

Aportes a la caracterización molecular e inmunológica de porinas de bacterias Gram-negativas y sus regiones variables

Olivia Niebla, Gerardo Guillén, Tamara Menéndez, Anabel Alvarez, Hilda E. Garay, Maite Delgado, Alejandro Martín, Sonia González, Ricardo Silva, Consuelo Nazábal, Dagmara Pichardo, Edelgis Coizeau, Alexis Musacchio

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa. Ciudad de La Habana. AP 6162, CP 10600, Cuba.
Telf.: (53-7) 271 6022; Fax: (53-7) 271 4764; E-mail: olivia.niebla@cigb.edu.cu

RESUMEN

Las porinas de bacterias Gram negativas son candidatos muy atractivos para la elaboración de vacunas contra patógenos de estas características. Estas son proteínas de la membrana externa de la bacteria y tienen una función biológica claramente definida en el transporte de nutrientes. La porina PorA de *Neisseria meningitidis* ofrece grandes posibilidades para la elaboración de una vacuna recombinante contra la meningitis meningocócica. El gen codificante para PorA se aisló de nueve cepas diferentes de *N. meningitidis*, incluyéndose el aislamiento clínico más frecuente de Cuba. Se realizó un análisis de secuencia que permitió definir las regiones variables, contra las cuales se dirigen los anticuerpos bactericidas y protectores que se inducen contra la proteína. PorA se expresó a altos niveles en *Escherichia coli*, empleando diferentes sistemas de expresión, y el antígeno purificado se caracterizó inmunológicamente. PorA recombinante se reconstituyó con detergentes y se incluyó en liposomas, obteniéndose altos niveles de anticuerpos con actividad bactericida contra *N. meningitidis*. También se diseñaron y expresaron en *E. coli* proteínas quiméricas que contenían fragmentos de PorA pertenecientes a varios subtipos, las cuales se inmunocarakterizaron. Se elaboraron péptidos sintéticos de las regiones hipervariables de esta proteína y se estudió su inmunogenicidad, obteniéndose altos niveles de anticuerpos en varias líneas de ratón. También se sintetizaron péptidos cíclicos, que se conjugaron a proteínas portadoras y los estudios inmunológicos en ratones revelaron que los péptidos fueron inmunogénicos y los anticuerpos generados reaccionaron con la proteína nativa. Las regiones variables de PorA se expresaron en la superficie del fago filamentoso M13, obteniéndose anticuerpos dirigidos contra la región variable 2 que reconocieron la proteína en la superficie de la bacteria y mostraron actividad bactericida contra *N. meningitidis*.

Descripción del resultado

En la División de Vacunas del CIGB se aisló el gen que codifica para una porina de membrana externa (PorA) de nueve cepas diferentes de *Neisseria meningitidis*, la secuencia de estos genes fue analizada extensamente para definir las regiones hipervariables con vistas a su empleo como posible candidato vacunal contra la meningitis meningocócica. El gen *porA* se clonó y expresó en *Escherichia coli*.

La producción por primera vez de una porina, con altos niveles de expresión en *E. coli* constituyó un resultado novedoso y de impacto para posteriores estrategias de trabajo. Las porinas como proteínas integrales de membrana presentan regiones o lazos expuestos y no expuestos en su estructura, en estrecha interacción con la capa lipídica y esto dificulta su re-naturalización una vez que se ha expresado en forma insoluble en una cepa heteróloga.

Para la obtención de anticuerpos funcionales contra PorA se obtuvieron péptidos sintéticos cíclicos y poliméricos y péptidos cíclicos conjugados a varias proteínas portadoras que indujeron la producción de anticuerpos específicos en animales de laboratorio, capaces de reconocer la proteína en su conformación nativa y con actividad biológica al ser enfrentados al meningococo.

