



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**DESPLIEGUE DE ANTÍGENOS EN LA
SUPERFICIE CELULAR BASADO EN
AUTOTRANSPORTADORES**

Tesis que presenta

Yuri Edith Monterrosa Rodas

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero de 2022



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Despliegue de antígenos en la superficie celular basado en Autotransportadores**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yuri Edith Monterrosa Rodas** y aprobada el **23 de Febrero de 2022** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Codirector de la tesis

Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández
Codirector de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Antonio De León Rodríguez y el Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández. Se contó con financiamiento parcial por recursos propios S-2100r.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 1009026 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio De León Rodríguez, por aceptarme en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División. También, por sus enseñanzas y consejos tanto de manera directa e indirecta, a lo largo de esta etapa de la maestría.

Al Dr. Víctor Balderas Hernández, por todo su apoyo, asesoría, paciencia y amabilidad durante mi trabajo en el Laboratorio.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro, por su tiempo para aportar con comentarios constructivos en este trabajo.

De manera general agradezco a cada uno de los profesores que han contribuido a mi formación, ya que sin sus conocimientos no habría sido posible terminar esta parte del camino.

Al consejo de profesores de la División por aceptarme como alumna del IPICYT y al CONACYT por la beca otorgada.

A mis amigas de generación y de la división de Nanociencias (Brenda, Andrea y Verónica) por hacer amena y divertida estos dos años de maestría.

A mi familia por siempre darme su apoyo incondicional, confiar en mí y hacerme sentir cerca de casa desde la distancia.

Por último, pero no menos importante, me agradezco por seguir mis sueños y metas.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Autotransportadores usados en el autodespliegue de antígenos	5
2.1 Autotransportador AIDA-I	5
2.2 Autotransportador Ag43	8
2.3 Autotransportador BrkA	10
2.4 Otros autotransportadores MisL y ShdA	12
3. Autodespliegue de antígenos y desarrollo de vacunas vivas	15
4. Perspectivas del uso de autotransportadores contra SARS-CoV-2.	20
5. Conclusiones	24
6. Bibliografía	25

Lista de tablas

1. Función y tamaño de proteínas pasajeras de autotransportadores	38
2. Antígenos expresados en la superficie celular usando autotransportador	39

Lista de figuras

1. Despliegue de proteínas heterólogas en la superficie celular.	40
2. Organización modular de los autotransportadores.	41
3. Mecanismo de secreción de los autotransportadores.	42
4. Organización modular del autotransportador AIDA-I de <i>E. coli</i> .	43
5. Estructura de cristalografía de rayos x del dominio β de AIDA-I.	44
6. Representación esquemática de la proteína S de SARS-CoV-2.	45

Resumen

“Autodespliegue de antígenos en la superficie celular basado en Autotransportadores”

La expresión de proteínas heterólogas en la superficie de células bacterianas mediante tecnología de ADN recombinante se ha convertido en una estrategia cada vez más utilizada en diversas aplicaciones biotecnológicas. Entre los sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas, la vía de secreción utilizando auto-transportadores tiene potencial para la exhibición en la superficie celular de enzimas, epítomos y otras proteínas debido a su simplicidad y versatilidad. Los autotransportadores se sintetizan como proteínas multi-dominio compuestas por un péptido señal, un dominio pasajero que será mostrado en la superficie y una unidad de translocación C-terminal anclada a la membrana. Los autotransportadores se han utilizado para colocar un antígeno en la superficie bacteriana, donde el pasajero natural del auto-transportador es entonces sustituido por proteínas heterólogas, dando lugar al autodespliegue de antígenos para el desarrollo de diferentes vacunas vivas recombinantes. De esta manera se puede mejorar la interacción del antígeno con el sistema inmunitario lo que da como resultado respuestas inmunitarias que protegen con buena eficiencia. Esta revisión consiste en una recopilación de los principales auto-transportadores usados para el desarrollo de diferentes vacunas vivas.

PALABRAS CLAVES: Proteínas heterólogas, vacunas vivas, vía de secreción V.

Abstract

“Autodisplay of antigens on the cellular surface based on Autotransporters”

The expression of heterologous proteins on the bacterial surface using recombinant DNA technology has become an increasingly frequent strategy used in biotechnological applications. Among the secretion systems of Gram-negative bacteria, the autotransporter pathway allows the efficient secretion of enzymes, epitopes, and other proteins due to its versatility and simplicity. Autotransporters are synthesized as multi-domain proteins composed of a N-terminal signal peptide, a passenger domain that will be displayed on the surface, and C-terminal β -domain integrated into the outer membrane. Autotransporters have been used to deliver antigens to the bacterial surface, where the natural passenger of the autotransporter is then replaced by heterologous proteins, giving rise to the autodisplay antigen for the development of different live recombinant vaccines and being able to enhance the interaction of the antigen with the immune system resulting in immune responses that protect with good efficiency. In this review, the main autotransporters used for the development of different live vaccines are described.

KEY WORDS: Heterologous proteins, live vaccines, type V secretion system.

1. INTRODUCCIÓN

El despliegue de proteínas en la superficie celular (DPSC) es una técnica de expresión de proteínas de interés en la superficie de un microorganismo a través de una fusión traduccional con una proteína de anclaje residente en la pared o superficie celular y la proteína presentadora/pasajera de interés (Figura 1) (Samuelson y cols., 2002). Este tipo de sistemas de expresión tienen como objetivo funcionalizar la superficie celular del huésped, con lo que se logra dotarlo de nuevas funciones o proveerlo de nuevas características de aplicación biotecnológica (Wei y cols., 2018). Por ello, se sugieren diversas aplicaciones como la producción de anticuerpos, la obtención de vacunas, bioconversiones catalíticas y bioabsorción (Lee y cols., 2003; Löfblom, 2011).

La técnica del sistema de despliegue en la superficie celular fue desarrollada primero en el bacteriófago filamentoso F1 (Smith, 1985). Posteriormente, la técnica fue empleada en otros fagos, sin embargo, las proteínas desplegadas en la superficie de los fagos están limitadas al tamaño del huésped (Li, 2000). Para resolver esta problemática se inició con la extrapolación de estas técnicas a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Isticato y cols., 2001 y Chen y cols., 2009).

Una amplia gama de estructuras de superficie y sistemas de secreción pueden usarse para el despliegue de proteínas en la superficie celular. Uno de ellos, la vía de secreción de autotransportadores, que destaca por su simplicidad y versatilidad para ser utilizado como acarreador de enzimas, epítomos y otro tipo de

proteínas. Los autotransportadores son proteínas de membrana externa o secretadas que poseen características estructurales únicas que facilitan su transporte independiente a través del sistema de membranas y el despliegue hacia la superficie bacteriana. Los autotransportadores pertenecen al sistema de secreción tipo V de bacterias Gram-negativas y se asocian con funciones que contribuyen a la virulencia como la adhesión, la formación de biopelículas, la agregación, la invasión y la toxicidad (Henderson y cols., 2004; Benz, 2011).

El primer autotransportador descubierto fue el de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner y cols., 1987). Desde entonces se han identificado muchos autotransportadores adicionales y ahora se conoce que la familia de autotransportadores contiene más de 700 miembros, lo que la convierte en la familia más grande de proteínas de secreción en bacterias Gram-negativas (Pallen y cols., 2003).

Los autotransportadores se sintetizan como proteína multi-dominio y la organización estructural se basa en tres segmentos: 1) un péptido señal N-terminal, 2) una proteína pasajera activa para su presentación o liberación extracelular y 3) una unidad de translocación C-terminal (autotransportador) que consta de un barril β y un conector que une al transportador con la proteína pasajera activa (Figura 2) (Henderson y cols., 1998).

Las proteínas pasajeras naturales bacterianas de los autotransportadores cumplen diversas funciones, comúnmente relacionadas con la patogenicidad. Estas funciones incluyen la adhesión celular, proteólisis, toxinas y muchos más.

Las proteínas pasajeras comúnmente son de tamaños grandes, frecuentemente con pesos moleculares de más de 100 kDa (Benz y cols., 2011) (Tabla 1). Esto hace que los autotransportadores sean candidatos interesantes para la expresión de proteínas recombinantes en la superficie ya que muchos de los otros sistemas de expresión son muy restrictivos con respecto al tamaño de la proteína expresada en la superficie.

El mecanismo de secreción de los autotransportadores inicia con la síntesis del autotransportador como una pre-proteína en el citoplasma, el péptido señal N-terminal (PS) permite la translocación a través de la membrana interna (MI) en una forma co- o postraducional utilizando el sistema dependiente de Sec (secreción tipo V). El autotransportador desplegado se transloca al periplasma y el péptido señal es escindido por una peptidasa anclada a la membrana. El barril β se inserta en la membrana externa (ME) y el pasajero es trasladado a través del poro formado por el barril β y se pliega en la superficie celular. Dependiendo del autotransportador utilizado, el pasajero puede ser escindido autoproteolíticamente y liberado al medio (Figura 3) (Nicolay y cols., 2015).

