos son generalmente menos conservados y, por lo tanto, parecen ser tolerantes a un cierto grado de modificación, como sustitución, inserción y eliminación. Estos bucles externos potencialmente se pueden utilizar como sitios de fusión para el *autodespliegue* de proteínas heterólogas. En general, se creía que los bucles externos de las PME solo podrían aceptar péptidos heterólogos de 70 aminoácidos o menos debido a la alteración de la integridad de la membrana de la proteína transportadora (Georgiou et al., 1997). Esta limitación también se aplica cuando los apéndices superficiales bacterianos se usan como socios de fusión en sandwich. Sin embargo, se ha demostrado que la OmpC de *E. coli* podría usarse como un socio de fusión en sandwich, mostrando muchos polipéptidos más largos de 162 aminoácidos, que es el péptido más grande insertado hasta la fecha utilizando el método de fusión sandwich (Fig. 3c) (Xu y Lee, 1999). La proteína LamB de *E. coli*, que transporta maltosa y maltodextrina, también se usó como un motivo de anclaje en sandwich. Sin embargo, solo se pueden mostrar polipéptidos cortos de hasta 88 aminoácidos (Martineau et al., 1991). Algunas proteínas transportadoras pueden mostrar péptidos extraños en más de un sitio de fusión: *E. coli* TraT es una proteína transportadora de este tipo. Los péptidos pasajeros podrían fusionarse no solo en el medio de TraT (Taylor et al., 1990), sino también en el extremo C-terminal. Cuando se expuso el veneno de serpiente rhodostomina, una distintegrina, en la superficie de *E. coli* usando TraT, *E. coli* recombinante se adhirió e internalizó en células de hámster BHK-21 (Chang et al., 1999). La proteína OmpC también se puede utilizar como un motivo de anclaje, aceptando las proteínas pasajeras tanto por fusión sandwich (Xu y Lee, 1999) o por fusión C-terminal.

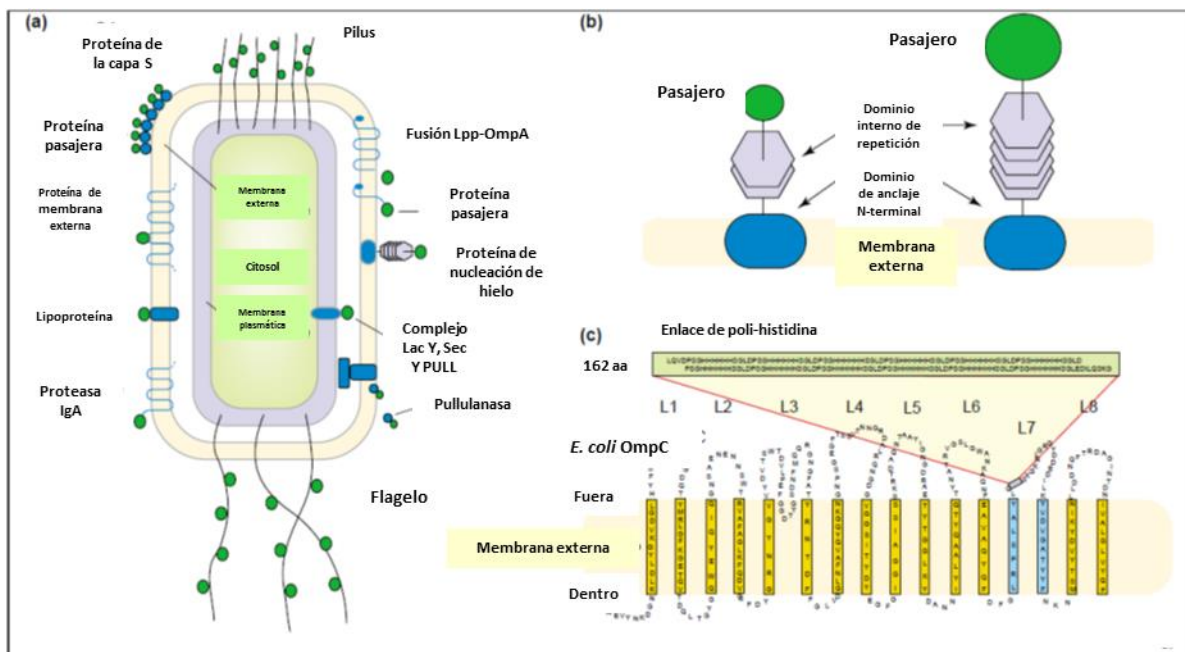


Figura 3. Sistemas de *autodespliegue* en la superficie celular en bacterias Gram negativas. Los círculos verdes representan proteínas pasajeras heterólogas. **(a)** Sistemas de *autodespliegue* en superficie desarrollados en bacterias Gram negativas. **(b)** Sistema de *autodespliegue* en la superficie celular que utiliza proteína de nucleación de hielo (INP), que es un ejemplo representativo del método de fusión N-terminal. El INP es el portador más estable y útil para expresar proteínas extrañas de hasta 60 kDa. **(c)** Sistema de *autodespliegue* en la superficie celular que utiliza la proteína C de la membrana externa de *E. coli*, que es un ejemplo representativo del método de fusión en sándwich. En este sistema, podrían insertarse péptidos de poli-histidina (poli-His) de hasta 162 aminoácidos en el séptimo bucle externo (L7) de *OmpC* y podrían *autodesplegarse* de manera eficiente en la superficie celular de *E. coli*. Modificado de: Lee et al., (2003).

Las proteínas de subunidades de *E. coli* como flagelo y fimbrias (o pili), se pueden usar para *autodesplegar* proteínas heterólogas. Algunos de los sitios expuestos de las proteínas de las subunidades principales son prescindibles y son relativamente tolerantes a aceptar secuencias heterólogas. Las subunidades quiméricas que llevan polipéptidos extraños todavía se pueden ensamblar en apéndices poliméricos, siempre que cada una de ellas lleve un segmento de péptido extraño (Stentebjerg-Olesen et al., 1997; Westerlund-Wikstrom et al., 1997).

Se encontró que la proteína de la capa S de la bacteria Gram negativa *C. crescentus* contiene un dominio N-terminal que puede unirse a la membrana externa, y un extremo C-terminal que transmite una señal de secreción (Bingle et al., 1997b). Esta proteína de la capa S se utilizó para mostrar un péptido de 12 aminoácidos de *Pseudomonas aeruginosa* K pilina en *C. crescentus* (Bingle et al., 1997a).

1.2. Mecanismos de secreción en bacterias Gram negativas.

Los patógenos bacterianos han desarrollado diferentes sistemas de secreción (SS) de moléculas de virulencia de naturaleza proteica a través de sus membranas celulares (Green y Mecsas, 2016). Debido a que estas proteínas secretadas actúan como factores de virulencia, que generan productos tóxicos para las células huésped y que pueden facilitar la adhesión a estas células, los patógenos bacterianos pueden invadir a otros microorganismos evadiendo el sistema inmune del huésped, produciendo daño tisular, diseminarse dentro de las células huésped para sobrevivir y multiplicarse (Henderson y Nataro, 2001a). Es por ello, que los sistemas de secreción juegan un papel importante en la comunicación bacteriana. Hasta el día de hoy, se han descrito 8 tipos de sistemas de secreción (SST1, SST2, SST3, SST4, SST5, SST6, SST7 y SST9) los cuales tienen diferentes funciones tales como el transporte de proteasas, lipasas, adhesinas, proteínas de unión a hemo y amidasas. Además de funciones específicas como la síntesis de proteínas en las células huésped, adaptación al medio ambiente, secreción de efectores para establecer un nicho infeccioso, transferencia, absorción y liberación de ADN, translocación de proteínas efectoras o ADN y secreción de autotransportadores. Todas estas funciones pueden contribuir a la virulencia y la patogénesis (Pena et al., 2019).

El sistema de secreción tipo I (SST1) está ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis* y *E. coli* (Thomas et al., 2014). El SST1 el cual tiene tres elementos estructurales (la proteína transportadora ABC, una proteína de fusión de membrana y un factor de membrana externa), pueden transferir sustratos a través de ambas membranas bacterianas en bacterias Gram negativas en un proceso de un solo paso (Green y Mecsas, 2016). El SST1 usa proteínas como sustratos, por ejemplo, proteasas y lipasas de diferentes tamaños y con diferentes funciones; estas proteínas tienen una señal de secreción no escindida en el extremo C-terminal que es reconocida por la proteína transportadora ABC para formar el complejo de translocación (Delepelaire, 2004; Kanonenberg et al., 2013). Hasta ahora se han descrito dos sistemas que regulan la expresión y secreción de sustratos a través del SST1, el sistema Has de *S. marcescens* y *P. aeruginosa*, y las hemolisinas de *Vibrio cholerae*, *N. meningitidis* y, en particular, de la *E. coli* uropatógena (Thomas et al., 2014).

El sistema de secreción tipo II (SST2), se conserva en la mayoría de las bacterias Gram negativas, es responsable de la secreción de proteínas plegadas del periplasma. Estas proteínas se transportan

primero a través de la membrana interna mediante la vía de translocación secretora general *Sec*, y por la vía de translocación de doble arinina *Tat*, luego se secretan del periplasma al medio extracelular por el SST2 (Green y Mecsas, 2016). El SST2 es una estructura compleja compuesta por 15 proteínas, denominadas proteínas de la vía de secreción general (Gsp) en *E. coli*, Eps en *V. cholera* y Xcp en *P. aeruginosa*, tiene una amplia gama de sustratos con diversas funciones, aunque todos comparten una característica, una señal N-terminal que les permite pasar al periplasma a través de los mecanismos de secreción *Sec* o *Tat* (Green y Mecsas, 2016; Nivaskumar y Francetic, 2014). La función principal del SST2 es adquirir nutrientes. Es responsable de la secreción de numerosas exoproteínas, la mayoría de las cuales son enzimas hidrolíticas y otras proteínas como toxinas, adhesinas y citocromos que desempeñan diversas funciones en la respiración, la formación de biopelículas y la motilidad. El SST2 ha estado en varias cepas ambientales y también en patógenos humanos como *V. cholera*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas* sp. y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Nivaskumar y Francetic, 2014).

El sistema de secreción de tipo III (SST3) o inyectosoma, es un aparato con doble membrana incrustada que se encuentra en múltiples bacterias patógenas Gram negativas como *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica, *Shigella* spp. y *Pseudomonas* spp. (Deng et al., 2017; Gaytan et al., 2016). Esta maquinaria compleja promueve la transferencia de proteínas de virulencia llamadas efectores desde el citoplasma bacteriano a la célula eucariota en un solo paso (Galan y Waksman, 2018). El SST3 está compuesto por aproximadamente 25 proteínas ensambladas en tres estructuras principales: el cuerpo basal, un conjunto de anillos que abarcan las dos membranas de la bacteria; un componente hueco en forma de aguja a través del cual se transportan los efectores semi-desplegados (estas dos primeras estructuras se denominan colectivamente "complejo de agujas"); y el translocón, compuesto por una proteína hidrófila que sirve como andamio para formar un poro de translocación, constituido por dos proteínas hidrófobas, que se inserta en la membrana de la célula huésped y a través de la cual se translocan directamente los efectores. Cada patógeno entrega un conjunto único de efectores, que subvierte las rutas específicas de señalización de la célula huésped para permitir la colonización bacteriana (Deng et al., 2017; Izore et al., 2011; Notti y Stebbins, 2016). El aparato de exportación asociado con el cuerpo basal está formado por cinco proteínas de membrana interna de polietileno que son esenciales para la secreción de sustrato. Este complejo de proteínas, junto con una plataforma de clasificación citoplasmática y el complejo ATPasa, son responsables del reclutamiento y la

clasificación del sustrato, y de energizar el proceso de secreción que permite la disociación del efector chaperona y el despliegue de proteínas para la entrada inicial en el canal central SST3 que sirve como la vía de secreción. Estos componentes están altamente conservados entre los diferentes sistemas SST3 con el flagelo, que está evolutivamente relacionado con el inyector (Abby y Rocha, 2012; Galan y Waksman, 2018). Se han descrito varios efectores del SST3 como ExoS, ExoT, ExoU y ExoY en *P. aeruginosa*; Tir y EspE en *E. coli* e YopE, YopH, YopM, YopJ / P, YopO / YpkA y YopT en *Yersinia* sp. (Cornelis y Van, 2000).

La familia del sistema de secreción tipo IV se encuentra en bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como en Archaea. El SST4 es el sistema de secreción más cosmopolita y difiere de otros SS, ya que es capaz de transferir ADN además de proteínas (Cascales y Christie, 2003). Más específicamente, el SST4 es capaz de realizar la secreción dependiente del contacto de moléculas efectoras en células eucariotas, la transferencia conjugativa de elementos móviles de ADN y también el intercambio de ADN sin ningún contacto con el exterior de la célula (Green y Meccas, 2016; Grohmann et al., 2018). El SST4 se puede dividir en función de su funcionalidad en dos subfamilias: sistemas de conjugación y translocadores efectores. Los sistemas de conjugación son responsables de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos y determinantes de virulencia entre bacterias. Los translocadores efectores introducen factores de virulencia en la célula huésped (Christie, 2016). Sin embargo, en bacterias Gram negativas, el SST4 se ha dividido en dos subfamilias diferentes: IVA y IVB. Los aparatos de conjugación de *E. coli* y el sistema VirB/D de *Agrobacterium tumefaciens* son los modelos utilizados para estudiar la estructura del tipo IVA del SST4 (Grohmann et al., 2018). El aparato VirB/D consta de 12 proteínas que forman una estructura compleja que abarca la envoltura que facilita la función de translocación. Dos de estas proteínas, VirB2 y VirB5, forman el pilus, mientras que otras tres proteínas actúan como ATPasas, y VirB1 es una transglicosilasa lítica (Costa et al., 2015; Green y Meccas, 2016). El sistema de *Legionella pneumophila* Dot/Icm (defectuoso para el tráfico de orgánulos/multiplicación intracelular) es el modelo utilizado para estudiar la subfamilia IVB del SST4 (Grohmann et al., 2018; Nagai y Kubori, 2011).

El sistema de secreción tipo V es único porque sus sustratos se transportan a través de la membrana externa. Los sustratos usan la maquinaria de translocación Sec para pasar a través de la membrana interna al espacio periplásmico. Se han identificado varios tipos diferentes de SST5:

autotransportadores (SST5a), translocadores de pasajeros de dos socios (SST5b), autotransportadores triméricos (SST5c), autotransportadores híbridos (SST5d) y autotransportadores invertidos (SST5e) (Henderson et al., 2004; Leo et al., 2012; Rojas-Lopez et al., 2017). En general, el SST5 transporta proteínas a través de la membrana externa (ME) que contiene lipopolisacáridos, a través de su propio dominio de translocación C-terminal que se inserta en la ME como un β -barril para completar la secreción del dominio del pasajero N-terminal a través del poro del β -barril. Varias chaperonas periplásmicas también participan en el transporte a través de la ME, específicamente la maquinaria de ensamblaje β -barril (complejo BAM) y el módulo de translocación y ensamblaje (complejo TAM) facilitan la secreción de proteínas (Rojas-Lopez et al., 2017). Se ha descrito un SST5 en patógenos humanos como *Bordetella pertussis* y *Haemophilus influenzae*, que tienen SS de dos socios y *E. coli* uropatógena, que tiene sistemas de chaperonas de acompañamiento (Costa et al., 2015; Green y Meccas, 2016). YadA de *Yersinia enterocolitica* y SadA de *Salmonella* son T5SS tipo c. Intimina de *E. coli* enteropatógena e invasiva de *Yersinia* spp. son de tipo Ve SS (Leo et al., 2012). Un autotransportador (SST5a) (Wilhelm et al., 2007a) y tres SST5b: sistema LepA /LepB (Kida et al., 2008), el sistema CupB (Ruer et al., 2008) y el sistema PdtA/PdtB (Faure et al., 2014), han sido reportados en *P. aeruginosa*. En *B. cenocepacia*, se han encontrado cuatro SST5 (Holden et al., 2009), dos con dominios de pertactina y dos con autotransportadores de hemaglutinina; este último tipo también está presente en *S. maltophilia* (Ryan et al., 2009).

El sistema de secreción tipo VI está ampliamente representado en bacterias Gram negativas (Coulthurst, 2013; Gallique et al., 2017b). El SST6 es un dispositivo de secreción integrado dentro de la membrana y transfiere sustratos, que son efectores tóxicos a las células eucariotas (Pukatzki et al., 2007) y procariotas (Russell et al., 2014). Desempeña un papel crucial en la patogénesis y la competencia entre bacterias (Costa et al., 2015; Gallique et al., 2017a; Ho et al., 2014; Zoued et al., 2014). El origen del SST6 está relacionado con bacteriófagos (Leiman et al., 2009). El SST6 es un aparato enorme y consta de 13 componentes centrales organizados en un complejo transmembrana, una estructura similar a una placa base en la cara citoplasmática de la membrana interna y un tubo interno revestido, que es el módulo de entrega efector que se expulsa a la célula diana. El complejo tubo-vaina se ensambla a partir de la placa base en el citoplasma y el tubo hueco se construye a partir de hexámeros de la proteína corregulada con hemolisina (Hcp). La vaina se contrae y empuja el tubo con los efectores asociados hacia las células objetivo, utilizando un

mecanismo de perforación similar al utilizado por las colas contráctiles de los fagos (Cianfanelli et al., 2016; Galan y Waksman, 2018; Green y Meccas, 2016).

El sistema de secreción tipo VII se ha descrito en algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y en especies de *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Este SS se reportó por primera vez en 2003 en *Mycobacterium tuberculosis* y se llamó ESX-1 (Stanley et al., 2003), que es un importante factor de virulencia en *M. tuberculosis*. Hasta la fecha, se han identificado cinco SST7 en *Mycobacterium* sp. pero los mecanismos de transporte a través de la membrana micobacteriana son casi desconocidos (Ates et al., 2016; Costa et al., 2015; Green y Meccas, 2016). La mayoría de los sustratos del SST7 pertenecen al clan EscAB que incluye seis familias de proteínas: Esx, PE, PPE, LXG, DUF2563 y DUF2580. ESAT-6 es una proteína de *M. tuberculosis* que pertenece a la familia Esx y que es secretada con EsxB (CFP-10) (Ates et al., 2016).

El sistema de secreción tipo IX (SST9) o sistema de secreción Por (SSPor), es el sistema descubierto más recientemente (Lasica et al., 2017). Su función es transportar moléculas a través de la membrana externa. Sus sustratos deben incluir una señal *Sec*, que permite la transferencia de proteínas a través de la membrana interna con la ayuda del sistema *Sec*. El SST9 se ha descrito en casi todos los miembros del filo *Bacteroidetes*, pero se ha estudiado principalmente en patógenos orales como *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. En *P. gingivalis*, el sistema SST9 consta de 16 proteínas con actividad estructural y funcional, y otras dos proteínas involucradas en la regulación del proceso de transporte (Lasica et al., 2017; Sato et al., 2010).

1.2.1. El mecanismo de secreción “autotransportador”

Para lograr sus objetivos fisiológicos, la mayoría de las bacterias Gram negativas deben secretar varias proteínas diferentes dentro o más allá de la membrana externa. Existen diferentes vías de secreción que transportan proteínas a través de la envoltura celular al medio extracelular. Entre estos, los autotransportadores monoméricos clásicos son la vía más ampliamente aplicada para exportar proteínas heterólogas con fines biotecnológicos y biomédicos (Jose y Meyer, 2007; Nicolay et al., 2015). Las bacterias Gram negativas utilizan de forma ubicua los autotransportadores clásicos para exportar los factores de colonización y virulencia a la superficie celular o al entorno. Se expresan como proteínas monoméricas que pasan la membrana interna y externa en dos pasos

consecutivos facilitados por el translocón *Sec* y el complejo BAM, respectivamente (van et al., 2018a). Los autotransportadores se descubrieron como factores que contribuyen a la virulencia de los patógenos Gram negativos al actuar como adhesinas, citotoxinas y proteasas que hidrolizan los componentes del sistema inmune del huésped (Henderson y Nataro, 2001b). Se clasifican como *Tipo Va* de la vía de secreción Tipo V, que es un grupo de sistemas de secreción bastantes simples y relacionados que median el paso de la membrana interna y externa de las bacterias Gram negativas en dos pasos consecutivos. Otras ramas de Tipo V son los dos sistemas de secreción asociados (*Tipo Vb*), los autotransportadores triméricos (*Tipo Vc*), los autotransportadores de tipo patatin (*Tipo Vd*) y los autotransportadores de tipo inverso o tipo Intimin (*Tipo Ve*) (Grijpstra et al., 2013; Leo et al., 2012).

Los autotransportadores incluyen múltiples dominios y subdominios involucrados en la secreción sobre la superficie celular (Dautin y Bernstein, 2007; Drobnak et al., 2015; Henderson et al., 1998). Los principales dominios involucrados son el dominio péptido señal amino terminal (N-terminal) y el dominio translocador carboxilo terminal (C-terminal) denominado dominio β (β -barril), que facilitan la orientación y el paso por la membrana interna y externa, respectivamente. Entre los dos dominios de orientación está el dominio secretado, la proteína madura "localizada en superficie" denominada α o dominio pasajero, que lleva la función biológica (Fig. 4a). Aunque la mayoría de los dominios pasajeros se escinden proteolíticamente de su dominio translocador después de alcanzar la superficie celular, permanecen unidos a esa superficie a través de interacciones no covalentes o se liberan en el medio extracelular. Excepciones conocidas son las esterases/hidrolasas lipolíticas, que no se escinden de sus dominios translocadores (Celik et al., 2012; van den Berg, 2010).

Las primeras estructuras obtenidas por cristalografía de los dominios pasajeros mostraron un tallo β -helicoidal rígido del cual sobresalen los dominios laterales funcionales (Emsley et al., 1996; Otto et al., 2005) (Fig. 4b). Sin embargo, no todos los dominios pasajeros son β -helicoidales, como se muestra para la esterasa *EstA* (van den Berg, 2010) y como se ha predicho para otros dominios pasajeros (Celik et al., 2012; Rojas-Lopez et al., 2017). Por el contrario, todas las predicciones y estructuras del dominio translocador muestran un β -barril de 12 cadenas con el poro ocupado por un segmento *linker* (enlazador) que conecta al dominio pasajero con el β barril (Barnard et al., 2007; Oomen et al., 2004; Tajima et al., 2010; Zhai et al., 2011). Este *linker* adopta un pliegue α -helicoidal

en la luz del barril y bloquea el poro cuando se libera al dominio pasajero (Fig. 5) (Roussel-Jazede et al., 2011).

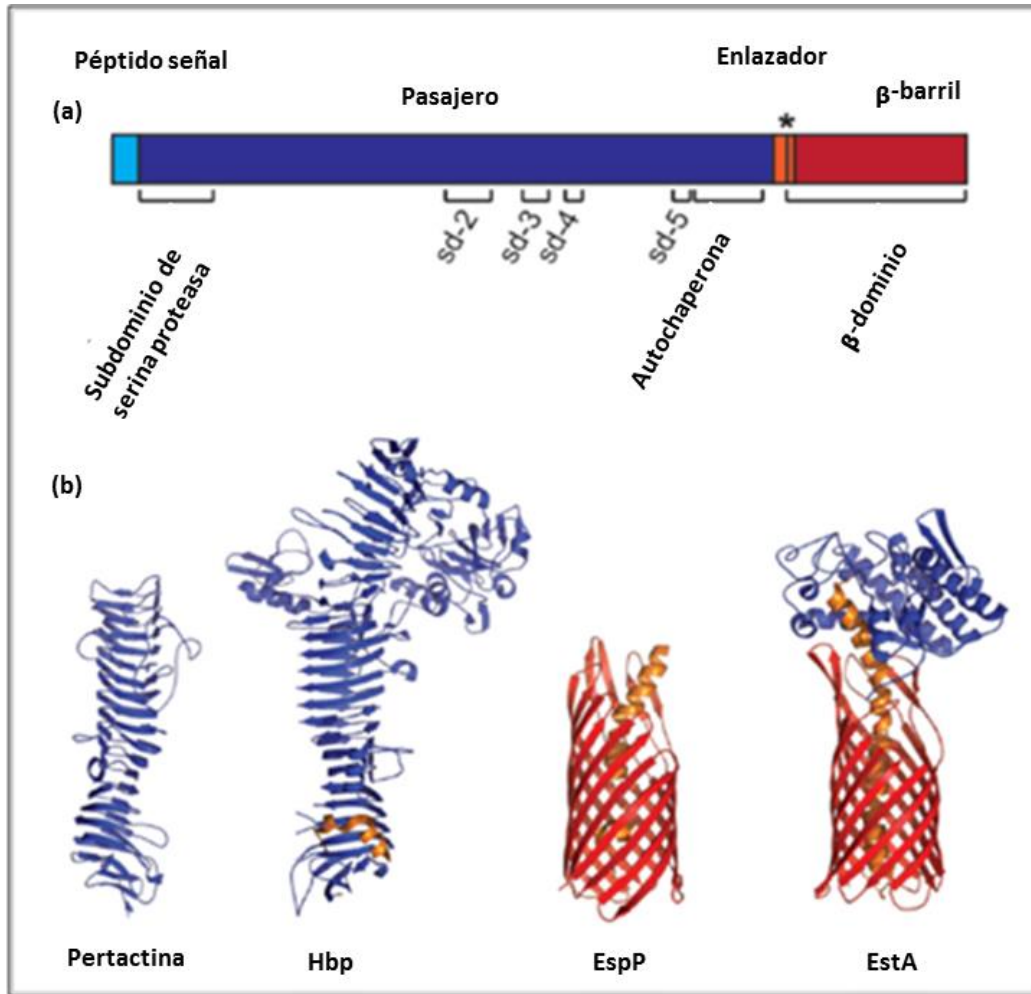


Figura 4. Dominios y estructuras autotransportadoras. (a) Descripción esquemática de los dominios de los autotransportadores monoméricos clásicos usando el HP de *E. coli* como ejemplo. El tamaño de los dominios indicados es proporcional a su longitud real. La nomenclatura de los dominios autotransportadores puede diferir entre autotransportadores y estudios. (b) Ejemplos de estructuras por cristalografía del dominio autotransportador. De izquierda a derecha: el dominio pasajero de pertactina, el dominio pasajero de Hbp (1WXR), el enlazador y el β barril de EspP (3SLO, que muestra la unidad antes de la escisión proteolítica) y EstA (3KVN). EstA incluye un pasajero que no se libera proteolíticamente de su β -barril y no se pliega en una estructura de tallo β -helicoidal. Modificado de: van Ulsen (2018).

Los autotransportadores han sido aprovechados para la exploración de los sistemas de secreción de polipéptidos heterólogos debido a su versatilidad y aparente simplicidad (Jose y Meyer, 2007). De

hecho, la inserción genética de tales secuencias entre el péptido señal y el dominio translocador a menudo resultó en la secreción exitosa de proteínas recombinantes. Además, la mutación del sitio de escisión proteolítica que separa al dominio pasajero del dominio translocador dio lugar a la exposición o visualización de los dominios pasajeros autotransportadores en la superficie de la célula (Jong et al., 2014). Además, ayudó a desarrollar el autotransporte como una herramienta biotecnológica versátil que se puede usar para muchos propósitos, incluida la visualización de bibliotecas de péptidos, vacunas o la localización de actividades enzimáticas en la superficie celular (Jong et al., 2010; Jose y Meyer, 2007; Nicolay et al., 2015).

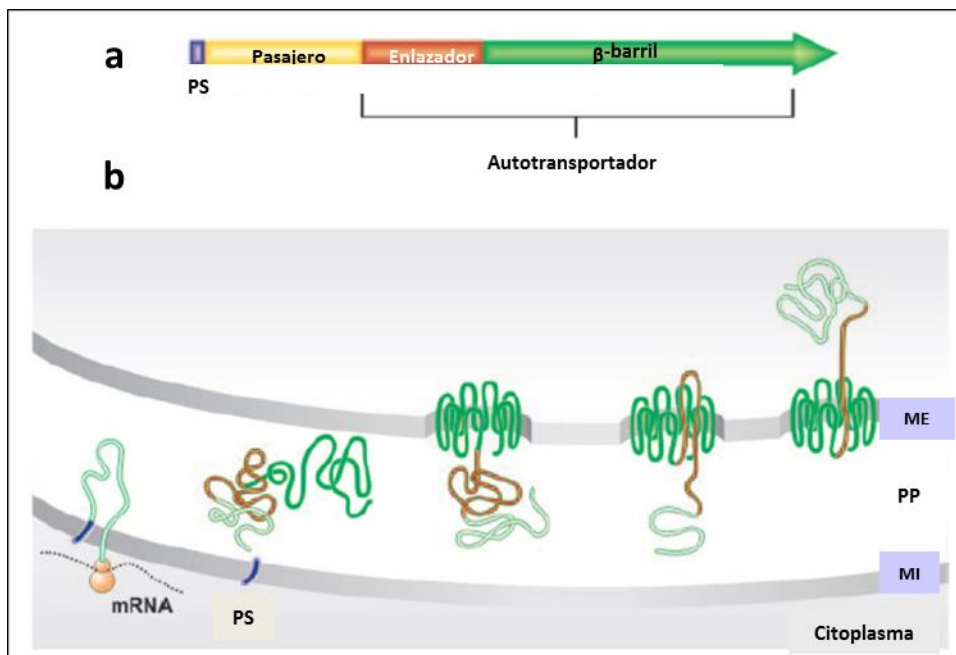


Figura 5. Mecanismo de secreción de las proteínas autotransportadoras. (a) Estructura del precursor de la poliproteína. (b) Transporte del dominio pasajero recombinante. Mediante el uso de un péptido señal típico, una proteína precursora llega a los compartimentos externos, tales como la membrana externa y el periplasma. Una vez en el periplasma, el dominio C-terminal del precursor se pliega en una estructura similar a la de una porina, el llamado β -barril permanece dentro de la membrana externa y el dominio pasajero se transmite a la superficie de la célula. PS: péptido señal; MI: membrana interna; PP: periplasma; ME: membrana externa. Modificado de: Jose y Meyer (2007).

Los autotransportadores se expresan como polipéptidos únicos que atraviesan la membrana interna de la célula Gram negativa a través del translocón *Sec*, que es el objetivo del péptido señal N-terminal. Este paso es un primer cuello de botella en el proceso de secreción con implicaciones para

los pasos posteriores (Brasemann et al., 2016; Jong et al., 2010; Szabady et al., 2005). En el periplasma, el dominio translocador se pliega en un β -barril de 12 cadenas y se inserta en la membrana externa para soportar el transporte del dominio pasajero a la superficie de la célula. La conformación β -barril es el pliegue general para las PME. La inserción del dominio translocador a la membrana externa, así como la secreción del dominio pasajero, requieren del complejo BAM (máquinaria de ensamblaje del β -barril) (Wu et al., 2005). De hecho, las vías para la secreción y el ensamblaje del autotransportador de proteínas de membrana externa se superponen, y comparten muchos factores involucrados en el autotransporte y la biogénesis de PME. En el periplasma, los autotransportadores interactúan con las chaperonas periplásmicas *SurA*, *Skp* y *DegP*. *SurA* y *Skp* se unen al autotransportador naciente antes y durante las interacciones con el complejo BAM, aunque ambos factores no son esenciales para la secreción del autotransportador (Ruiz-Perez et al., 2009a).

Los estudios detallados del plegamiento de la PME *FhuA* utilizando microscopía de fuerza atómica demostraron que tanto *Skp* como *SurA* previenen el plegado y la agregación del β -barril de *FhuA*, mientras que *SurA* también promueve su correcto plegamiento (Thoma et al., 2015). La interacción de los autotransportadores nacientes con las dos chaperonas se demostró en experimentos de entrecruzamiento utilizando mutantes de los autotransportadores *EspP* y *Hbp* que permanecieron pegados en la membrana externa muy cerca del complejo BAM (Ieva y Bernstein, 2009; Ieva et al., 2011; Pavlova et al., 2013; Peterson et al., 2010; Sauri et al., 2009; Soprova et al., 2010). Estos estudios indicaron que tanto el dominio pasajero como el translocador interactúan con las chaperonas en el contexto del complejo BAM.

La proteasa periplásmica *DegP* es parte de la respuesta al estrés de la envoltura celular σ^E que se induce cuando se acumulan PME nacientes (Raivio, 2005). *DegP* combina una función chaperona para el plegado de las PME y una actividad de proteasa para degradar las PME que no se ensamblan en la membrana externa (Spiess et al., 1999). De acuerdo con esta función de vigilancia, los autotransportadores mutantes estancados que se acumulan dentro del complejo BAM también se degradan por *DegP* (Jong et al., 2007; Junker et al., 2009; Peterson et al., 2017; Ruiz-Perez et al., 2009b). En general, las chaperonas mantienen a los autotransportadores en un estado competente de secreción y parecen actuar como un sistema de control de calidad cuando se dificulta la secreción.