La aplicación de la tecnología de expresión de antígenos en la superficie de fagos filamentosos al estudio de las proteínas de *N. meningitidis* es un elemento novedoso, que permitió obtener anticuerpos capaces de reconocer a la proteína en la superficie de la bacte-

ria y que mostraron actividad bactericida contra *N. meningitidis*.

Por otro lado, la presentación de esta porina recombinante en liposomas y/o detergentes permitió elevar en una alta proporción su capacidad de inducir anticuerpos bactericidas y protectores frente a la bacteria. Adicionalmente, debido a la variabilidad de esta proteína en la bacteria, el uso de proteínas quiméricas como vacunas contra esta enfermedad, y en el desarrollo de vacunas combinadas, constituye una nueva alternativa. Estos resultados avalados por publicaciones recientes, que reflejan las potencialidades de esta proteína y de diferentes estrategias para conservar sus propiedades inmunológicas, fueron reconocidos como Resultado Destacado de la Investigación Científica por la ACC 2002.

Análisis comparativo de secuencia de ADN de nueve genes diferentes de PorA

Mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa se aislaron los genes codificantes para nueve porinas PorA de *N. meningitidis*. Los genes se clonaron y secuenciaron. Se realizó un estudio comparativo entre las secuencias de ADN respecto a otras secuencias ya publicadas. Como resultado se encontró que la secuencia de tres de las proteínas no había sido reportada con anterioridad, el resto de las proteínas secuenciadas mostraron algunas variaciones respecto a los reportes publicados en la literatura, lo que confirmó

la alta variabilidad genética entre cepas. También se evidenció el papel de la variabilidad de estas regiones en el grado de respuesta inmunológica de las cepas [1].

Clonaje y expresión del gen *porA* en *Escherichia coli*

La expresión de porinas de bacterias gram negativas en *E. coli* usualmente ha resultado tóxica para el hospedero [2]. Empleando el fragmento amino-terminal de la interleucina 2 y la proteína P64k de *Neisseria* como estabilizadores de la expresión, se lograron niveles de expresión de PorA recombinante mayores al 30% de las proteínas totales de *E. coli* (Figura 1). La identidad de los polipéptidos obtenidos fue comprobada con el empleo de anticuerpos monoclonales obtenidos contra las regiones hipervariables de la proteína nativa. Mediante la inmunización de ratones Balb/c, se obtuvieron sueros policlonales contra este antígeno. Los anticuerpos inducidos reconocieron a la proteína recombinante por *Western blot* y ELISA [3, 4, 5]. Otra estrategia fue la expresión de la proteína PorA empleando el fragmento amino-terminal de P64k, como estabilizador, donde se obtuvieron igualmente altos niveles de expresión de la proteína.

Renaturalización en liposomas y con detergentes

A partir de esta última construcción génica, se confeccionó un banco primario y de trabajo para establecer las condiciones de fermentación y purificación del antígeno. Esta porina define el subtipo de la cepa CU385, el aislamiento de meningococo más frecuente en Cuba. La proteína se reconstituyó con detergentes y/o en vesículas de fosfolípidos, mejorando su inmunogenicidad. Los ratones inmunizados con estas variantes de renaturali-

zación rindieron sueros hiperinmunes que reconocieron la proteína natural y mostraron actividad biológica *in vitro* al enfrentarse a la bacteria [6].

Este sistema de expresión, purificación y renaturalización para proteínas integrales de membrana puede ser empleado como instrumento rutinario en el trabajo con antígenos vacunales de esta naturaleza. En la Figura 2A se muestra una foto obtenida durante los estudios de inmunoidentificación por microscopía electrónica, que evidencia el reconocimiento de PorA recombinante en la superficie de los liposomas con un anticuerpo monoclonal subtipo específico obtenido en nuestro grupo.

Obtención de péptidos sintéticos, cíclicos y poliméricos.