El potencial de secreción de proteínas recombinantes utilizando autotransportadores se dio poco después del descubrimiento del primer autotransportador. El despliegue en la superficie de la toxina B del cólera fue reportada por Klauser y cols., (1990) solo tres años después del descubrimiento de la proteasa IgA1 de *N. gonorrhoeae*. Desde entonces se han realizado diversas investigaciones dirigidas hacia el uso de autotransportadores para la expresión superficial de una variedad de antígenos heterólogos para el desarrollo de

diferentes vacunas vivas. Una vacuna viva consiste en un microorganismo debilitado (o atenuado) que se puede replicar por sí mismo en el huésped y actúa como un inmunógeno sin causar la enfermedad. Las vacunas vivas ofrecen varias ventajas distintas sobre las vacunas convencionales inactivadas y de subunidades. Al replicarse en el huésped, imitan con mayor precisión la infección natural, proporcionan inmunidad de larga duración y estimulan una respuesta inmunitaria más “completa” que incluye inmunidad humoral y celular. La inmunidad humoral actúa contra patógenos extracelulares a través de moléculas que circulan en la sangre y en secreciones de las mucosas (anticuerpos) y la inmunidad celular se especializa en luchar contra patógenos intracelulares (células T citotóxicas) (Saliou P, 1995; Francis MJ, 2018). Además, el uso de bacterias como vehículos de administración presentan una serie de ventajas adicionales como su facilidad de producción, menor costo de producción, facilidad de transferir la tecnología a países poco desarrollados, un aumento de la vida media y la estabilidad de las vacunas, facilidad de administración y un bajo costo de distribución (Annick y cols., 2000).

En el presente trabajo se ha realizado una recopilación de autotransportadores utilizados para la expresión de antígenos heterólogos para el desarrollo de vacunas vivas.

2. Autotransportadores usados en el autodespliegue de antígenos

2.1 Autotransportador AIDA-I

Uno de los sistemas de autotransporte de uso común es el sistema AIDA-I (adhesina involucrada en la adherencia difusa) de *Escherichia coli* (Tabla 2). AIDA-I es una proteína localizada en la membrana de las cepas de *E. coli* con fenotipo de adherencia difusa y su función es permitir que cepas enteropatógenas se adhieran a las células epiteliales en los intestinos (Benz y cols., 1992). El autotransportador AIDA-I se sintetiza a partir del gen *aidA* como una pre-proteína (preAIDA-I), preAIDA-I consiste de diferentes dominios funcionales: un péptido señal N-terminal para el transporte mediante la vía Sec a través de la membrana interna, un dominio pasajero (adhesina AIDA-I) que confiere la capacidad de adhesión en el espacio extracelular y un dominio AIDAc conformado por los siguientes subdominios: un dominio de unión (une el dominio pasajero con el dominio $\beta 2$) y un dominio $\beta 2$ (translocón AIDA-I), que forma un barril β en la membrana externa (Henderson y cols., 2004; Jose, 2006; Leyton y cols., 2012). PreAIDA-I es una proteína de 132 kDA que comprende 1286 aminoácidos (Benz y cols., 1992) (Figura 4a). Después de la translocación de preAIDA-I, el péptido señal (49 aminoácidos) se escinde y se libera proAIDA-I en el periplasma. El dominio β (439 aminoácidos) (Figura 5) se integra en la membrana externa y el dominio pasajero (796 aminoácidos) se transloca hacia la superficie celular externa. Por último el pasajero se escinde de forma autoproteolítica entre los aminoácidos S846-A847 del dominio de unión (Figura 4b). Después de la escisión, la adhesina AIDA-I permanece asociada de forma no covalente con la superficie bacteriana (Benz y cols., 1992, Suhr y cols., 1996).

El desarrollo de sistemas de autodespliegue utilizando AIDA-I, consiste en diseñar vectores con el gen que codifica para los dominios del autotransportador AIDA-I. Se determinó que la porción mínima requerida del dominio de unión de AIDA-I para alcanzar la superficie celular era de 52 aminoácidos (Maurer y cols., 1997). Esta porción mínima del dominio de unión se utilizó para la presentación superficial de péptidos cortos y de bibliotecas de péptidos. Sin embargo, para el autotransporte de proteínas más grandes como enzimas, se utiliza el tamaño del dominio de unión nativo (160 aminoácidos) de AIDA-I, ya que limitar la flexibilidad podría restringir el plegamiento y en consecuencia, la función de la proteína pasajera. Se han insertado sitios de reconocimiento de proteasas en el dominio de unión, para permitir la liberación específica de la proteína pasajera en el medio. También se han insertado epítomos específicos para permitir la detección mediante anticuerpos monoclonales (Jose y cols., 2001; Schultheiss y cols., 2002 y Jose y cols., 2004).

El sistema de autodespliegue es muy flexible para la adaptación de aplicaciones biotecnológicas como: biocatálisis de células enteras, biorremediación y desarrollo de vacunas vivas (Jose y cols., 2004; Nhan y cols., 2011; Detzel y cols., 2012). Esta flexibilidad es proporcionada por diferentes modificaciones del dominio de unión de AIDA-I, el uso de diferentes péptidos señal bajo el control de promotores inducibles o constitutivos. Por ejemplo, Maurer y cols, (1997), diseñaron un plásmido de mediano número de copias, denominado pJM7, el cual contiene una región péptido señal proveniente de la subunidad β de la toxina del cólera (CTB) y un promotor constitutivo artificial (PTK) (Maurer y cols.,

1997). Sobre esta base se han realizado modificaciones como agregar sitios de corte para proteasas por ejemplo tripsina, quimotripsina o para OmpT, lo que permite tener un sistema donde se puede mantener la proteína de interés anclada a la membrana de la bacteria o dar tratamiento con proteasas para liberarlas al medio de cultivo. Un ejemplo de este sistema es el trabajo realizado por Jose y cols. (2001) donde expresaron la adrenodoxina bovina utilizando el sistema AIDA y agregando un sitio de corte para tripsina en el fragmento del dominio de unión.

Gutiérrez-García y cols., (2020) expresaron una α -amilasa de *Bacillus megaterium* en la superficie celular de cepas de *Escherichia coli* utilizando el sistema de autodespliegue AIDA-I para la bioconversión de almidón en hidrógeno, etanol y ácido succínico. Para lo cual, diseñaron el vector pAIDA-amyA, el cual contiene: el péptido señal de la toxina *Vibrio cholerae*, el gen *amyA* como pasajero (se añadieron sitios de restricción para poder intercambiar la proteína pasajera cuando sea necesario), el péptido conector y β -barril de AIDA-I y el promotor gapAP1 del gen constitutivo *gapA* de *E. coli* como regulador transcripcional del gen *amyA-AIDA* debido a que funciona en condiciones aerobias y anaerobias. Esto permitirá utilizarlo para procesos de sacarificación y fermentación simultánea. Posteriormente, Balderas y cols., (2021) utilizando el vector pAIDA, expresaron en la superficie de *E. coli* la enzima endo-1-4- β -xilanasasa (XynA) proveniente de *Clostridium cellulovorans* para llevar a cabo biocatálisis de célula completa. Los resultados que obtuvieron indican que el vector pAIDA-xynA es funcional para expresar enzimas xilanolíticas y realizar biocatálisis de célula completa para la hidrólisis de material hemicelulósico.

Para el diseño de sistemas de autodespliegue con AIDA-I comúnmente se utiliza el dominio de unión y el barril β de AIDA-I en combinación con el péptido señal de la toxina *Vibrio cholerae*, su uso exitoso para el autodespliegue en la superficie celular de proteínas pasajeras heterólogas que normalmente se localizan en el citoplasma ha confirmado su idoneidad. También se ha utilizado el péptido señal del autotransportador AIDA-I y el péptido señal PelB (pectato liasa B) de *Erwinia carotovora* de manera eficiente (Casali y cols., 2002; Konieczny y cols., 2000).

2.2 Autotransportador Ag43

El antígeno 43 (Ag43) es una proteína de superficie de *E. coli* K12 de alrededor de 50,000 copias por célula y que se distribuyen uniformemente en toda su superficie (Owen., 1992). La proteína Ag43 es codificada por el gen *agn43* (o *flu*) (Diderichsen, 1980), es miembro de la familia de autotransportadores y la proteína contiene toda la información requerida para el transporte a la membrana externa y la secreción a través de la envoltura celular (Henderson y cols., 1998).

La expresión de *agn43* es variable debido a la acción concertada de la metilasa Dam (regulación positiva) y el regulador global OxyR (regulación negativa) (Haagmans y cols., 2000). Ag43 se sintetiza como una pre-proteína de 1,039 aminoácidos, que se procesa en una forma madura que consta de dos subunidades, α (dominio pasajero) y β (dominio translocón), de 499 y 488 residuos de aminoácidos, respectivamente (Hasman y cols., 1999; Henderson y cols.,

1999). El dominio β se integra en la membrana externa, donde forma una estructura de barril en forma de poro de forma análoga a su homólogo AIDA. El dominio pasajero alcanza el exterior de la célula asistido por el dominio β y permanece unida a la superficie celular, presumiblemente a través de interacciones no covalentes con el dominio β ; sin embargo, puede fácilmente desprenderse por calentamiento a 60°C (Maurer y cols., 1999).