La PME *BamA* es la subunidad principal del complejo de BAM y consiste en un β -barril de 16 cadenas con una puerta lateral formada por las cadenas β cortas y flexibles (Iadanza et al., 2016; Noinaj et al., 2014; Noinaj et al., 2013). El β -barril también parece comprimir la bicapa lipídica de la membrana externa, lo que podría ayudar a disminuir la barrera energética para que las superficies hidrófobas se inserten en los lípidos de la membrana externa (Noinaj et al., 2013). El N-terminal del β -barril de la proteína *BamA* tiene cinco dominios POTRA que se extienden hacia el espacio periplásmico (Kim et al., 2007). Actúan como dominios receptores para complejos de chaperonas de sustrato y ensamblan las cuatro lipoproteínas accesorias (*BamB-E*) que también forman parte del complejo de BAM (Bakelar et al., 2016). Juntos, *BamB-E* forman una estructura dinámica similar a un anillo debajo del β -barril de *BamA*, de la cual la subunidad *BamC* también puede estar parcialmente expuesta superficialmente en conformaciones específicas del complejo BAM (Webb et al., 2012a). Varias observaciones indican que el ensamblaje del dominio translocador autotransportador en la membrana externa y la translocación del dominio pasajero a la superficie celular ocurren simultáneamente coordinados por el complejo BAM (Fig. 6).

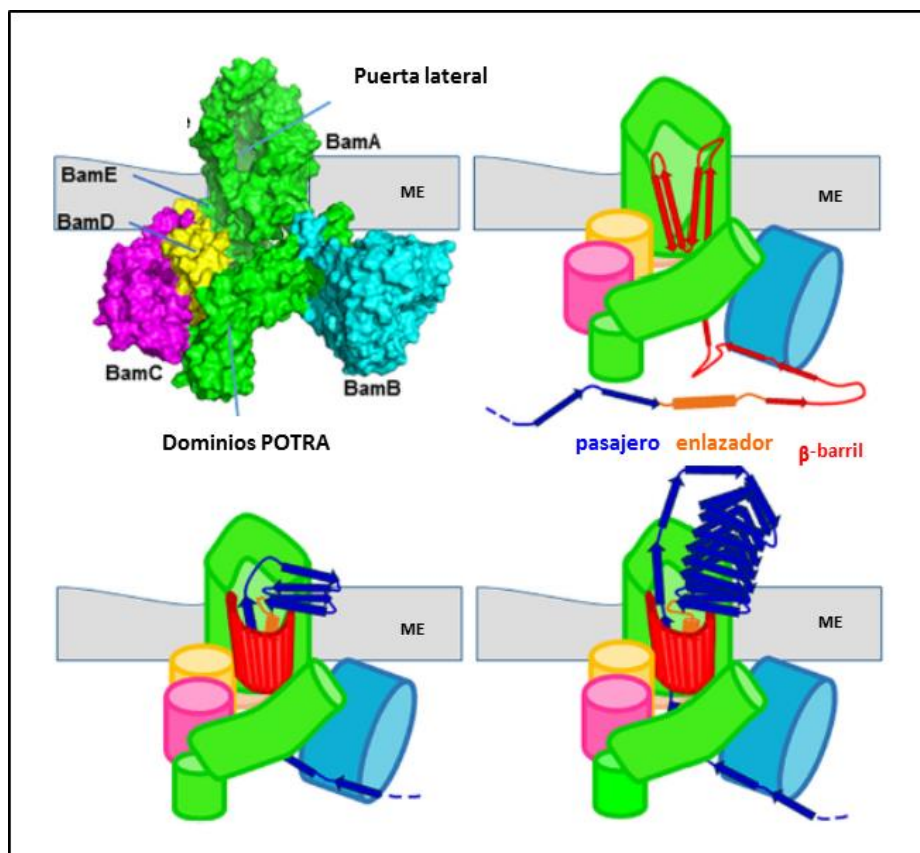


Figura 6. Modelo para la secreción del dominio pasajero autotransportador a través de la membrana externa. Panel superior izquierdo: la estructura del complejo BAM obtenida por crió-EM. Se indican las características de *BamA* que parecen importantes para su función. La subunidad *BamE* no es visible en esta vista. Panel superior derecho: representación esquemática de un primer paso, con las hebras del dominio β -barril ensambladas en la puerta lateral de *BamA*. Panel inferior izquierdo: el plegado continuo del β -barril coloca un segmento de iniciación del dominio pasajero en la superficie de la celda mientras que el β -barril aún no está completamente plegado. Panel inferior derecho: la presencia de este segmento comienza a doblar más al pasajero en la superficie de la celda en un movimiento similar a un trinquete. En este paso, el β -barril permanece en contacto con *BamA*, impidiendo su plegado completo y muy probablemente formando un canal híbrido con *BamA* que permite el paso de segmentos pasajeros, incluidas las estructuras que son más grandes que el tamaño con el que puede contar el β -barril completamente plegado. ME: membrana externa. Modificado de: van Ulsen (2018).

1.2.2. Aplicaciones del sistema de secreción autotransportador.

Las bacterias Gram negativas, como *E. coli*, se utilizan ampliamente en los procesos de producción biotecnológica. La secreción de proteínas recombinantes en su medio extracelular ofrece varias ventajas. Lo primero y más importante es la facilidad de purificación de las proteínas secretadas, ya que la recolección de medios, ya sea por filtración o centrifugación, resulta en un importante enriquecimiento de las proteínas de interés, dados los bajos niveles de secreción de proteínas endógenas en *E. coli*. Además, el plegamiento, la solubilidad, la actividad y la estabilidad de las proteínas generalmente se benefician de las estrategias de producción extracelular. En particular, las proteínas propensas a la agregación y la degradación se benefician de una transferencia rápida desde el citoplasma abarrotado al medio extracelular. Para aplicaciones tales como el desarrollo de vacunas, la biocatálisis con células integrales, el desarrollo de biosensores y el cribado de bibliotecas combinatorias, se prefiere la exposición de proteínas recombinantes en la superficie celular a su liberación en el medio de cultivo (van et al., 2018b). Históricamente, los autotransportadores clásicos de *Tipo-Va* han sido portadores de proteínas recombinantes, debido a su relativa simplicidad en comparación con los sistemas de secreción de múltiples componentes (Jong et al., 2010; Jose y Meyer, 2007), aunque también los autotransportadores inversos (*Tipo Ve*) se han utilizado (Salema et al., 2013; Wentzel et al., 2001). Los autotransportadores también pueden ser fácilmente modificados para pasar de liberación extracelular de una proteína híbrida a exponer esa proteína en la superficie celular simplemente mutando el sitio de escisión proteolítica que separa el dominio pasajero del dominio translocador (Fig. 7) (Jong et al., 2012). Alternativamente, un sitio de reconocimiento para la proteasa de membrana externa *OmpT* fue introducido para controlar la liberación o retención de la expresión en cepas silvestres o knock-out de *OmpT* (Fleetwood et al., 2014).

Otra ventaja de usar autotransportadores para la secreción o exposición de proteínas recombinantes radica en su compatibilidad con diferentes especies hospedadoras, aparte de sus hospedadores naturales (Tozakidis et al., 2015). Históricamente, esto se atribuyó a la presunta naturaleza autónoma del mecanismo de secreción que se refleja en la designación "autotransportador" (Henderson et al., 1998). Sin embargo, la participación del complejo BAM en la secreción de autotransportadores puede explicar las diferencias en la eficacia observada con el uso de autotransportadores entre especies de este tipo (Jong et al., 2018; Marin et al., 2010;

Tozakidis et al., 2015). Se sabe que su componente principal *BamA*, reconoce un motivo de secuencia en la última hebra β de proteínas β -barril para facilitar su inserción en la membrana externa (Robert et al., 2006; Webb et al., 2012b). Las variaciones específicas de la secuencia en este motivo podrían explicar algunos de los problemas de incompatibilidad observados, aunque los β -barriles no relacionados tienden a ser manejados por el complejo BAM (Walther et al., 2010). En cualquier caso, las implicaciones intrincadas y sutiles de la expresión no endógena no pueden excluirse si *BamA* y el β -barril autotransportador contribuyen a la translocación de dominios pasajeros. Para estar seguros, se recomienda el uso de un autotransportador homólogo o al menos filogenéticamente no demasiado lejano (Jong et al., 2018). En *E. coli*, la mayoría de las aplicaciones involucran la exposición de proteínas recombinantes en lugar de su secreción, y los autotransportadores endógenos *AIDA-I*, *Ag43*, *Pet* y *Hbp* se han utilizado como transportadores (Jose y Meyer, 2007; Nicolay et al., 2015). Se han explorado dos estrategias de fusión (van et al., 2014) a) reemplazo del dominio pasajero por la secuencia heteróloga que por lo tanto está directamente relacionada con el dominio del translocador; b) inserción de la secuencia en el dominio pasajero, preferiblemente reemplazando los dominios laterales que sobresalen del tallo β -helicoidal (Fig. 3). Cabe señalar que recientemente se demostró que la exposición de las fusiones directas al dominio translocador se mejoraron notablemente al modificar el conector entre el β -barril y el compañero de fusión (Quehl et al., 2017). Sin embargo, la segunda estrategia puede beneficiarse de la estabilidad del pasajero β -helicoidal que permanece intacto y puede ayudar a plegar la proteína recombinante fusionada (Jong et al., 2012; Sevastyanovich et al., 2012). Además, el tallo rígido del pasajero orienta el polipéptido insertado y lo coloca a una distancia de la superficie celular (Fig. 7), lo que puede ser ventajoso en aplicaciones donde la accesibilidad es crítica. La conservación de la estructura del pasajero también permite la visualización simultánea de múltiples inserciones en los dominios laterales disponibles (Fig. 7). Otra forma de lograr la exposición superficial de diferentes proteínas en una bacteria es mediante la expresión conjunta de construcciones compatibles en una cepa (Quehl et al., 2016; Yoo et al., 2015). Este enfoque se ha utilizado recientemente para expresar simultáneamente una lipasa unida a su plegasa en dos construcciones expuestas por separado (Kranen et al., 2014; Wilhelm et al., 2007b). La coinserción en la membrana externa de la lipasa y la plegasa permitió la activación eficiente de la lipasa, lo que indica la posibilidad de utilizar células bacterianas como biocatalizadores de células completas.

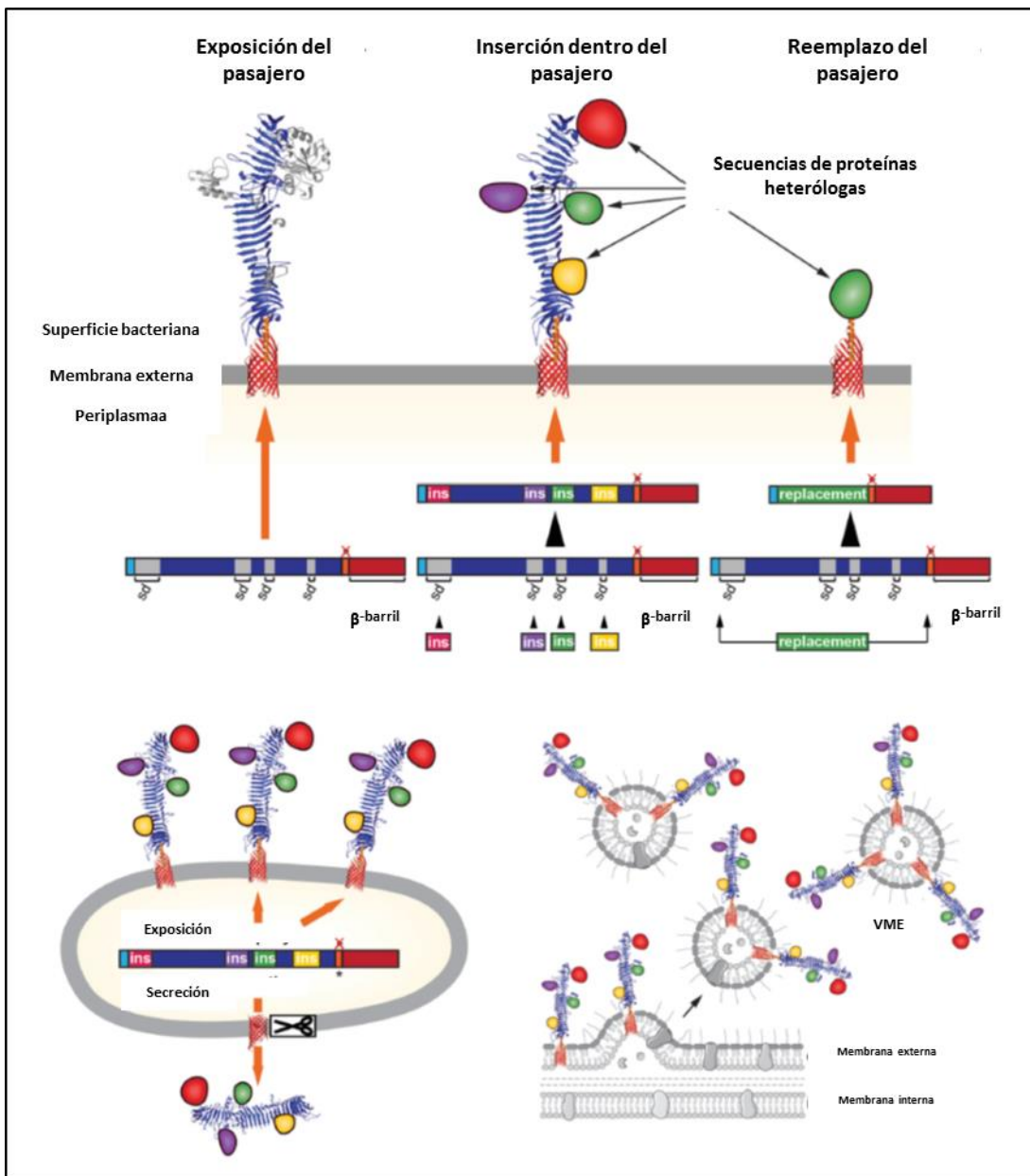


Figura 7. Autotransportadores como portadores para la secreción o exposición de secuencias de proteínas heterólogas. Los autotransportadores se utilizan para la exportación de proteínas heterólogas con fines biotecnológicos y biomédicos. **Panel superior:** la mutación del sitio de escisión autoproteolítica (X) en el enlazador da como resultado la exposición del pasajero en la superficie celular (izquierda). Inserción de secuencias de proteínas heterólogas dentro del pasajero (ins), preferiblemente reemplazando los dominios laterales (sd; gris) que sobresalen del tallo β -helicoidal (centro), o reemplazando la secuencia completa del pasajero por una proteína de interés (reemplazo) ; derecho. **Panel inferior izquierdo:** la expresión de autotransportadores que llevan inserciones puede resultar en la secreción o exposición de la proteína heteróloga. Panel inferior derecho: el uso de cepas hiper-vesiculantes permite la purificación de vesículas de membrana externa (VME) que muestran secuencias de proteínas heterólogas. Modificado de: van Ulsen (2018).

Más recientemente, se demostró que la combinación de membranas de células que muestran la lipasa o la plegasa ofrecía un mejor control de los niveles de actividad (Chang et al., 2017).

Por otra parte, en los sistemas de expresión *in cis*, la optimización de la producción y translocación de proteínas heterólogas, mediante el sistema de autotransportador; el acortamiento de la unidad translocadora y el incremento del tamaño de la secuencia señal de corte, han sido explotados para lograr este fin (Jiang et al., 2011; Oliver et al., 2003).

Utilizando la tecnología del *autodespliegue*, se logró expresar por medio de un dominio autotransportador llamado AIDA-I (adhesina involucrada en la adherencia difusa) estreptavidina en la membrana externa de *E. coli* UT5600 como una proteína de fusión recombinante (Park et al., 2011). Sin embargo, este es el primer informe de la expresión y exposición de un análogo de la avidina por un autotransportador en *E. coli* que mantiene sus propiedades biológicas.

1.2.3. El autotransportador *ShdA* de *Salmonella enterica*.

El gen *shdA* se encuentra en una isla genética de 25 kb en la región intergénica *xseA-yfgK* en el centisoma 54 (isla CS54) del cromosoma de *Salmonella* serotipo *Typhimurium* (Kingsley et al., 2002). El dominio de translocación de *ShdA* está compuesto por un dominio β -barril transmembrana integrado a la membrana externa y a una región *linker* que conecta el β -barril con el dominio pasajero.

ShdA se ha caracterizado como una proteína de membrana externa que pertenece a la familia de autotransportadores caracterizada por un dominio pasajero que consta de dos regiones: una región de no repetición N-terminal y una región de repetición que comprende dos tipos de repeticiones de aminoácidos directos imperfectos (llamadas A y B). La región A se repite tres veces (A1 a A3), mientras que la región B se repite 9 veces (B1 a B9) (Fig. 8) (Kingsley et al., 2004).

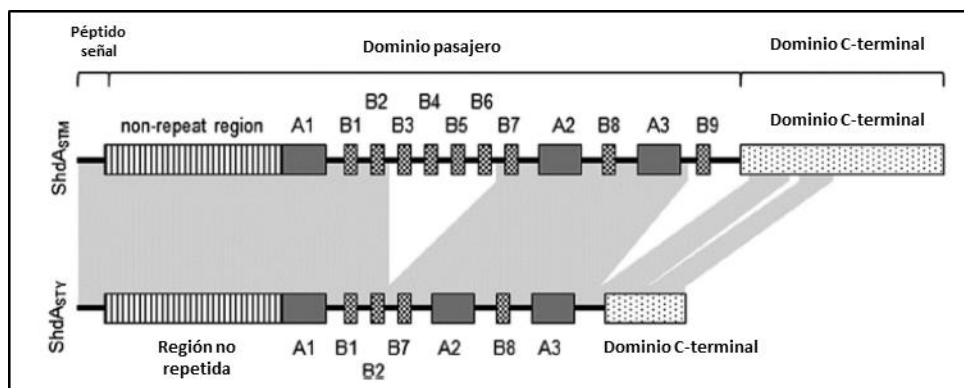


Figura 8. Regiones y dominios encontrados en *ShdA*. ShdASTm presenta un dominio pasajero que se puede dividir en dos regiones: una región no repetitiva N-terminal y una región repetida constituida por dos tipos de repeticiones de aminoácidos directos imperfectos (denominadas A y B). La región A se repite tres veces (A1 a A3), mientras que la región B se repite 9 veces (B1 a B9). Los dominios y regiones de ShdASTy se dedujeron de la comparación con ShdASTm. Modificado de: Urrutia (2014).

Salmonella enterica es un patógeno invasivo, facultativo e intracelular de animales y el hombre con la capacidad de colonizar varios nichos en diversos organismos hospedadores. La patogenia de las infecciones por *S. enterica* requiere adhesión a varias superficies de la célula huésped, y se pueden encontrar una gran cantidad de estructuras adhesivas. Dependiendo del serotipo de *S. enterica*, se identifican agrupaciones de genes para más de 10 adhesinas fimbriales diferentes, con fimbrias tipo I como *Fim*, *Lpf* (fimbrias polares largas), *Tafi* (fimbrias agregativas delgadas) o *pili* tipo IV de serotipo *Typhi*. Además, se han identificado adhesinas autotransportadoras como *ShdA*, *MisL* y *SadA* y las adhesinas repetitivas grandes de tipo I *SiiE* y *BapA*. Aunque las funciones de muchas de las diversas adhesinas no se conocen bien, estudios muestran las propiedades estructurales y funcionales específicas de las adhesinas de *Salmonella* y cómo actúan en conjunto con otros determinantes de virulencia (Dorsey et al., 2005; Wagner y Hensel, 2011).

Los autotransportadores, como familia grande y diversa de proteínas de membrana externa, contribuyen a la patogenicidad de las bacterias Gram negativas (Wang et al., 2018). En este contexto, el autotransportador *ShdA* de *Salmonella typhimurium* es una proteína que reconoce y se une específicamente a la fibronectina, una glicoproteína producida de manera abundante por las células intestinales epiteliales, durante el daño inflamatorio inducido por la colonización bacteriana (Kingsley et al., 2002). De esta manera, *ShdA* contribuye a la adherencia e invasión de las células productoras de fibronectina. Además, *ShdA* está involucrado en la colonización del ciego y las placas

de Peyer del íleon de ratones (Urrutia et al., 2014) y en menor grado, los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo, de ratón (Kingsley et al., 2003). Las mutantes en *ShdA* (Δ shdA) de *S. typhimurium*, muestran una colonización y persistencia reducida en el intestino del ratón (Kingsley et al., 2003). Sin embargo, esta misma delección resulta más virulenta en cerdos, sin afectar la persistencia bacteriana en este último hospedero (Boyen et al., 2006).

1.2.4. *ShdA* como dominio translocador en la expresión de péptidos heterólogos.

Está reportado que más de 15 autotransportadores han sido usados para la translocación de péptidos heterólogos, como dominios pasajeros y con fines de vacuna (Nicolay et al., 2015). El epítipo *Nef* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Maurer et al., 1997), se expresó en la superficie celular de la adhesina bacteriana FimH, de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, mediante el autotransportador gp43 (Kjaergaard et al., 2002). Un epitope de la *ureasa A* de *H. pylori*, se expresó en la superficie celular de una cepa atenuada de *Salmonella*, mediante el autotransportador AIDA-I (Rizos et al., 2003), al igual que péptidos derivados de la proteína de la cápside de Enterovirus 71 (responsable de la enfermedad de manos-pies-boca), los cuales han sido expresados en la superficie bacteriana de una cepa atenuada de *Bordetella*, mediante el autotransportador *BrkA* (Xin et al., 2010).

De manera importante, la región *linker* de *ShdA* es indispensable para la translocación del dominio pasajero a la superficie bacteriana. El acortamiento o mutagénesis sitio-dirigida en la región *linker* representa un impedimento para el *autodespliegue* de péptidos heterólogos. A este respecto, se requieren 16 aminoácidos del dominio α del autotransportador *ShdA*, para que se pueda translocar a la superficie bacteriana, péptidos heterólogos (Osorio-León, 2004).

Por su parte, el autotransportador *ShdA* de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261, ha sido empleado para expresar en la superficie bacteriana, un epítipo de 30 aminoácidos (Ag30), derivado de la glicoproteína de 43 kDa (aminoácidos 210-239), de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*. En este estudio se indujo una protección parcial (62.8%) contra la infección. La proteína de fusión provocó anticuerpos en ratones BALB/c que fueron capaces de reconocer el epítipo nativo en la superficie de las larvas del músculo *T. spiralis*. Este estudio demostró la utilidad

de *Salmonella* como portadora de epítomos de nematodos, proporcionando un sistema de exposición en superficie gracias al autotransportador *ShdA* para la aplicación de un candidato a vacuna contra parásitos intestinales (Pompa-Mera et al., 2011).

Con la finalidad de incrementar la inmunogenicidad y el nivel de protección conferida por la cepa candidato a vacuna *Salmonella* pAg30 (Pompa-Mera et al., 2011), se fusionaron tres copias del adyuvante molecular P28-C3d y una secuencia de corte (SCOT), al epítomo Ag30, generando la cepa pAg30-C3d-P28₃-SCOT. La inmunización intranasal de ratones BALB/c con *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261 atenuada, cepa pAg30-C3d-P283-SCOT, resultó en una reducción del 92.8% de la carga parasitaria, a nivel intestinal, en comparación con el grupo inmunizado con la cepa pAg30. De manera importante, la inmunización con la cepa pAg30-C3d-P283-SCOT, resultó en un perfil de citocinas Th1/Th2, con predominancia de la respuesta Th2, caracterizada por la presencia de IgG1, producción de IgA intestinal y secreción de IL-5 (Pompa-Mera et al., 2014).

1.2.5. Sistemas de *autoexpresión in trans*.

En su mayoría, los enfoques para la expresión de péptidos heterólogos en superficie bacteriana, mediante los autotransportadores, como unidades de translocación, se caracterizan por ser sistemas *in cis*, es decir, el acarreador bacteriano produce la proteína heteróloga. Más aún, los sistemas *in cis* están imposibilitados para la expresión de proteínas con modificaciones postraduccionales, tales como glicoproteínas. Recientemente, han emergido los sistemas de *autoexpresión in trans*, en los cuales la proteína heteróloga es purificada por separado y fusionada a la proteína de anclaje a la membrana celular (Kalyanasundram et al., 2015).

La producción de proteínas recombinantes complejas o con requerimientos adicionales, en términos de modificaciones postraduccionales, con frecuencia se logra en líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, el proceso para este fin, se ve obstaculizado por el bajo rendimiento y nivel de expresión, que muchas veces suele ser inestable conforme pasa el tiempo. (Kwaks y Otte, 2006). Si bien, el empleo de los sistemas de expresión en *E. coli* suelen ser muy versátiles; también pueden resultar en problemas relacionados con la sobreexpresión de proteínas recombinantes. En estos casos, las proteínas recombinantes se acumulan como agregados insolubles en cuerpos de

inclusión. Para superar estos problemas, la expresión de proteínas *in trans* emergió como una alternativa, especialmente y ante la necesidad de contar con biomoléculas complejas o con modificaciones postraduccionales, expresadas y purificadas de una célula huésped, antes de fusionarlas al motivo de anclaje superficial de bacterias (Mustafa et al., 2018; Mustafa et al., 2019).

Existen ejemplos de sistemas de expresión *in trans* que han sido reportados. La glicoproteína TRP-2-cA se produjo en células de ovario de hámster chino (CHO) y posteriormente se unió al dominio de anclaje de la pared celular lactocócica de *L. lactis*. Este estudio demuestra que los antígenos glicosilados se pueden producir en un sistema celular de mamífero y luego se pueden anclar a una superficie celular bacteriana, por fusión con un motivo de anclaje de la pared celular (Kalyanasundram et al., 2015). Otro caso es ejemplificado por la producción de ACERL como proteína de fusión, la cual pudo ser unida al dominio de anclaje de *L. plantarum*, lo cual permitió la expresión eficiente en la superficie bacteriana, con una unión estable (Mustafa et al., 2018). Asimismo, la exposición *in trans* de antígenos de tuberculosis (TB) en la pared celular, a través del dominio de unión LysM, ha permitido el empleo de probióticos como *Lactobacillus plantarum* con fines de vacuna, sin la necesidad de modificación genética del vector (Mustafa et al., 2019).

Hasta el momento, *ShdA* se ha usado para la exposición *in cis* de proteínas de fusión en la superficie bacteriana; pero su uso para la tecnología de exposición de péptidos heterólogos *in trans*, aún no ha sido explorado.

1.3. Principios y aplicaciones del sistema de unión avidina-biotina.

1.3.1. Características de la interacción avidina-biotina.

La interacción avidina-biotina es una de las interacciones no covalentes más fuertes en la naturaleza. Por lo tanto, la avidina y sus análogos (estreptavidina, neutravidina, bradavidina II) se han utilizado ampliamente como sondas y matrices de afinidad para una amplia variedad de aplicaciones en ensayos bioquímicos, diagnóstico, purificación por afinidad y administración de fármacos. Recientemente, ha habido un creciente interés en explorar esta interacción no covalente en sistemas de administración de fármacos a nano escala para agentes farmacéuticos, que incluyen moléculas pequeñas, proteínas, vacunas, anticuerpos monoclonales y ácidos nucleicos. Particularmente, la facilidad de fabricación sin perder las propiedades químicas y biológicas de las moléculas acopladas hace que el sistema de avidina-biotina sea una plataforma versátil para la nanotecnología. Además, las nano partículas basadas en avidina se han investigado como sistemas de diagnóstico para varios tumores y antígenos de superficie (Jain y Cheng, 2017a).

La avidina es una glicoproteína tetramérica básica compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una se une a la biotina con alta especificidad y afinidad ($K_d = 1.3 \times 10^{-15}$ M a pH 5.0). La avidina se deriva originalmente de los huevos de aves, reptiles y anfibios. Se han estudiado varias avidinas modificadas genéticamente y químicamente y sus análogos para mejorar las características funcionales y estructurales de las avidinas (Laitinen et al., 2006). La interacción avidina-biotina se considera una de las interacciones no covalentes más específicas y estables. La mayor ventaja de este sistema es su interacción de alta afinidad, que es estable frente a la manipulación, las enzimas proteolíticas, la temperatura, el pH, los reactivos orgánicos agresivos y otros reactivos de desnaturalización (Elia, 2008; Rybak et al., 2004) . Por lo tanto, la interacción avidina-biotina sirve como una gran herramienta en las aplicaciones biomédicas y nanotecnológicas. Por otro lado, los conjugados basados en biotina son fáciles de sintetizar y tienen menos impacto en la actividad de las biomoléculas (Jain y Cheng, 2017b).

En comparación con otras interacciones covalentes y no covalentes, el sistema avidina-biotina ofrece enormes ventajas, como la amplificación de señales débiles, el funcionamiento eficiente y la estabilidad. Por lo tanto, la avidina ha sido una modalidad muy versátil en el campo de la

biotecnología, especialmente en los ensayos bioquímicos y de la purificación por afinidad durante varias décadas. También se han realizado enormes esfuerzos para utilizar las propiedades inherentes de la avidina en los medicamentos de biotecnología, y algunos de ellos se han evaluado en estudios clínicos (Jain y Cheng, 2017b).

1.3.2. Estructura y propiedades físico químicas de la avidina.

La avidina es una glicoproteína tetramérica básica ($pI \sim 10$) (peso molecular 66–69 kDa) (Yao et al., 1998). Cada una de las cuatro subunidades contiene 128 aminoácidos y se une a la biotina con alta especificidad y afinidad ($K_d \sim 10^{-15}$ M) (Livnah et al., 1993; Rosano et al., 1999). Cada subunidad está compuesta por ocho cadenas β antiparalelas que forman un β barril, cuyo extremo ancho se une a la biotina (Pazy et al., 2003).

La interacción avidina-biotina es aproximadamente de 10^3 a 10^6 veces más alta que la interacción anticuerpo-antígeno. Sin embargo, la avidina puede tener un alto grado de unión inespecífica *in vivo* debido a su pI básico y su glicosilación. Se han realizado esfuerzos para estudiar las propiedades estructurales de la avidina mediante el análisis con rayos X de su estructura 3D para mejorar su estabilidad y propiedades funcionales. Se han generado con éxito varios análogos de avidina quiméricos con mejor estabilidad térmica y resistencia a las enzimas proteolíticas (Maatta et al., 2011; Taskinen et al., 2014). Por otro lado, la fuerte interacción entre la avidina y la biotina puede suponer una limitación en la liberación de las biomoléculas marcadas de la biotina o la avidina. La reversibilidad de la interacción avidina-biotina se puede lograr mediante la adición de una solución de biotina altamente concentrada. También se han desarrollado análogos de biotina que tienen una afinidad ligeramente baja hacia la avidina en comparación con la biotina. Por ejemplo, la destiobiotina puede ser fácilmente liberada desde la adición de una solución de biotina concentrada en forma moderada (Hirsch et al., 2002). Otro método consiste en insertar un enlazador escindible, como un enlazador que responde a estímulos, entre las biomoléculas y la biotina o avidina. Cabe destacar que la modificación química de las biomoléculas puede comprometer su actividad (Chivers et al., 2010).

1.3.3. Estructura y propiedades físico químicas de la biotina.

La biotina es una vitamina, también conocida como vitamina H, vitamina B7 o coenzima R. La biotina está compuesta por un anillo de tetrahidrotiofeno fusionado con un anillo ureido (tetrahidroimidazona). Juega un papel clave en la señalización celular y actúa como un promotor de crecimiento celular. El receptor de biotina (transportador multivitamínico dependiente de sodio y transportador de biotina de alta afinidad) se expresa ampliamente en casi todas las células vivas. Además, su expresión en células cancerosas en división es más alta que en las células normales, lo que hace de la biotina un potencial grupo para el tratamiento del cáncer (Chen et al., 2010). Por lo tanto, se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar plataformas basadas en biotina para la detección y diagnóstico de tumores (Ren et al., 2015). Los grupos funcionales de la biotina se han modificado químicamente para sintetizar análogos de la biotina, como la iminobiotina, la etilbiotina, la destiobiotina, la biotina-carbamato y la biotina carbonato para diversas aplicaciones (Yamamoto et al., 2015). La modificación química de la biotina puede afectar su afinidad hacia la avidina. Por ejemplo, la iminobiotina muestra valores de K_d dependientes del pH. Su K_d es 3.5×10^{-11} M a pH básico pero mayor a 10^{-3} M a pH ácido de 3 a 4. (Fudem-Goldin y Orr, 1990). Aparte de la biotina, la etiqueta strep (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) es un péptido que muestra alta afinidad (K_d 2.7×10^{-4} M) a la estreptavidina (Schmidt y Skerra, 1994). Se ha utilizado en una variedad de aplicaciones de nanotecnología y biotecnología (Baumann et al., 2016; Liu et al., 2016). Las proteínas recombinantes de interés pueden fusionarse fácilmente con la etiqueta *strep* para la purificación de proteínas y otras aplicaciones.