Estudio de inmunogenicidad

Mediante una nueva metodología de síntesis química se sintetizaron péptidos cíclicos y poliméricos derivados de la región hipervariable 2 de PorA de la cepa CU385. Los antisueros obtenidos en diferentes líneas de ratón mostraron inmunogenicidad y actividad funcional para la forma cíclica polimérica del péptido obtenido [7]. También se sintetizaron péptidos cíclicos correspondientes a las regiones variables 1 y 2 de PorA y se conjugaron a las proteínas portadoras seroalbúmina bovina y P64k. Al inmunizar ratones los conjugados fueron altamente inmunogénicos y los anticuerpos obtenidos reconocieron la proteína nativa [8, 9].

Obtención de anticuerpos con actividad bactericida contra *Neisseria meningitidis* por inmunización con fagos filamentosos que exponen la región variable 2 de la proteína PorA

Con el objetivo de obtener anticuerpos con actividad funcional contra *N. meningitidis*, mediante la inmunización con los péptidos correspondientes a las regiones variables, se evaluaron otras formas de expresión e inmunización con estos. Los fragmentos de genes correspondientes a las regiones variables 1 y 2 de la

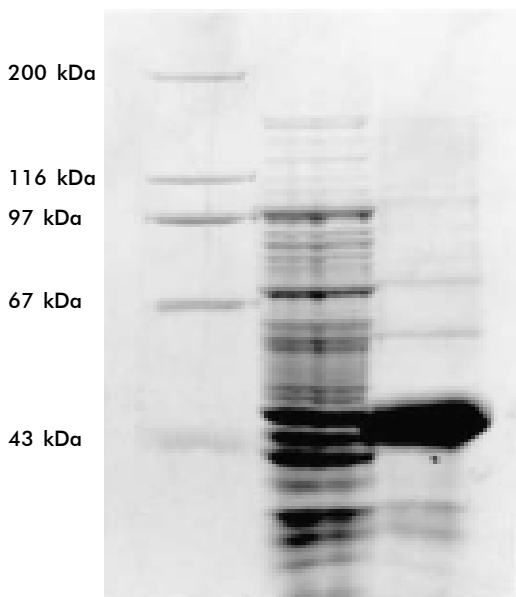


Figura 1. La porina PorA de *Neisseria meningitidis* se expresó a altos niveles en *Escherichia coli*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, lisado de proteínas de la cepa de *E. coli* nativa; carril 3, lisado de proteínas de la cepa de *E. coli* expresando la proteína PorA.

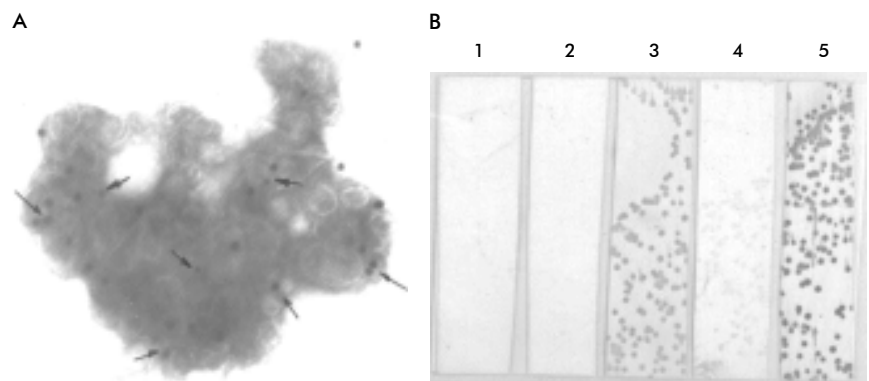


Figura 2. Ejemplos de caracterización inmunológica de la porina PorA. A) La porina PorA es reconocida por anticuerpos monoclonales específicos al ser renaturalizada en vesículas liposomales. B) Los anticuerpos generados en ratones inmunizados con fagos filamentosos, que expresan la región variable 2 de PorA, reconocen células enteras de *Neisseria meningitidis*. 1 y 2, controles negativos; 3, nueva construcción génica para la expresión de proteínas en fagos filamentosos; 4, construcción convencional empleada para la expresión en fagos; 5, control positivo.