Se ha encontrado que Ag43 induce propiedades superficiales características en las células huésped, como la autoagregación y colonias con morfología encrespada (Hasman y cols., 2000). Además, se ha demostrado que Ag43 está involucrado en la formación de biopelículas bacterianas (Kjaergaard y cols., 2000). Se han reportado una serie de ventajas relacionadas con su utilización como el plegamiento estable, localización y procesamiento cuando se expresan proteínas quiméricas; capacidad de translocar proteínas plegadas, incluso con puentes disulfuro y cadenas más largas que su dominio pasajero nativo; capacidad de exhibir dominios protéicos funcionales completos; y expresión con alto número de copias mantenida para quimeras (Wells y cols., 2007; Muñoz y cols., 2014; Ramesh y cols., 2012; Huang y cols., 2014). Aunque es originaria de *E. coli*, se puede expresar en una forma completamente funcional en un amplio espectro de bacterias Gram-negativas, incluyendo *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens* y muchos otras (Kjaergaard y cols., 2002). Estos atributos hacen de Ag43 una proteína altamente versátil y potencialmente un candidato ideal para la expresión de secuencias heterólogas en la superficie de una amplia gama de organismos. El

antígeno 43 ha sido ampliamente utilizado como sistema de secreción para proteínas recombinantes mediante la inserción de secuencias heterólogas que reemplazan total o parcialmente a los codones del dominio pasajero, conservando los nativos del péptido señal y el dominio translocador (Kjaergaard y cols., 2002).

2.3 Autotransportador BrkA

BrkA (proteína A que elimina la sensibilidad sérica de *Bordetella*) es un factor importante de virulencia en *Bordetella pertussis* que confiere resistencia sérica y media la adherencia. Fernández y cols. (1994) demostraron que las mutantes de BrkA de *B. pertussis* tienen graves defectos en su capacidad para colonizar ratones y causar una infección letal en el modelo de ratón lactante. Estudios posteriores demostraron que la proteína BrkA recombinante es un antígeno candidato prometedor para mejorar las vacunas Pa (tosferina acelular) existentes en humanos (Marr y cols., 2008). BrkA es miembro de la familia de proteínas de autotransportadores, se sintetiza como una proteína de 103 kDa que se procesa en un péptido de señal de 42 aminoácidos de longitud, un dominio pasajero de 70 kDa y un dominio β de 30 kDa (Shannon y cols., 1999; Oliver y cols., 2003). La autoescisión de BrkA se lleva a cabo entre el aminoácido Asn731 y Ala732 mediante una inusual díada catalítica formada por la ciclación de la asparagina. Después de la translocación a través de la membrana externa, el dominio pasajero permanece estrechamente asociado con la superficie bacteriana (Hamstra y cols., 1995; Oliver y cols., 2003). El dominio β de BrkA tiene una identidad de secuencia del 55% con el dominio β de la pertactina, otro factor de virulencia altamente

inmunogénico de *B. pertussis*. La estructura en forma de horquilla y la cavidad hidrófoba en el lado periplásmico del dominio β son cruciales para la translocación del dominio pasajero de BrkA (Zhai y cols., 2011).

Fang y cols. (2015) diseñaron un sistema de autodespliegue denominado *BrkAutoDisplay*, basado en la estructura del autotransporte BrkA. En el sistema *BrkAutoDisplay*, se han expresado eficientemente varias proteínas exógenas en la superficie de *E. coli*, incluyendo la proteína verde fluorescente (GFP), varias enzimas y un anticuerpo. La expresión de las enzimas CotA, EstPc y PalA a través del sistema *BrkAutoDisplay* mostró actividad significativa de lacasa, esterasa y lipolítica (0.12, 6.88 y 0.32 mUs (cantidad de enzima requerida para convertir 1.0 μ mol de sustrato por minuto) por 5.2×10^8 células bacterianas vivas) respectivamente, que tendrán amplias aplicaciones en la industria y biorremediación del medio ambiente.

Dado que los anticuerpos recombinantes se utilizan cada vez más en muchas aplicaciones, como el diagnóstico clínico y la terapéutica, se utilizó el sistema *BrkAutoDisplay* para expresar el anticuerpo ATscFv (el cual reconoce el antígeno del factor de necrosis tumoral alfa), que anteriormente, Xiao y cols. (2013) expresaron en el sistema Ag43 β -ATscFv (basado en el autotransportador Ag43). El ensayo de accesibilidad a la tripsina reveló que ATscFv puede mostrarse significativamente en la superficie bacteriana. Además, los resultados de los ensayos de cuantificación de la eficiencia de presentación en la superficie y la cuantificación de la capacidad de unión al antígeno mediante citometría de flujo, sugirieron que el sistema *BrkAutoDisplay* tuvo un mejor rendimiento que el sistema

basado en Ag43 β -ATscFv. Lo que sugiere una aplicación potencial de *BrkAutoDisplay* para el futuro desarrollo de anticuerpos.

2.4 Otros autotransportadores MisL y ShdA

En *Salmonella* spp. se han descrito tres adhesinas de la familia de los autotransportadores. Las adhesinas ShdA y MisL son autotransportadores monoméricos mientras que la adhesina SadA es un autotransportador trimérico. Para los dos autotransportadores monoméricos de *Salmonella*, su función de adhesina ha sido probada experimentalmente. Las islas de patogenicidad son elementos de DNA cromosomal ausentes en bacterias no patógenas. Estas islas a menudo tienen una proporción de G+C diferente del encontrado en el cromosoma del organismo hospedero y usualmente están flanqueadas por secuencias de inserción, genes de bacteriófagos o transposones (Blanc y cols., 1999). ShdA es codificado por un gen dentro de la isla CS54. La búsqueda en la base de datos reveló una identidad de secuencia del 92% del dominio pasajero con otros autotransportadores de adhesinas como AIDA de *E. coli* (kingsley y cols., 2000).

Se ha identificado el gen que codifica para la proteína MisL (proteína de membrana de inserción y secreción) en *Salmonella typhimurium*, se encuentra dentro de una isla de patogenicidad SPI-3 y muestra propiedades muy similares a ShdA (Blanc y cols., 1999). La isla SPI-3 contiene al menos 10 genes, para 2 de los cuales sus funciones ya han sido descritas (supervivencia intramacrófago, la virulencia en ratones y el crecimiento en medios con bajo contenido de Mg²⁺) y los

demás muestran similitud a factores de virulencia en otras especies bacterianas (Blanc y cols., 1999).

El hecho de que la proteína MisL se haya encontrado en una isla de patogenicidad sugiere que se trata de un factor de virulencia del microorganismo, pero aún no se conoce bien su función.

La homología entre MisL, ShdA y la proteína AIDA de *E. coli* enteropatógena está limitada al extremo carboxilo terminal, lo que sugiere una función similar en los autotransportadores, más que similitudes funcionales dadas por el dominio pasajero las cuales han sido adjudicadas a la adherencia difusa en células HeLa y a la propagación célula-célula, respectivamente.

Ruiz y cols. (2002) diseñaron un sistema de autodespliegue basado en MisL denominado pnirBLTB-NANP-MisL, el cual contiene: un promotor inducible *nirB*, el péptido señal de la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli*, un dominio pasajero de cuatro repeticiones del tetrapéptido NANP inmunodominante de células B de la proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* y el dominio β del autotransportador MisL (Ruiz y cols., 2002). A este diseño se le han realizado modificaciones como incluir la secuencia de escisión de reconocimiento de la proteasa de superficie OmpT de *E. coli* y la sustitución del dominio pasajero por otras proteínas heterólogas. Bajo este sistema se han expresado con éxito epítomos de proteínas virales y parasitarias en cepas vacunales de *Salmonella* y *E. coli* XL-10Gold, que han inducido respuestas inmunitarias específicas de epítomo con propiedades protectoras (Ruiz y cols., 2003; Luria y cols., 2007).

Los plásmidos utilizados para expresar proteínas heterólogas basados en el autotransportador ShdA, se derivaron del plásmido pnirBLTB que contiene el promotor nirB (inducible en condiciones anaeróbicas) y la secuencia que codifica el péptido señal LTB para la translocación de la proteína de fusión al espacio periplásmico (Ruiz-Pérez y cols. 2002 y Ruiz-Olvera y cols. 2003). Pompa y cols. (2011) agregaron al plásmido pnirBLTB el dominio pasajero de ShdA truncado ($\Delta\alpha$), el dominio β completo de ShdA y una etiqueta molecular (FLAG) con el fin de rastrear la proteína de fusión, al plásmido resultante lo denominaron pnirBLTB- $\Delta\alpha$ - β ShdA. Posteriormente, utilizaron el plásmido pnirBLTB- $\Delta\alpha$ - β ShdA para expresar el epítipo Ag30 de la glicoproteína de 43 kDa de *Trichinella spiralis* en *S. enterica*. Los resultados de los ensayos de citometría de flujo y el análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFA) confirmaron que el plásmido pnirBLTB- $\Delta\alpha$ - β ShdA es funcional para expresar el antígeno pasajero en la superficie de *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261. Además, se demostró que los sueros producidos contra Ag30 recombinante reconocieron la proteína nativa en la superficie y los orgánulos internos de *T. spiralis*, lo que indica que el epítipo Ag30 en la proteína de fusión, mantuvo sus propiedades conformacionales y antigénicas.