1.3.4. Aplicaciones de la interacción avidina-biotina en sistemas de liberación a nano escala.

Los ácidos nucleicos, incluidos el DNA plasmídico, siRNA, miRNA, aptámeros y oligonucleótidos, se han explorado ampliamente como agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades, y algunos de ellos se han aplicado clínicamente. Su carga negativa y baja estabilidad son los dos obstáculos principales que impiden que los ácidos nucleicos alcancen su potencial pleno como terapéuticos. Aunque los vectores virales son generalmente efectivos para la administración de ácidos nucleicos, las preocupaciones de seguridad asociadas con el virus hacen que los sistemas

no virales sean mejores candidatos para aplicaciones terapéuticas. Numerosas plataformas no virales, especialmente los sistemas de administración a nano escala que incluyen liposomas, nano-complejos peptídicos, nano partículas basadas en polímeros y nano-partículas inorgánicas, se han desarrollado para la administración de ácidos nucleicos durante las últimas dos décadas (Jain y Cheng, 2017b).

La liberación de proteínas y péptidos ha generado un interés considerable en las últimas dos décadas sobre la base de sus aplicaciones potencialmente importantes en la terapia dirigida. Los péptidos terapéuticos, las enzimas y las proteínas recombinantes se encuentran entre los productos que generan mayores ingresos entre todos los productos farmacéuticos ofrecidos en el mundo (Mitragotri et al., 2014). Sin embargo, los medicamentos macromoleculares enfrentan desafíos sustanciales en el suministro, incluida una permeabilidad lenta o baja a través de membranas biológicas y una baja biodistribución específica hacia su blanco (Albarran et al., 2011). El mayor obstáculo para el suministro de péptidos y proteínas es su encapsulación. Se debe prestar especial atención a las propiedades químicas y físicas de los productos biológicos antes de contemplar el nano transportador. Debido a que las proteínas son propensas a la distorsión estructural que puede conducir a la pérdida de la actividad biológica, se necesita un cuidado especial en la modificación de la proteína para minimizar la pérdida de la actividad de estas moléculas (Putney y Burke, 1998).

Debido a la modificación mínima requerida para la biotinylación de una proteína, se han empleado las avidinas como portadores para la administración de péptidos, como los péptidos que penetran las células (CPP) (Saalik et al., 2004; Saalik et al., 2009) y el péptido TAT (Howl y Jones, 2015). Los cuatro sitios de unión a biotina en avidina pueden explotarse para el suministro de diferentes secuencias peptídicas para roles específicos, como dirigirse a un ligando. La internalización de una proteína por una célula diana implica superar una serie de barreras. Se han desarrollado proteínas de fusión que incluyen avidina o estreptavidina para mejorar la absorción de pequeñas moléculas sintéticas mediadas por receptores. La presencia de la estreptavidina en estas proteínas de fusión desencadena la internalización y, por lo tanto supera las barreras de administración (Martin y Peterson, 2003).

En los últimos años, el desarrollo de vacunas ha generado mucho interés. Se han realizado esfuerzos rigurosos para reducir el tiempo entre el descubrimiento de las vacunas candidatas y su desarrollo clínico. El mayor desafío consiste en la producción de antígenos en una cantidad apropiada para

inducir una respuesta inmune óptima en el cuerpo (Kaufmann et al., 2014). La avidina también proporciona la ventaja de variar y ajustar las proteínas quiméricas de la superficie en bacterias para inducir una respuesta inmunogénica más alta hacia la vacuna. Además, la biotilación de las proteínas de la superficie bacteriana no tiene efecto sobre las características fenotípicas de las bacterias o las propiedades exógenas de la proteína, lo que hace de la avidina una opción muy apropiada para el desarrollo de vacunas. Además de todas las otras ventajas, la avidina monovalente desglicosilada reduce sustancialmente las posibilidades de que las vacunas se agreguen (Liao et al., 2015).

El uso de avidina en vectores recombinantes ha aumentado la posibilidad de administrar varias clases de antígenos biotilados. Los vectores que se dirigen a las células dendríticas utilizando un anticuerpo de cadena única (scFv) fusionado con un núcleo de estreptavidina es un ejemplo de este enfoque. Este núcleo de estreptavidina y el antígeno biotilado posteriormente forman un complejo y suministran los antígenos a las células dendríticas blanco (Wang et al., 2009).

La tecnología de avidina y biotina ha hecho posible que un anticuerpo monoclonal lleve una carga útil a los sitios de destino vitales. Las proteínas de fusión o acoplamiento de avidina no solo facilitan la formulación del portador, sino que ayudan a aumentar la captación en un sitio objetivo. La avidina proporciona una mayor ventaja para el suministro de fármacos cuando se acopla a anticuerpos monoclonales. Estas proteínas de fusión de avidina han mostrado una excelente especificidad a su sitio blanco (Jain y Cheng, 2017b). Los anticuerpos también se usan ampliamente en la radioinmunoterapia, que requiere una molécula interactiva altamente específica para la unión del efector a la molécula de pre blanco (Sakahara y Saga, 1999).

La nanotecnología ha proporcionado muchas formas de administrar medicamentos quimioterapéuticos de manera eficiente al sitio de acción. El suministro eficiente de moléculas pequeñas requiere una alta especificidad para el sitio blanco que solo se puede lograr mediante la unión de ligandos específicos (Barve et al., 2016). La avidina proporciona un excelente puente para los ligandos relevantes para el diagnóstico que se dirigen a receptores específicos (Steinbach et al., 2016).

El sistema de avidina-biotina también se ha utilizado ampliamente como una estrategia de focalización previa (Martensson et al., 2007; Urbanska et al., 2012). Además, se ha informado que la avidina y la biotina apuntan y se acumulan, respectivamente, en los tumores (Hama et al., 2007).

Estas propiedades hacen que sean una excelente opción para una estrategia de formulación dirigida a tumores. La alta acumulación de avidina en el hígado después del tratamiento, así como las propiedades mencionadas anteriormente, se ha explotado para atacar el carcinoma hepático. Recientemente, se diseñaron nano partículas de quitosano modificadas con biotina y avidina en las que se utilizaron las manosas y N-acetil glucosaminas de la glicosilación de la avidina para dirigirlas al hígado. La avidina permitió la adición de múltiples ligandos en la superficie para lograr una focalización altamente específica. Además, que la avidina unida a la biotina en la superficie de nano partículas fue responsable de la mayor acumulación de nano partículas en el hígado y, por lo tanto, aumentaba la actividad anticancerígena (Bu et al., 2013).

1.3.5. Aplicaciones de los sistemas de avidina-biotina a nano escala en diagnóstico y biotecnología.

La interacción de avidina con biotina proporciona una excelente plataforma para el desarrollo de varios sistemas de ensayo. Aunque los sistemas de ensayo basados en anticuerpos son altamente específicos, la conjugación química con colorantes fluorescentes o compuestos quimioluminiscentes puede tener algunos impactos en la especificidad del anticuerpo. Los puntos cuánticos han demostrado ser una herramienta altamente eficiente en comparación con los tradicionales ensayos basados en anticuerpos con colorantes fluorescentes. Los puntos cuánticos proporcionan varias ventajas, tales como alta intensidad de señal, alta estabilidad y alto rendimiento cuántico para la detección de proteínas con una amplificación de señal mejorada (Zhu et al., 2014). La interacción no covalente entre biotina y estreptavidina sirve como la mejor herramienta para la modificación de la superficie de los puntos cuánticos y permite el desarrollo de un sistema de ensayo selectivo sin comprometer su especificidad de unión al blanco. En un desarrollo similar, se diseñó una plataforma de inmunoensayo basada en puntos cuánticos conjugados con estreptavidina, que se utilizan para unirse a un anticuerpo biotilado y se pueden detectar usando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para la cuantificación de proteínas marcadas. Este sistema permite la cuantificación de proteínas en muestras con concentraciones tan bajas como 50 ng/ml (Montoro Bustos et al., 2015). Se ha demostrado que el sistema avidina-biotina es el mejor método para hacer funcionar los conjugados de enzimas con puntos cuánticos luminiscentes en comparación con los enfoques tradicionales (Iyer et al., 2014).

La tecnología de imágenes ha evolucionado ampliamente en los últimos años. Su mayor aplicación es el diagnóstico y la detección de marcadores biológicos para enfermedades específicas, como el cáncer. Varios anticuerpos radio marcados se están estudiando ampliamente y se están realizando ensayos clínicos para la obtención de imágenes y el diagnóstico de cáncer (Barbet et al., 2012; Galli et al., 2015). En general, la avidina se usa para eliminar los anticuerpos biotinilados circulantes en la circulación sistémica, pero para la estrategia previa a la eliminación, la estreptavidina o la neutravidina se usan ampliamente. Curiosamente, se ha encontrado que la estreptavidina marcada por fluorescencia o radio marcada mostró una mayor captación en los tumores en comparación con los tejidos normales que la del anticuerpo radio marcado solo (Liu et al., 2012; Petronzelli et al., 2005).

Para fines de diagnóstico, la expresión de un antígeno específico en un tipo de célula particular puede aprovecharse y posteriormente detectarse con técnicas favorables. Del mismo modo, los tipos de antígenos o marcadores presentes en las células cancerosas revelan los grados de malignidad, invasión, neovascularización y metástasis. Los anticuerpos marcados con fluorescencia para estos marcadores específicos de células se utilizan para la detección eficiente mediante imágenes u otras herramientas de diagnóstico. Debido a que la avidina es muy estable a la modificación química, sirve como un buen candidato para fines de conjugación. La avidina activada con maleimida se utilizó para modificar un MAb que es específico para la proteína delta del cáncer embrionario (Dlk-1). Se diseñó una proteína bioluminiscente fluorescente (FBP) mediante la conjugación de la luciferasa cípridina biotinilada (CLu) con un derivado de indocianina fluorescente. Posteriormente, el FBP se acopló al MAb específico de Dlk-1 para identificar el antígeno de cáncer embrionario Dlk-1 a través de la interacción avidina-biotina (Wu et al., 2009).

Los injertos se consideran el método más común utilizado para la reparación clínica de defectos de la piel (Henderson et al., 2012). Sin embargo, hay problemas como la contracción de los injertos, el rechazo debido a la inmunidad y la disfunción del injerto. La ingeniería tisular es una alternativa prometedora para superar las deficiencias de las técnicas de injerto. Esta estrategia alternativa implica la fabricación de un andamio que imita la matriz extracelular natural (MEC) de la célula diana (MacNeil, 2007). La avidina se inmoviliza en las superficies de los biomateriales y las membranas celulares se conjugan con biotina. La extraordinaria afinidad de estas dos moléculas media la unión eficiente de las células a los biomateriales. La adhesión celular natural se produce por la formación

de enlaces mediados por integrina entre la integrina en la membrana celular y las proteínas de adhesión en la matriz (Hynes, 1992). Se demostró que el sistema de unión avidina-biotina es superior al sistema de proteínas integrina-suero con respecto a la fuerza de adhesión celular (Kuo y Lauffenburger, 1993). Recientemente, se utilizó el sistema de unión avidina-biotina (ABBS) para fabricar la matriz de nanofibras PCL/Pluronic para aplicaciones de cuidado de la piel (2015).

Los biomateriales de seda con moléculas bioactivas unidas se utilizan ampliamente para la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos. El acoplamiento covalente tiene un impacto negativo muy grande en la bioactividad de las biomoléculas debido a la reactividad del grupo amino. Por lo tanto, se recomiendan métodos de acoplamiento no covalentes como la avidina-biotina. La versatilidad y simplicidad del sistema de avidina-biotina permitió que la fibroína de seda (proteína fibrosa producida por algunos artrópodos) en micro esferas se combinara con neutravidina. La fibroína de seda retuvo sus características de rigidez y resistencia después de la reacción. Se observó que más de cuatro moléculas de neutravidina se unían a una molécula de seda. Las micro esferas de seda acopladas a neutravidina se acoplaron con anticuerpo anti-CD3 biotinilado y posteriormente todo el sistema fue capaz de unirse específicamente a la línea Jurkat de células linfocíticas T CD3 positivas (Wang y Kaplan, 2011). El ABBS se utilizó en un andamio de vidrio de fosfato de calcio para la adhesión del tejido óseo. El andamio inmovilizado con avidina mostró una unión celular sustancialmente mayor. El ABBS tiene una gran ventaja sobre otros andamios, ya que no inhibe la proliferación celular. El andamio funcional con ABBS puede mejorar la adhesión de células similares a osteoblastos. Se concluyó que el andamio ABBS ayuda en la proliferación después de la unión eficaz de las células similares a los osteoblastos (Kim et al., 2015).

Como una de las interacciones no covalentes más fuertes en la naturaleza, la interacción avidina-biotina, ha evolucionado hasta convertirse en una plataforma muy versátil para una gran variedad de aplicaciones en biotecnología y nanotecnología. Se están desarrollando nuevos análisis de avidina con mejores propiedades físicas y químicas para fines específicos. Este sistema se encuentra en su principio fundamental, el sistema de avidina y biotina es tan fuerte y aplicable. El uso extensivo de este sistema en una amplia variedad de campos, como la administración de medicamentos, la selección de antígenos, el diagnóstico y la ingeniería de tejidos es la prueba de sus ventajas sin paralelo (Dundas et al., 2013).

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La expresión de proteínas o péptidos heterólogos en la superficie bacteriana, ha sido reportada por diversos grupos de investigación en todo el mundo. Una de las estrategias para la exposición de proteínas o péptidos heterólogos, en la superficie bacteriana, han sido los autotransportadores, los cuales han servido de unidades de translocación. A este respecto, los autotransportadores se componen de múltiples dominios y subdominios, involucrados en la translocación, exposición en la superficie bacteriana y en algunos casos, la secreción de proteínas autólogas. De manera general, un autotransportador tiene en el extremo amino terminal, un péptido señal (que dirige el tráfico de la proteína hacia el periplasma); un dominio translocador localizado hacia el extremo carboxilo terminal o dominio β , el cual funciona como dominio de anclaje a la membrana externa. De manera importante, entre los dos dominios amino y carboxilo, se localiza una región conocida como dominio α o pasajero y que corresponde a la proteína por exponer o secretar. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación, han demostrado que la delección de aminoácidos en la región *linker* de *ShdA* representa un impedimento para el *autodespliegue* de péptidos heterólogos. Se observó que se requieren 16 aminoácidos del dominio α del autotransportador, para una translocación exitosa de péptidos heterólogos a la superficie bacteriana, permitiendo así la fusión con el autotransportador de péptidos de mayor tamaño que se deseen *autodesplegar*. Diversos estudios han documentado el uso potencial de los autotransportadores para la exposición de antígenos o péptidos heterólogos, para diferentes fines, ya sea de vacuna o biotecnológicos. Para ello y mediante tecnología del DNA recombinante, el dominio pasajero nativo, es sustituido por la secuencia que codifica para el péptido o proteína heteróloga. De esta manera, el uso de los autotransportadores para la exposición de antígenos o péptidos heterólogos ha sido exitoso. Sin embargo y aún con las ventajas que ofrecen a las bacterias que los utilizan como sistemas de expresión *in cis*, los autotransportadores están limitados al no poder expresar proteínas con modificaciones postraduccionales tales como las glicoproteínas, además de que puede haber problemas de sobreexpresión de proteínas recombinantes acumulándose como cuerpos de inclusión. A este respecto, una alternativa ante la necesidad de contar con biomoléculas complejas con modificaciones postraduccionales localizadas sobre la superficie bacteriana, podría ser el uso de un sistema de expresión *in trans*, en el cual la proteína heteróloga que se desea desplegar sobre la membrana externa bacteriana es sintetizada y purificada de forma independiente y posteriormente es unida a un péptido recombinante de anclaje

el cual ha sido fusionado a la molécula autotransportadora y translocado sobre la superficie de la membrana externa bacteriana. Hasta el momento, *ShdA* ha sido empleado en la exposición *in cis* de proteínas con propiedades antigénicas e inmunogénicas, en la superficie bacteriana de *Salmonella* con fines de vacuna. Sin embargo, su uso en la tecnología de exposición *in trans* de péptidos heterólogos; aún no ha sido explorado. Si bien, el papel de *ShdA* como motivo de anclaje a la membrana externa de la bacteria es crucial, para la exposición *in trans* resulta indispensable otro componente, una molécula recombinante acopladora, que lleve a cabo la unión estable de la proteína que se desea desplegar sobre la superficie de la membrana externa bacteriana. Por otra parte, se sabe que la interacción avidina-biotina es una de las interacciones no covalentes, específicas, fuertes y estables, que se hayan documentado. La conservación de las propiedades químicas y biológicas de las moléculas acopladas, hace que el sistema de avidina-biotina sea una plataforma atractiva para una amplia variedad de campos, como la administración de medicamentos, la selección de antígenos, el diagnóstico y la ingeniería de tejidos, dada su versatilidad en muchas áreas. La mayor ventaja del sistema avidina-biotina, es su interacción de alta afinidad y estabilidad frente a la acción de las enzimas proteolíticas, la temperatura, el pH, los reactivos orgánicos agresivos y otros agentes desnaturizantes. Ya que, como una de las interacciones no covalentes más fuertes en la naturaleza, ha evolucionado hasta convertirse en una plataforma muy versátil sin paralelo. De manera colectiva, estos datos sugieren que el sistema avidina-biotina podría ser empleado como un sistema que permitiría la unión *in trans* a la superficie de *E. coli*, sin alterar las propiedades biológicas de la proteína heteróloga. Sin embargo, la expresión de una avidina recombinante con actividad de unión a biotina, en la superficie bacteriana de *E. coli*, a través de formas acotadas del autotransportador *ShdA*, aún no ha sido explorado. De aquí, el interés de producir un sistema de expresión procariótico en *E. coli*, basado en el uso de formas acotadas del autotransportador *ShdA*, fusionado a una avidina recombinante como un dominio pasajero, para la exposición *in trans* de péptidos producidos de manera externa.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN.

El aprovechamiento biotecnológico de los sistemas de secreción natural de bacterias Gram negativas, ofrece diversas aplicaciones biotecnológicas, entre las que destacan, la exposición de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana de cepas modificadas genéticamente, el desarrollo de vacunas vivas, entre otros. En este contexto, uno de los sistemas de secreción, los autotransportadores (sistema de secreción tipo V), resulta especialmente atractivo, debido a su simplicidad para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana, proceso conocido como *autodespliegue* (del inglés *autodisplay*), el cual se basa en la sustitución del dominio pasajero nativo, por una proteína heteróloga modificada mediante ingeniería genética. Por otra parte, la secreción de proteínas recombinantes *autodesplegadas* y posteriormente liberadas hacia el medio extracelular, ofrecen diversas ventajas que facilitan su purificación y su enriquecimiento. En este contexto, los autotransportadores también pueden ser fácilmente modificados *in cis*, a través de la inserción de mutaciones en el sitio de escisión proteolítica que separa el dominio pasajero del dominio translocador. De esta manera, es posible la liberación extracelular de la proteína heteróloga para diferentes fines. Aunque la gran mayoría de los estudios para el *autodespliegue* de proteínas heterólogas, han empleado esta tecnología para diferentes finalidades, están basados en el diseño y desarrollo de sistemas de expresión tipo *in cis*; estos poseen ciertas limitaciones que impiden la expresión de proteínas con modificaciones postraduccionales. A este respecto, está documentado que el *autodespliegue* ineficiente puede estar influenciado por estructuras terciarias complejas e hidrofobicidad de la proteína. Además, puede existir toxicidad debida a la formación de cuerpos de inclusión con la proteína recombinante, generando problemas relacionados con el incremento de la carga metabólica para las bacterias transformadas y pobre adaptación. Una alternativa para resolver los problemas mencionados con anterioridad y otros asociados con la producción inadecuada o el plegamiento inadecuado de las proteínas recombinantes que se muestran en la superficie bacteriana, es el sistema de exposición en la superficie *in trans*, en el cual la proteína de interés se purifica de manera preliminar de una fuente separada y luego se une a la superficie bacteriana. A este respecto, el desarrollo de un sistema *in trans* para el *autodespliegue* de la avidina en la superficie de *E. coli* usando el autotransportador *ShdA*, permitiría un puente entre las moléculas biotiniladas a un sustrato en las superficies celulares. De esta manera, este sistema podría representar una alternativa en ensayos bioquímicos, en pruebas diagnósticas, y en sistemas de

liberación de fármacos basados en la interacción de avidina-biotina, aprovechando sus características en términos de afinidad y especificidad. El uso del autotransportador *ShdA* para expresar *in trans* proteínas heterólogas en la superficie de *E. coli*, abre la interesante posibilidad de recubrir superficies bacterianas con diferentes péptidos o proteínas modificadas postraduccionalmente para diferentes fines, sin comprometer la carga metabólica de este acarreador bacteriano.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS.

La expresión de una avidina monomérica recombinante con capacidad de unión *in trans* de moléculas biotiniladas, en la superficie bacteriana de *E. coli* DH5 α , mediante el uso de dos variantes del autotransportador *ShdA*: short *ShdA* y whole *ShdA*; permite el desarrollo de un sistema acarreador bacteriano como una herramienta para una amplia gama de aplicaciones biológicas.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la habilidad de dos cepas de *Escherichia coli* DH5 α transformadas con dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*) de expresar en su superficie una forma recombinante de avidina monomérica, con capacidad de unión *in trans*, a biotina o moléculas biotiniladas.

5.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Demostrar la expresión de los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina que codifican para las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*), fusionado a la forma recombinante de avidina monomérica.
2. Confirmar el autodespliegue sobre la superficie de *E. coli* DH5 α de las proteínas de fusión constituidas por la avidina monomérica recombinante fusionada a las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*).
3. Evaluar la capacidad de unión a biotina de las proteínas de fusión constituidas por la avidina monomérica recombinante fusionada a las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*), sobre la superficie de *E. coli* DH5 α .
4. Evaluar la capacidad de unión a proteínas biotiniladas de las proteínas de fusión constituidas por la avidina monomérica recombinante fusionada a las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*), sobre la superficie de *E. coli* DH5 α .

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

De manera general, el diseño experimental se resume en la figura 9. Tres etapas comprendieron el desarrollo del presente estudio; I) Ingeniería genética (tecnología de DNA recombinante); II) Caracterización y análisis de la expresión de proteínas; III) Actividad de unión a biotina.

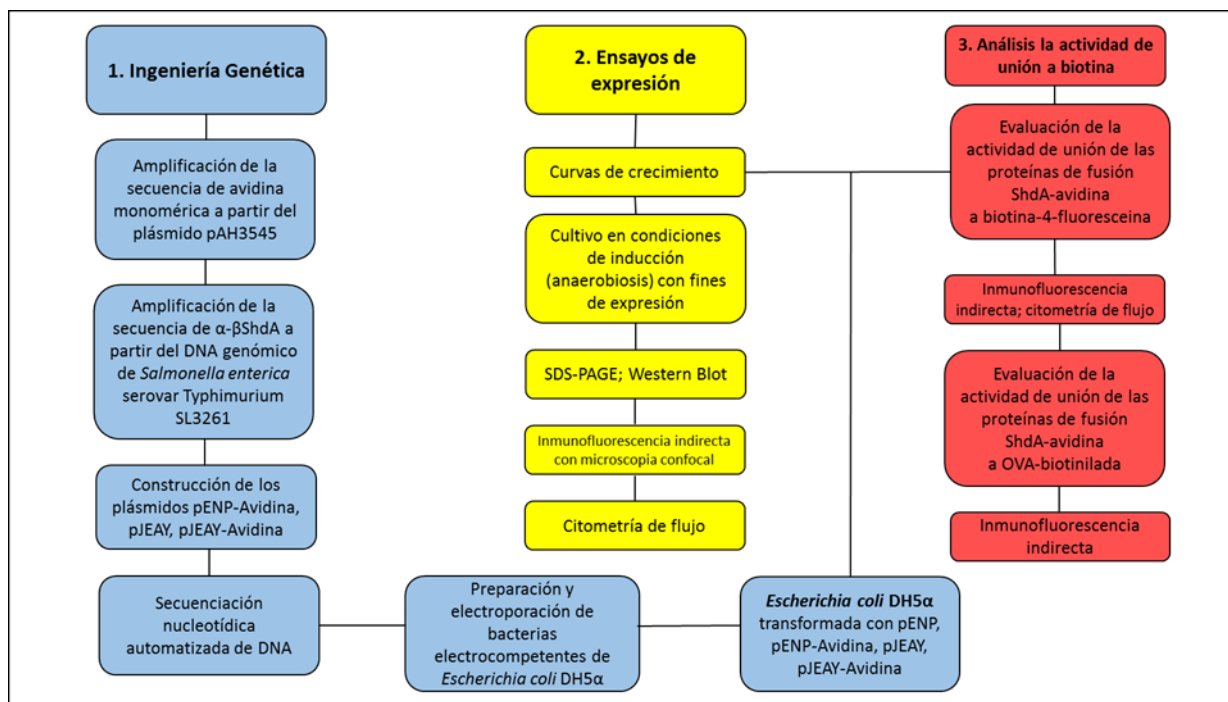


Figura 9. Diseño experimental del presente estudio. Se muestran las tres etapas del diseño del estudio: I) Ingeniería genética, II) Ensayos de expresión y III) Análisis de la actividad de unión a biotina.

6.1. Tecnología del DNA recombinante

El desarrollo de un sistema capaz de unir moléculas biotiniladas, basado en un acarreador bacteriano, requiere de llevar a cabo la tecnología del DNA recombinante. Para ello, *Escherichia coli* DH5α se usó como cepa huésped para la construcción de plásmidos y como cepa de expresión de proteínas recombinantes. La tabla 1 resume las características de la cepa bacteriana empleada en el presente trabajo. Todas las cepas bacterianas recombinantes fueron manejadas de acuerdo con las regulaciones nacionales de bioseguridad para organismos genéticamente modificados que

fueron publicadas y actualizadas en DOF 06-03-2009. Las extracciones, preparaciones y manipulaciones de DNA plasmídico y genómico, así como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones y los protocolos del Manual de Laboratorio de Clonación Molecular (Sambrook y Rusell, 2001) y de acuerdo a las instrucciones de los estuches comerciales empleados. Todas las enzimas de restricción y de ligación fueron de la marca New England Biolabs NEB®. La purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen®. El análisis de todos los productos de PCR, así como fragmentos para llevar a cabo las subsecuentes reacciones, se realizaron en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	supE44 Δlac169 φ80lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi- 1 relA1	Invitrogen ®
<i>Salmonella entérica</i> serovar <i>Typhimurium</i> SL3261	AroA::Tn10	Hoiseth y Stocker, 1981

Los vectores pAH3545 (3545 pb) (donado por el Dr. Manuel L. Penichet, UCLA, USA), pENP (3415 pb) (Pompa-Mera et al., 2011) y pJEAY (3727 pb), fueron usados para expresar avidina recombinante de *Gallus gallus* en los vectores pENP-avidina (3794 pb) y pJEAY-avidina (4094 pb). La expresión de las proteínas recombinantes de todos los plásmidos derivados contenía el promotor inducible *nirB* de la nitrato reductasa, el cual es inducible en condiciones de anaerobiosis o microaereofílicas (Chatfield et al., 1992; Huang et al., 2000). Todos los plásmidos (con la excepción del plásmido pAH3545) codifican para el péptido bandera FLAG, que fue incluido para la detección de la proteína de fusión, empleando un anticuerpo monoclonal dirigido hacia este marcador (Pompa-Mera et al., 2011). Así mismo, este sistema de expresión cuenta con el marcador de selección de resistencia a ampicilina. Por su parte el plásmido pAH3545 codifica para una forma recombinante de la avidina de *Gallus gallus*.

Las características particulares de cada uno de los plásmidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características particulares de cada uno de los plásmidos utilizados.

Plásmido	Tamaño* (pb)	Proteína de fusión codificada (NH ₂ ----COOH)	Tamaño* (kDa)	Localización de la proteína de fusión localizada	Referencia
pAH3545	3545	AVIDINA	0.01 kDa	NA	Donación del Dr. ML Penichet, UCLA, USA.
pENP [♠]	3415	LTB-FLAG-sShdA	39 kDa	Membrana externa	Pompa-Mera et al., 2011.
pENP-Avidina	3794	LTB-AVIDINA-FLAG-sShdA	52.2 kDa	Membrana externa	Pardavé-Alejandro et al., 2018
pJEAY ^{♠♠}	3727	LTB-FLAG-wShdA	56.2 kDa	Membrana externa	Pardavé-Alejandro et al., 2018
pJEAY-Avidina	4094	LTB-AVIDINA-FLAG-wShdA	70.1 kDa	Membrana externa	Pardavé-Alejandro et al., 2018

*Tamaño aproximado. NA = no aplica.

[♠] Control negativo con bandera molecular FLAG y sShdA.

^{♠♠} Control negativo con bandera molecular FLAG y wShdA.

6.1.1. Construcción de los plásmidos pENP-avidina, pJEAY, pJEAY-avidina.

La secuencia que codifica para los 123 aminoácidos de la avidina de *Gallus gallus* (aminoácidos 25-146, NCBI Reference Sequence: NM_205320.1), se obtuvo mediante PCR, a partir del plásmido pAH3545 (donado por el Dr. Manuel L. Penichet, UCLA, EUA), con base en lo reportado por (Gope et al., 1987). Para ello, se emplearon los oligonucleótidos avi-1 y avi-2 (tabla 3), los cuales contienen los adaptadores o sitios de restricción XhoI y HindIII, para la subclonación sitio-dirigida en el plásmido pENP. Tanto el amplicón (correspondiente a la secuencia codificante de avidina) y el plásmido pENP se cortaron con las enzimas XhoI y HindIII, se purificaron con el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen®, CA) y se ligaron empleando el kit de ligación Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas®), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El producto de ligación (pENP-avidina) se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5α. De esta manera, se obtuvo el plásmido codificante para la variante del dominio o versión corta (sShdA con 314 aminoácidos).

Por otra parte, para la construcción del plásmido pJEAY-avidina, codificante para la variante con el dominio completo α-β (wShdA con 476 aminoácidos) fusionado a avidina, se obtuvo mediante la sustitución de la secuencia ΔShdA (codificante de la versión corta sShdA), por la secuencia ShdA (previamente amplificada a partir de DNA genómico de *Salmonella*). A este respecto, se construyó el plásmido pJEAY, el cual posee la secuencia ShdA, obtenida mediante PCR, usando los

oligonucleótidos *shdA*-1 y *shdA*-2 (tabla 3), diseñados con base en el número de acceso de secuencia del GenBank AF140550.2 y usando como templado DNA genómico de *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* SL3261; de acuerdo a lo descrito por (Osorio-León, 2004). Para la inserción de la secuencia *shdA* (codificante de *wShdA*), se emplearon los sitios NheI y BamHI. Para la generación del plásmido pJEAY-avidina, una estrategia similar usada en la construcción del plásmido pENP-avidina, fue usada. Todos los productos de ligación se reservaron para la transformación en células competentes de *E. coli* *DH5α*. En la figura 10, se muestra la estrategia general de la construcción de los plásmidos de este trabajo.