proteína PorA fueron clonados en un vector para la expresión de estos péptidos en la superficie del fago filamentosos M13. En este trabajo se desarrolló y evaluó un sistema de expresión donde se introdujo un fragmento espaciador entre el péptido expresado y la proteína del fago a la cual se fusionó este. La inmunización con los fagos que expresaban la región variable 2 indujo la producción de anticuerpos anti-péptido que reconocieron células enteras de *N. meningitidis* (Figura 2B). Adicionalmente, los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados con los fagos obtenidos al emplear la modificación al sistema de expresión desarrollado en este trabajo, mostraron actividad bactericida contra el patógeno [10].

Expresión de proteínas quiméricas

Las porinas de *Neisseria* presentan una alta variabilidad que se acentúa en regiones denominadas hipervariables, las cuales son las responsables de la inmunogenicidad y de la generación de anticuerpos protectores contra este patógeno en el hospedero. La expresión de proteínas quiméricas, que incluyan varias de estas regiones hipervariables, constituye una solución al problema de la obtención de una vacuna contra diferentes cepas causantes de epidemias de meningitis meningocócica en el mundo. Por primera vez se obtuvo con altos niveles de expresión en *E. coli* una porina recombinante quimérica que portaba las regiones hipervariables de varias cepas diferentes [11].

Se expresaron en *E. coli* varias porinas quiméricas obtenidas mediante la tecnología de ADN recombinante que contienen hasta 5 subtipos diferentes y las mismas se purificaron a partir de cuerpos de inclusión. El producto resultante ha inducido respuesta específica contra las cepas homólogas para el subtipo en cuestión y anticuerpos funcionales contra la bacteria.

Establecimiento del proceso de purificación de PorA para estudios de inmunogenicidad

Se logró establecer un proceso de purificación para PorA que puede ser empleado para la purificación de otras porinas de membrana externa de bacterias gram negativas teniendo en cuenta la homología estructural entre ellas. PorA fue purificada con más de un 90% de pureza que permite la realización y aprobación de estudios precisos de estructura e inmunogenicidad en diferentes especies animales.

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra PorA

Se generó un grupo de anticuerpos monoclonales (Mabs) contra la proteína natural que reconocen dos epitopos no sobrelapados. Estos epitopos corresponden con las regiones hipervariables 1 y 2 de la proteína PorA de la cepa correspondiente al aislamiento cubano CU385. Estos anticuerpos también se estudiaron por ELISA de células totales, donde se corroboró su identidad antigénica subtipo específico. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se emplean como controles en ELISA y en la comprobación de la identidad antigénica de la proteína recombinante y los péptidos correspondientes a las regiones variables por *Western blot*. Por otra parte, se emplean como controles en

varios modelos experimentales por tener una marcada actividad bactericida. Se generó además un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante PorA del subtipo P1.9 que fue empleada en la cuantificación por ELISA de las proteínas recombinantes.

Colaboradores

Osvaldo Reyes, Nelson Santiago Vispo, Rolando Pajón, Viviana Falcón, Gilda Lemos, Teresita Paredes, Luis Herrera, Luis Javier González, Isabel de Haz, Lourdes Roque, Lisset Hermida, Yasmiana Muñoz.