3. Autodespliegue de antígenos y desarrollo de vacunas vivas

La vacunación es el proceso que permite generar una resistencia a una enfermedad infecciosa y consiste en imitar una infección por medio del agente patógeno, o fragmentos de él, contra el cual se desea proteger. Las vacunas pueden ser de diversos tipos: virus o bacterias inactivadas, polisacáridos, vacuna viva, proteínas, material genético (ADN o mRNA), virus recombinantes, pseudopartículas virales, etc. Una vacuna viva consiste en un microorganismo no patógeno o atenuado que se puede replicar por sí mismo en el individuo o que puede infectar células y actúa como un inmunógeno sin causar la enfermedad natural (García., 1999). Las vacunas vivas ofrecen ventajas al replicarse en el huésped, imitan con mayor precisión la infección natural, proporcionan inmunidad de larga duración y estimulan una respuesta inmunitaria más “completa” (estimulación de las respuestas sistémica y mucosal), que incluye anticuerpos humorales, anticuerpos secretores y células T citotóxicas (Francis MJ, 2018). Además, son menos costosas de producir, tienen un aumento de la vida media y la estabilidad de la vacuna, facilidad de administración y un bajo costo de distribución en comparación con las vacunas tradicionales (Dertzbaugh, 1998). El uso de epítopos presentados en la superficie presenta dos características principales. Primero, los epítopos o antígenos expuestos son más accesibles para el sistema inmunológico debido a que tienen la capacidad de interactuar directamente con el medio ambiente (mucosas). En segundo lugar, los componentes de la superficie de las células bacterianas pueden servir como

adyuvantes provocando así una respuesta inmune fuerte (Georgiou y cols., 1993; Georgiou y cols., 1997).

El uso de autotransportadores se ha aplicado para la presentación en la superficie celular de una multitud de diferentes vacunas candidatas (Tabla 2). En donde el pasajero natural del autotransportador se sustituye por proteínas heterólogas, dando lugar al despliegue de antígenos para el desarrollo de diferentes vacunas vivas. A continuación, se mencionan algunos trabajos desarrollados en el despliegue de epítomos y antígenos en la superficie celular basado en autotransportadores para el desarrollo de diferentes vacunas.

El epítomo Nef del virus de la inmunodeficiencia humana y la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) fueron los pasajeros iniciales expresados en el sistema de autodespliegue basado en AIDA-I en la cepa *E. coli* UT5600. La expresión de las proteínas fue monitoreada por SDS-PAGE de lisados de células completas, ambas proteínas se visualizaron como bandas de proteínas prominentes, que migraron de acuerdo con sus masas moleculares de 58.9 y 49.8 kDa, respectivamente, lo que representa hasta un 5% de la proteína celular total en la membrana externa. La exposición de las proteínas Nef y CTB en la superficie se determinó mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas, microscopia de inmunofluorescencia y microscopia electrónica de inmuno-oro utilizando antisueros específicos para los pasajeros. Desde entonces se han realizado investigaciones dirigidas hacia el uso de autotransportadores para la expresión superficial de una variedad de antígenos heterólogos para la construcción de vacunas bacterianas recombinantes vivas (Maurer y cols., 1997).

Los epítomos de la proteína de choque térmico 60 (HSP60) de *Yersinia enterocolitica* se expresaron mediante la fusión con el dominio del autotransportador AIDA-I en la superficie de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. Las células T aisladas de ratones inmunizados con células de *Salmonella* que muestran HSP60 exhibieron una proliferación específica de antígeno que se acompañó de secreción de interferón gamma de alto nivel. Esto indica una estimulación inmunológica eficaz por las cepas de vacuna administradas por vía oral a ratones C57BL/6 y demuestra la aplicabilidad del autodespliegue de determinantes antigénicos para el desarrollo de vacunas vivas de cepas atenuadas de *Salmonella* (Kramer y cols., 2003). La presentación de superficie mediada por AIDA-I también se ha utilizado para expresar un fragmento de la subunidad A de la ureasa de *Helicobacter pylori* en una cepa vacunal de *Salmonella*, para la posterior inmunización oral de ratones hembra (BALB/c) libres de patógenos específicos. Esto dio como resultado una reducción significativa en los niveles de *H. pylori* después de la infección (Rizos y cols., 2003).

Utilizando el autotransportador Ag43, la parte N-terminal de una adhesina bacteriana, se desplegó el antígeno FimH en la superficie celular de una cepa atenuada de *S. entérica* serotipo *Typhimurium* (Kjaergaard y cols., 2002). Aparte del uso de la cepa vacunal atenuada de *Salmonella*, también se utilizó una cepa atenuada de *Bordetella pertussis*, el agente causal de tosferina. Por medio del autotransportador BrkA, se expuso en la superficie celular el péptido neutralizante SP70 del enterovirus 71 (EV71) en la cepa atenuada de *Bordetella* BPZE1, a la cepa productora de BrkA-SP70 se le denominó BPSQ5. La administración nasal de la cepa recombinante viva (BPSQ5) desencadenó una respuesta de

anticuerpos anti-SP70 sistémica fuerte y sostenida en ratones. Además, el análisis de subtipos de IgG anti-SP70 de los sueros de los ratones inmunizados con la cepa BPSQ5, mostró que eran predominantemente anticuerpos IgG2a/IgG2b, indicativo de una respuesta inmune orientada a Th1. Los sueros de ratones inmunizados con la cepa BPSQ5, mostraron actividades neutralizantes significativas contra el virus EV71 *in vitro* y confieren protección completa a las células con diluciones de suero que varían de 1:2 a 1:32, lo que demuestra la presencia de anticuerpos anti-SP70 en los antisueros (Ho y cols., 2008). El uso de una cepa atenuada de *B. pertussis* en combinación con la presentación de epítomos de Enterovirus 71 en la superficie celular proporcionó un enfoque innovador para vacunar simultáneamente contra dos enfermedades.

El autotransportador MisL de *Salmonella* se empleó para expresar el epítomo NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) inmunodominante de células B de la proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* en la superficie de *S. entérica* serovar *Typhimurium* así como en *S. entérica* serovar *Typhi*. El epítomo se expresó con éxito mediante la fusión con MisL recombinante en ambas cepas vacunales de *Salmonella* e indujeron respuestas inmunes significativas a partir de la inmunización de ratones con cualquiera de los vectores vivos (Ruiz y cols., 2002). En una investigación de seguimiento, se construyeron dos pasajeros que consistían en 8 o 53 repeticiones del tetrapéptido NANP, que exhibieron eficientemente las proteínas pasajeras en la superficie bacteriana y su liberación en *Salmonella* y *E. coli*, ya que los plásmidos diseñados contenían la secuencia de escisión de la proteasa de superficie OmpT de *E. coli* (Ruiz y cols., 2003).

El desarrollo de vacunas vivas utilizando el sistema de despliegue de antígenos en la superficie celular basadas en autotransportadores también ha encontrado su aplicación en la acuicultura. El antígeno Et18 inmunoprotector contra *Edwardsiella tarda*, un patógeno de peces, fue expresado en la superficie celular de *E. coli* usando el autotransportador Pfal de *Pseudomonas fluorescens*. La vacunación del pez lenguado japonés usando esta vacuna viva mejoró la inmunoprotección en comparación con la vacunación con el antígeno purificado (Hu y cols., 2009). Tomados en conjunto, estos resultados indican que el autodespliegue aumenta la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes expresados en microorganismos para el desarrollo de vacunas vivas.

4. Perspectivas del uso de autotransportadores contra SARS-CoV-2.

El brote de COVID-19 causado por el virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) se ha convertido en una pandemia. El genoma viral codifica 4 proteínas estructurales principales: espiga o *spike* (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (Zhou y cols., 2020). La proteína S de SARS-CoV-2 es una proteína crucial para la unión del receptor, la fusión de membranas a través de cambios conformacionales, la internalización del virus y tropismo del tejido del hospedero. La proteína S de SARS-CoV-2 está compuesta por 1260 aminoácidos (residuos 14 al 1273), que se dividen en dos subunidades S1 y S2. La subunidad de superficie S1 está compuesta por 672 aminoácidos (residuos 14 al 685) y está organizada en cuatro dominios: un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión al receptor (RBD) y dos subdominios (SD1 y SD2). La subunidad transmembranal S2 participa en la fusión con la membrana celular (Walls y cols., 2020) y está compuesta por 588 aminoácidos (residuos 686 al 1273), la cual incluye un péptido de fusión (FP), dos repeticiones en tándem de una secuencia de siete aminoácidos, también llamadas regiones héptadas repetidas (HR1 y HR2) y un dominio transmembranal (TM) y una cola citoplasmática (CT), organizado como FP-HR1-HR2-TM-CT (Figura 6) (Wrapp y cols., 2020; Jun Lan y cols., 2020).

Se ha descifrado la estructura de varios complejos del receptor ACE2 en complejo con el dominio RBD y estos datos han revelado interacciones detalladas entre ambos (Lan J y cols., 2020). Estructuralmente, RBD tiene una hoja β antiparalela trenzada por cinco hebras (β 1, β 2, β 3, β 4 y β 7) con hélices y bucles de conexión que forman el núcleo. Entre las hebras β 4 y β 7 del núcleo, hay un

bucle extendido (residuos 438-506) que contiene las hebras $\beta 5$, $\beta 6$ y las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Este bucle extendido es el motivo de unión al receptor (RBM), que contiene la mayoría de los residuos de contacto del SARS-CoV-2 que se unen a ACE2. RBM contiene una superficie cóncava donde se acomoda la hélice N-terminal ($\alpha 1$) de ACE2 (Jun Lan y cols., 2020). La proteína S es uno de los principales componentes antigénicos responsables de inducir respuestas inmunitarias, tanto de anticuerpos neutralizantes como inmunidad celular contra la infección por el coronavirus (Amanat y cols., 2020). Por lo tanto, la proteína S se ha seleccionado como el principal objetivo para el desarrollo de vacunas y de métodos de diagnóstico contra el SARS-CoV-2.