6.1.2. Secuenciación nucleotídica automatizada.

El DNA de todos los plásmidos se verificó mediante secuenciación nucleotídica automatizada de una hebra (sentido) usando el primer pNirl. Se usó un kit de secuenciación Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando 20 ng de DNA templado se añadieron en cada reacción y el programa de termociclado que incluyó 25 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 30 s, alineamiento a 50 ° C durante 15 s y extensión a 60°C durante 4 min. Las muestras se analizaron en un analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

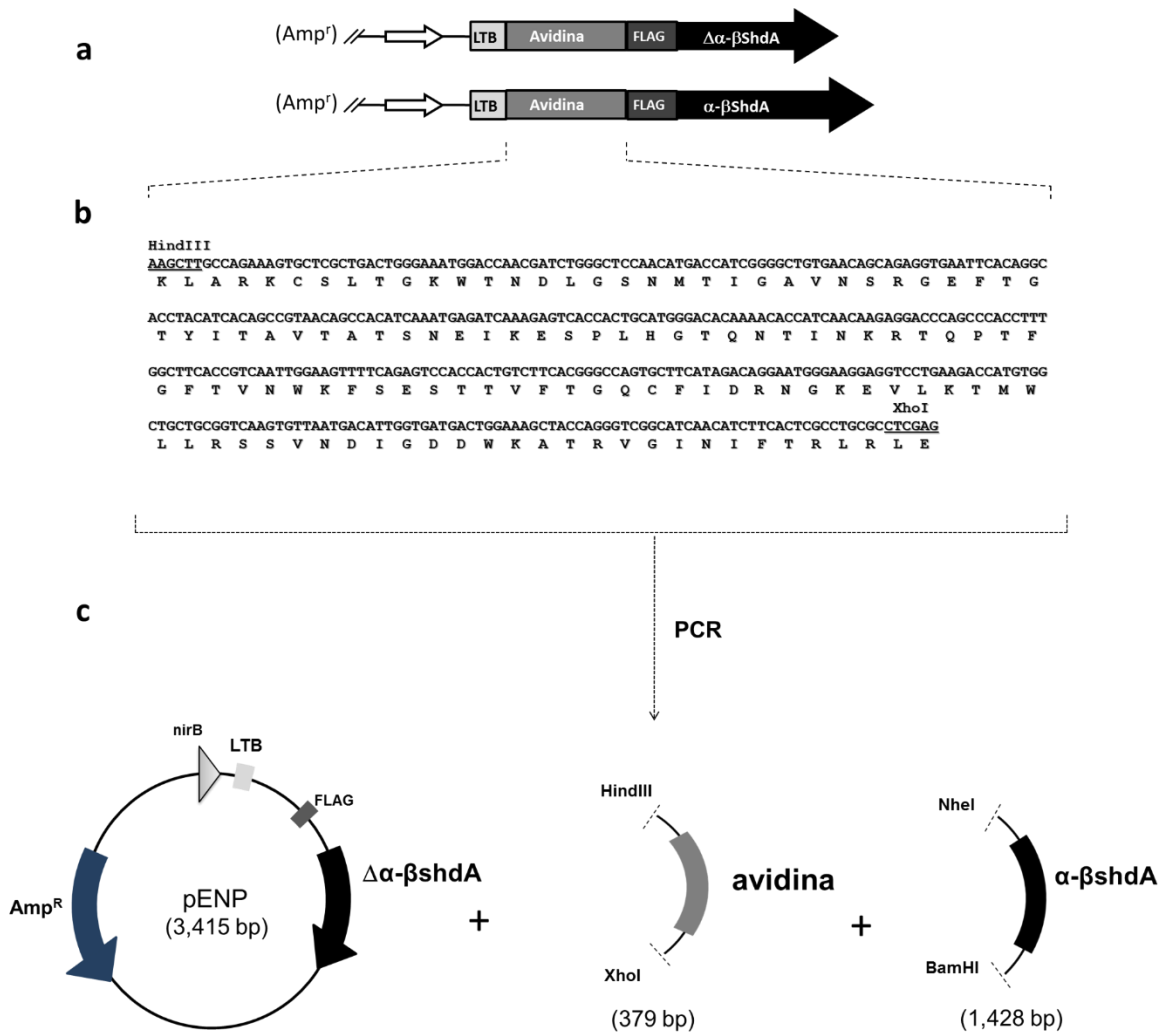


Figura 10. Representación esquemática de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina. a) Proteínas de fusión, b) Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la avidina clonada en este estudio y c) Estrategia para la construcción de los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina (Pardavé-Alejandre, et al. 2018).

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados en la construcción y secuenciación de los plásmidos pENP-avidina; pJEAY y pJEAY-avidina.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
shdA-1	5' CTAGCTAGCTGGCAATACGCTTTATGTCGATGGC 3'	NheI
shdA-2	5' GCTAAGGGATCCAGTTATAGCGCAGATTGAGGCTAC 3'	BamHI
avi-1	5' CCCAAGCTTGGGGCGCGCAAATGCAGCCTGACCGGCAAATGGACC 3'	HindIII
avi-2	5' CCGCTCGAGCGGCAGGCGAGTGAAGATGTTGATGCC 3'	XhoI
pNirl	5'-TTCAGGTAAATTTGATACATCAA-3'	NA

6.1.3. Preparación de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α .

Se partió de un cultivo bacteriano de 250 mL de *Escherichia coli* DH5 α en medio líquido Luria-Bertani (LB), en fase logarítmica de crecimiento (D.O.= 0.7; 5 h aproximadamente). Se procedió a centrifugar a 6000 rpm y se cosechó el paquete bacteriano. El paquete celular se resuspendió en 2 mL de solución de agua desionizada-glicerol 20% y se prepararon alícuotas de 100 μ L en viales y se ultracongelaron a -70°C hasta su uso. Para el choque térmico, este se realizó de acuerdo a las especificaciones y los protocolos del Manual de Laboratorio de Clonación Molecular (Sambrook et al., 2001). Inmediato al choque térmico, las bacterias se depositaron en 2 mL de medio SOC (0.5 % de extracto de levadura, 2% de triptona, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron 1 h a 37°C en un agitador orbital (Orbit Lab-line Environ-Shaker®) a 200 rpm. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de BHI agar con 100 μ g/mL de ampicilina (BHI-ampicilina), se incubaron a 37°C. Se aislaron colonias de cada una de las cepas recombinantes y se purificaron los plásmidos por lisis alcalina (Sambrook et al., 2001). La confirmación de clonas positivas para cada una de las construcciones se verificó mediante PCR. Las clonas recombinantes que resultaron positivas se crio-preservaron en medio líquido BHI con 15% de glicerol, a -70°C para su posterior caracterización.

6.2. Caracterización y análisis de la expresión de proteínas

6.2.1. Cultivo, curvas de crecimiento, condiciones de inducción con fines de expresión.

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α transformadas con los diferentes plásmidos (pENP, pENP-avidina, pJEAY y pJEAY-avidina) se cultivaron a 37°C en medio sólido de LB-ampicilina. Una vez que se aislaron colonias de cada una de las cepas, se procedió a inocularlas en medio líquido LB-ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Orbit Lab-line Environ-Shaker®) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O₆₀₀ nm) aproximada de 1. Posteriormente, un volumen de 100 μ L del cultivo de cada uno de ellos se transfirió a tubos con 30 mL de medio líquido LB-ampicilina (DIFCO® Laboratories, Detroit, MI) hasta que se alcanzó OD₆₀₀ nm = 1.0. Para realizar las curvas de crecimiento se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos de las cepas inducidas, cada 60 minutos hasta completar las 12 h de cultivo. En cada toma se procedió a medir la D.O₆₀₀ nm en un espectrofotómetro (Biometrix). Se incluyó como control, la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , sin transformar.

Para la inducción del promotor *nirB* con fines de expresión, las cepas de *Escherichia coli* DH5 α transformadas con los diferentes plásmidos se cultivaron en 30 mL de medio líquido LB-ampicilina y se incubaron a 33°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital, usando un sistema anaeróbico GasPak (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA) para favorecer un ambiente anaeróbico. Las bacterias se cosecharon a las 20 h de incubación.

6.2.2. Extracción de proteínas totales y de proteínas membrana externa de las cepas recombinantes de *Escherichia coli* DH5 α .

Las cepas recombinantes de *Escherichia coli* DH5 α transformadas con los diferentes plásmidos se cultivaron en condiciones inductoras a 33°C con agitación de 200 rpm durante 20 h. Para la extracción de proteínas totales, se recuperó una alícuota de 1 mL (1X10⁶ bacterias) de cada una de las cepas y se cosechó el botón bacteriano mediante centrifugación en una microcentrífuga a 6000 rpm a temperatura ambiente. Las bacterias se lavaron tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y después de descartar el sobrenadante el botón se resuspendió con 50 μ L de agua inyectable. Para la obtención de proteínas de membrana externa, se recuperó una alícuota de 3 mL

de cada una de las cepas bacterianas, se cosechó el botón bacteriano mediante centrifugación a 6000 rpm a temperatura ambiente. Las bacterias se lavaron tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y después de descartar el sobrenadante, se lavaron con 1 mL de buffer de Na_2PO_4 10 mM pH 7.2. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 0.5 mL de amortiguador de Na_2PO_4 10 mM pH 7.2 con inhibidor de proteasas. Cada uno de los extractos se pasaron a través un equipo Polytron Homogenizer (Thomas Scientific®) para lisar a las bacterias. Las bacterias lisadas fueron centrifugadas a 11,500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante conteniendo la fracción de membrana externa y se centrifugó a 11,500 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se recuperó el botón y se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador de Na_2PO_4 10 mM pH 7.2. Se le adicionaron 2 μL de Sarcosil al 0.5 % y se incubó a 37° C en agitación a 200 rpm durante 30 minutos. Se centrifugó a 11,500 rpm durante 30 minutos a 4° C y el botón conteniendo la fracción de membrana externa fue resuspendido en 50 μL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0. Finalmente, a la suspensión de bacterias para extracción de proteínas totales y a la suspensión de fracciones membranales se les adicionó 50 μL de amortiguador de muestra (SDS 25%, glicerol 25%, Tris-base 200mM, azul de bromofenol 0.025%) para proteínas y 5 μL de β -mercaptoetanol. Las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 minutos en baño María. Posteriormente, se dejaron enfriar, se pasaron por jeringa Hamilton a fin de homogenizar y se cuantificó la concentración de proteínas totales y de proteínas de membrana externa por el método de Bradford, usando el estuche comercial Bio-Rad Protein Assay™ (BioRad®).

6.2.3. SDS-PAGE y Western-blot.

Las muestras de proteínas totales y proteínas de membrana externa derivadas de cada una de las distintas cepas recombinantes de *Escherichia coli* DH5 α , se ajustaron a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en dos geles de poliacrilamida al 12 % (en condiciones desnaturalizantes) de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli UK., 1970), usando una cámara de electroforesis vertical BioRad® (modelo Mini-Protean 3 Cell). Se utilizó amortiguador de corrimiento Tris-glicina (Tris base 25mM, glicina 250 mM, SDS 0.01%, pH 8.3) y las condiciones del corrimiento fueron a 45 mA por dos h. Para visualizar las proteínas separadas, un gel se fijó por 3 h con solución acetona-metanol-agua (proporción 45:10:45)

y se tiñó con colorante azul de Coomassie (Bio-Rad®) por 30 minutos y posteriormente se decoloró con solución ácido acético-metanol agua (30:10:60). Finalmente, el gel de poliacrilamida se secó en medio de una membrana (Gel drying Promega®) en un soporte de acrílico.

Para detectar de manera específica las proteínas de fusión de interés (previamente separadas por el gel de poliacrilamida), las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente (Hybond-C Extra (300mm x 3m, Amersham Bioscience, GE technologies®), usando amortiguador de transferencia (Tris base glicina, pH 8.3) en una cámara vertical de transferencia (BioRad® Mini Trans-Blot Cell 2005) a 140 V por 1 h, a 4°C. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con PBS-leche descremada al 5% toda la noche y se lavó tres veces con 10 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS 1x) (pH 7.4, 137 mM NaCl), 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG (Sigma-Aldrich®) en dilución 1:1500 en PBS 1x. Se realizaron tres lavados con solución PBS 1x y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (H + L)-HRP conjugate (Zymed® Laboratories) en dilución 1:3000 en PBS 1x. Las membranas se lavaron tres veces con PBS 1x. Para detectar la expresión de la bandera FLAG fusionada a las proteínas de interés en extractos totales y extractos membranales, la reacción se reveló con una mezcla de 50 mL de PBS 1x (pH 7.4), 30 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 10 mL de metanol y adicionando como sustrato 100 µL de peróxido de hidrógeno; durante 10-30 segundos. Al final la reacción se detuvo con agua destilada. Todos los lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente por 10 minutos en un agitador orbital.

6.2.4. Microscopía de inmunofluorescencia confocal y análisis de citometría de flujo de las cepas de *Escherichia coli* DH5α.

Se cultivaron cada una de las *Escherichia coli* DH5α en condiciones de inducción. Se recuperó una alícuota de 1 mL (1X10⁶ bacterias) de cada cepa y se cosechó el botón bacteriano mediante centrifugación a 6000 rpm a temperatura ambiente. Las bacterias se lavaron tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y después de descartar el sobrenadante, se fijaron durante toda la noche con paraformaldehído al 4 %. Se lavaron tres veces con PBS 1x y se bloquearon incubando 1 h a temperatura ambiente, con PBS suplementado con albumina sérica bovina al 3 % (BSA; Sigma-

Aldrich). Entonces, las bacterias fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-FLAG (Sigma-Aldrich®) en dilución 1:50 en PBS-BSA durante toda la noche a 25° C en agitación. Las bacterias fueron lavadas tres veces con PBS 1x e incubadas con un anticuerpo hecho en cabra anti-ratón IgG (H + L)-FITC (Zymed®) en dilución 1:100 en PBS-BSA durante 2 h a 25° C con agitación en oscuridad. Las bacterias se lavaron tres veces con PBS 1x y fueron suspendidas en 50 µL de PBS 1x. De cada suspensión bacteriana se tomaron 5 µL, se realizó un frotis sobre cubreobjetos recubiertos con poly-L-lisina, los cuales fueron colocados sobre porta objetos y examinados con un microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse. Por otra parte, la expresión de la bandera FLAG fusionada a las proteínas de interés se analizó por citometría de flujo. Las bacterias fueron marcadas con anti-FLAG (Sigma-Aldrich®) en dilución 1:100 y posteriormente con anti-ratón IgG (H + L)-FITC (Zymed®) en dilución 1:250 y analizadas con un equipo de citometría de flujo Beckman Coulter FacScalibur usando el software FLOWJO v.7.5 (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

6.3. Capacidad de unión a biotina.

6.3.1. Evaluación de la capacidad de unión a biotina de las proteínas de fusión *ShdA*-avidina.

La capacidad de las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina de unir biotina se evaluó usando biotina-4-fluoresceína. Después de la inducción, cada una de las cepas de *E. coli* DH5α transformadas fue cosechada, lavada tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y fue ajustada a 1×10^8 UFC e incubada a 37° C con 50 µL de biotina-4-fluoresceína (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones 3.12×10^{-5} , 6.25×10^{-5} , 1.25×10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 5×10^{-4} M. Cada suspensión de bacterias fue analizada por citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La capacidad de las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina de unir moléculas biotiniladas como OVA-biotinilada (bio-OVA) a la proteína de fusión *ShdA*-avidina autoexpuesta sobre la superficie bacteriana fue evaluada por IFI. La OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA) fue biotinilada usando un kit de biotinilación ImmunoProbe (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la inducción, cada una de las cepas de *Escherichia coli* DH5α fue cosechada, lavada tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril, ajustada a 1×10^8 UFC e

incubada con 50 μL de bio-OVA en concentraciones 1×10^{-4} , 1×10^{-3} y 1×10^{-2} M. Posteriormente, la suspensión de bacterias fue lavada dos veces con PBS 1x y los botones fueron resuspendidos en 500 μL de PBS 1x. Fueron incubadas a 37°C con agitación con el anticuerpo primario anti-ovoalbumina en dilución 1:1000. Después de tres lavados con PBS 1x, fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (H+L) conjugado a FITC (Zymed®), diluido a 1:1500. Finalmente, la suspensión de cada una de las cepas de bacterias, fue resuspendida en 50 μL de PBS 1x y 5 μL de la suspensión de bacterias fue colocada sobre porta objetos y observada utilizando un microscopio de fluorescencia (BX-40; Olympus).

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Construcción de los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina.

En la figura 11 se muestran los plásmidos construidos en este trabajo y cuya expresión se encuentra bajo el promotor *nirB*. Los tamaños moleculares estimados fueron: pENP (3,415 pb), pENP-avidina (3,794 pb), pJEAY (3,727 pb) y pJEAY-avidina (4,094 pb).

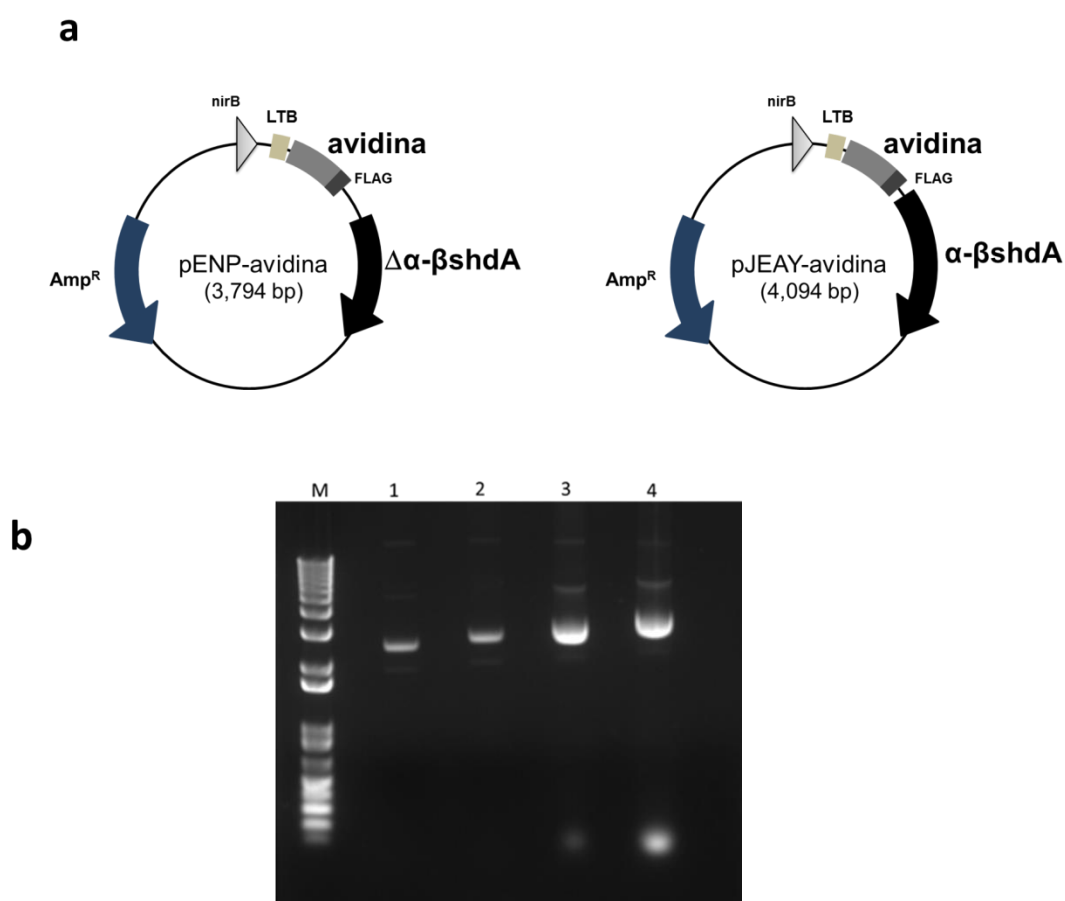


Figura 11. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1.0 % de los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina. a) Representación esquemática de los plásmidos pENP-avidina (3,794 pb) y pJEAY-avidina (4,094 pb) que codifican para las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina respectivamente. b) Análisis electroforético de los plásmidos sin digerir, en geles de agarosa al 1.0 % M) Marcador de 1 Kb (Plus DNA Invitrogen®), plásmidos: 1) pENP, 2) pENP-avidina, 3) pJEAY, 4) pJEAY-avidina.

7.2. Expresión de *ShdA*-avidina bajo el control del promotor *nirB*.

Dos proteínas de fusión *ShdA*-avidina fueron construidas, una versión corta: LTB-avidina-FLAG- Δ *ShdA* (*sShdA*-avidina) y una versión larga: LTB-avidina-FLAG-*ShdA* (*wShdA*-avidina). Todas las proteínas de fusión se encuentran bajo el control del promotor inducible *nirB*. De esta manera, un modelo hipotético de translocación para *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina es mostrado en la figura 12a. La producción de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina, fue demostrada mediante SDS-PAGE (figura 12b) y Western-blot (figura 12c), con lisados de extractos totales y extractos de membrana externa, después de inducir a los cultivos bacterianos. Las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos pENP, pENP-avidina, pJEAY y pJEAY-avidina expresaron con éxito, las proteínas de fusión que contienen a la avidina recombinante tanto en extractos totales, como en extractos de membrana externa (figuras 12b y 12c).

Es importante mencionar que las bandas esperadas correspondientes a las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina con pesos moleculares de 52.2 y 70.1 kDa fueron observadas (figura 12b carriles 5 y 9 respectivamente). En la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con los plásmidos pENP y pJEAY, las bandas de las proteínas con pesos moleculares de 39 y 56.2 kDa fueron observadas respectivamente (figura 12b, carriles 3 y 7). Un extracto de proteínas totales de *E. coli* no transformada fue incluido como control negativo (figura 12b, carril 1). Además, se detectaron las proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina en fracciones de membrana externa de cepas inducidas de *E. coli* que contenían los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina (figura 12b, carriles 6 y 10, respectivamente). Se detectó una expresión similar de proteínas de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina en fracciones de membrana externa de *E. coli* transformadas con los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina, respectivamente.

Así, el peso molecular de la avidina recombinante fue consistente con el diseño de ingeniería genética.

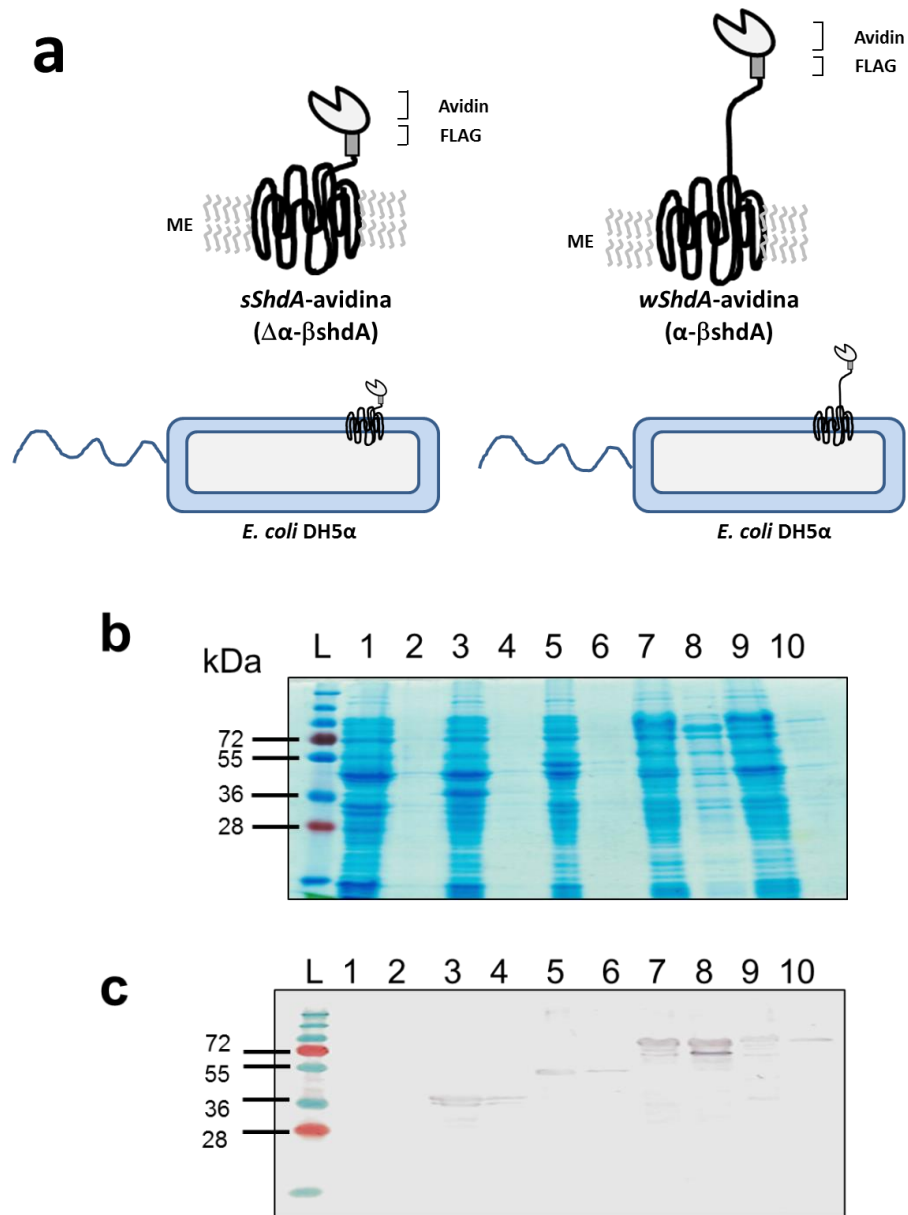


Figura 12. Expresión de las proteínas de fusión que contienen avidina monomérica recombinante en lisados de células completas y en fracción de membrana externa de *E. coli* DH5 α . a) Modelo hipotético de translocación para *sShdA*-avidina ($\Delta\alpha$ - β shdA-avidina) y *wShdA*-avidina (α - β shdA-avidina) en la superficie de *E. coli* DH5 α . b) Análisis por SDS-PAGE. c) Análisis por Western-blot de las proteínas de fusión LTB-FLAG-*sShdA* (carriles 3 y 4), LTB-Avidina-FLAG-*sShdA* (carriles 5 y 6), LTB-FLAG-*wShdA* (carriles 7 y 8) y LTB-Avidina-FLAG-*wShdA* (carriles 9 y 10). Un lisado de células completas y la fracción de membrana externa derivadas de cepas de *E. coli* DH5 α no transformadas fueron incluidas como control negativo (carriles 1 y 2 respectivamente). Carriles 1, 3, 5, 7 y 9, proteínas totales; Carriles 2, 4, 6, 8 y 10, fracción de membrana externa. Todas las proteínas de fusión fueron rastreadas con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

7.3. Efecto del plásmido sobre la cinética de crecimiento de *E. coli* DH5 α .

Generalmente, la introducción de un plásmido en un huésped bacteriano como (*E. coli*), conlleva a ciertos beneficios para el acarreador bacteriano. Por otra parte, la expresión de las proteínas recombinantes, codificadas por el plásmido dependen en buena parte de la persistencia continua del plásmido y a su vez, la persistencia del plásmido puede tener un impacto significativo en la cinética de crecimiento del acarreador bacteriano. Con base en esta premisa, se evaluó el efecto de la persistencia de los plásmidos pENP, pENP-avidina, pJEAY y pJEAY-avidina, sobre la cinética de crecimiento de *E. coli*. En la figura 13, se muestra cómo la persistencia de los plásmidos impacta en la cinética de crecimiento de *E. coli*, ya que la cepa de *E. coli* DH5 α carente de plásmido posee una velocidad de crecimiento mayor respecto de las cepas transformadas con pENP, pENP-avidina y pJEAY-avidina que muestran cinéticas muy semejantes. Incluso este efecto fue mucho más evidente con la cepa pJEAY. De esta manera, estos resultados demuestran que la persistencia y replicación de un plásmido impacta en la adaptación o *fitness* al introducirse una carga metabólica adicional en *E. coli*. (figura 13).

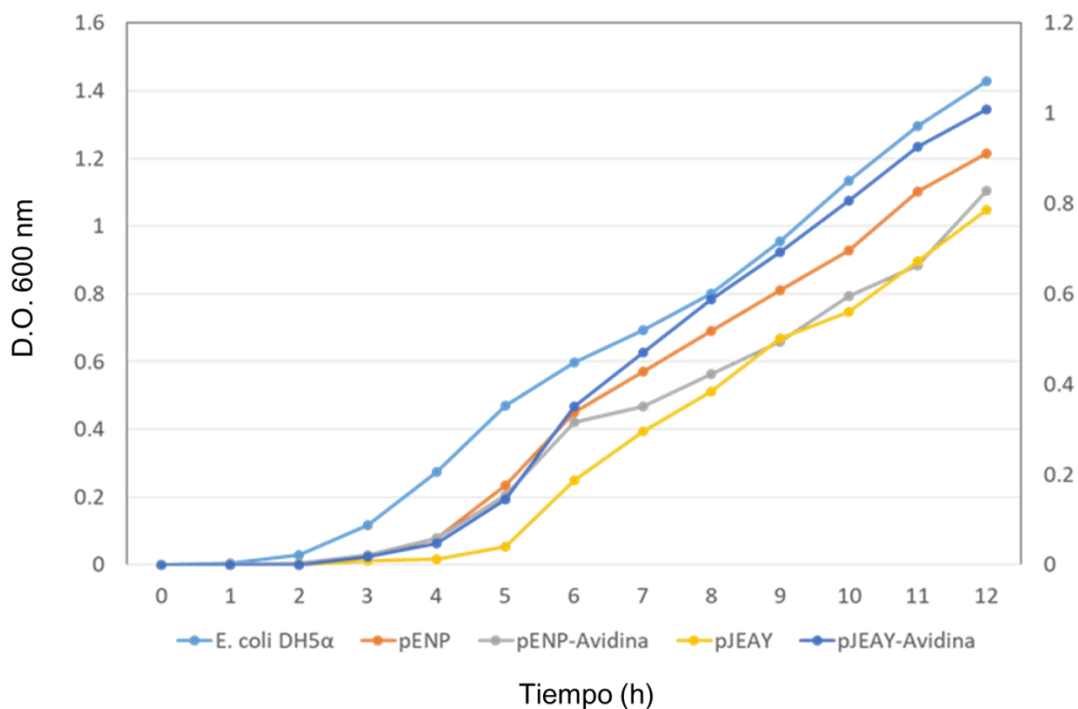


Figura 13. Cinética de crecimiento de *E. coli* DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.

7.4. Exposición de las proteínas de fusión *ShdA*-avidina sobre la superficie celular de *E. coli* DH5 α .

Con el objetivo de confirmar el *autodespliegue* de las proteínas de fusión constituidas por la avidina monomérica recombinante fusionada a las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*) sobre la superficie de *E. coli* DH5 α , se confirmó su presencia mediante microscopia de inmunofluorescencia confocal y citometría de flujo empleando un anticuerpo monoclonal dirigido a la bandera molecular FLAG (figura 14). Las cepas de *E. coli* DH5 α : pENP (LTB-FLAG-*sShdA*) (figura 14b); pENP-avidina (LTB-AVIDINA-FLAG-*sShdA*) (figura 14c); pJEAY (LTB-FLAG-*wShdA*) (figura 14d) y pJEAY-avidina (LTB-AVIDINA-FLAG-*wShdA*) (figura 14e); mostraron fluorescencia en su superficie, sugiriendo el *autodespliegue* de las proteínas de fusión LTB-FLAG-*sShdA*, LTB-Avidina-FLAG-*sShdA*, LTB-FLAG-*wShdA* y LTB-Avidina-FLAG-*wShdA* respectivamente. En cambio, en la cepa control *E. coli* DH5 α (sin transformar) no se observó fluorescencia en su superficie (figura 14a). Por otra parte, los histogramas obtenidos a partir de ensayos de citometría de flujo mostrados en la figura 14f, también de las proteínas de fusión constituidas por la avidina monomérica recombinante fusionada a las dos variantes del autotransportador *ShdA* (short *ShdA* y whole *ShdA*) sobre la superficie de *E. coli* DH5 α confirmaron el *autodespliegue* de la avidina recombinante sobre la superficie celular de *E. coli*. A este respecto, 87.1 % de células de la cepa pENP (LTB-FLAG-*sShdA*) mostraron haber unido a FLAG-FITC ya que se observó un desplazamiento de la unidad de luz relativa de 2-log con respecto a la cepa control de *E. coli* DH5 α no transformada. Por su parte, las cepas pENP-avidina, pJEAY y pJEAY-avidina, mostraron porcentajes de células capaces de unir a FLAG-FITC menores del 60.1 %, 62 % y 64 %, respectivamente. Por lo tanto, se observó que las proteínas de fusión LTB-Avidina-FLAG-*sShdA* y LTB-Avidina-FLAG-*wShdA* se *autodesplegaron* en la superficie celular de *E. coli*, a través de las dos versiones del autotransportador *ShdA* (*sShdA* y *wShdA*).

7.5. Capacidad de unión de *ShdA*-avidina a moléculas biotiniladas en la superficie de *E. coli* DH5 α .

Una vez demostrado el *autodespliegue* de las proteínas de fusión LTB-Avidina-FLAG-*sShdA* y LTB-Avidina-FLAG-*wShdA* sobre la superficie celular de *E. coli*, se procedió a determinar mediante citometría de flujo, la concentración de biotina necesaria para unirse a la avidina recombinante, incubando diluciones seriadas de biotina-4-fluoresceína con células de *E. coli* DH5 α (fase logarítmica

tardía). En la tabla 4, se observa que la unión de biotina-4-fluoresceína a la avidina recombinante *autodesplegada* por las diferentes cepas transformadas de *E. coli* DH5 α , es concentración dependiente. A una concentración de biotina-4-fluoresceína de 3.12×10^{-5} M, se observó que el porcentaje de células que *autodesplegaron* la avidina recombinante y unieron biotina-4-fluoresceína fue del 58.5% para la cepa pENP-avidina y del 20.1% para la cepa pJEAY-avidina. Por otra parte, a una concentración de 5×10^{-4} M, el porcentaje de células que unieron biotina-4-fluoresceína fue del 80.5% en el caso de la cepa pENP-avidina y 83.2% para la cepa pJEAY-avidina. Sin embargo, a diferencia de la concentración menor de 3.12×10^{-5} M, se observó que cuando se incubaba *E. coli* con biotina-4-fluoresceína a una concentración mayor de 5×10^{-4} M, el porcentaje de células que la unieron incrementó en el caso de las cepas con los plásmidos pENP y pJEAY hasta un 72.9% y 44.6%, respectivamente, siendo que no expresaban la avidina recombinante. Con la concentración 5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína, si bien se observó el mayor porcentaje de células que la unieron por parte de las cepas pENP-avidina 80.5 % y pJEAY-avidina 83.2%, también en la cepa control (*E. coli* DH5 α sin transformar) se observó un porcentaje del 53 % de células que la unieron. De esta manera y con base en los porcentajes de células capaces de unir biotina-4-fluoresceína, 76.9 % en la cepa pENP-avidina, 45.7 % en la cepa pJEAY-avidina y 19.7 % en la cepa control de *E. coli* DH5 α no transformada, observados en los histogramas obtenidos por citometría de flujo (figura 15) donde se observó un desplazamiento de la unidad de luz relativa de la curva de 2-log, se consideró que la concentración de 2.5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína fue la que permitió evaluar la capacidad de unión a biotina.