Obra científica editada

- Guillén, G., A. Alvarez, G. Lemos, T. Paredes, R. Silva and A. Martín (1993). Comparison of the DNA sequence of nine different genes for the Class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Biología Aplicada*. 10:108-113.
- Guillén, G., A. Alvarez, O. Niebla, R. Silva, S. González, A. Musacchio, A. Martín, M. Delgado and L. Herrera (1996). Cloning and expression of the *porA* gene of the *Neisseria meningitidis* strain B:4:P1.15 in *Escherichia coli*. Primary characterization of the recombinant protein. *Acta Biotechnol.* 16:165-173.
- Guillén, G., A. Alvarez, S. González, A. Musacchio, O. Niebla, E. Coizeau, R. Silva, A. Martín and L. Herrera (1996). Expression in *Escherichia coli* and immunological characterization of a hybrid class 1-P64k protein from *Neisseria meningitidis*. *Biología Aplicada*, 13:271-275.
- Alvarez, A., R. Pajón, R. Silva, G. Guillén (1997). Clonación, expresión y caracterización de proteínas quiméricas de *Neisseria meningitidis* en *Escherichia coli*. *Microbiología e Infectología*. 4:8-14.
- Garay, H., Niebla O., González, L.J., Menéndez, T., Cruz, L.J., Reyes, O (2000). Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of class 1 OMP of *Neisseria meningitidis*. *Letters in Peptide Science*, 7: 97-105.
- Menéndez, T., De Haz, I., Delgado, M., Garay, H., Martín, A., Vispo, N.S. (2001). Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunology Letters* 39, 143-148.
- Niebla, O., Alvarez, A., Martín, A., Rodríguez, A., Delgado, M., Falcón, V., Guillén, G. (2001). Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine* 19, 3568-3574.

Los resultados han sido recogidos en los siguientes trabajos presentados en eventos

- Comparison of DNA sequence of nine Class 1 outer membrane proteins from different strains of *Neisseria meningitidis*. Congreso Internacional Biotecnología Habana 92 (Cuba 1992).
- Cloning and expression of a fusion protein (PM6-P1.15) from *Neisseria meningitidis* in *E. coli*. Congreso Internacional Biotecnología Habana 92 (Cuba 1992).
- Cloning and expression of the Class 1 major outer membrane protein of the *Neisseria meningitidis*

- strain B4: P1.15 in *E. coli*. Congreso Internacional Biotecnología Habana 92 (Cuba 1992).
4. Purification and immunogenicity of a hybrid recombinant protein including epitopes of P1.15 and PM6 from *N. meningitidis*. Pathobiology and Immunobiology of Neisseriaceae (México 1994).
 5. Obtención de mutantes de *Neisseria meningitidis* para las proteínas de membrana externa de Clase 1 y PM6. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología y I Congreso Cubano de Medicina Tropical (Cuba 1994).
 6. Cloning and sequencing of PorA, the gene encoding the Class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. Purification and immunological characterisation of recombinant polypeptide. 6to Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas (Cuba 1995).
 7. Ciclización por puentes disulfuros de un péptido sintetizado en fase sólida. XV Conferencia de Química (Cuba 1996).
 8. Expresión en fago filamentosos de la región variable 2 de la proteína de Clase 1 de *Neisseria meningitidis*. I Jornada Nacional de Inmunología (Cuba, 1996).
 9. Phage display of variable region 2 from Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*. Evaluation of the immune response against the recombinant phages. Congreso Internacional Biotecnología Habana 97 (Cuba 1997).
 10. Expresión en fagos filamentosos de la región variable 2 de la proteína de Clase 1 de *Neisseria meningitidis*. V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical, Congreso 60 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (Cuba, 1997).
 11. Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide corresponding to loop 4 of outer membrane protein P1.15 of *Neisseria meningitidis*. Congreso Internacional Biotecnología Habana 97 (Cuba 1997).
 12. Comparative immunogenicity of meningococcal subtypes P1.15 and P1.19 in animals and humans. Eleventh International Pathogenic *Neisseria* Conference (Francia, 1998).
 13. Solid Phase Synthesis and conjugation of cyclic peptides derived from loops 1 and 4 of Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*. XVI Conferencia de Química (Cuba, 1999).
 14. Cyclic peptides derived from loops 1 and 4 from Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*: synthesis, conjugation and immunological evaluation. Congreso Internacional "Biotecnología Habana 99 (Cuba, 1999).
 15. Solid phase synthesis of cyclic peptides derived from the surface loops 1 and 4 of Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*. Immunological evaluation of peptide-P64k conjugate. IV Congreso Internacional de Química. XIII Conferencia del Caribe de Química e Ingeniería Química (Cuba 2001).
 16. P64K as a carrier protein of *Neisseria meningitidis* PorA peptides. Primer Evento Internacional y Segundo Evento Nacional sobre Adyuvantes para Vacunas (Cuba 2001).