Existen vacunas aprobadas para SARS-CoV-2 basadas en ADN, ARNm, epítomos, partículas similares a virus (VLP), proteínas y virus recombinantes (U.S. Food & Drugs, 2021). Algunas de ellas requieren instalaciones de producción dedicadas, emplean materiales costosos y exigen cadenas de frío logísticamente desafiantes especialmente para países pocos desarrollados. Por otra parte, la OMS a la fecha del 04 de enero 2022, ha reportado 11 variantes de preocupación de SARS-CoV-2 (Alfa, Beta, Gamma, Delta, Kappa, Epsilon, Eta, Iota, Lambda, Mu y Ómicron). Las vacunas disponibles han demostrado cierta reducción de la efectividad contra algunas variantes (Delta y Ómicron) (OMS/Infobae, 2022), y mientras el virus SARS-CoV-2 siga evolucionando, es posible que haya que actualizar la composición de las vacunas actuales para asegurar que sigan ofreciendo los niveles de protección recomendadas por la OMS contra la infección y la enfermedad por variantes preocupantes futuras.

A medida que avanza la pandemia por el virus SARS-CoV-2, es necesario explorar nuevas plataformas de vacunas fácilmente escalables y económicas con un almacenamiento y transporte más sencillos.

La tecnología del ADN recombinante ha introducido la posibilidad de producir vacunas vivas utilizando cepas de bacterias modificadas genéticamente como vectores de ADN heterólogo para la producción de antígenos. El uso de bacterias como vehículos de administración presenta una serie de ventajas como: son menos costosas de producir, tienen un aumento de la vida media y la estabilidad de la vacuna, facilidad de administración y un bajo coste de distribución en comparación con las vacunas convencionales (Dertzbaugh, 1998). Como se ha mencionado anteriormente los autotransportadores se han utilizado para colocar el antígeno en la superficie bacteriana, para mejorar la interacción del antígeno con el sistema inmunitario dando como resultado respuestas inmunitarias que protegen con buena eficiencia. La expresión de la proteína S de SARS-CoV-2 basada en autotransportadores podría ser una plataforma para desarrollar una vacuna para combatir la pandemia por SARS-CoV-2.

En un estudio por Maeda y cols. (2021) demostraron la utilidad de esta plataforma al expresar el péptido de fusión (FP) de SARS-CoV-2 en la superficie de *Escherichia coli* utilizando el autotransportador AIDA-I. La vacuna indujo una potente respuesta inmune secundaria o anamnésica (producción de anticuerpos IgG contra el antígeno tras una reexposición), una respuesta de interferón- γ y proporcionó una protección significativa contra la enfermedad clínica. Sin embargo, la vacuna candidata del estudio no provocó fuertes respuestas

inmunitarias humorales neutralizantes (Maeda y cols., 2021) por lo que se requiere de investigación adicional para mejorar dicha respuesta.

De acuerdo con las características mencionadas anteriormente de la proteína S que es uno de los principales componentes antigénicos responsables de inducir respuestas inmunitarias, tanto de anticuerpos neutralizantes como inmunidad celular contra la infección por coronavirus, probablemente la expresión de la proteína S en esta plataforma podría producir una mejor respuesta inmune al ser más inmunogénica.

Dado que el almacenamiento y el transporte a muy baja temperatura pueden presentar un desafío para los países más pobres del mundo, las vacunas adicionales contra SARS-CoV-2 que no requieran de la cadena fría pudieran llegar a resultar útiles.

5. Conclusiones

Las características específicas de los autotransportadores como el tener su propia maquinaria para el despliegue de sus proteínas pasajeras, el que sus proteínas pasajeras sean generalmente grandes (frecuentemente con pesos moleculares de >100 kDa), el que el pasajero puede quedarse anclado o escindirse autoproteolíticamente, dependiendo del autotransportador utilizado, hacen que los autotransportadores sean candidatos interesantes para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie de una amplia gama de microorganismos.

De acuerdo con los estudios aquí mencionados, la expresión de los antígenos anclados a la superficie usando autotransportadores, pueden mostrar efectos inmunológicos más pronunciados, debido a que expresan los antígenos en la superficie celular y tienen la capacidad de interactuar directamente con el medio ambiente (mucosas). Además se evita la degradación proteolítica dentro de la bacteria en comparación con la expresión antígenos citoplasmáticos.

Las vacunas de bacterias recombinantes vivas pese a sus limitaciones poseen cualidades que las hacen idóneas para una producción sencilla y económica de vacunas suficientemente efectivas y que producen una memoria inmunológica apropiada. Queda un largo camino para que se pueda demostrar la seguridad y eficacia de este tipo de vacunas, pero con la cantidad de estudios favorables que han surgido en los últimos años y sus alentadoras perspectivas de futuro, es muy posible que estas vacunas lleguen a ser comercializadas.

6. Bibliografías

1. Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T.H.O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G.A., Jurczynszak, D., Polanco, J., et al. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20037713>
2. Balderas Hernández, V. E., Salas-Montantes, C. J., Barba-De la Rosa, A. P., & De Leon-Rodriguez, A. (2021). Autodisplay of an endo-1,4- β -xylanase from *Clostridium cellulovorans* in *Escherichia coli* for xylans degradation. *Enzyme and microbial technology*, 149, 109834. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109834>
3. Benz, I., & Schmidt, M. A. (1992). Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infection and immunity*, 60(1), 13–18. <https://doi.org/10.1128/iai.60.1.13-18.1992>
4. Benz, I., & Schmidt, M. A. (2011). Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(6), 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.03.003>
5. Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., & Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*, 181(3), 998–1004. <https://doi.org/10.1128/JB.181.3.998-1004.1999>
6. Casali, N., Konieczny, M., Schmidt, M. A., & Riley, L. W. (2002). Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the

- Escherichia coli AIDA autotransporter. *Infection and immunity*, 70(12), 6846–6852. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6846-6852.2002>
7. Chatfield, S. N., Fairweather, N., Charles, I., Pickard, D., Levine, M., Hone, D., Posada, M., Strugnell, R. A., & Dougan, G. (1992). Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine*, 10(1), 53–60. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(92\)90420-o](https://doi.org/10.1016/0264-410x(92)90420-o)
 8. Chen, Y. P., Hwang, I. E., Lin, C. J., Wang, H. J., & Tseng, C. P. (2012). Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas fimi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 112(3), 455–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05232.x>
 9. Diderichsen B. (1980). flu, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 141(2), 858–867. <https://doi.org/10.1128/jb.141.2.858-867.1980>
 10. Fernandez, R. C., & Weiss, A. A. (1994). Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infection and immunity*, 62(11), 4727–4738. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4727-4738.1994>
 11. Francis, M. J. (2018). Recent advances in vaccine technologies. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 48(2), 231.
 12. Gutiérrez-García, A. K., Alvarez-Guzmán, C. L., & De Leon-Rodríguez, A. (2020). Autodisplay of alpha amylase from *Bacillus megaterium* in *E. coli* for the bioconversion of starch into hydrogen, ethanol and succinic acid. *Enzyme and microbial technology*, 134, 109477. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109477>

13. Haagmans, W., & van der Woude, M. (2000). Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Molecular microbiology*, 35(4), 877–887. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01762.x>
14. Haddad, D., Liljeqvist, S., Kumar, S., Hansson, M., Ståhl, S., Perlmann, H., Perlmann, P., & Berzins, K. (1995). Surface display compared to periplasmic expression of a malarial antigen in *Salmonella typhimurium* and its implications for immunogenicity. *FEMS immunology and medical microbiology*, 12(3-4), 175–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00190.x>
15. Hamstra, H. J., Kuipers, B., Schijf-Evers, D., Loggen, H. G., & Poolman, J. T. (1995). The purification and protective capacity of *Bordetella pertussis* outer membrane proteins. *Vaccine*, 13(8), 747–752. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)00040-t](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)00040-t)
16. Hasman, H., Chakraborty, T., & Klemm, P. (1999). Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4834–4841. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4834-4841.1999>
17. Hasman, H., Schembri, M. A., & Klemm, P. (2000). Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 182(4), 1089–1095. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1089-1095.2000>
18. Henderson, I. R., & Owen, P. (1999). The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the

- immunoglobulin A1 protease class of exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR. *Journal of bacteriology*, 181(7), 2132–2141. <https://doi.org/10.1128/JB.181.7.2132-2141.1999>
19. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., & Nataro, J. P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in microbiology*, 6(9), 370–378. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01318-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01318-3)
20. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(4), 692–744. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004>
21. Ho, S. Y., Chua, S. Q., Foo, D. G., Locht, C., Chow, V. T., Poh, C. L., & Alonso, S. (2008). Highly attenuated *Bordetella pertussis* strain BPZE1 as a potential live vehicle for delivery of heterologous vaccine candidates. *Infection and immunity*, 76(1), 111–119. <https://doi.org/10.1128/IAI.00795-07>
22. Hu, Y. H., Liu, C. S., Hou, J. H., & Sun, L. (2009). Identification, characterization, and molecular application of a virulence-associated autotransporter from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4333–4340. <https://doi.org/10.1128/AEM.00159-09>
23. Huang, F. Y., Li, L., Liu, Q., Li, Y. N., Bai, R. Z., Huang, Y. H., Zhao, H. G., Guo, J. L., Zhou, S. L., Wang, H., Lin, Y. Y., & Tan, G. H. (2014). Bacterial surface display of endoglin by antigen 43 induces antitumor effectiveness