Tabla 4. Porcentaje de células bacterianas que unieron biotina-4-fluoreceína a diferentes concentraciones sobre la superficie celular de *E. coli* DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.

[biotina-4-fluoresceína]	<i>E. coli</i> DH5 α	pENP (LTB-FLAG-sShdA)	pENP-avidina (LTB-Avidina-FLAG-sShdA)	pJEAY (LTB-FLAG-wShdA)	pJEAY-avidina (LTB-Avidina-FLAG-wShdA)
3.12×10^{-5} M	7.0 %	55.7 %	58.5 %	15.6 %	20.1 %
6.25×10^{-5} M	8.2 %	58.0 %	55.4 %	14.3 %	24.2 %
1.25×10^{-4} M	11.9 %	65.7 %	72.2 %	26.2 %	36.3 %
2.5×10^{-4} M	19.7 %	72.2 %	76.9 %	25.2 %	45.7 %
5×10^{-4} M	53.0 %	72.9 %	80.5 %	44.6 %	83.2 %

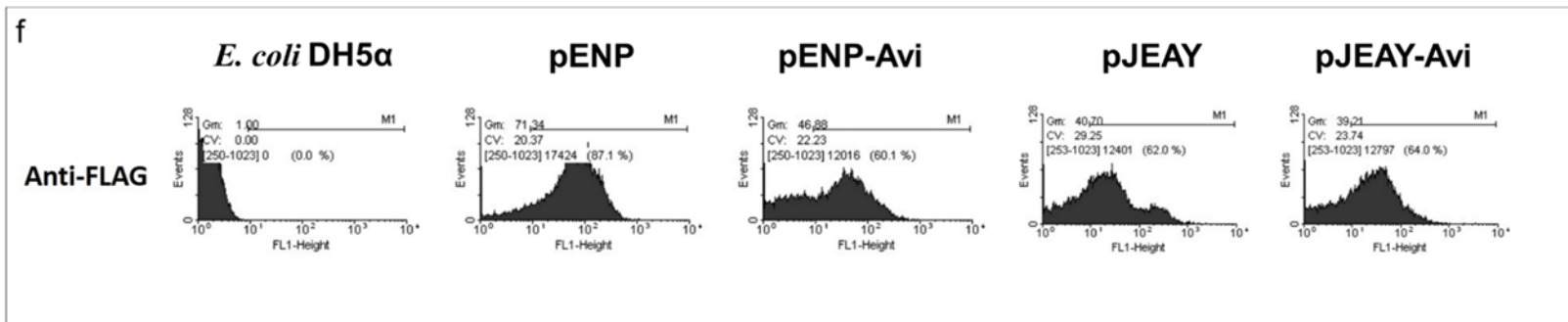
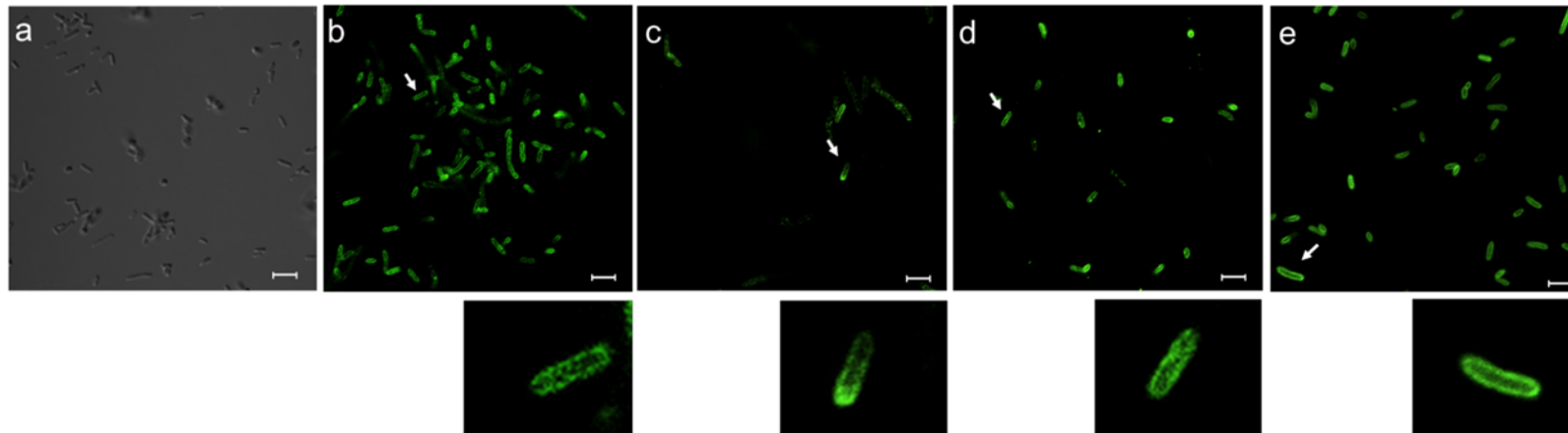


Figura 14. Exposición de la avidina monomérica recombinante sobre la superficie celular de las cepas de *E. coli* revelada por microscopia inmunofluorescencia confocal. a) Se observó *E. coli* DH5α (en campo claro), **b)** pENP **c)** pENP-avidina, **d)** pJEAY y **e)** pJEAY-avidina. Micrografías observadas a 100x de magnificación. Las imágenes fluorescentes mostradas en el inferior de cada micrografía corresponden a las flechas indicadas en **b-e)**. Cada barra de escala representa 5 μm. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes. **f)** Histogramas que muestran la expresión de las proteínas de fusión en la superficie de *E. coli* DH5a transformada con diferentes plásmidos. Las células se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG y anticuerpo anti-IgG conjugado con FITC.

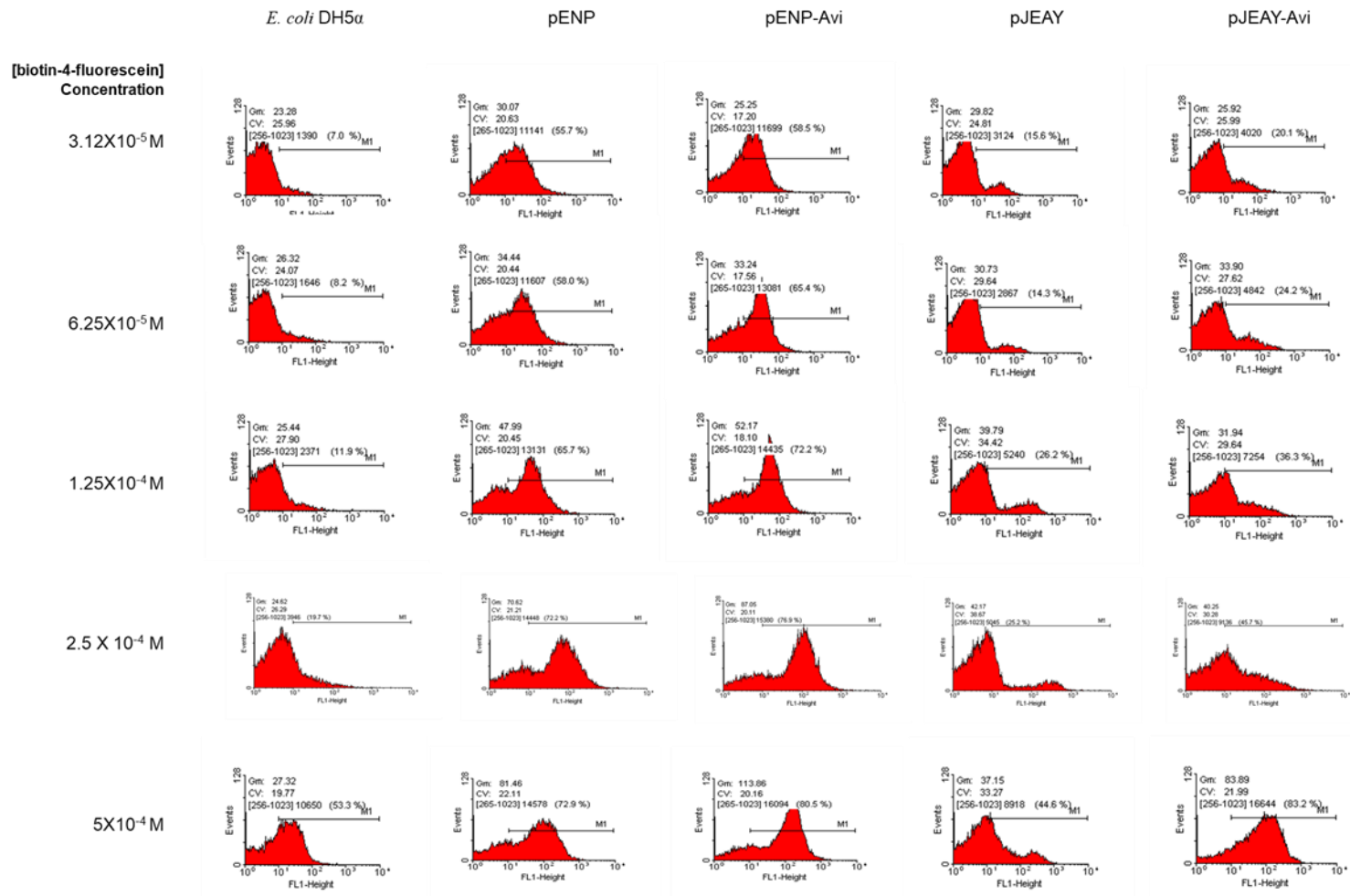


Figura 15. Determinación de la concentración de biotina-4-fluoresceína unida a avidina monomérica recombinante presentada por *E. coli* DH5α. Las cepas de *E. coli* DH5α se cultivaron en condiciones inductoras y se incubaron con diferentes concentraciones de biotina-4-fluoresceína (3.12 x 10⁻⁵ M, 6.25 x 10⁻⁵ M, 1.25 x 10⁻⁴ M, 2.5 x 10⁻⁴ M y 5 x 10⁻⁴ M).

Si bien, ambas formas de *ShdA* (*sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina) mostraron habilidad de unión a biotina, de una manera concentración dependiente; se consideró la concentración de 2.5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína, como la que permitió evaluar la capacidad de unión a biotina debido al comportamiento observado en los histogramas obtenidos por citometría de flujo (figura 16a) donde se observó un desplazamiento de la unidad de luz relativa de la curva de *2-log* en la cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con pENP-avidina y pJEAY-avidina con respecto a la cepa control de *E. coli* DH5 α no transformada. Esta fue la única concentración donde se observó este comportamiento. En consecuencia, con esta misma concentración se evaluó qué forma de *ShdA* unía mejor a la biotina-4-fluoresceína. A este respecto, a través de un gráfico de frecuencia relativa (figura 16b) fue posible observar la densidad de las poblaciones (cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con *sShdA* y *wShdA*) capaces de unir biotina-4-fluoresceína siendo mayor en la cepas de *E. coli* que expresaban *sShdA*, con un porcentaje del 68.8 % en la cepa pENP y del 74 % en la cepa pENP-avidina en comparación con el 21.8 % en la cepa pJEAY y el 42.5 % en la cepa pJEAY-avidina, respectivamente. De manera colectiva, estos datos sugieren que la capacidad de unión a biotina parece ser mejor en la cepa que expresa la variante corta *sShdA* (pENP-avidina), en comparación con la variante completa *wShdA* (pJEAY-avidina), aunque se observó que la cepa transformada con variante corta *sShdA* (pENP) también unió biotina-4-fluoresceína (68.8 %) de forma inespecífica siendo que este plásmido no codificaba para la avidina monomérica recombinante en contraste con la cepa transformada con la variante completa *wShdA* (pJEAY) con un 21.8 % siendo que este plásmido tampoco codificaba para la proteína recombinante (Tabla 5).

Además de la biotina-4-fluoresceína que permitió evaluar la capacidad de la avidina recombinante fusionada a la variante corta *sShdA* y la variante completa *wShdA*, otra molécula evaluada fue la ovoalbúmina biotinilada (OVA-biotinilada). Bacterias transformadas con los plásmidos pJEAY y pJEAY-avidina (variante completa *wShdA*) mostraron capacidad de unirse a biotina-4-fluoresceína en una concentración de 2.5×10^{-4} M (figura 17a) y OVA-biotinilada en una concentración de 1×10^{-4} M (figura 17b), además se observó que la cepa de *E. coli* DH5 α sin transformar tiene una capacidad basal para unir biotina, como también se pudo evidenciar mediante citometría de flujo (figura 15). Por su parte, la cepa de *E. coli* pJEAY-avidina además de unir OVA-biotinilada formó agregados bacterianos posteriores a la unión de OVA-biotinilada (figura 17b).

Tabla 5. Porcentaje de células bacterianas que unieron biotina-4-fluoreceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M sobre la superficie celular de *E. coli* DH5 α transformada con los diferentes plásmidos.

[biotina-4-fluoresceína]	<i>E. coli</i> DH5 α	pENP (LTB-FLAG-s <i>ShdA</i>)	pENP-avidina (LTB-Avidina-FLAG-s <i>ShdA</i>)	pJEAY (LTB-FLAG-w <i>ShdA</i>)	pJEAY-avidina (LTB-Avidina-FLAG-w <i>ShdA</i>)
2.5×10^{-4} M	16 %	68.8 %	74 %	21.8 %	42.5 %

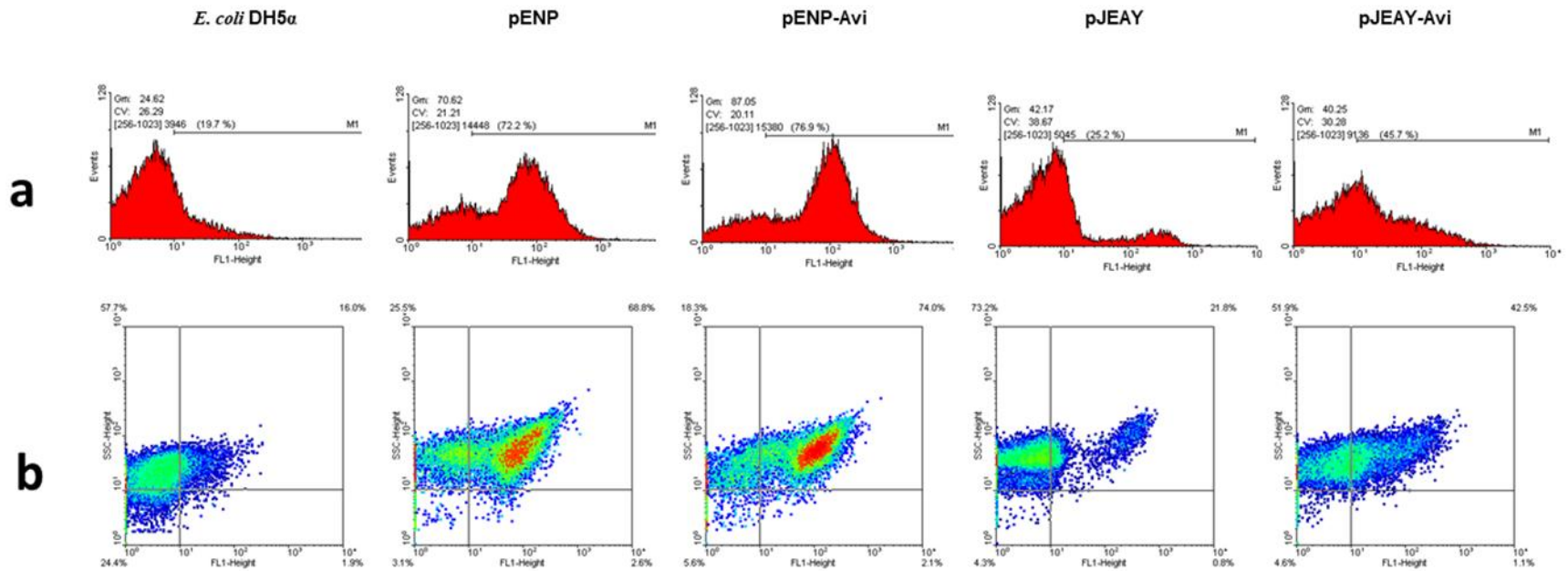


Figura 16. Capacidad de unión a biotina de avidina monomérica recombinante en la superficie de *E. coli* DH5a transformada con diferentes plásmidos.

a) Histogramas correspondientes a biotina-4-fluoresceína unida a avidina recombinante en la superficie de cepas de *E. coli*. **b)** Diagramas de puntos representativos de la dispersión lateral y la intensidad de fluorescencia media de los análisis de citometría de flujo de pENP, pENP-avidina, pJEAY y pJEAY-avidina de *E. coli* después del tratamiento con 2.5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína; el porcentaje de células fluorescentes se presenta. Se usó una cepa de *E. coli* DH5a no transformada como control.

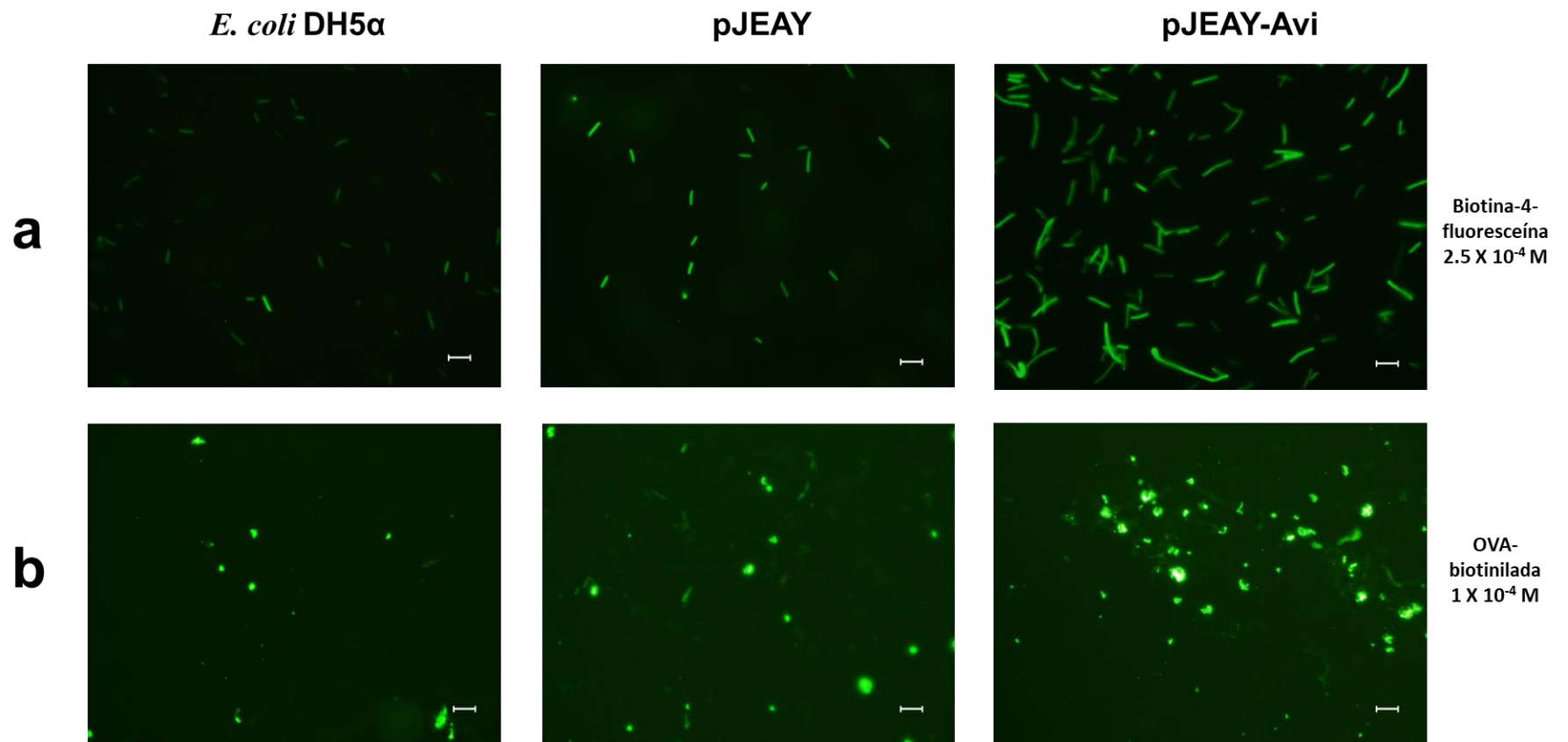


Figura 17. Determinación de la unión de moléculas biotiniladas a la avidina recombinante presentada en la superficie de *E. coli* DH5 α mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA). **a)** IFA de cepas de *E. coli* (*wShdA*) incubadas con 2.5 x 10⁻⁴ M biotina-4-fluoresceína. **b)** IFA de cepas de *E. coli* (*wShdA*) incubadas con 1 x 10⁻⁴ M OVA-biotinilada y reveladas con anticuerpo anti-OVA y conjugado FITC-anti IgG. Micrografías observadas a 100 x de aumento. Cada barra de escala representa 5 μ m.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

Los autotransportadores son proteínas que constituyen el sistema tipo V de secreción de las bacterias Gram negativas y los utilizan de forma ubicua para exportar factores de virulencia y colonizar otras células y/o sensar su entorno. Se expresan como proteínas monoméricas que pasan la membrana interna y externa en dos pasos consecutivos facilitados por el translocón *Sec* y el complejo BAM, respectivamente (van et al., 2018b). Han sido ampliamente usados para *autodesplegar* proteínas o péptidos heterólogos funcionales sobre la superficie de bacterias. Este método es simple y tiene varias ventajas por encima de la producción de proteínas recombinantes en otros compartimentos bacterianos. Sin embargo, el *autodespliegue* tiene varias limitaciones entre las cuales se encuentran las diferencias en el plegamiento de la proteína recombinante con respecto a la proteína nativa. Por otra parte, los sistemas autotransportadores de bacterias Gram negativas no resultan adecuados cuando la glicosilación y las modificaciones postraduccionales son importantes para la función de la proteína recombinante o dominio pasajero.

En el presente estudio, desarrollamos un sistema de expresión y de visualización en superficie “*in trans*” utilizando el autotransportador *ShdA* para el *autodespliegue* de avidina monomérica recombinante en la superficie celular de la bacteria *E. coli* DH5 α . La fusión de avidina recombinante al autotransportador *ShdA*, se realizó con la finalidad de exponer hacia el medio extracelular, la avidina recombinante con capacidad de unir externamente moléculas biotiniladas, producidas o purificadas de manera separada. De esta manera, la unión de biotina-4-fluoresceína y OVA-biotinilada en la superficie de *E. coli* DH5 α , nos permitió retomar el concepto de expresión “*in trans*” como un sistema alternativo para unir moléculas con modificaciones postraduccionales.

La avidina se une a la biotina con alta especificidad y afinidad ($K_d = 1.3 \times 10^{-15}$ M a pH 5.0) y se conoce como la interacción no covalente más fuerte en la naturaleza (Chivers et al., 2011) y sus propiedades han sido utilizadas como una herramienta biológica para una amplia gama de aplicaciones. El enfoque que nosotros presentamos aquí representa un sistema que une moléculas biotiniladas, con propiedades bioquímicas diversas, en la superficie bacteriana de *E. coli*. Lo anterior es importante, dado que sugiere tener potencial para el desarrollo de pruebas diagnósticas de aglutinación rápida o desarrollo de vacunas. Además, este sistema podría representar una

alternativa viable, para que, en caso de requerirse, sustituya a la clonación y la expresión de proteínas recombinantes que precisen de modificaciones postraduccionales para mantener sus características de proteína nativa (Liao et al., 2015).

El uso del autotransportador *ShdA* implica considerar que la región *linker* es indispensable para la translocación del dominio pasajero a la superficie bacteriana (Jong et al., 2018). De manera importante, está documentado que el acortamiento o mutagénesis sitio-dirigida en esta región, representa un impedimento para el *autodespliegue* de péptidos heterólogos y a este respecto, se requieren 16 aminoácidos del dominio α del autotransportador *ShdA*, para translocar a la superficie bacteriana, péptidos heterólogos (Osorio-León, 2004). En consecuencia, en el presente trabajo se construyeron dos versiones de la proteína de fusión *ShdA*-avidina: una corta *sShdA*-avidina (pENP-avidina) de 3,794 pb; y una completa *wShdA*-avidina (pJEAY-avidina) de 4,094 pb (Figura 11a). La versión corta de *sShdA*-avidina, contiene un dominio α truncado a diferencia de la versión completa *wShdA*-avidina.

Una vez que se transformó a *E. coli* con las diferentes construcciones, se procedió a demostrar la expresión de los plásmidos pENP-avidina y pJEAY-avidina que codifican para las dos variantes del autotransportador *ShdA*: short *ShdA* (*sShdA*) y whole *ShdA* (*wShdA*), fusionado a la forma recombinante de avidina monomérica. Si bien varios estudios han demostrado que las formas incompletas y trucas del motivo de anclaje son mejores que el dominio completo para el *autodespliegue* de proteínas de superficie, debido a las limitaciones de tamaño y el plegado incorrecto que podrían presentar las moléculas que se desean *autodesplegar* (Han y Lee, 2015); los resultados de este estudio mediante el ensayo de Western-blot (Figura 12c), mostraron que ambas formas de la proteína de fusión *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina permitieron la expresión de la avidina monomérica recombinante como dominio pasajero, tanto en extractos totales, así como en la fracción de la membrana externa de la bacteria. A este respecto, los autotransportadores como parte de la familia de las proteínas de la membrana externa en bacterias Gram negativas, se encuentran residiendo en la membrana externa (Meuskens et al., 2019). Por lo tanto, resultó indispensable detectar en este compartimento, la presencia de las dos variantes recombinantes de la proteína de fusión *ShdA*-avidina, confirmando así que el dominio β -barril de *ShdA* residía en la

membrana externa de *E. coli* permitiendo el *autodespliegue* del dominio pasajero hacia la superficie bacteriana.

Al igual que en otros sistemas de expresión empleados por nuestro grupo de investigación (Pompa-Mera et al., 2014; Pompa-Mera et al., 2011; Ruiz-Perez et al., 2002), para asegurar la translocación de la proteína de fusión hacia el periplasma y hacia la membrana externa de la bacteria, se consideró emplear la secuencia señal de tráfico de la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de *E. coli*. ETEC, la cual es una secuencia *Sec-dependiente* (Choi y Lee, 2004), del mismo modo, se decidió el uso del promotor *nirB* en los plásmidos de expresión construidos, el cual es un promotor inducible en condiciones microaerófilas y en anaerobiosis *in vitro*. De esta manera, la expresión inducible de las proteínas de fusión a través de un sistema de bajo número de copias puede evitar la expresión constitutiva de una proteína heteróloga con la finalidad de regular la expresión inducible de las proteínas de fusión cuya síntesis representa una carga metabólica adicional para la bacteria transformada, resultando muchas veces en un producto tóxico o en un cuerpo de inclusión (Chatfield et al., 1992). Por lo tanto, se procedió a evaluar el efecto de cada plásmido sobre la cinética de crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* en condiciones inductoras (Figura 13). Con respecto a las cepas transformadas con pENP, pENP-avidina y pJEAY-avidina, estas muestran cinéticas de crecimiento muy semejantes en la fase *log* y a partir de las 6 h es evidente que el plásmido pENP-avidina tiene un impacto en la velocidad de crecimiento a diferencia de las cepas pENP y pJEAY-avidina. Aunque todas fueron muy semejantes entre sí, es notable el efecto que tiene pENP-avidina y pJEAY sobre el crecimiento de la bacteria, a pesar de que el promotor del plásmido es de origen procarionte. Esta observación sugiere que el crecimiento bacteriano se afecta a medida que el plásmido codifica para una proteína de fusión de mayor tamaño y que permanece anclada a la membrana externa. Pero en el caso particular de pENP y pJEAY-avidina el crecimiento bacteriano no se vio disminuido y cuya cinética de crecimiento fue similar a la de la cepa control *E. coli* DH5 α . Ninguna de las cepas analizadas mostró efectos tóxicos atribuibles a la replicación o expresión de alguno de los plásmidos. Los resultados de la cinética de crecimiento de las cepas de *E. coli* en el presente estudio, demuestran que la persistencia y replicación de los plásmidos impactan en la adaptación al introducirse una carga metabólica adicional. De hecho, la cepa transformada con el plásmido pJEAY, tiene una cinética de crecimiento más lenta, a diferencia de la cepa pJEAY-avidina. Los aspectos relacionados con la cinética de crecimiento son cruciales, ya que pueden también

reflejar la velocidad de crecimiento *in vivo* afectando la cantidad de péptido heterólogo (Galen et al., 2010). La persistencia y replicación de un plásmido implica costos para la adaptación o *fitness* en términos del metabolismo del acarreador bacteriano, es decir, se introduce una carga metabólica adicional, por tal motivo, con el paso del tiempo los plásmidos no persistirán y se perderán (Carroll y Wong, 2018).

Diversos estudios realizados por nuestro grupo de investigación, han demostrado que el dominio β -barril completo del autotransportador *ShdA*, resulta eficiente para translocar y expresar en la superficie diversos dominios pasajeros (Pompa-Mera et al., 2014; Pompa-Mera et al., 2011; Ruiz-Perez et al., 2002). De manera importante, diversos autotransportadores como AIDA-I (*adhesin-involved-in-diffuse-adherence*), han mostrado que requieren del papel esencial de la región *linker* (localizada entre los dominios α y β para la translocación y exportación del dominio pasajero (Maurer et al., 1999). Un ejemplo similar ocurre en el caso de la región *linker* de *ShdA*, en donde 16 aminoácidos del dominio α del autotransportador *ShdA*, resultan indispensables para translocar a la superficie bacteriana, péptidos heterólogos (Osorio-León, 2004). La idea de emplear una versión corta del autotransportador de *ShdA* (*sShdA*), surge a partir de la necesidad de translocar proteínas pasajeras de mayor tamaño. Con base en esta premisa, en el presente estudio se construyeron dos versiones de la proteína de fusión *ShdA*-avidina, una corta (*sShdA*-avidina) y una completa (*wShdA*-avidina) y su *autodespliegue* sobre la superficie de *E. coli* DH5 α se confirmó mediante microscopia de inmunofluorescencia confocal y citometría de flujo. Los resultados mostraron que el dominio pasajero de la proteína de fusión se expresó más eficientemente en la superficie de *E. coli* pJEAY-avidina (64%), en comparación con la cepa pENP-avidina (60.1%) (Figura 14f), lo que sugiere que la forma corta del autotransportador *ShdA* (*sShdA*) contribuya de manera menos eficiente al *autodespliegue* de moléculas de menor tamaño, al contar con una región *linker* más corta. Asimismo, los porcentajes de positividad a FLAG-FITC mostrados por las cepas pJEAY y pJEAY-avidina, si bien fueron muy similares (62% y 64%), también sugieren que la forma completa de *ShdA* (*wShdA*) contribuye mucho mejor al *autodespliegue* de moléculas de mayor tamaño, como la avidina monomérica recombinante de 124 aminoácidos. Lo anterior, también se ve reflejado por las diferencias en la positividad a FLAG-FITC que hay entre las cepas pENP-avidina (60.1%) *versus* su contraparte pJEAY-avidina (64%). De esta manera, se confirmó, que el sistema mediado por el autotransportador *ShdA* permitió la translocación y expresión de avidina monomérica

recombinante. La funcionalidad del autotransportador *ShdA* se demostró en *E. coli* DH5α de forma colectiva a través de ensayos de Western blot, microscopia confocal y citometría de flujo.