Trabajos de tesis

Algunos de los resultados presentados han sido recogidos en:

- ◆ Cuatro Tesis de Diploma de la Facultad de Biología.
- ◆ Una Tesis de Diploma de la Facultad de Farmacia y Alimentos
- ◆ Una Tesis de Diploma del Instituto Politécnico Mártires de Girón.

Reconocimientos

El clonaje, secuencia y expresión del gen codificante para la proteína P1.15 de la cepa B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis* circulante en Cuba, fue considerado como *Logro Institucional del CIGB* en el año 1991.

1. Guillén, G., A. Alvarez, G. Lemos, T. Paredes, R. Silva, A. Martín (1993). Comparison of the DNA sequence of nine different genes for the Class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Biotecnología Aplicada*. 10, 2:108-113.

2. Li ZM, Hannah JH, et al. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of Bordetella pertussis. *Mol Microbiol*, 1991; 5: 1649-1656.

3. Rodríguez, A. y Niebla O. Trabajo de grado. Purificación de la proteína recombinante P1.15. Facultad de biología-Centro de ingeniería genética y biotecnología. 1994.

4. Guillén, G., A. Alvarez, O. Niebla, R. Silva, S. González, A. Musacchio, A. Martín, M. Delgado and L. Herrera (1996). Cloning and expression of the porA gene of the *Neisseria meningitidis* strain B:4:P1.15 in *Escherichia coli*. Primary characterization of the recombinant protein. *Acta Biotechnol*. 16, 2-3:165-173.

5. Guillén, G., A. Alvarez, S. González, A. Musacchio, O. Niebla, E. Coizeau, R. Silva, A. Martín and L. Herrera (1996). Expression in *Escherichia coli* and immunological characterization of a hybrid class 1-P64k protein from *Neisseria meningitidis*. *Biotecnología Aplicada*, 13:271-275.

6. Niebla, O., Alvarez, A., Martín, A., Rodríguez, A., Delgado, M., Falcón, V., Guillén, G. (2001). Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine* 19, 3568-3574.

7. Garay, H., Niebla O., González, L.J., Menéndez, T., Cruz, L.J., Reyes, O (2000). Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of class 1 OMP of *Neisseria meningitidis*. *Letters in Peptide Science*, 7: 97-105.

8. Garay, H., Menéndez, T., et al. Cyclic peptides derived from loops 1 and 4 from Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*: synthesis,

conjugation and immunological evaluation. Libro de resúmenes del Congreso Internacional "Biotecnología Habana 99 (Cuba, 1999).

9. Garay, H., González, S., et al. Solid phase synthesis of cyclic peptides derived from the surface loops 1 and 4 of Class 1 protein of *Neisseria meningitidis*. Immunological evaluation of peptide-P64k conjugate. IV Congreso Internacional de Química. XIII Conferencia del Caribe de Química e Ingeniería Química (Cuba 2001).

10. Menéndez, T., De Haz, I., Delgado, M., Garay, H., Martín, A., Vispo, N.S. (2001). Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunology Letters* 39, 143-148.

11. Alvarez, A., R. Pajón, R. Silva, G. Guillén (1997). Clonación, expresión y caracterización de proteínas quiméricas de *Neisseria meningitidis* en *Escherichia coli*. *Microbiología e Infectología*. 4, 1:8-14.