- via bypassing immunotolerance and inhibition of angiogenesis. *International journal of cancer*, 134(8), 1981–1990. <https://doi.org/10.1002/ijc.28511>
24. Isticato, R., Cangiano, G., Tran, H. T., Ciabattini, A., Medagliani, D., Oggioni, M. R., De Felice, M., Pozzi, G., & Ricca, E. (2001). Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6294–6301. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6294-6301.2001>
25. Janssen, R., & Tommassen, J. (1994). PhoE protein as a carrier for foreign epitopes. *International reviews of immunology*, 11(2), 113–121. <https://doi.org/10.3109/08830189409061719>
26. Jose, J., & von Schwichow, S. (2004). Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 5(4), 491–499. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300774>
27. Jose, J., Bernhardt, R., & Hannemann, F. (2001). Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2(9), 695–701. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010903\)2:9<695::AID-CBIC695>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010903)2:9<695::AID-CBIC695>3.0.CO;2-S)
28. Jose, J., Jähnig, F., & Meyer, T. F. (1995). Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Molecular microbiology*, 18(2), 378–380. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18020378.x
29. Kjaergaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A., & Klemm, P. (2002). Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface

- presentation system. *Journal of bacteriology*, 184(15), 4197–4204.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4197-4204.2002>
30. Kjaergaard, K., Schembri, M. A., Ramos, C., Molin, S., & Klemm, P. (2000). Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environmental microbiology*, 2(6), 695–702. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00152.x>
31. Klauser, T., Pohlner, J., & Meyer, T. F. (1990). Extracellular transport of cholera toxin B subunit using Neisseria IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *The EMBO journal*, 9(6), 1991–1999.
32. Konieczny, M. P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I. B., & Alexander Schmidt, M. (2000). Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS immunology and medical microbiology*, 27(4), 321–332. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01446.x>
33. Konieczny, M. P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I. B., & Alexander Schmidt, M. (2000). Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS immunology and medical microbiology*, 27(4), 321–332. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01446.x>
34. Kramer, U., Rizos, K., Apfel, H., Autenrieth, I. B., & Lattemann, C. T. (2003). Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains. *Infection and*

- immunity*, 71(4), 1944–1952. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1944-1952.2003>
35. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
36. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
37. Lee, S. Y., Choi, J. H., & Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends in biotechnology*, 21(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)00006-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)00006-9)
38. Li M. (2000). Applications of display technology in protein analysis. *Nature biotechnology*, 18(12), 1251–1256. <https://doi.org/10.1038/82355>
39. Löfblom J. (2011). Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnology journal*, 6(9), 1115–1129. <https://doi.org/10.1002/biot.201100129>
40. Luria-Perez, R., Cedillo-Barron, L., Santos-Argumedo, L., Ortiz-Navarrete, V. F., Ocaña-Mondragon, A., & Gonzalez-Bonilla, C. R. (2007). A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine*, 25(27), 5071–5085. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.047>

41. Maeda, D., Tian, D., Yu, H., Dar, N., Rajasekaran, V., Meng, S., Mahsoub, H. M., Sooryanarain, H., Wang, B., Heffron, C. L., Hassebroek, A., LeRoith, T., Meng, X. J., & Zeichner, S. L. (2021). Killed whole-genome reduced-bacteria surface-expressed coronavirus fusion peptide vaccines protect against disease in a porcine model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(18), e2025622118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025622118>
42. Marr, N., Oliver, D. C., Laurent, V., Poolman, J., Denoël, P., & Fernandez, R. C. (2008). Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine*, *26*(34), 4306–4311. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.017>
43. Maurer, J., Jose, J., & Meyer, T. F. (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *179*(3), 794–804. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.794-804.1997>
44. Maurer, J., Jose, J., & Meyer, T. F. (1999). Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *Journal of bacteriology*, *181*(22), 7014–7020. <https://doi.org/10.1128/JB.181.22.7014-7020.1999>
45. Muñoz-Gutiérrez, I., Moss-Acosta, C., Trujillo-Martinez, B. *et al.* Ag43-mediated display of a thermostable β -glucosidase in *Escherichia coli* and its use for simultaneous saccharification and fermentation at high temperatures. *Microb Cell Fact* **13**, 106 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0106-3>

46. Nicolay, T., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2015). Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 41(1), 109–123. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.804032>
47. Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S., & Fernandez, R. C. (2003). A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Molecular microbiology*, 47(5), 1367–1383. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03377.x>
48. Owen P. (1992). The gram-negative outer membrane: structure, biochemistry and vaccine potential. *Biochemical Society transactions*, 20(1), 1–6. <https://doi.org/10.1042/bst0200001>
49. Pallen, M. J., Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2003). Genomic analysis of secretion systems. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.005>
50. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., & Meyer, T. F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 325(6103), 458–462. <https://doi.org/10.1038/325458a0>
51. Ramesh, B., Sendra, V. G., Cirino, P. C., & Varadarajan, N. (2012). Single-cell characterization of autotransporter-mediated *Escherichia coli* surface display of disulfide bond-containing proteins. *The Journal of biological chemistry*, 287(46), 38580–38589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.388199>
52. Rizos, K., Lattemann, C. T., Bumann, D., Meyer, T. F., & Aebischer, T. (2003). Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA

- fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and immunity*, 71(11), 6320–6328. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6320-6328.2003>
53. Ruiz-Olvera, P., Ruiz-Pérez, F., Sepulveda, N. V., Santiago-Machuca, A., Maldonado-Rodríguez, R., Garcia-Elorriaga, G., & González-Bonilla, C. (2003). Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid*, 50(1), 12–27. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(03)00047-7)
54. Ruiz-Olvera, P., Ruiz-Pérez, F., Sepulveda, N. V., Santiago-Machuca, A., Maldonado-Rodríguez, R., Garcia-Elorriaga, G., & González-Bonilla, C. (2003). Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid*, 50(1), 12–27. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(03)00047-7)
55. 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. *Infection and immunity*, 70(7), 3611–3620. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3611-3620.2002>
56. 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. *Infection and*

- immunity*, 70(7), 3611–3620. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3611-3620.2002>
57. Saliou P. (1995). Les vaccins vivants [Live vaccines]. *La Revue du praticien*, 45(12), 1492–1496.
58. Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. A., & Ståhl, S. (2002). Display of proteins on bacteria. *Journal of biotechnology*, 96(2), 129–154. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00043-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00043-3)
59. Schultheiss, E., Paar, C., Schwab, H., & Jose, J. (2002). Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 18(1-3), 89-97. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00063-2)
60. Shannon, J. L., & Fernandez, R. C. (1999). The C-terminal domain of the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *Journal of bacteriology*, 181(18), 5838–5842. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5838-5842.1999>
61. Smith G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
62. Suhr, M., Benz, I., & Schmidt, M. A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Molecular microbiology*, 22(1), 31–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02653.x>
63. Sun, F., Pang, X., Xie, T., Zhai, Y., Wang, G., & Sun, F. (2015). BrkAutoDisplay: functional display of multiple exogenous proteins on the

- surface of *Escherichia coli* by using BrkA autotransporter. *Microbial cell factories*, 14, 129. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0316-3>
64. Suzuki, T., Lett, M. C., & Sasakawa, C. (1995). Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *The Journal of biological chemistry*, 270(52), 30874–30880. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30874>
65. Walls, A.C., Park, Y.J., Tortorici, M.A., Wall, A., McGuire, A.T., y Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
66. Wei, Q., Yan, J., Chen, Y., Zhang, L., Wu, X., Shang, S., Ma, S., Xia, T., Xue, S., & Zhang, H. (2018). Cell Surface Display of MerR on *Saccharomyces cerevisiae* for Biosorption of Mercury. *Molecular biotechnology*, 60(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0039-2>
67. Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C., & Schembri, M. A. (2007). Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS microbiology letters*, 274(2), 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00833.x>
68. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K.S., Goldsmith, J.A., Hsieh, C.L., Abiona, O., Graham, B.S., y McLellan, J.S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (80-.). DOI: [10.1126/science.abb2507](https://doi.org/10.1126/science.abb2507)
69. Yang, X., Sun, S., Wang, H., & Hang, H. (2013). Comparison of autotransporter and ice nucleation protein as carrier proteins for antibody display on the cell surface of *Escherichia coli*. *Prog Biochem Biophys*, 40, 1209-19.

70. Zhai, Y., Zhang, K., Huo, Y., Zhu, Y., Zhou, Q., Lu, J., Black, I., Pang, X., Roszak, A. W., Zhang, X., Isaacs, N. W., & Sun, F. (2011). Autotransporter passenger domain secretion requires a hydrophobic cavity at the extracellular entrance of the β -domain pore. *The Biochemical journal*, 435(3), 577–587. <https://doi.org/10.1042/BJ20101548>
71. Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Tablas

Tabla 1. Función y tamaño de proteínas pasajeras de autotransportadores.