Una vez demostrado que el sistema con el autotransportador *ShdA*, permitió la translocación del dominio pasajero de la proteína de fusión conteniendo a la avidina monomérica recombinante, en la superficie de *E. coli*, lo siguiente fue evaluar su capacidad para unir moléculas biotiniladas. En este contexto, nuestros resultados obtenidos a través de ensayos de citometría de flujo, demuestran que el 45.7 % de las bacterias transformadas con el plásmido pJEAY-avidina (versión *wShdA*), permitieron la unión en modo “*in trans*” de biotina-4-fluoresceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M, en contraste con el 76.9 % las bacterias transformadas con el plásmido pENP-avidina (versión *sShdA*), pero donde fue visible que el 72.2 % de bacterias control transformadas con el plásmido pENP (versión *sShdA*), permitieron la unión inespecífica en modo “*in trans*” de biotina-4-fluoresceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M, a pesar de que el plásmido no codificaba para expresión de la avidina monomérica recombinante. No así, en las bacterias control transformadas con el plásmido pJEAY (versión *wShdA*) donde se observó que sólo el 25.2 % fueron capaces de unir inespecíficamente en modo “*in trans*” biotina-4-fluoresceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M, siendo que este plásmido tampoco codificaba para la expresión de la avidina monomérica recombinante (Figura 15). Si bien el uso de concentraciones mayores o del orden de 5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína incrementan el porcentaje de actividad de unión a biotina en las cepas pENP-avidina (80.5%) y pJEAY-avidina (83.2%), también muestran unión inespecífica de biotina-4-fluoresceína en las cepas control (pENP 72.9 % y pJEAY 44.6%). Se sabe que la avidina monomérica recombinante de solo 124 aminoácidos tiene una afinidad menor que la avidina tetramérica; no obstante, ambas versiones de la proteína de fusión *ShdA*-avidina se unieron a la biotina a una concentración de 2.5×10^{-4} M, demostrando que la avidina monomérica recombinante mantuvo su afinidad por la biotina. Asimismo, la unión inespecífica de biotina-4-fluoresceína observada a una concentración de 5×10^{-4} M se puede atribuir también al punto de saturación alcanzado, que se produce con altas concentraciones de biotina-4-fluoresceína, aunque esto también se observó a bajas concentraciones de 3.12×10^{-5} M, particularmente con *E. coli* pENP (55.7 %). Se sabe que la holocarboxilasa sintetasa (HCS) de humanos y la biotina proteína ligasa (BirA) de *E. coli* son proteínas ligasas de biotina que catalizan la unión de biotina dependiente de ATP a apocarboxilasas. La unión de biotina ocurre en un residuo de lisina altamente conservado dentro de una secuencia de

consenso (Ala/Val-Met-Lys-Met) que se encuentra en las carboxilasas en la mayoría de los organismos. Numerosos estudios han indicado que la HCS y la BirA, así como biotina proteína ligasas de otros organismos, pueden unir biotina a apocarboxilasas de diferentes organismos, lo que indica que el mecanismo de unión de biotina está bien conservado y que podría estar contribuyendo a la unión de biotina de manera inespecífica. (Healy et al., 2010).

Para evaluar la capacidad de la proteína de fusión constituida por la avidina monomérica recombinante fusionada al autotransportador *ShdA*, de unir proteínas biotiniladas sobre la superficie de *E. coli* DH5 α , la ovoalbúmina (OVA) fue empleada en los ensayos de unión a la avidina recombinante. Bacterias transformadas con el plásmido pJEAY-avidina (variante *wShdA*) mostraron capacidad de unirse a OVA-biotinilada en una concentración de 1×10^{-4} M (figura 17b). Sin embargo, es importante mencionar que la unión de OVA-biotinilada evidenció la presencia de agregados bacterianos de *E. coli* pJEAY y pJEAY-avidina, lo que sugiere la formación de redes debido a la unión multimérica en la superficie bacteriana. A este respecto, el marcaje de proteínas con biotina es un medio de detección muy eficaz, ya que la conjugación de biotina con proteínas permite la asimilación de un marcador muy específico que generalmente no perturba la función de la proteína o molécula diana (Wilchek y Bayer, 1990). Aunque a la fecha la función biológica de la OVA se desconoce, se ha descrito su uso como una proteína transportadora capaz de conjugarse con péptidos sintéticos para su uso como inmunógeno, debido a que posee los siguientes residuos de aminoácidos para conjugarse: 10 de tirosina, 6 de cisteína, 14 de ácido aspártico, 33 de ácido glutámico y 20 de lisina, siendo estos últimos residuos de lisina imprescindibles para conjugarla con la biotina (Harlow y Lane, 1988). La OVA es una glicoproteína fosforilada de 44.3 kDa de masa molecular, está constituida por 385 aminoácidos. Pertenece a la familia de los inhibidores de la serina proteasa (serpinas). Su estructura tridimensional consta de tres laminas β , nueve hélices α y un bucle central reactivo. Revela la presencia de 6 residuos de cisteína, entre los cuales se forman cuatro puentes disulfuro. Contiene una cadena de carbohidratos y puede presentar hasta dos residuos de fosfoserina, un puente disulfuro y cuatro grupos sulfidrilos, por lo tanto, hay numerosos sitios para fosforilación y glicosilación, que son modificaciones postraduccionales muy comunes en las proteínas. La mitad de los residuos de aminoácidos de la OVA son hidrofóbicos y un tercio presenta residuos cargados, la mayoría ácidos, confiriéndole a la proteína un pI de 4.5 (Li-Chan y Nakai, 1989). A este respecto, está documentado que el uso de avidina tiene como única desventaja

su tendencia a unir inespecíficamente componentes biológicos distintos a la biotina a pH fisiológico como resultado de su alto pI de 10.5 y su contenido de carbohidratos (Takakura et al., 2012). Además, la fuerte carga positiva en la proteína avidina provoca interacciones iónicas, con moléculas cargadas negativamente, especialmente en superficies celulares (Hermanson G., 2013). Esto puede explicar la formación de agregados bacterianos debido a la unión inespecífica de la avidina recombinante con las superficies bacterianas cercanas. Sin embargo, la avidina monomérica recombinante producida en *E. coli* carece de cadenas laterales de carbohidratos y la ausencia de glicosilación debería disminuir la unión inespecífica que exhibe la avidina hacia muchos componentes biológicos evitando los problemas reportados en varias aplicaciones que utilizan la tecnología avidina-biotina (Hytonen et al., 2004).

Por otra parte, la formación de agregados bacterianos también podría explicarse a través de la capacidad que poseen las lectinas (adesinas) bacterianas de *E. coli* de unir azúcares específicamente. Las lectinas bacterianas son capaces de unirse de manera no covalente a carbohidratos y de esta forma aglutinar y/o precipitar polisacáridos, glicoproteínas, células y glucoconjugados (Nilsson, 2007). Entre sus múltiples funciones biológicas, las lectinas bacterianas facilitan la unión de las bacterias a las células huésped durante la infección. Estas se unen a los receptores de glucanos a través del dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Hooper y Gordon, 2001). La mayoría de las bacterias poseen múltiples lectinas con diversas especificidades de carbohidratos. Algunas lectinas se unen a residuos de azúcar terminales a través de su CRD, mientras que otras se unen a secuencias internas de cadenas de oligosacáridos lineales o ramificadas (Nizet et al., 2017). Las lectinas bacterianas se presentan comúnmente en forma fimbrias (pelos) o pili (hilos), que interactúan con las glicoproteínas y los receptores de glucolípidos en las células huésped. Las mejor caracterizadas son las fimbrias de tipo 1 específicas de manosa, las fimbrias P específicas de galabiosa y las fimbrias F-17 de unión a *N*-acetilglucosamina producidas por diferentes cepas de *E. coli*. Las bacterias fimbriadas expresan de 100 a 400 de estos apéndices, que normalmente tienen un diámetro de 5-7 nm y pueden extenderse cientos de nanómetros de longitud. Por tanto, los pili se extienden mucho más allá del glucocálix bacteriano formado a partir de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares. El dominio de reconocimiento de carbohidratos de las fimbrias se encuentra en la subunidad menor que generalmente se encuentra en la punta de las fimbrias. Algunas de las otras lectinas bacterianas son proteínas de membrana monoméricas u oligoméricas.

La unión es generalmente de baja afinidad, pero debido a que las lectinas y los receptores a menudo se agrupan en el plano de la membrana, la avidéz resultante puede ser grande (Sharon N. y Lis H., 2004). A este respecto, se sabe que *Entamoeba histolytica* es capaz de unirse a los carbohidratos de OVA a través de su actividad de lectina superficial la cual facilitó su fagocitosis (Heron et al., 2011). La OVA madura tiene un 3.2 % de carbohidratos en peso (Nisbet et al., 1981). Tiene un único sitio de *N*-glicosilación en asparagina 292, con una mezcla heterogénea de glicanos neutros unidos, en su mayoría del tipo de manosa ramificada sin modificar o de variedad híbrida parcialmente modificada (Man₅ GlcNAc₂, Man₅ GlcNAc₃, Man₅ GlcNAc₄ y Man₆ GlcNAc₂) que representan más del 60% del total (Thaysen-Andersen et al., 2009). Se observó, que la desglicosilación química y enzimática de OVA redujo sustancialmente su capacidad para estimular fagocitosis en *E. histolytica*. La OVA desnaturalizada con calor estimuló fagocitosis en *E. histolytica* e inhibió la unión de la OVA-biotinilada, al menos, así como OVA nativa, lo que indica que el efecto no está relacionado con la estructura terciaria de OVA y apoya aún más la especificidad del efecto inhibitor de la desglicosilación. La especificidad está indicada además por la capacidad de la OVA desnaturalizada y nativa sin marcar para competir por la unión, mientras que la OVA desglicosilada no compitió. Dados estos datos, la conclusión fue que *E. histolytica* tiene una actividad de lectina que reconoce modificaciones de carbohidratos en la OVA a través de su lectina *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), la cual fue inhibida por la desglicosilación de OVA. Esta evidencia abre la posibilidad de probar este mecanismo de acción en nuestro sistema de *autodespliegue* para evitar la formación de agregados bacterianos de *E. coli* derivados de la posible actividad de lectina presente en sus fimbrias y pili, siendo esto, una alternativa viable que nos permita evaluar la capacidad de unión de la OVA-biotinilada a la proteína de fusión constituida por la avidina monomérica recombinante fusionada al autotransportador *ShdA*.

Para lograr la unión en la superficie bacteriana mediante la interacción avidina-biotina, la actividad de la avidina recombinante debe ser preservada. A este respecto, varios sistemas para la expresión heteróloga de estreptavidinas recombinantes en *E. coli* han sido publicadas (Demonte et al., 2014), pero su expresión recombinante soluble es difícil, por lo tanto algunos estudios se han centrado en su expresión en la superficie bacteriana de *E. coli*. Por ejemplo, la producción de una estreptavidina funcional en la superficie bacteriana de *E. coli* UT5600, utilizando el autotransportador AIDA-I fue reportada, aunque quedó por demostrar su potencial de unión a moléculas biotiniladas en la

superficie (Park et al., 2011). Así mismo, varios estudios diseñados para aislar la avidina recombinante han reportado dificultades técnicas diferentes, tales como la acumulación intracelular de la proteína heteróloga, la formación de cuerpos de inclusión y toxicidad parcial (Wu y Wong, 2006). Además, la purificación adicional o los pasos de renaturalización son requeridos cuando la secreción de avidina bioactiva dentro del medio es deseable.

La proteína de fusión *ShdA*-avidina en sus versiones *sShdA* y *wShdA* fue capaz de translocar avidina a pesar de contener ocho cadenas β antiparalelas y bucles de interconexión. La exposición en la superficie de una avidina tetramérica no es posible con el *autodespliegue*; sin embargo, una avidina funcional monomérica fue suficiente para unir moléculas biotiniladas. El mecanismo de secreción de los autotransportadores normalmente permite cierto dominio del pasajero plegado y la presencia de enlaces disulfuro. Aunque en este estudio no se predijo el plegamiento adecuado de la avidina translocada a la superficie bacteriana como una proteína de fusión con *ShdA*, confirmamos que efectivamente se mostraba en la superficie de *E. coli* DH5a y era capaz de unirse a la biotina.

Hasta nuestro conocimiento, el presente estudio representa la primera demostración de la expresión y *autodespliegue* de avidina monomérica recombinante por un autotransportador (*ShdA*), en la superficie *E. coli*, que mantiene sus propiedades intrínsecas de unión a biotina conjugada a moléculas expresadas "*in trans*".

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. Las variantes *sShdA*-avidina y *wShdA*-avidina de la proteína de fusión *ShdA*-avidina permitieron la expresión de la avidina monomérica recombinante en la fracción de membrana externa de *E. coli*, confirmando así que el dominio β -barril de *ShdA* residía en la membrana externa de la bacteria permitiendo el *autodespliegue* del dominio pasajero hacia la superficie bacteriana.
2. Los plásmidos que codifican para las proteínas *sShdA* y *wShdA* fusionados a la avidina recombinante tienen impacto en el crecimiento bacteriano a medida que el plásmido codifica para una proteína de fusión de mayor tamaño y que permanece anclada a la membrana externa demostrando que la persistencia y replicación de los plásmidos impactan en la adaptación al introducirse una carga metabólica adicional.
3. La versión completa del autotransportador *ShdA* (*wShdA*) contribuye mucho mejor a la translocación de moléculas de mayor tamaño, en contraste con la versión corta de *ShdA* (*sShdA*) que cuenta con una región *linker* más corta. El dominio pasajero de la proteína de fusión se translocó más eficientemente en la superficie de *E. coli* transformada con el plásmido pJEAY-avidina, indicando que el sistema mediado por el autotransportador *ShdA* permite la translocación de avidina monomérica recombinante.
4. La capacidad de unión "*in trans*" de la proteína de fusión *wShdA*-avidina no se ve comprometida y por lo tanto demostró unirse a moléculas biotiniladas como biotina-4-fluoresceína a una concentración de 2.5×10^{-4} M. Siendo una limitante del sistema de *autodespliegue* que a esta misma concentración existe mayor unión inespecífica de la proteína de fusión *sShdA*-avidina y a concentraciones mayores de 5×10^{-4} M de biotina-4-fluoresceína existe una mayor unión inespecífica en ambas versiones de la proteína de fusión *ShdA*-avidina.

5. La capacidad de unión "*in trans*" de la proteína de fusión *wShdA*-avidina se ve comprometida al unirse a OVA-biotinilada en una concentración de 1×10^{-4} M. Sin embargo, la unión a OVA-biotinilada evidenció la presencia de agregados bacterianos de *E. coli* pJEAY y pJEAY-avidina a esa misma concentración, lo que sugiere la formación de redes debido a la unión multimérica en la superficie bacteriana la cual interfiere con la evaluación de la capacidad de unión a proteínas biotiniladas más complejas con modificaciones postraduccionales.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

1. Si bien se demostró que la proteína de fusión *ShdA-avidina* se transloca a la superficie bacteriana de *E. coli* DH5 α , se requieren estudios adicionales para determinar la cantidad aproximada de proteína de fusión que se está translocando y *autodesplegando* a la superficie bacteriana.
2. Se deben probar mecanismos de acción en nuestro sistema de unión "*in trans*" como la previa desglicosilación de glicoproteínas biotiniladas a unir, para comprobar que la formación de agregados bacterianos se debe a la posible actividad de lectina presente en las fimbrias y pilli de *E. coli* lo que permitiría evaluar la capacidad de unión "*in trans*" de estas moléculas a la proteína de fusión *ShdA-avidina*.
3. Se requieren de estudios adicionales que permitan evaluar la capacidad de unión de la proteína de fusión *ShdA-avidina* a moléculas más complejas con modificaciones postraduccionales, tales como glicoproteínas que aun siendo biotiniladas conserven sus propiedades antigénicas, bioquímicas y actividad biológica después de unirse "*in trans*".
4. En nuestro grupo de trabajo existe la posibilidad de evaluar nuestro sistema de unión "*in trans*" a través de la proteína de fusión *ShdA-avidina* utilizando glicoproteínas como antígenos, tal es el caso de la Ag30 de *Trichinella spiralis* la cual es una glicoproteína inmunogénica que ha sido utilizada previamente como candidato a vacuna protegiendo parcialmente contra la infección en un modelo murino.

REFERENCIAS

- Abby,S.S. and Rocha,E.P. (2012). The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted system 2. *PLoS. Genet.* **8**, e1002983.
- Albarran,B., Hoffman,A.S., and Stayton,P.S. (2011). Efficient Intracellular Delivery of a Pro-Apoptotic Peptide With A pH-Responsive Carrier. *React. Funct. Polym.* **71**, 261-265.
- Aoki,T., Tahara,T., Fujino,H., and Watabe,H. (2002). "GFP-display," an easy detection method for single amino acid changes in a target polypeptide: application to random mutagenesis. *Anal. Biochem.* **300**, 103-106.
- Ates,L.S., Houben,E.N., and Bitter,W. (2016). Type VII Secretion: A Highly Versatile Secretion System. *Microbiol. Spectr.* **4**.
- Bae,W., Chen,W., Mulchandani,A., and Mehra,R.K. (2000). Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 518-524.
- Bae,W., Mulchandani,A., and Chen,W. (2002). Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *J. Inorg. Biochem.* **88**, 223-227.
- Bakelar,J., Buchanan,S.K., and Noinaj,N. (2016). The structure of the beta-barrel assembly machinery complex. *Science* **351**, 180-186.
- Barbet,J., Bardies,M., Bourgeois,M., Chatal,J.F., Cherel,M., Davodeau,F., Faivre-Chauvet,A., Gestin,J.F., and Kraeber-Bodere,F. (2012). Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. *Methods Mol. Biol.* **907**, 681-697.
- Barnard,T.J., Dautin,N., Lukacik,P., Bernstein,H.D., and Buchanan,S.K. (2007). Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1214-1220.
- Barve,A., Jain,A., Liu,H., Jin,W., and Cheng,K. (2016). An enzyme-responsive conjugate improves the delivery of a PI3K inhibitor to prostate cancer. *Nanomedicine.* **12**, 2373-2381.
- Baumann,F., Bauer,M.S., Milles,L.F., Alexandrovich,A., Gaub,H.E., and Pippig,D.A. (2016). Monovalent Strep-Tactin for strong and site-specific tethering in nanospectroscopy. *Nat. Nanotechnol.* **11**, 89-94.
- Bingle,W.H., Nomellini,J.F., and Smit,J. (1997a). Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **26**, 277-288.

Bingle,W.H., Nomellini,J.F., and Smit,J. (1997b). Linker mutagenesis of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: toward a definition of an N-terminal anchoring region and a C-terminal secretion signal and the potential for heterologous protein secretion. *J. Bacteriol.* **179**, 601-611.

Boyen,F., Pasmans,F., Donne,E., Van,I.F., Morgan,E., Adriaensen,C., Hernalsteens,J.P., Wallis,T.S., Ducatelle,R., and Haesebrouck,F. (2006). The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella typhimurium* in pigs. *Vet. Microbiol.* **115**, 284-290.

Brasemann,E., Chaney,J.L., Champion,M.M., and Clark,P.L. (2016). DegP Chaperone Suppresses Toxic Inner Membrane Translocation Intermediates. *PLoS. One.* **11**, e0162922.

Bu,L., Gan,L.C., Guo,X.Q., Chen,F.Z., Song,Q., Qi,Z., Gou,X.J., Hou,S.X., and Yao,Q. (2013). Trans-resveratrol loaded chitosan nanoparticles modified with biotin and avidin to target hepatic carcinoma. *Int. J. Pharm.* **452**, 355-362.

Carroll,A.C. and Wong,A. (2018). Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can. J. Microbiol.* **64**, 293-304.

Cascales,E. and Christie,P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 137-149.

Celik,N., Webb,C.T., Leyton,D.L., Holt,K.E., Heinz,E., Gorrell,R., Kwok,T., Naderer,T., Strugnell,R.A., Speed,T.P., Teasdale,R.D., Likic,V.A., and Lithgow,T. (2012). A bioinformatic strategy for the detection, classification and analysis of bacterial autotransporters. *PLoS. One.* **7**, e43245.

Chang,H.J., Sheu,S.Y., and Lo,S.J. (1999). Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein traT. *J. Biomed. Sci.* **6**, 64-70.

Chang,S.Y., Bong,J.H., Yoo,G., Lee,M., Kang,M.J., Jose,J., and Pyun,J.C. (2017). Activity control of autodeployed proteins on the same outer membrane layer of *E. coli* by using Z-domain/streptavidin/and lipase/foldase systems. *Enzyme Microb. Technol.* **96**, 85-95.

Chatfield,S.N., Charles,I.G., Makoff,A.J., Oxeer,M.D., Dougan,G., Pickard,D., Slater,D., and Fairweather,N.F. (1992). Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology (N. Y.)* **10**, 888-892.

Chen,S., Zhao,X., Chen,J., Chen,J., Kuznetsova,L., Wong,S.S., and Ojima,I. (2010). Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release. *Bioconjug. Chem.* **21**, 979-987.

Cherf,G.M. and Cochran,J.R. (2015). Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. *Methods Mol. Biol.* **1319**, 155-175.

Chivers,C.E., Crozat,E., Chu,C., Moy,V.T., Sherratt,D.J., and Howarth,M. (2010). A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat. Methods* **7**, 391-393.

Chivers,C.E., Koner,A.L., Lowe,E.D., and Howarth,M. (2011). How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem. J.* **435**, 55-63.

Cho,C.M., Mulchandani,A., and Chen,W. (2002). Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2026-2030.

Choi JH, Lee SY. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **64**(5): 625-635.

Christie,P.J. (2016). The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal. Plus.* **7**.

Cianfanelli,F.R., Monlezun,L., and Coulthurst,S.J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol.* **24**, 51-62.

Cornelis,G.R. and Van,G.F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 735-774.

Costa,T.R., Felisberto-Rodrigues,C., Meir,A., Prevost,M.S., Redzej,A., Trokter,M., and Waksman,G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 343-359.

Coulthurst,S.J. (2013). The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* **164**, 640-654.

Dautin,N. and Bernstein,H.D. (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 89-112.

Delepelaire,P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 149-161.

Demonte,D., Dundas,C.M., and Park,S. (2014). Expression and purification of soluble monomeric streptavidin in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6285-6295.

Deng,W., Marshall,N.C., Rowland,J.L., McCoy,J.M., Worrall,L.J., Santos,A.S., Strynadka,N.C.J., and Finlay,B.B. (2017). Corrigendum: Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 379.

Dhillon,J.K., Drew,P.D., and Porter,A.J. (1999). Bacterial surface display of an anti-pollutant antibody fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 350-354.

Dorsey,C.W., Laarakker,M.C., Humphries,A.D., Weening,E.H., and Baumler,A.J. (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol. Microbiol.* **57**, 196-211.

Drobnak,I., Braselmann,E., and Clark,P.L. (2015). Multiple driving forces required for efficient secretion of autotransporter virulence proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 10104-10116.

Dundas,C.M., Demonte,D., and Park,S. (2013). Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9343-9353.

Elia,G. (2008). Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics.* **8**, 4012-4024.

Emsley,P., Charles,I.G., Fairweather,N.F., and Isaacs,N.W. (1996). Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**, 90-92.

Faure,L.M., Garvis,S., de,B.S., and Bigot,S. (2014). Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **160**, 1940-1952.

Fleetwood,F., Andersson,K.G., Stahl,S., and Lofblom,J. (2014). An engineered autotransporter-based surface expression vector enables efficient display of Affibody molecules on OmpT-negative E. coli as well as protease-mediated secretion in OmpT-positive strains. *Microb. Cell Fact.* **13**, 179.

Fudem-Goldin,B. and Orr,G.A. (1990). 2-Iminobiotin-containing reagent and affinity columns. *Methods Enzymol.* **184**, 167-173.

Galan,J.E. and Waksman,G. (2018). Protein-Injection Machines in Bacteria **12**. *Cell* **172**, 1306-1318.

Galen JE, Wang JY, Chinchilla M, Vindurampulle C, Vogel JE, Levy H, Blackwelder WC, Pasetti MF, Levine MM. 2010. A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in Salmonella enterica serovar Typhi live vectors. *Infect Immun*, **78**(1):337-347.

Galli,F., Rapisarda,A.S., Stabile,H., Malviya,G., Manni,I., Bonanno,E., Piaggio,G., Gismondi,A., Santoni,A., and Signore,A. (2015). In Vivo Imaging of Natural Killer Cell Trafficking in Tumors. *J. Nucl. Med.* **56**, 1575-1580.

Gallique,M., Bouteiller,M., and Merieau,A. (2017a). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?. *Front Microbiol.* **8**, 1454.

Gallique,M., Decoin,V., Barbey,C., Rosay,T., Feuilloy,M.G., Orange,N., and Merieau,A. (2017b). Contribution of the Pseudomonas fluorescens MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. *PLoS. One.* **12**, e0170770.

Gaytan,M.O., Martinez-Santos,V.I., Soto,E., and Gonzalez-Pedrajo,B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect. Microbiol.* **6**, 129.

Georgiou,G., Stathopoulos,C., Daugherty,P.S., Nayak,A.R., Iverson,B.L., and Curtiss,R., III (1997). Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* **15**, 29-34.

Gope,M.L., Keinanen,R.A., Kristo,P.A., Conneely,O.M., Beattie,W.G., Zarucki-Schulz,T., O'Malley,B.W., and Kulomaa,M.S. (1987). Molecular cloning of the chicken avidin cDNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3595-3606.

Green,E.R. and Meccas,J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol. Spectr.* **4**.

Grijpstra,J., Arenas,J., Rutten,L., and Tommassen,J. (2013). Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res. Microbiol.* **164**, 562-582.

Grohmann,E., Christie,P.J., Waksman,G., and Backert,S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **107**, 455-471.

Hama,Y., Urano,Y., Koyama,Y., Kamiya,M., Bernardo,M., Paik,R.S., Shin,I.S., Paik,C.H., Choyke,P.L., and Kobayashi,H. (2007). A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched avidin-rhodamine conjugate. *Cancer Res.* **67**, 2791-2799.

Han,M.J. and Lee,S.H. (2015). An efficient bacterial surface display system based on a novel outer membrane anchoring element from the Escherichia coli protein YiaT. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, 1-7.

Harlow, E. and Lane,D. (1988). *Antibodies: A Lab Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY. p.77.

Healy, S., McDonald, M. K., Wu, X., Yue, W. W., Kochan, G., Opperman, U., and Gravel, R. A. (2010). Structural impact of human and Escherichia coli biotin carboxyl carrier proteins on biotin attachment. *Biochemistry*, **49**, 4687-4692.

Henderson,I.R. and Nataro,J.P. (2001a). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**, 1231-1243.

Henderson,I.R. and Nataro,J.P. (2001b). Virulence functions of autotransporter proteins 5. *Infect. Immun.* **69**, 1231-1243.

Henderson,I.R., Navarro-Garcia,F., Desvaux,M., Fernandez,R.C., and Ala'Aldeen,D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692-744.

Henderson,I.R., Navarro-Garcia,F., and Nataro,J.P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**, 370-378.

Henderson,J., Arya,R., and Gillespie,P. (2012). Skin graft meshing, over-meshing and cross-meshing. *Int. J. Surg.* **10**, 547-550.

Hermanson G. Chapter 11: (Strep)avidin-Biotin Systems Chapter Book. IN: *Bioconjugate Techniques*, Third Edition. 2013 Elsevier Inc.

Heron, B. T., Sateriale, A., Teixeira, J. E., & Huston, C. D. (2011). Evidence for a novel *Entamoeba histolytica* lectin activity that recognises carbohydrates present on ovalbumin. *International journal for parasitology*, *41*(2), 137–144.

Hirsch, J.D., Eslamizar, L., Filanoski, B.J., Malekzadeh, N., Haugland, R.P., Beechem, J.M., and Haugland, R.P. (2002). Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. *Anal. Biochem.* *308*, 343-357.

Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host. Microbe* *15*, 9-21.

Hoischen, C., Fritsche, C., Gumpert, J., Westermann, M., Gura, K., and Fahnert, B. (2002). Novel bacterial membrane surface display system using cell wall-less L-forms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 525-531.

Holden, M.T., Seth-Smith, H.M., Crossman, L.C., Sebaihia, M., Bentley, S.D., Cerdeno-Tarraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E.P., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R., Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E., and Parkhill, J. (2009). The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* *191*, 261-277.

Howl, J. and Jones, S. (2015). Cell penetrating peptide-mediated transport enables the regulated secretion of accumulated cargoes from mast cells. *J. Control Release* *202*, 108-117.

Huang, Y., Hajishengallis, G., and Michalek, S.M. (2000). Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible *nirB* promoter. *Infect. Immun.* *68*, 1549-1556.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* *69*, 11-25.

Hytonen, V.P., Laitinen, O.H., Airene, T.T., Kidron, H., Meltola, N.J., Porkka, E.J., Horha, J., Paldanius, T., Maatta, J.A., Nordlund, H.R., Johnson, M.S., Salminen, T.A., Airene, K.J., Yla-Herttuala, S., and Kulomaa, M.S. (2004). Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *384*, 385-390.

Hooper, L.V., Gordon, J.I. (2001). Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* *11* (2), 1R–10R.

Iadanza, M.G., Higgins, A.J., Schiffrin, B., Calabrese, A.N., Brockwell, D.J., Ashcroft, A.E., Radford, S.E., and Ranson, N.A. (2016). Lateral opening in the intact beta-barrel assembly machinery captured by cryo-EM. *Nat. Commun.* *7*, 12865.

Ieva, R. and Bernstein, H.D. (2009). Interaction of an autotransporter passenger domain with Bama during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 19120-19125.

Ieva,R., Tian,P., Peterson,J.H., and Bernstein,H.D. (2011). Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, E383-E391.

Iyer,A., Chandra,A., and Swaminathan,R. (2014). Hydrolytic enzymes conjugated to quantum dots mostly retain whole catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2935-2943.

Izore,T., Job,V., and Dessen,A. (2011). Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*. *19*, 603-612.

Jain,A. and Cheng,K. (2017a). The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J. Control Release* *245*, 27-40.

Jain,A. and Cheng,K. (2017b). The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J. Control Release* *245*, 27-40.

Jeong,H., Yoo,S., and Kim,E. (2001). Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme Microb. Technol.* *28*, 155-160.

Jiang,X., Ruiz,T., and Mintz,K.P. (2011). The extended signal peptide of the trimeric autotransporter EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* modulates secretion. *J. Bacteriol.* *193*, 6983-6994.

Jong,W.S., Daleke-Schermerhorn,M.H., Vikstrom,D., Ten Hagen-Jongman,C.M., de,P.K., van der Wel,N.N., van de Sandt,C.E., Rimmelzwaan,G.F., Follmann,F., Agger,E.M., Andersen,P., de Gier,J.W., and Luirink,J. (2014). An autotransporter display platform for the development of multivalent recombinant bacterial vector vaccines. *Microb. Cell Fact.* *13*, 162.

Jong,W.S., Sauri,A., and Luirink,J. (2010). Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters. *Curr. Opin. Biotechnol.* *21*, 646-652.

Jong,W.S., Soprova,Z., de,P.K., Ten Hagen-Jongman,C.M., Wagner,S., Wickstrom,D., de Gier,J.W., Andersen,P., van der Wel,N.N., and Luirink,J. (2012). A structurally informed autotransporter platform for efficient heterologous protein secretion and display. *Microb. Cell Fact.* *11*, 85.

Jong,W.S., Ten Hagen-Jongman,C.M., den,B.T., Slotboom,D.J., Tame,J.R., Wickstrom,D., de Gier,J.W., Otto,B.R., and Luirink,J. (2007). Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol. Microbiol.* *63*, 1524-1536.

Jong,W.S.P., Schillemans,M., Ten Hagen-Jongman,C.M., Luirink,J., and van,U.P. (2018). Comparing autotransporter beta-domain configurations for their capacity to secrete heterologous proteins to the cell surface. *PLoS. One.* *13*, e0191622.

Jose,J., Bernhardt,R., and Hannemann,F. (2002). Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J. Biotechnol.* *95*, 257-268.

Jose,J., Kramer,J., Klauser,T., Pohlner,J., and Meyer,T.F. (1996). Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the Escherichia coli cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178, 107-110.

Jose,J. and Meyer,T.F. (2007). The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 600-619.

Jung,H.C., Lebeault,J.M., and Pan,J.G. (1998a). Surface display of Zymomonas mobilis levansucrase by using the ice-nucleation protein of Pseudomonas syringae. *Nat. Biotechnol.* 16, 576-580.

Jung,H.C., Park,J.H., Park,S.H., Lebeault,J.M., and Pan,J.G. (1998b). Expression of carboxymethylcellulase on the surface of Escherichia coli using Pseudomonas syringae ice nucleation protein. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 348-354.

Junker,M., Besingi,R.N., and Clark,P.L. (2009). Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol. Microbiol.* 71, 1323-1332.

Kalyanasundram,J., Chia,S.L., Song,A.A., Raha,A.R., Young,H.A., and Yusoff,K. (2015). Surface display of glycosylated Tyrosinase related protein-2 (TRP-2) tumour antigen on Lactococcus lactis. *BMC. Biotechnol.* 15, 113.