Autotransportador	Bacteria	Función	Tamaño del pasajero (kDa)
AIDA	<i>E. coli</i>	Adhesión	79.5
Ag43	<i>E. coli</i>	Formación de biopelículas	49.8
Proteasa IgA1	<i>N. gonorrhoea</i>	Proteasa	106
EspP	<i>E. coli</i>	Proteasa citotóxica	105.4
BrkA	<i>B. pertussis</i>	Resistencia sérica	111.8
Hbp	<i>E. coli</i>	Proteasa hemoglobina	68.4
Pertactina	<i>B. pertussis</i>	Adhesión	60.2

La tabla muestra la función de diferentes proteínas pasajeras de autotransportadores, la mayoría relacionadas para albergar la virulencia. Las proteínas pasajeras son generalmente grandes, frecuentemente con pesos moleculares de >65 kDa.

Tabla 2. Antígenos expresados en la superficie celular usando autotransportador.

Despliegue de antígenos usando autotransportador							
Aplicación	Autotransportador		Pasajero		Huésped	Referencia	
	Nombre	Origen	Nombre	Origen			
Desarrollo de vacunas vivas	AIDA	<i>E. coli</i>	Hsp60	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>S. entérica</i>	Kramer y cols., 2010	
			Ureasa A y fragmentos	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>S. enterica Typhimurium</i>	Rizos y cols., 2003	
			Subunidad B de heat labile	<i>Y. enterocolitica, E. coli</i>		Nhan y cols., 2011	
			Epítomos de células T de Hsp60	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	Ruiz y cols., 2002	
			Proteínas fimbrial (SefA)	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>S. entérica Typhimurium, E. coli</i>	Rizos y cols., 2003	
		MisL	<i>S. entérica</i>	NANP epítomos	<i>P. falciparum, E. coli</i>	<i>S. entérica, E. coli</i>	Zhu y cols., 2006
				Toxina Shiga	<i>P. falciparum</i>	<i>S. entérica</i>	Jong y cols., 2012
		Hbp	<i>E. coli</i>	ESAT6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>S. entérica</i>	Xin y cols., 2010
		Ag43	<i>E. coli</i>	CTP3, Chlam12, FimH	<i>Vibrio Cholerae</i>	<i>S. entérica</i>	Kjaergaard y cols 2002
		Pfal	<i>P. fluorescens</i>	Inmunógeno Et18	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. coli</i>	Hu y cols., 2009

Figuras

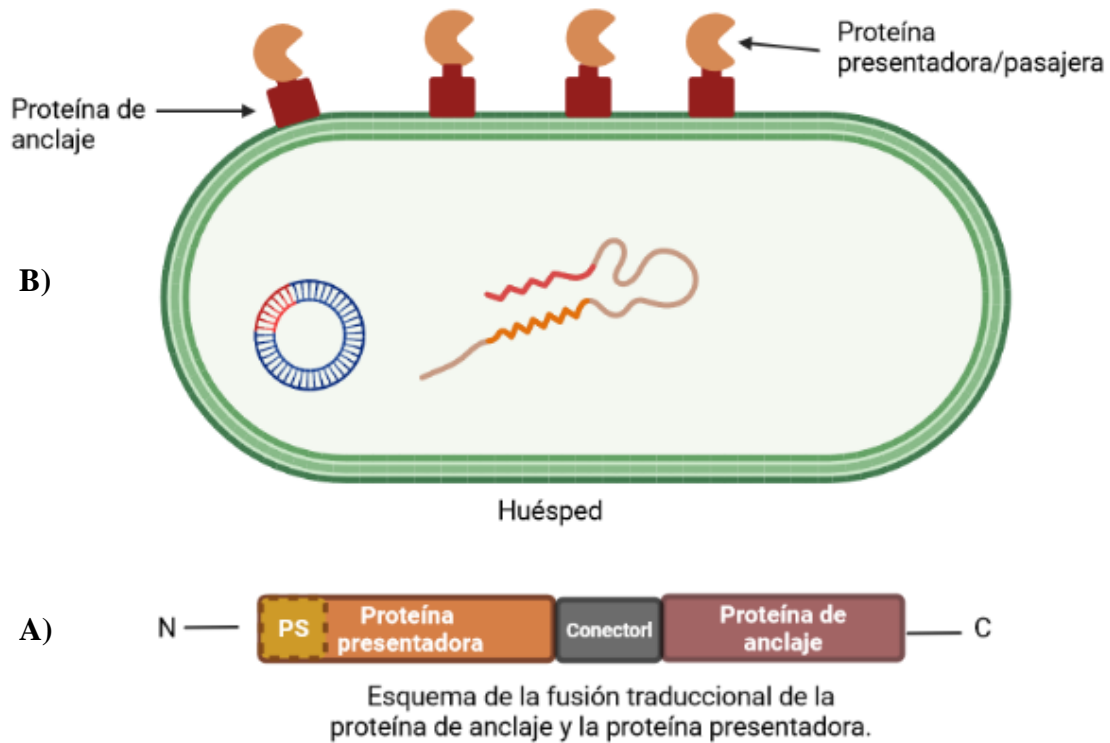


Fig. 1. Despliegue de proteínas heterólogas en la superficie celular.

El despliegue de proteínas heterólogas en la superficie celular se lleva a cabo por una fusión de la proteína residente en la superficie (color rojo) y la proteína presentadora/pasajera de interés (color naranja) (Figura B). La fusión resultante se traduce y se transloca en la membrana externa donde se muestra la proteína presentadora/pasajera de interés (Figura A).

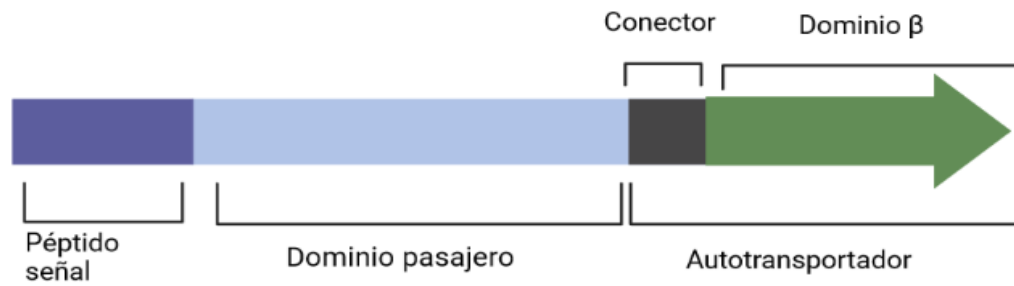


Fig. 2. Organización modular de los autotransportadores.

La organización estructural de un autotransportador se basa en tres segmentos: Un péptido señal N-terminal (azul), un dominio pasajero activo para su presentación o liberación extracelular (celeste) y una unidad de translocación C-terminal denominado autotransportador que consta de un barril β (verde olivo) y un conector (negro).

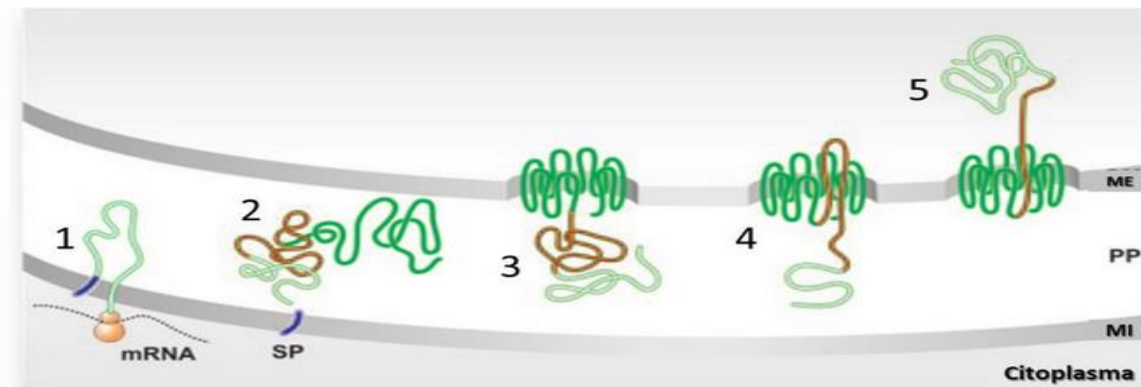


Fig. 3. Mecanismo de secreción de los autotransportadores.

El mecanismo de secreción de los autotransportadores inicia con: 1) la síntesis del autotransportador como una pro-proteína en el citoplasma, el péptido señal (SP) N-terminal (azul) permite la translocación a través de la membrana interna (MI) utilizando el sistema de secreción general anclado (Vía de secreción Sec dependiente). 2) El autotransportador desplegado se transloca al periplasma y el péptido señal es escindido por una peptidasa anclada a la membrana. 3) El barril β se inserta en la membrana externa (ME). 4) el pasajero es trasladado a través del poro formado por el barril β y 5) La proteína pasajera se pliega en la superficie celular. (Nicolay y cols., 2015).