Kanonenberg,K., Schwarz,C.K., and Schmitt,L. (2013). Type I secretion systems - a story of appendices. *Res. Microbiol.* 164, 596-604.

Kaufmann,S.H., McElrath,M.J., Lewis,D.J., and Del,G.G. (2014). Challenges and responses in human vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* 28, 18-26.

Kida,Y., Higashimoto,Y., Inoue,H., Shimizu,T., and Kuwano,K. (2008). A novel secreted protease from Pseudomonas aeruginosa activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.* 10, 1491-1504.

Kim,M.C., Hong,M.H., Lee,B.H., Choi,H.J., Ko,Y.M., and Lee,Y.K. (2015). Bone Tissue Engineering by Using Calcium Phosphate Glass Scaffolds and the Avidin-Biotin Binding System. *Ann. Biomed. Eng* 43, 3004-3014.

Kim,S., Malinverni,J.C., Sliz,P., Silhavy,T.J., Harrison,S.C., and Kahne,D. (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317, 961-964.

Kingsley,R.A., Abi,G.D., Puebla-Osorio,N., Keestra,A.M., Berghman,L., and Baumler,A.J. (2004). Fibronectin binding to the Salmonella enterica serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J. Bacteriol.* 186, 4931-4939.

Kingsley,R.A., Humphries,A.D., Weening,E.H., De Zoete,M.R., Winter,S., Papaconstantinopoulou,A., Dougan,G., and Baumber,A.J. (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect. Immun.* **71**, 629-640.

Kingsley,R.A., Santos,R.L., Kestra,A.M., Adams,L.G., and Baumber,A.J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol. Microbiol.* **43**, 895-905.

Kjaergaard,K., Hasman,H., Schembri,M.A., and Klemm,P. (2002). Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J. Bacteriol.* **184**, 4197-4204.

Kornacker,M.G. and Pugsley,A.P. (1990). The normally periplasmic enzyme beta-lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol. Microbiol.* **4**, 1101-1109.

Kranen,E., Detzel,C., Weber,T., and Jose,J. (2014). Autodisplay for the co-expression of lipase and foldase on the surface of *E. coli*: washing with designer bugs. *Microb. Cell Fact.* **13**, 19.

Kuo,S.C. and Lauffenburger,D.A. (1993). Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys. J.* **65**, 2191-2200.

Kwaks,T.H. and Otte,A.P. (2006). Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol.* **24**, 137-142.

Laitinen,O.H., Hytonen,V.P., Nordlund,H.R., and Kulomaa,M.S. (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2992-3017.

Lasica,A.M., Ksiazek,M., Madej,M., and Potempa,J. (2017). The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. *Front Cell Infect. Microbiol.* **7**, 215.

Lee,J.S., Shin,K.S., Pan,J.G., and Kim,C.J. (2000). Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* **18**, 645-648.

Lee,S.Y., Choi,J.H., and Xu,Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* **21**, 45-52.

Leiman,P.G., Basler,M., Ramagopal,U.A., Bonanno,J.B., Sauder,J.M., Pukatzki,S., Burley,S.K., Almo,S.C., and Mekalanos,J.J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 4154-4159.

Leo,J.C., Grin,I., and Linke,D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **367**, 1088-1101.

Li,M. (2000). Applications of display technology in protein analysis. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1251-1256.

Liao,T.Y., Lau,A., Joseph,S., Hytonen,V., and Hmama,Z. (2015). Improving the Immunogenicity of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine by Non-Genetic Bacterial Surface Decoration Using the Avidin-Biotin System. *PLoS. One.* *10*, e0145833.

Li-Chan E, Nakai S (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology* *2*: 21-58.

Liu,L., Sommermeyer,D., Cabanov,A., Kosasih,P., Hill,T., and Riddell,S.R. (2016). Inclusion of Strep-tag II in design of antigen receptors for T-cell immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* *34*, 430-434.

Liu,Y., Cheng,D., Liu,X., Liu,G., Dou,S., Xiao,N., Chen,L., Rusckowski,M., and Hnatowich,D.J. (2012). Comparing the intracellular fate of components within a noncovalent streptavidin nanoparticle with covalent conjugation. *Nucl. Med. Biol.* *39*, 101-107.

Livnah,O., Bayer,E.A., Wilchek,M., and Sussman,J.L. (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 5076-5080.

Maatta,J.A., Eisenberg-Domovich,Y., Nordlund,H.R., Hayouka,R., Kulomaa,M.S., Livnah,O., and Hytonen,V.P. (2011). Chimeric avidin shows stability against harsh chemical conditions--biochemical analysis and 3D structure. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 481-490.

MacNeil,S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* *445*, 874-880.

Marin,E., Bodelon,G., and Fernandez,L.A. (2010). Comparative analysis of the biochemical and functional properties of C-terminal domains of autotransporters. *J. Bacteriol.* *192*, 5588-5602.

Martensson,L., Nilsson,R., Ohlsson,T., Sjogren,H.O., Strand,S.E., and Tennvall,J. (2007). Improved tumor targeting and decreased normal tissue accumulation through extracorporeal affinity adsorption in a two-step pretargeting strategy. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5572s-5576s.

Martin,S.E. and Peterson,B.R. (2003). Non-natural cell surface receptors: synthetic peptides capped with N-cholesterylglycine efficiently deliver proteins into Mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* *14*, 67-74.

Martineau,P., Charbit,A., Leclerc,C., Werts,C., O'Callaghan,D., and Hofnung,M. (1991). A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. *Biotechnology (N. Y.)* *9*, 170-172.

Maurer,J., Jose,J., and Meyer,T.F. (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* *179*, 794-804.

Meuskens,I., Saragliadis,A., Leo,J.C., and Linke,D. (2019). Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front Microbiol.* *10*, 1163.

Mitragotri,S., Burke,P.A., and Langer,R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 655-672.

Montoro Bustos,A.R., Garcia-Cortes,M., Gonzalez-Iglesias,H., Ruiz,E.J., Costa-Fernandez,J.M., Coca-Prados,M., and Sanz-Medel,A. (2015). Sensitive targeted multiple protein quantification based on elemental detection of quantum dots. *Anal. Chim. Acta* **879**, 77-84.

Mustafa,A.D., Kalyanasundram,J., Sabidi,S., Song,A.A., Abdullah,M., Abdul,R.R., and Yusoff,K. (2018). Proof of concept in utilizing in-trans surface display system of *Lactobacillus plantarum* as mucosal tuberculosis vaccine via oral administration in mice. *BMC. Biotechnol.* **18**, 63.

Mustafa,A.D., Kalyanasundram,J., Sabidi,S., Song,A.A., Abdullah,M., Abdul,R.R., and Yusoff,K. (2019). Recovery of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens fused with cell wall-anchoring motif (LysM) from inclusion bodies using non-denaturing reagent (N-laurylsarcosine). *BMC. Biotechnol.* **19**, 27.

Nagai,H. and Kubori,T. (2011). Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Front Microbiol.* **2**, 136.

Nguyen,T.N., Gourdon,M.H., Hansson,M., Robert,A., Samuelson,P., Libon,C., Andreoni,C., Nygren,P.A., Binz,H., Uhlen,M., and . (1995). Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosum*. *J. Biotechnol.* **42**, 207-219.

Nicolay,T., Vanderleyden,J., and Spaepen,S. (2015). Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria. *Crit Rev. Microbiol.* **41**, 109-123.

Nilsson, C.L., 2007. Lectins: analytical tools from nature. In: *Lectins*. Elsevier, pp. 1–13.

Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJG, Fothergill LA, Fothergill JE. (1981) The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* **115**:335–345.

Nivaskumar,M. and Francetic,O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1568-1577.

Nizet, V., Varki, A., Aebi, M. (2017). Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet], third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Noinaj,N., Kuszak,A.J., Balusek,C., Gumbart,J.C., and Buchanan,S.K. (2014). Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. *Structure.* **22**, 1055-1062.

Noinaj,N., Kuszak,A.J., Gumbart,J.C., Lukacik,P., Chang,H., Easley,N.C., Lithgow,T., and Buchanan,S.K. (2013). Structural insight into the biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **501**, 385-390.

Notti,R.Q. and Stebbins,C.E. (2016). The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol. Spectr.* **4**.

Oliver,D.C., Huang,G., and Fernandez,R.C. (2003). Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J. Bacteriol.* **185**, 489-495.

Oomen,C.J., van,U.P., van,G.P., Feijen,M., Tommassen,J., and Gros,P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J.* **23**, 1257-1266.

Otto,B.R., Sijbrandi,R., Luirink,J., Oudega,B., Heddle,J.G., Mizutani,K., Park,S.Y., and Tame,J.R. (2005). Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 17339-17345.

Park,M., Jose,J., Thommes,S., Kim,J.I., Kang,M.J., and Pyun,J.C. (2011). Autodisplay of streptavidin 7. *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 307-311.

Pavlova,O., Peterson,J.H., Ieva,R., and Bernstein,H.D. (2013). Mechanistic link between beta barrel assembly and the initiation of autotransporter secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, E938-E947.

Pazy,Y., Eisenberg-Domovich,Y., Laitinen,O.H., Kulomaa,M.S., Bayer,E.A., Wilchek,M., and Livnah,O. (2003). Dimer-tetramer transition between solution and crystalline states of streptavidin and avidin mutants. *J. Bacteriol.* **185**, 4050-4056.

Pena,R.T., Blasco,L., Ambroa,A., Gonzalez-Pedrajo,B., Fernandez-Garcia,L., Lopez,M., Bleriot,I., Bou,G., Garcia-Contreras,R., Wood,T.K., and Tomas,M. (2019). Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol.* **10**, 1100.

Peterson,J.H., Plummer,A.M., Fleming,K.G., and Bernstein,H.D. (2017). Selective pressure for rapid membrane integration constrains the sequence of bacterial outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **106**, 777-792.

Peterson,J.H., Tian,P., Ieva,R., Dautin,N., and Bernstein,H.D. (2010). Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 17739-17744.

Petronzelli,F., Pelliccia,A., Anastasi,A.M., D'Alessio,V., Albertoni,C., Rosi,A., Leoni,B., De,A.C., Paganelli,G., Palombo,G., Dani,M., Carminati,P., and De,S.R. (2005). Improved tumor targeting by combined use of two antitenascin antibodies. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7137s-7145s.

Pompa-Mera,E.N., Arroyo-Matus,P., Ocana-Mondragon,A., Gonzalez-Bonilla,C.R., and Yopez-Mulia,L. (2014). Protective immunity against enteral stages of *Trichinella spiralis* elicited in mice by live attenuated *Salmonella* vaccine that secretes a 30-mer parasite epitope fused to the molecular adjuvant C3d-P28. *Res. Vet. Sci.* **97**, 533-545.

Pompa-Mera,E.N., Yopez-Mulia,L., Ocana-Mondragon,A., Garcia-Zepeda,E.A., Ortega-Pierres,G., and Gonzalez-Bonilla,C.R. (2011). *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* **129**, 393-401.

Pukatzi,S., Ma,A.T., Revel,A.T., Sturtevant,D., and Mekalanos,J.J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 15508-15513.

Putney,S.D. and Burke,P.A. (1998). Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat. Biotechnol.* **16**, 153-157.

Quehl,P., Hollender,J., Schuurmann,J., Brossette,T., Maas,R., and Jose,J. (2016). Co-expression of active human cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 reductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **15**, 26.

Quehl,P., Schuurmann,J., Hollender,J., and Jose,J. (2017). Improving the activity of surface displayed cytochrome P450 enzymes by optimizing the outer membrane linker. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 104-116.

Raivio,T.L. (2005). Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **56**, 1119-1128.

Ren,W.X., Han,J., Uhm,S., Jang,Y.J., Kang,C., Kim,J.H., and Kim,J.S. (2015). Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chem. Commun. (Camb.)* **51**, 10403-10418.

Richins,R.D., Kaneva,I., Mulchandani,A., and Chen,W. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat. Biotechnol.* **15**, 984-987.

Rizos,K., Lattemann,C.T., Bumann,D., Meyer,T.F., and Aebischer,T. (2003). Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* **71**, 6320-6328.

Robert,V., Volokhina,E.B., Senf,F., Bos,M.P., van,G.P., and Tommassen,J. (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS. Biol.* **4**, e377.

Rojas-Lopez,M., Zorgani,M.A., Kelley,L.A., Bailly,X., Kajava,A.V., Henderson,I.R., Polticelli,F., Pizza,M., Rosini,R., and Desvaux,M. (2017). Identification of the Autochaperone Domain in the Type Va Secretion System (T5aSS): Prevalent Feature of Autotransporters with a beta-Helical Passenger. *Front Microbiol.* **8**, 2607.

Rosano,C., Arosio,P., and Bolognesi,M. (1999). The X-ray three-dimensional structure of avidin. *Biomol. Eng* **16**, 5-12.

Roussel-Jazede,V., van,G.P., Sijbrandi,R., Rutten,L., Otto,B.R., Luirink,J., Gros,P., Tommassen,J., and van,U.P. (2011). Channel properties of the translocator domain of the autotransporter Hbp of *Escherichia coli*. *Mol. Membr. Biol.* **28**, 158-170.

Ruer,S., Ball,G., Filloux,A., and de,B.S. (2008). The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J.* **27**, 2669-2680.

Ruiz-Perez,F., Henderson,I.R., Leyton,D.L., Rossiter,A.E., Zhang,Y., and Nataro,J.P. (2009a). Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* **191**, 6571-6583.

Ruiz-Perez,F., Henderson,I.R., Leyton,D.L., Rossiter,A.E., Zhang,Y., and Nataro,J.P. (2009b). Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* **191**, 6571-6583.

Ruiz-Perez,F., Leon-Kempis,R., Santiago-Machuca,A., Ortega-Pierres,G., Barry,E., Levine,M., and Gonzalez-Bonilla,C. (2002). Expression of the Plasmodium falciparum immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of Salmonella enterica using the autotransporter MisL. *Infect. Immun.* **70**, 3611-3620.

Russell,A.B., Peterson,S.B., and Mougous,J.D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 137-148.

Ryan,R.P., Monchy,S., Cardinale,M., Taghavi,S., Crossman,L., Avison,M.B., Berg,G., van der Lelie,D., and Dow,J.M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 514-525.

Rybak,J.N., Scheurer,S.B., Neri,D., and Elia,G. (2004). Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics.* **4**, 2296-2299.

Saalik,P., Elmquist,A., Hansen,M., Padari,K., Saar,K., Viht,K., Langel,U., and Pooga,M. (2004). Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study. *Bioconjug. Chem.* **15**, 1246-1253.

Saalik,P., Padari,K., Niinep,A., Lorents,A., Hansen,M., Jokitalo,E., Langel,U., and Pooga,M. (2009). Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways. *Bioconjug. Chem.* **20**, 877-887.

Sakahara,H. and Saga,T. (1999). Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **37**, 89-101.

Salema,V., Marin,E., Martinez-Arteaga,R., Ruano-Gallego,D., Fraile,S., Margolles,Y., Teira,X., Gutierrez,C., Bodelon,G., and Fernandez,L.A. (2013). Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of E. coli cells with two beta-domains of opposite topologies. *PLoS. One.* **8**, e75126.

Sato,K., Naito,M., Yukitake,H., Hirakawa,H., Shoji,M., McBride,M.J., Rhodes,R.G., and Nakayama,K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 276-281.

Sauri,A., Soprova,Z., Wickstrom,D., de Gier,J.W., Van der Schors,R.C., Smit,A.B., Jong,W.S., and Luirink,J. (2009). The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* **155**, 3982-3991.

Schmidt,T.G. and Skerra,A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A* **676**, 337-345.

Sevastyanovich,Y.R., Leyton,D.L., Wells,T.J., Wardius,C.A., Tveen-Jensen,K., Morris,F.C., Knowles,T.J., Cunningham,A.F., Cole,J.A., and Henderson,I.R. (2012). A generalised module for the selective extracellular accumulation of recombinant proteins. *Microb. Cell Fact.* **11**, 69.

Sharon N, Lis H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 2004;14:53R–62R

Shibasaki,S., Ueda,M., Ye,K., Shimizu,K., Kamasawa,N., Osumi,M., and Tanaka,A. (2001). Creation of cell surface-engineered yeast that display different fluorescent proteins in response to the glucose concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 528-533.

Sjolander,A., Stahl,S., Lovgren,K., Hansson,M., Cavelier,L., Walles,A., Helmby,H., Wahlin,B., Morein,B., Uhlen,M., and . (1993). Plasmodium falciparum: the immune response in rabbits to the clustered asparagine-rich protein (CARP) after immunization in Freund's adjuvant or immunostimulating complexes (ISCOMs). *Exp. Parasitol.* **76**, 134-145.

Smith,G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.

Soprova,Z., Sauri,A., van,U.P., Tame,J.R., den,B.T., Jong,W.S., and Luirink,J. (2010). A conserved aromatic residue in the autochaperone domain of the autotransporter Hbp is critical for initiation of outer membrane translocation. *J. Biol. Chem.* **285**, 38224-38233.

Sousa,C., Kotrba,P., Ruml,T., Cebolla,A., and De,L., V (1998). Metalloadsorption by Escherichia coli cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* **180**, 2280-2284.

Spiess,C., Beil,A., and Ehrmann,M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339-347.

Stanley,S.A., Raghavan,S., Hwang,W.W., and Cox,J.S. (2003). Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 13001-13006.

Steinbach,J.M., Seo,Y.E., and Saltzman,W.M. (2016). Cell penetrating peptide-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with enhanced cell internalization. *Acta Biomater.* **30**, 49-61.

Stentebjerg-Olesen,B., Pallesen,L., Jensen,L.B., Christiansen,G., and Klemm,P. (1997). Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. *Microbiology* **143 (Pt 6)**, 2027-2038.

Suzuki,T., Lett,M.C., and Sasakawa,C. (1995). Extracellular transport of VirG protein in Shigella. *J. Biol. Chem.* **270**, 30874-30880.

Szabady,R.L., Peterson,J.H., Skillman,K.M., and Bernstein,H.D. (2005). An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 221-226.

Tajima,N., Kawai,F., Park,S.Y., and Tame,J.R. (2010). A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins. *J. Mol. Biol.* **402**, 645-656.

Takakura,Y., Oka,N., Kajiwara,H., and Tsunashima,M. (2012). Engineering of novel tamavidin 2 muteins with lowered isoelectric points and lowered non-specific binding properties. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 485-489.

Taskinen,B., Airene,T.T., Janis,J., Rahikainen,R., Johnson,M.S., Kulomaa,M.S., and Hytonen,V.P. (2014). A novel chimeric avidin with increased thermal stability using DNA shuffling. *PLoS. One.* **9**, e92058.

Taylor,I.M., Harrison,J.L., Timmis,K.N., and O'Connor,C.D. (1990). The TraT lipoprotein as a vehicle for the transport of foreign antigenic determinants to the cell surface of Escherichia coli K12: structure-function relationships in the TraT protein. *Mol. Microbiol.* **4**, 1259-1268.

Thaysen-Andersen M, Mysling S, Hørjup P. (2009) Site-specific glycoprofiling of N-linked glycopeptides using MALDI-TOF MS: strong correlation between signal strength and glycoform quantities. *Anal. Chem.* **81**:3933–3943.

Thoma,J., Burmann,B.M., Hiller,S., and Muller,D.J. (2015). Impact of holdase chaperones Skp and SurA on the folding of beta-barrel outer-membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 795-802.

Thomas,S., Holland,I.B., and Schmitt,L. (2014). The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1629-1641.

Tozakidis,I.E., Sichert,S., and Jose,J. (2015). Going beyond E. coli: autotransporter based surface display on alternative host organisms. *N. Biotechnol.* **32**, 644-650.

Urbanska,K., Lanitis,E., Poussin,M., Lynn,R.C., Gavin,B.P., Kelderman,S., Yu,J., Scholler,N., and Powell,D.J., Jr. (2012). A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* **72**, 1844-1852.

Urrutia,I.M., Fuentes,J.A., Valenzuela,L.M., Ortega,A.P., Hidalgo,A.A., and Mora,G.C. (2014). Salmonella Typhi shdA: pseudogene or allelic variant?. *Infect. Genet. Evol.* **26**, 146-152.

van den Berg,B. (2010). Crystal structure of a full-length autotransporter. *J. Mol. Biol.* **396**, 627-633.


van,B.E., Winter,R.T., Kolmar,H., and Fraaije,M.W. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* **29**, 79-86.

- van,U.P., Rahman,S., Jong,W.S., Daleke-Schermerhorn,M.H., and Luirink,J. (2014). Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1592-1611.
- van,U.P., Zinner,K.M., Jong,W.S.P., and Luirink,J. (2018a). On display: autotransporter secretion and application. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**.
- van,U.P., Zinner,K.M., Jong,W.S.P., and Luirink,J. (2018b). On display: autotransporter secretion and application. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**.
- Wagner,C. and Hensel,M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 17-34.
- Walther,D.M., Bos,M.P., Rapaport,D., and Tommassen,J. (2010). The mitochondrial porin, VDAC, has retained the ability to be assembled in the bacterial outer membrane. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 887-895.
- Wang,S., Yang,D., Wu,X., Wang,Y., Wang,D., Tian,M., Li,T., Qi,J., Wang,X., Ding,C., and Yu,S. (2018). Autotransporter MisL of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium facilitates bacterial aggregation and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**.
- Wang,W.W., Das,D., and Suresh,M.R. (2009). A versatile bifunctional dendritic cell targeting vaccine vector. *Mol. Pharm.* **6**, 158-172.
- Wang,X. and Kaplan,D.L. (2011). Functionalization of silk fibroin with NeutrAvidin and biotin. *Macromol. Biosci.* **11**, 100-110.
- Webb,C.T., Heinz,E., and Lithgow,T. (2012a). Evolution of the beta-barrel assembly machinery. *Trends Microbiol.* **20**, 612-620.
- Webb,C.T., Heinz,E., and Lithgow,T. (2012b). Evolution of the beta-barrel assembly machinery. *Trends Microbiol.* **20**, 612-620.
- Wentzel,A., Christmann,A., Adams,T., and Kolmar,H. (2001). Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J. Bacteriol.* **183**, 7273-7284.
- Wernerus,H. and Stahl,S. (2004). Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**, 209-228.
- Westerlund-Wikstrom,B., Tanskanen,J., Virkola,R., Hacker,J., Lindberg,M., Skurnik,M., and Korhonen,T.K. (1997). Functional expression of adhesive peptides as fusions to *Escherichia coli* flagellin. *Protein Eng* **10**, 1319-1326.
- Wilchek, M. and Bayer, E. A. (1990) Avidin–biotin technology, in *Methods in Enzymology*, vol. 184, Academic Press, New York, pp. 213–217.

- Wilhelm,S., Gdynia,A., Tielen,P., Rosenau,F., and Jaeger,K.E. (2007a). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**, 6695-6703.
- Wilhelm,S., Rosenau,F., Becker,S., Buest,S., Hausmann,S., Kolmar,H., and Jaeger,K.E. (2007b). Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem.* **8**, 55-60.
- Wu,C., Mino,K., Akimoto,H., Kawabata,M., Nakamura,K., Ozaki,M., and Ohmiya,Y. (2009). In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from *Cypridina* bioluminescence to an organic dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 15599-15603.
- Wu,S.C. and Wong,S.L. (2006). Intracellular production of a soluble and functional monomeric streptavidin in *Escherichia coli* and its application for affinity purification of biotinylated proteins. *Protein Expr. Purif.* **46**, 268-273.
- Wu,T., Malinverni,J., Ruiz,N., Kim,S., Silhavy,T.J., and Kahne,D. (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**, 235-245.
- Xu,Z. and Lee,S.Y. (1999). Display of polyhistidine peptides on the *Escherichia coli* cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5142-5147.
- Yamamoto,T., Aoki,K., Sugiyama,A., Doi,H., Kodama,T., Shimizu,Y., and Kanai,M. (2015). Design and synthesis of biotin analogues reversibly binding with streptavidin. *Chem. Asian J.* **10**, 1071-1078.
- Yao,Z., Zhang,M., Sakahara,H., Saga,T., Arano,Y., and Konishi,J. (1998). Avidin targeting of intraperitoneal tumor xenografts. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 25-29.
- Yoo,G., Saenger,T., Bong,J.H., Jose,J., Kang,M.J., and Pyun,J.C. (2015). Co-autodisplay of Z-domains and bovine caseins on the outer membrane of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 3126-3133.
- Zhai,Y., Zhang,K., Huo,Y., Zhu,Y., Zhou,Q., Lu,J., Black,I., Pang,X., Roszak,A.W., Zhang,X., Isaacs,N.W., and Sun,F. (2011). Autotransporter passenger domain secretion requires a hydrophobic cavity at the extracellular entrance of the beta-domain pore. *Biochem. J.* **435**, 577-587.
- Zhu,K., Dietrich,R., Didier,A., Doyscher,D., and Martlbauer,E. (2014). Recent developments in antibody-based assays for the detection of bacterial toxins. *Toxins. (Basel)* **6**, 1325-1348.
- Zoued,A., Brunet,Y.R., Durand,E., Aschtgen,M.S., Logger,L., Douzi,B., Journet,L., Cambillau,C., and Cascales,E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 1664-1673.

PUBLICACIONES

Autodisplay of an avidin with biotin-binding activity on the surface of *Escherichia coli*

H. D. Pardavé-Alejandre · J. E. Alvarado-Yaah · E. N. Pompa-Mera ·
J. E. Muñoz-Medina  · B. Sárquiz-Martínez · C. E. Santacruz-Tinoco ·
R. G. Manning-Cela · V. Ortiz-Navarrete · C. López-Macías · C. R. González-Bonilla

Received: 6 July 2017 / Accepted: 8 January 2018
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract

Objectives To display a recombinant avidin fused to the autotransporter ShdA to bind biotinylated molecules on the surface of *Escherichia coli*.

Results Two chimeric protein constructs containing avidin fused to the autotransporter ShdA were expressed on the surface of *Escherichia coli* DH5 α . One fusion protein contained 476 amino acids of the ShdA α and β domains, whereas the second consisted of a 314 amino acid from α and truncated β domains. Protein production was verified by SDS-PAGE using

an antibody to the molecular FLAG-tag. The surface display of the avidin-shdA fusion protein was confirmed by confocal microscopy and flow cytometry analysis, and the biotin-binding activity was evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry using biotin-4-fluorescein and biotinylated-ovalbumin (OVA).

Conclusions Expression of a recombinant avidin with biotin-binding activity on the surface of *E. coli* was achieved using the autotransporter ShdA. This system is an alternative to bind biotinylated molecules to *E. coli*.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2507-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Autodisplay · Avidin · Biotin-binding activity · *In trans* surface display · ShdA

H. D. Pardavé-Alejandre · J. E. Alvarado-Yaah ·
J. E. Muñoz-Medina · B. Sárquiz-Martínez ·
C. E. Santacruz-Tinoco · C. R. González-Bonilla (✉)
Laboratorio Central de Epidemiología, Coordinación de
Vigilancia Epidemiológica, Instituto Mexicano del Seguro
Social, Mexico City, México
e-mail: cesar.gonzalezb@imss.gob.mx

C. López-Macías
Unidad de Investigación Médica en Inmunología,
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional
Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social,
Mexico City, México

E. N. Pompa-Mera
Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y
Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico
Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro
Social, Mexico City, México

C. López-Macías
Nuffield Department of Medicine, University of Oxford,
Oxford, UK

R. G. Manning-Cela · V. Ortiz-Navarrete
Depto. de Biomedicina Molecular, Centro de
Investigación y de Estudios Avanzados del IPN,
Mexico City, Mexico

Introduction

The display of heterologous proteins on the surface of engineered *Enterobacteria* strains has several biotechnological applications, including the evaluation of protein secretion pathways, and live vaccine development (Daugherty 2007). Expression of recombinant proteins on the surface of transformed bacteria can be achieved using their natural secretion systems; autotransporters, which comprise the type V secretion system in Gram-negative bacteria, are especially attractive due to their simplicity. In general, these proteins contain three functional domains: a N-terminal signal peptide that mediates the translocation of the protein to the bacterial periplasm through the *Sec* machinery; a passenger α domain, which is transported to the bacterial surface and may be trimmed and secreted into the milieu and, an outer membrane-anchored C-terminal β -domain that mediates the translocation of the α -domain to the bacterial surface (Nicolay et al. 2015). The autotransporters have been extensively used for the expression and secretion of recombinant proteins. This method is often referred to as autodisplay, indicating the surface expression of heterologous proteins by autotransporters and the substitution of the natural passenger α by a heterologous (passenger) protein through genetic engineering. Thus, the use of autotransporters to translocate heterologous proteins opens up the interesting possibility of coating bacterial surfaces with different peptides or proteins, which may be advantageous for the development of recombinant bacterial vector vaccines.

However, efficient autodisplay depends on several properties of the passenger protein, such as molecular weight, amino acid composition, tendency to form complex tertiary structures and hydrophobicity. Moreover, the recombinant protein may be toxic or constitute a metabolic burden to the transformed bacteria. Therefore, inadequate expression or poor biological function of the passenger protein is not an infrequent occurrence.

ShdA is a large outer membrane protein (OMP) of the autotransporter family from *Salmonella enterica*, involved in the colonization of the cecum and the Peyer's patches of terminal ileum in mice (Kingsley et al. 2003). In addition, ShdA functions as adhesine, *in virtue* of its passenger domain ability to bind fibronectin and collagen I (Kingsley et al. 2004;

Wagner and Hensel 2011). The translocation domain of ShdA is composed by a transmembrane β -barrel domain embedded in the outer membrane, and a linker region (connecting the β -barrel to the passenger domain). Both have been used for *in cis* surface display of fusion proteins (Pompa-Mera et al. 2011, 2014). However, the use of ShdA for *in trans* surface display technology has not been explored.

The interaction of biotin and avidin or streptavidin has been used in many medical and biotechnological applications due to its strong affinity and specificity, allowing the bridging between biotinylated molecules to a substrate in cell surfaces (Liao et al. 2015).

In the present study, a recombinant avidin with biotin-binding activity was fused to the autotransporter ShdA. This strategy allowed the *in trans* surface display of biotin-4-fluorescein and biotinylated ovalbumin (OVA-biotin) on the surface of *Escherichia coli* DH5 α . This system represents a new tool for display of exogenous biotinylated molecules on cell surface of *E. coli*.

Materials and methods

Strains and plasmids

Escherichia coli DH5 α (supE44 Δ lac169 ϕ 80lacZ Δ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) was used in this study. The vectors pENP (3415 bp) (Pompa-Mera et al. 2011), pAH3545 (3545 bp) (kindly donated by Dr. ML Penichet, UCLA, USA), pENP-Avi (3794 bp), pJEAY (3727 bp) and pJEAY-Avi (4094 bp) were used to express a recombinant avidin from *Gallus gallus*. All plasmids contain the *nirB* promoter (inducible under anaerobic conditions), with the exception of pAH3545, a 12,526 bp plasmid that encodes the LTB signal peptide for translocation of the fusion protein to the periplasmic space, as previously reported (Ruiz-Pérez et al. 2002). A FLAG-tag was included to trace the fusion proteins as reported previously (Pompa-Mera et al. 2011). Two variants of ShdA were constructed, one with the complete α - β -domains (wShdA) (476 amino acid residues) and one a previously reported $\Delta\alpha$ - β -domain variant of ShdA (Pompa-Mera et al. 2011, 2014) containing a shorter version of ShdA (sShdA) (314 amino acid residues). All recombinant bacterial strains were handled

according to national biosafety regulations for genetically modified organisms that was published and updated in DOF 06-03-2009.

Plasmid construction

The expression vector pJEAY-Avidin, encoding the LTB-Avidin-FLAG-ShdA fusion protein, was constructed from the plasmid pENP as follows: a full-length sequence coding for the complete α - β domains of ShdA (wShdA) was amplified by PCR using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 genomic DNA as a template. Based on the GenBank sequence accession number AF140550.2, the primers sense shda-1 and antisense Tshda-2 were designed, containing the restriction sites *NheI* and *BamHI* (underlined), respectively. The resulting 1428 bp amplicon encodes 476 amino acids (positions 1560–2035). After restriction enzyme digestion, the amplicon was ligated to plasmid pENP. This strategy allowed the short ShdA (sShdA) sequence to be replaced and generated a complete ShdA fused to avidin (wShdA-Avi). The sequence coding for a *Gallus gallus* avidin was amplified by PCR from plasmid pAH3545 using primers *avi-1* and *avi-2* with *HindIII* and *XhoI* restriction sites incorporated at the 5'- and 3'-ends, respectively. The primer sequences used to construct plasmids are listed in Supplementary Table 1. The avidin encoding sequence (379 bp) was inserted in plasmid pJEAY that had been digested with the same enzymes (Supplementary Fig. 1). The resulting plasmid, pENP-Avi, contains the sShdA domain fused to avidin (sShdA-Avi). Competent *E. coli* DH5 α cells were transformed with the pENP, pENP-Avi, pJEAY and, pJEAY-Avi plasmids. All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). PCR reagents and plasmid preparation kits were purchased from Invitrogen (Palo Alto, CA, USA) and Qiagen (Qiagen, Mexico), respectively. DNA manipulation was performed according to the methods described by Sambrook and Russell (1989). The constructs engineered in this study were verified by nucleotide sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the pNirI primer (5'-TTCAGGTAAATTTGATACAT-CAAA-3'). Sequencing reactions were analysed on an ABI Prism 310 genetic analyser (applied biosystems).

Culture and induction conditions

Escherichia coli DH5 α transformants were cultured on Luria–Bertani (LB) agar plates supplemented with 100 μ g/ml of ampicillin at 37 °C. For inducing conditions, bacterial strains were incubated at 37 °C in 45 ml of thioglycolate medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) under an anaerobic atmosphere using a GasPak Anaerobic System (Becton–Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) until OD_{540nm} = 1.0 was reached.

Analysis of expression of ShdA-Avidin fusion proteins by immunoblotting

Expression of the ShdA-Avidin fusion proteins was demonstrated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) of whole-cell lysates and outer membrane fraction from *Escherichia coli* DH5 α strains transformed with plasmids pENP-Avi, pJEAY-Avi (encoding sShdA-Avi and wShdA-Avi, respectively), pJEAY and pENP (controls). Outer membrane proteins were prepared as previously described (Park et al. 2013). The samples were electrophoresed under reducing conditions (1% SDS, 140 mM 2-mercaptoethanol, 95 °C, 10 min) in 12% gels and then transferred onto nitrocellulose membrane 0.45 μ m (BioRad[®]). Immunoblotting of protein extracts was performed with a mouse monoclonal anti-FLAG[®] M2 antibody (F3165, Sigma[®]) diluted to 1:1500 in PBS 5% skim milk (BioRad[®]). After washing, a secondary goat anti-mouse IgG antibody (H + L)-HRP conjugate (Zymed[®]) that was diluted to 1:3000 was applied. The immune reaction was revealed by 4-chloro-1- α -naphthol-30% H₂O₂ in PBS (pH 7.4). Expression analysis was performed with the BioRad[®] ChemiDoc[™] XRS System and Image Lab[™] Software v. 2.0 (Hercules, CA), using the protein ladder PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific[™]) to estimate the fusion proteins molecular size.

Confocal immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis

Surface expression of the sShdA-Avi and wShdA-Avi fusion proteins was evaluated by fluorescence confocal microscopy. After induction, the bacterial strains were harvested, washed thrice with PBS and overnight

fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde. After washing with PBS, cells were incubated with PBS supplemented with 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich). Then, cells were incubated with the monoclonal anti-FLAG[®] M2 antibody (F3165, Sigma[®]) at dilution of 1:50 in PBS, overnight at 25 °C with agitation. The cells were washed thrice with PBS and incubated with a goat anti-mouse IgG (H + L)-FITC conjugate (Zymed[®]), diluted to 1:100 in PBS for 2 h at 25 °C with agitation in the dark. The samples were suspended in 50 µl PBS, and 5 µl of the bacterial suspensions was placed on a poly-L-lysine coated microscopic slides and examined on a Nikon Ti Eclipse inverted confocal microscope. Imaging was performed using a 100× (oil immersion, NA 1.45) objective lens. The FITC-label was excited using a built-in 488 nm laser line. This light source was also used to acquire the transmitted light channel. FITC fluorescence was read in the 500–550 nm range. Images were acquired and analysed using NIS Elements v.5.00.

Surface display of the ShdA-Avidin fusion proteins on the cell surface of *E. coli* was also confirmed by flow cytometry. Cells were labelled with monoclonal anti-FLAG antibody, diluted to 1:100 and goat anti-mouse IgG (H + L)-FITC conjugate were used (Zymed[®]), diluted to 1:250, and analysed in a Beckman Coulter FacScalibur using FLOWJO v.7.5 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Evaluation of the biotin-binding activity of the ShdA-avidin fusion proteins

The ability of the two recombinant avidin fusion proteins (sShdA-Avi and wShdA-Avi) to bind biotin or biotinylated molecules was assessed, using biotin-4-fluorescein and ovalbumin (biotinylated-OVA).

After induction, the transformed bacterial strains were harvested, washed twice with PBS, and adjusted to 1×10^8 CFU. Cells were harvested, washed twice with PBS, adjusted to 1×10^8 CFU and incubated at 37 °C with 50 µl of biotin-4-fluorescein (Sigma-Aldrich) at 1×10^{-12} , 1×10^{-10} , 1×10^{-8} , 1×10^{-6} , 1×10^{-4} , and 1×10^{-2} M concentrations. Bacterial suspensions were analysed by flow cytometry and indirect immunofluorescence assay (IFA).

The binding of the biotinylated ovalbumin (bio-OVA) to the ShdA-Avidin displayed on the bacterial surfaces was evaluated by IFA. Briefly, ovalbumin

OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA) was biotinylated using an ImmunoProbe[™] Biotinylation Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. After culturing cells under inducing conditions, 1×10^8 CFU of each bacterial strain was incubated with 50 µl of bio-OVA at concentrations of 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , and 1×10^{-2} M. Bacterial suspensions were washed twice with PBS, and pellets were suspended in 500 µl PBS. Then, samples were incubated at 37 °C with agitation with the primary antibody, anti-Ovalbumin in dilution 1:1000. After three washes with PBS, samples were incubated with goat anti-mouse IgG (H + L)-FITC conjugate (Zymed[®]), diluted to 1:1500. Finally, the samples were suspended in 50 µl PBS, and 5 µl of the bacterial suspensions was placed on slides and observed using a fluorescence microscope (BX-40; Olympus).

Results

Expression of ShdA-avidin under control of the nirB promoter

Two ShdA-Avidin fusion proteins were constructed, including a short sShdA-Avidin construct (amino acids 1721–2035) containing (from the 5'-terminus) LTB-Avidin-FLAG-ΔShdA and a long wShdA-Avidin construct (amino acids 1560–2035) containing LTB-Avidin-FLAG-ShdA. The fusion genes were cloned into the pENP and pJEAY vectors under control of the inducible *nirB* promoter (Supplementary Fig. 1). A schematic representation of the two forms of recombinant avidin is shown in Fig. 1a. *E. coli* DH5α was transformed with the vectors pENP-Avi and pJEAY-Avi. The production of the fusion proteins was demonstrated in whole-cell lysates by SDS-PAGE (Fig. 1b), and immunoblotting using antibodies to the FLAG-tag (Fig. 1c).

The expected bands corresponding to sShdA-Avi and wShdA-Avi fusion proteins with molecular weights of 52.2 and 70.1 kDa were observed as shown in Fig. 1c, lanes 5 and 9, respectively. In the *E. coli* strains transformed with the pENP and pJEAY plasmids, protein bands with molecular weights of 39 and 56.2 kDa were observed, respectively (Fig. 1c, lanes 3 and 7). A total protein extract from untransformed *E. coli* DH5α was included as a negative control in Fig. 1c, lane 1. Thus, the molecular weight

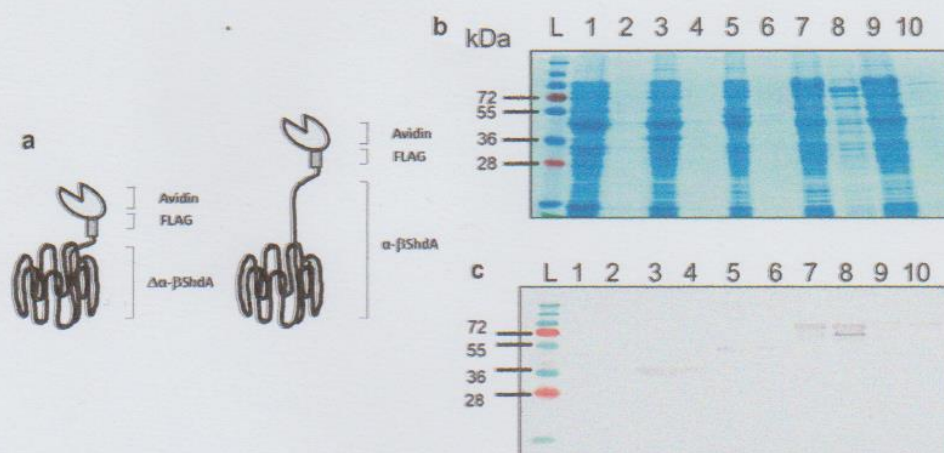


Fig. 1 Expression of fusion proteins containing recombinant monomeric avidin in whole-cell lysates and outer membrane fraction of *E. coli* DH5 α . **a** Hypothetical model for the display of recombinant monomeric avidin by ShdA autotransporter on the surface of *E. coli* DH5 α . **b** SDS-PAGE analysis and **c** immunoblotting analysis of fusion proteins LTB-FLAG- Δ ShdA (lanes 3 and 4), LTB-Avi-FLAG- Δ ShdA (lanes 5 and 6), LTB-

FLAG-ShdA (lanes 7 and 8) and LTB-Avi-FLAG-ShdA (lanes 9 and 10). A whole-cell lysate and outer membrane fraction derived from untransformed *E. coli* DH5 α strain was included as a negative control (lanes 1 and 2, respectively). Lanes 1, 3, 5, 7, and 9, total proteins; lanes 2, 4, 6, 8 and 10, outer membrane fraction. All fusion proteins were tracked with an anti-FLAG monoclonal antibody

of the recombinant avidin was consistent. Although no quantitative measurements of protein production were performed, it is noteworthy that sShdA-Avi (Fig. 1c, lane 5) showed lower expression as estimated by the 52.2 kDa band intensity when compared with the intensity of sShdA alone (39 kDa) (Fig. 1c, lane 3). In contrast, cloning of recombinant avidin in the pJEAY vector also resulted in low expression, as indicated by the intensity of the 73.5 kDa band (Fig. 1c, lane 9). These results show that *E. coli* successfully expressed the fusion construct of the FLAG-tagged avidin.

In addition, sShdA-Avi and wShdA-Avi fusion proteins were detected in outer membrane fractions of induced strains of *E. coli* carrying pENP-Avi and pJEAY-Avi plasmids (Fig. 1c, lanes 6 and 10, respectively). Similar expression of sShdA-Avi and wShdA-Avi fusion proteins, was detected in outer membrane fractions from *E. coli* transformed with pENP-Avi and pJEAY-Avi plasmids, respectively.

Display of ShdA-avidin fusion proteins on the *E. coli* cell surface

To confirm the presence and localization of avidin on the *E. coli* cell surface, recombinant strains were analyzed by confocal immunofluorescence microscopy. Fluorescence was observed in *E. coli* carrying

pENP-Avi (Fig. 2c) and pJEAY-Avi plasmids (Fig. 2e). Expression of wShdA-Avi fusion protein on the cell surface of *E. coli* (strain pJEAY-Avi) was higher in comparison to showed by *E. coli* strain pENP-Avi. Histograms showed in Fig. 2f confirmed the display of recombinant avidin on the cell surface of *E. coli* transformed with the pENP-Avi and pJEAY-Avi plasmids. The expression of sShdA-Avi and wShdA-Avi fusion proteins, reached a 2-log-relative-light-unit displacement with respect to the untransformed *E. coli* DH5 α control. Thus, recombinant avidin was efficiently translocated and displayed on cell surface of *E. coli*, through the two version of ShdA autotransporter (sShdA and wShdA).

Biotin-binding activity of ShdA-avidin displayed on the surface of *E. coli*

The functional activity of the recombinant ShdA-Avidin displayed on the bacterial surface was further evaluated by flow cytometry. Biotin-binding activity was determined using serial dilutions of biotin-4-fluorescein (Supplementary Fig. 2). High concentrations of biotin-4-fluorescein [1.25×10^{-4} M] were necessary to reach an optimal biotin-binding activity. Histogram and dot-plots shown in Fig. 3 revealed different biotin-binding activities between sShdA-Avi

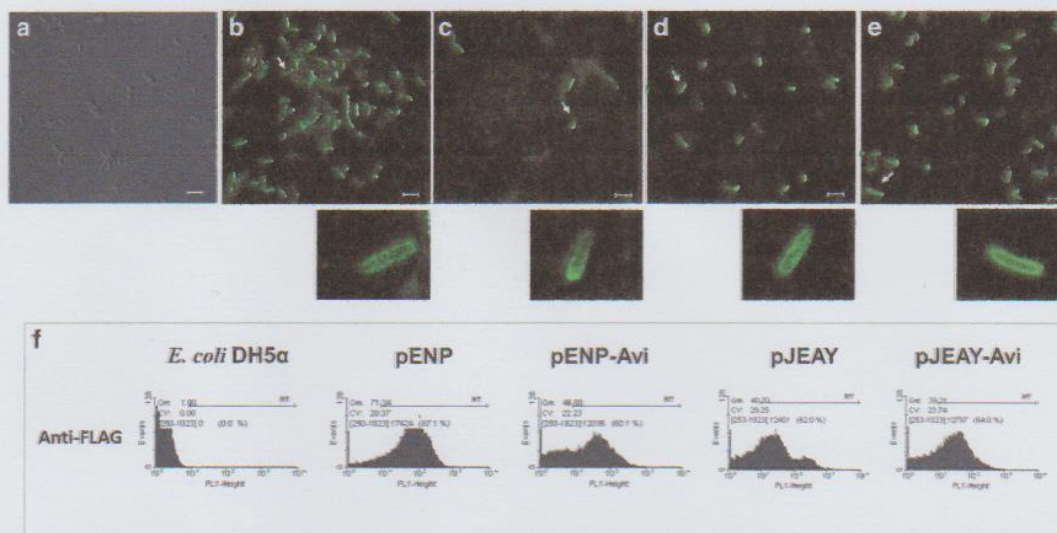


Fig. 2 Display of recombinant monomeric avidin on the cell surface of *E. coli* strains, revealed by confocal immunofluorescence microscopy. **a** *E. coli* DH5 α observed (in light field), **b** pENP **c** pENP-Avi, **d** pJEAY and **e** pJEAY-Avi. Slides observed at 100 \times magnification. **f** Histograms showing the expression of fusion proteins on the surface of *E. coli* DH5 α

transformed with different plasmids. Cells were labelled with an anti-FLAG monoclonal antibody and FITC conjugate anti-IgG antibody. Fluorescent images shown in the lower correspond to the arrows indicated in **b–e**. Each scale bar represents 5 μ m. A representative figure of three independent experiments is shown

and wSdhA-Avi when the bacteria were incubated with 2.5×10^{-4} M biotin-4-fluorescein. *E. coli* pENP and pENP-Avi showed the highest mean fluorescence intensity (MFI) due to the retention of the biotin-4-fluorescein on their cell surfaces (MFI = 70.62 and MFI = 87.05, respectively) compared to the

fluorescence detected with *E. coli*-pJEAY and *E. coli*-pJEAY-Avi (MFI = 42.17 and MFI = 40.25, respectively) (Fig. 3a).

These results demonstrate that ShdA-Avidin showed biotin-binding activity. Both variants of the fusion protein ShdA-Avidin showed biotin-binding

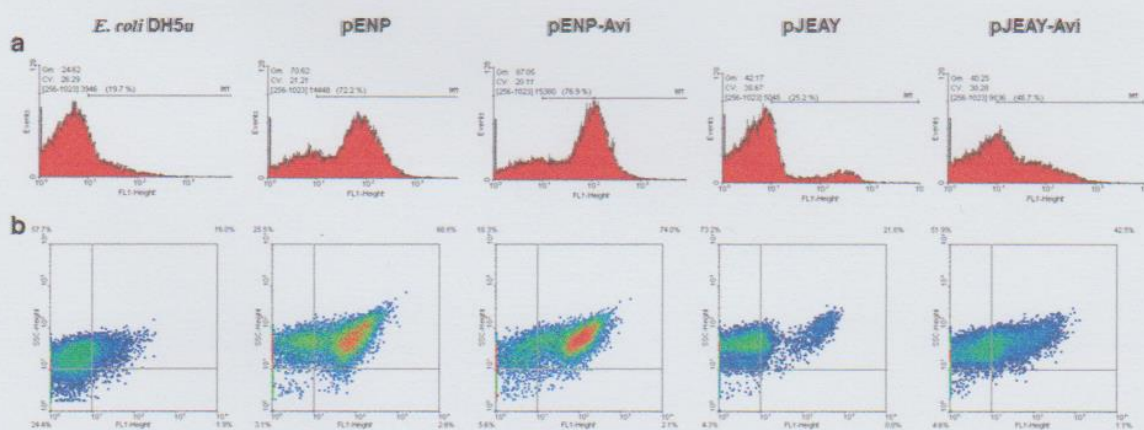


Fig. 3 Biotin-binding activity of recombinant monomeric avidin on the surface of *E. coli* DH5 α transformed with different plasmids. **a** Histograms corresponding to biotin-4-fluorescein bound to recombinant avidin on the surface of *E. coli* strains. **b** Representative dot plots of side scatter and mean fluorescence

intensity from flow-cytometric analyses of *E. coli* pENP, pENP-Avi, pJEAY and pJEAY-Avi after treatment with 2.5×10^{-4} M biotin-4-fluorescein; the percentage of fluorescent cells is presented. An untransformed *E. coli* DH5 α strain was used as a control

activity, reaching a 2-log-relative-light-unit displacement with respect to the untransformed *E. coli* DH5 α control.

Both sShdA-Avi and wShdA-Avi showed biotin-binding activity in a concentration-dependent manner. Non-specific biotin-4-fluorescein binding activity was observed in all strains at the highest concentration tested (5×10^{-4} M). Non-specific biotin-binding was also observed in the strains transformed with pENP, pENP-Avi and pJEAY-Avi, suggesting that ShdA increases the binding of biotin-4-fluorescein on the bacterial surface (Supplementary Fig. 2).

The Fig. 3b shows dot plots of cells exhibiting a positive fluorescence side scattering signal after incubation with 2.5×10^{-4} M biotin-4-fluorescein. The percentage of fluorescent cells for *E. coli* transformed with pENP-Avi or pJEAY-Avi was 74 and 42.5%, respectively. However, *E. coli* DH5 α strains transformed with pENP or pENP-Avi showed higher MFIs, suggesting that sShdA facilitates the unspecific binding of avidin. *E. coli* strains not expressing avidin (DH5 α and DH5 α -pJEAY) also showed background fluorescence (24.62 and 42.17, respectively). A significant fluorescent signal was detected from the pENP-Avi strain incubated with 2.5×10^{-4} M biotin-4-fluorescein. Non-specific fluorescence was observed with *E. coli* DH5 α and DH5 α -pJEAY. Thus, these results demonstrated that avidin displayed on the surface of *E. coli* cells was indeed able to bind biotinylated molecules (Fig. 3a), with the biotin-binding activity being more efficient in strains expressing short sShdA compared to the complete wShdA (Fig. 3b).

In addition, IFA was employed to determine whether the recombinant avidin on the surface of *E. coli* was able to bind biotin-4-fluorescein and biotinylated ovalbumin (biotinylated-OVA). A few bacteria transformed with pJEAY showed an ability to bind biotin-4-fluorescein (Fig. 4a) and biotinylated-OVA (Fig. 4b), which demonstrates that the *E. coli* strain had a basal ability to bind biotin. However, *E. coli* pJEAY-Avi efficiently bound biotinylated-OVA (Fig. 4b). It is noteworthy that bacterial aggregates were formed, suggesting mesh formation due to multimeric binding on the bacterial surface.

Discussion

Autotransporters are proteins that constitutes the type V secretion system of Gram-negative bacteria and have been widely used to autodisplay functional heterologous peptides or proteins on the surface of bacteria. This method is simple and has several advantages over the production of recombinant proteins from other bacterial compartments. However, autodisplay has several limitations; for instance, the folded, recombinant protein may not resemble the native protein, and this method is not suitable when glycosylation and posttranslational modifications are important for the function of the recombinant protein. An alternative to solve the problems associated with the inadequate production or improper folding of recombinant proteins displayed on the bacterial surface is the *in trans* surface display system, where the protein of interest is first purified from a separate source and then linked to the bacterial surface (Kalyanasundram et al. 2015).

Here, we report a similar *in trans* surface display system using the autodisplay of avidin on the bacterial surface. The *in trans* surface display of avidin was performed using the autotransporter ShdA to externally bridge the biotinylated molecules biotin-4-fluorescein and biotinylated-OVA. The binding of biotin-avidin/streptavidin is the strongest non-covalent interaction known in nature (Chivers et al. 2011), and this property has been exploited as a biological tool for a wide range of applications. The approach we describe here may represent a universal system to bind biotinylated molecules with diverse biochemical natures on the bacterial surface and is especially attractive, for rapid agglutination diagnostic tests or vaccine development. Furthermore, this system represents an efficient alternative for gene transfer approaches, in which cloning and expression of recombinant proteins have some limitations, in the expression of proteins with posttranslational modifications (Liao et al. 2015).

To achieve bacterial surface binding by the avidin-biotin interaction, the activity of the recombinant avidin must be preserved. Various systems for the heterologous expression of recombinant streptavidins in *E. coli* have been published (Demonte et al. 2014). Several studies designed to isolate the recombinant avidin have reported different technical difficulties, such as the intracellular accumulation of the

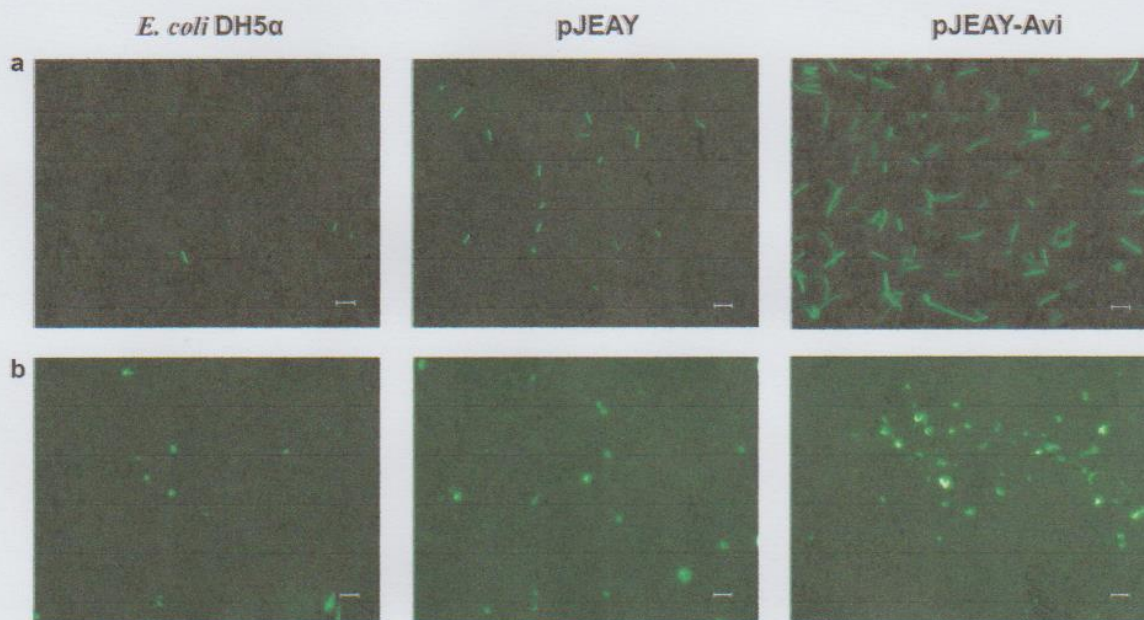


Fig. 4 Determination of binding of biotinylated molecules to recombinant avidin displayed on the surface of *E. coli* DH5 α by an indirect immunofluorescence assay (IFA). **a** IFA of *E. coli* strains incubated with 2.5×10^{-4} M biotin-4-fluorescein. **b** IFA

of *E. coli* strains incubated with 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} M biotinylated-OVA and revealed with anti-OVA antibody and conjugate FITC-anti-IgG. Slides were observed at $100 \times$ magnification. Each scale bar represents 5 μ m

heterologous protein, the formation of inclusion bodies and partial toxicity (Wu and Wong 2006). In addition, additional purification or renaturation steps are required when the secretion of bioactive avidin into the medium is desirable.

Although we cannot predict the proper folding of the avidin translocated to the bacterial surface as a fusion protein with ShdA and although it seems highly improbable, we found that it was indeed displayed on the surface of *E. coli* DH5 α and was able to bind biotin. Two versions of ShdA-Avi were constructed. The short version of ShdA (Δ ShdA), containing a truncated α domain, was more efficiently displayed than the complete ShdA. While a number of studies have shown that incomplete, truncated forms of the anchoring motif are better to display proteins surface than the complete α passenger domain (Han and Lee 2015); results from this study showed that complete ShdA autotransporter (wShdA) allowed a efficient expression of recombinant monomeric avidin as passenger domain. The secretion mechanism of autotransporters typically allows some passenger domain folding and the presence of disulphide bonds. The fusion protein ShdA-Avi was able to translocate avidin

despite containing eight antiparallel β -strands and interconnecting loops. The surface display of a tetrameric avidin is not possible with autodisplay; however, a monomeric functional avidin was enough to bind biotinylated molecules. To increase recombinant protein production, we used the inducible promoter *nirB*, which offers some advantages over constitutive expression. This study shows that the *nirB* promoter is suitable for the expression of an avidin with bioactive function in *E. coli* DH5 α . This approach offers some clear advantages, such as the availability of an avidin with biotin-binding activity having the potential to bridge biotinylated molecules without compromising the viability of host bacteria. Another advantage of this system is the fact that the recombinant avidin contains only 124 amino acids, maintaining its affinity for biotin. It is known that the monomeric avidin has a lower affinity than the tetrameric avidin; however, both ShdA-Avi fusion proteins were able to bind biotin at a concentration of 2.5×10^{-4} M. These recombinant avidins lack the carbohydrate side chains, avoiding the problems reported in several applications of avidin-biotin technology (Hytonen et al. 2004).

While the flow cytometry analysis showed that the avidin displayed on the *E. coli* surface was able to bind biotin, one limitation of this study is the inability to determine the amount of biotin-binding sites per bacterial cell.

The non-specific bond of biotin-4-fluorescein observed at a concentration of 5×10^{-4} M can be attributed to the saturation point being reached, which occurs with high biotin-4-fluorescein concentrations. However, non-specific binding to biotin-4-fluorescein at low concentrations [3.12×10^{-5} M] was also observed, particularly with *E. coli* pENP. The presence of the conserved lysine residue within a consensus sequence (Ala/Val-Met-Lys-Met) found in carboxylases might contribute to the biotin binding (Healy et al. 2010). In contrast, avidin has a high level of nonspecific binding to various biological components at physiological pH as a result of its high isoelectric point (Takakura et al. 2012).

The production of soluble, recombinant streptavidin in *Escherichia coli* may be difficult. Therefore, some studies have focused on their expression on the bacterial surface. The production of a functional streptavidin on the bacterial surface of *E. coli* UT5600 has been shown using the autotransporter AIDA-I (Park et al. 2011). However, to our knowledge, this is the first report of the expression and display of avidin by an autotransporter in *E. coli* that maintains its biological properties.

Conclusions

Here, we report on a recombinant avidin fused to the membrane anchoring motif of ShdA in *E. coli* DH5 α . This approach constitutes an effective *in trans* surface display system for exogenous biotinylated molecules. This method could provide an alternative, wide-ranging method to bind proteins and other biomolecules to bacterial surfaces.

Acknowledgments This work was approved by the Local Research and Bioethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) and was supported by grants from the IMSS-FIS (FIS/IMSS/PROT/566) and (UC-MEXUS-CONACYT, number CN-07-122). Héctor Daniel Pardavé-Alejandre is a PhD student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a PhD Fellowship from CONACYT (#228005) and COMECYT (12BCD0045-I). The authors acknowledge Dr. M. Penichet

from the Division of Surgical Oncology, UCLA, USA for the donation of the pAH3545 plasmid and Javier Hernández Acosta for his technical assistance. We also thank Vadim Pérez Koldenkova Ph.D. from Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Centro Médico Nacional S. XXI, IMSS, by its technical assistance in confocal microscopy, and the Laboratorios San Ángel S.A. for their financial support in the publication of this manuscript.

Supporting information Supplementary Table 1—List of primers used in the construction of the pENP-Avi, pJEAY and pJEAY-Avi plasmids.

Supplementary Figure 1—Schematic representation of the construction of the pENP-Avi and pJEAY-Avi plasmids. A plasmid containing a full-length sequence coding for the complete α - β domains of the ShdA AT (complete ShdA) was constructed using the pENP plasmid to replace the short ShdA AT (Δ ShdA). A DNA fragment encoding for 124 amino acids, corresponding to monomeric avidin from *Gallus gallus*, was amplified by PCR using the pAH3545 plasmid as template. The resulting amplicon (379 bp) was digested with *HindIII* and *XhoI* enzymes and inserted into the pJEAY vector, creating the pJEAY-Avi plasmid.

Supplementary Figure 2—Determination of the optimal concentration of biotin-4-fluorescein bound to recombinant monomeric avidin displayed by *E. coli* DH5 α . Strains of *E. coli* DH5 α were cultured under inducing conditions and incubated with different concentrations of biotin-4-fluorescein.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical approval The study was approved by the Ethics Committee and the Research Committee of the National Committee of Scientific Research of the Instituto Mexicano del Seguro Social with the registration number R-2012-785-064.

References

- Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M (2011) How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J* 435:55–63
- Daugherty PS (2007) Protein engineering with bacterial display. *Curr Opin Struct Biol* 17:474–480
- Demonte D, Dundas CM, Park S (2014) Expression and purification of soluble monomeric streptavidin in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6285–6295
- Han MJ, Lee SH (2015) An efficient bacterial surface display system based on a novel outer membrane anchoring element from the *Escherichia coli* protein yiaT. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–7
- Healy S, McDonald MK, Wu X, Yue WW, Kochan G, Oppermann U, Gravel RA (2010) Structural impact of human and

- Escherichia coli* biotin carboxyl carrier proteins on biotin attachment. *Biochemistry* 49:4687–4694
- Hytonen VP, Laitinen OH, Airene TT, Kidron H, Meltola NJ, Porkka EJ, Horha J, Paldanius T, Maatta JA, Nordlund HR, Johnson MS, Salminen TA, Airene KJ, Yla-Herttuala S, Kulomaa MS (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem J* 384:385–390
- Kalyanasundram J, Chia SL, Song AA, Raha AR, Young HA, Yusoff K (2015) Surface display of glycosylated Tyrosinase related protein-2 (TRP-2) tumour antigen on *Lactococcus lactis*. *BMC Biotechnol* 15:113
- Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A, Dougan G, Bäumlér AJ (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* 71:629–640
- Kingsley RA, Abi Ghanem D, Puebla-Osorio N, Keestra AM, Berghman L, Bäumlér AJ (2004) Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA auto-transporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* 186:4931–4939
- Liao TY, Lau A, Joseph S, Hytönen V, Hmama Z (2015) Improving the immunogenicity of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine by non-genetic bacterial surface decoration using the avidin-biotin system. *PLoS ONE* 10:e0145833
- Nicolay T, Vanderleyden J, Spaepen S (2015) Autotransporter-based cell surface display in gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 41:109–123
- Park M, Jose J, Thommes S, Kim JI, Kang MJ, Pyun JC (2011) Autodisplay of streptavidin. *Enzyme Microb Technol* 48:307–311
- Park TJ, Heo NS, Yim SS, Park JH, Jeong KJ, Lee SY (2013) Surface display of recombinant proteins on *Escherichia coli* by BclA exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microb Cell Fact* 12:81
- Pompa-Mera EN, Yepez-Mulia L, Ocana-Mondragon A, Garcia-Zepeda EA, Ortega-Pierres G, Gonzalez-Bonilla CR (2011) *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 129:393–401
- Pompa-Mera EN, Arroyo-Matus P, Ocana-Mondragon A, Gonzalez-Bonilla CR, Yepez-Mulia L (2014) Protective immunity against enteral stages of *Trichinella spiralis* elicited in mice by live attenuated salmonella vaccine that secretes a 30-mer parasite epitope fused to the molecular adjuvant C3d-P28. *Res Vet Sci* 97:533–545
- Ruiz-Pérez F, León-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, González-Bonilla C (2002) Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP) 4 on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun* 70:3611–3620
- Sambrook J, Russell DW (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Takakura Y, Oka N, Kajiwara H, Tsunashima M (2012) Engineering of novel tamavidin 2 muteins with lowered isoelectric points and lowered non-specific binding properties. *J Biosci Bioeng* 114:485–489
- Wagner C, Hensel M (2011) Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* 715:17–34
- Wu SC, Wong SL (2006) Intracellular production of a soluble and functional monomeric streptavidin in *Escherichia coli* and its application for affinity purification of biotinylated proteins. *Protein Expr Purif* 46:268–273