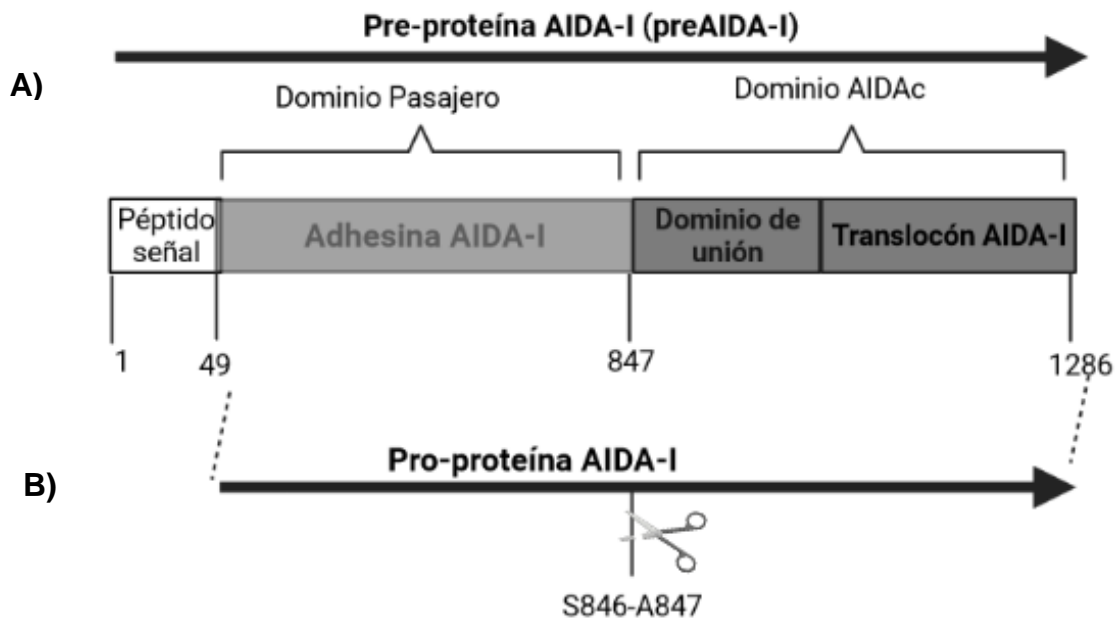


Fig. 4. Organización modular del autotransportador AIDA-I de *E. coli*

A) El autotransportador AIDA-I se sintetiza como una pre-proteína AIDA-I que consiste de tres dominios funcionales: un péptido señal N-, un dominio pasajero (adhesina AIDA-I) y un dominio AIDAc conformado por los siguientes subdominios: un dominio de unión (une el dominio pasajero con el dominio $\beta 2$) y un dominio $\beta 2$ (translocón AIDA-I). B) Después de la translocación de preAIDA-I, el péptido señal (49 aminoácidos) se escinde y se libera proAIDA-I en el periplasma. Luego de la translocación de proAIDA-I, el pasajero se escinde de forma autoproteolítica entre los aminoácidos S846-A847 del dominio de unión. Posteriormente de la escisión, la adhesina AIDA-I permanece asociada de forma no covalente con la superficie bacteriana.

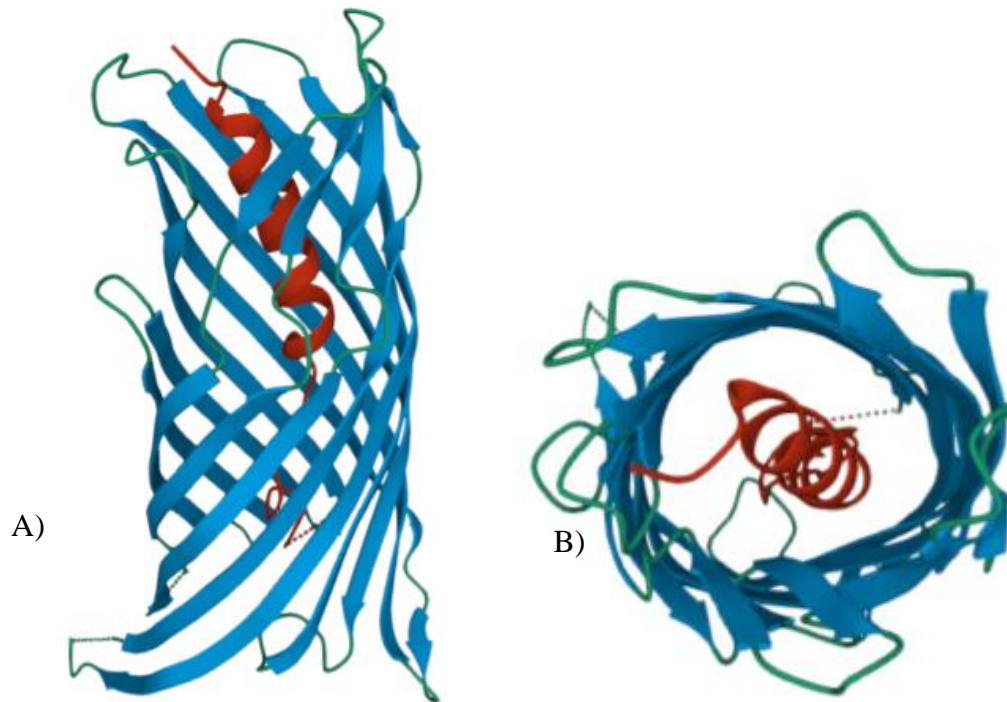


Fig. 5. Estructura de cristalografía de rayos X del dominio β de AIDA-I

Se representa una vista lateral (A) y una vista desde arriba (B) del dominio β de AIDA-I de *E. coli*. La proteína adopta una configuración de barril- β de 12 cadenas (color azul), formando un poro en el que reside la helice α (color rojo). Las cadenas β están conectadas por giros periplasmicos cortos y bucles extracelulares mas largos (color verde) (RCSB PDM ID: 4MEE).

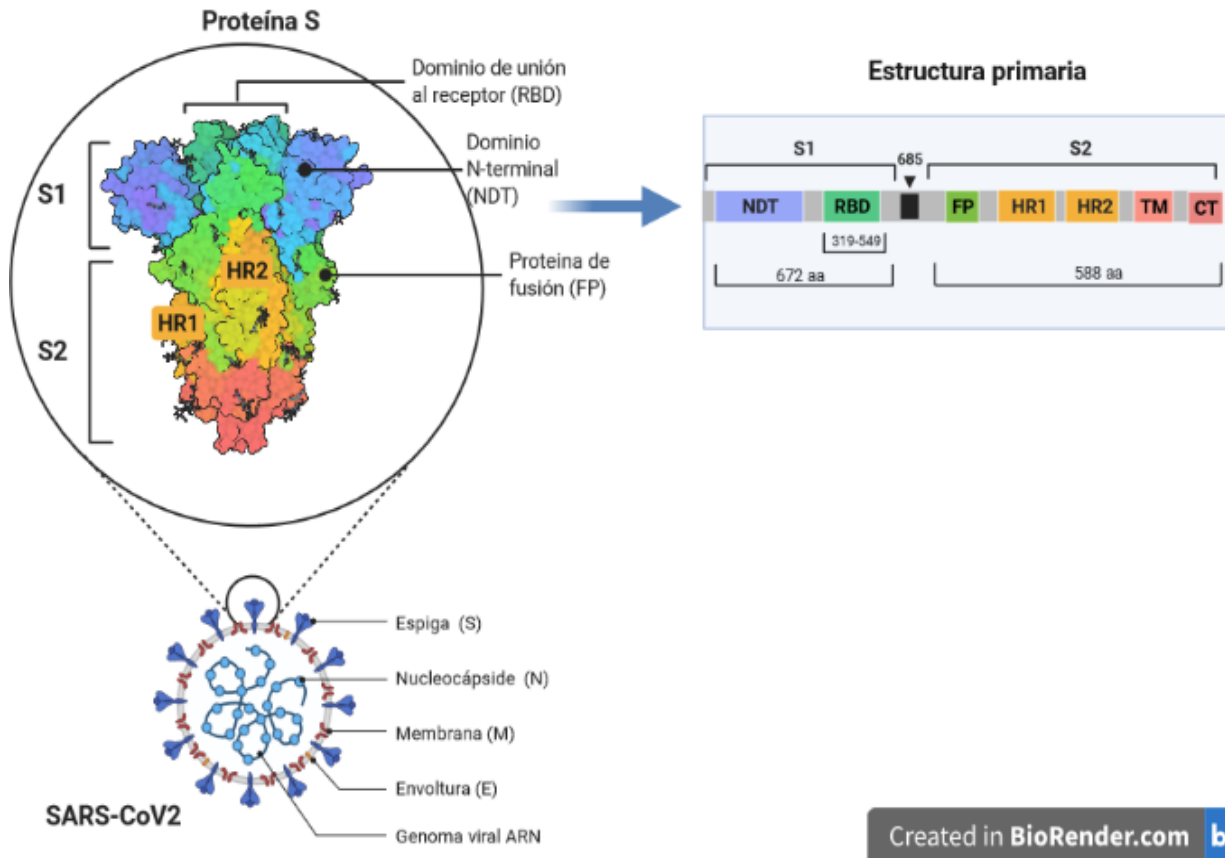


Fig. 6. Representación esquemática de la proteína S de SARS-CoV-2.

La proteína espiga (S) de SARS-CoV-2 está compuesta por 1260 aminoácidos, que se dividen en dos subunidades S1 y S2. La subunidad S1 está compuesta por 672 aminoácidos y está organizada en cuatro dominios: un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión al receptor (RBD), y dos subdominios (SD1 y SD2). La subunidad transmembranal S2 está compuesta por 588 aminoácidos, la cual incluye un péptido de fusión (FP), dos repeticiones en tándem de una secuencia de siete aminoácidos, también llamadas regiones héptadas repetidas (HR1 y HR2) y un dominio transmembranal (TM) y una cola citoplasmática (CT), organizado como FP-HR1-HR2-TM-CT (estructura primaria).