

Obtención y caracterización bioquímica e inmunológica de la proteína recombinante Opc de *Neisseria meningitidis* Demostración de su capacidad como proteína portadora para inmunización con ADN

Alexis Musacchio Lasa,¹ Tania Carmenate Portilla,¹ Circe Mesa Pardillo,²
Diógenes Quintana Vázquez,¹ Sonia González Blanco,¹ Maité Delgado Espina,¹
Viviana Falcón Cama,¹ Anabel Álvarez Acosta,¹ Julio Cesar Álvarez Obregón,¹
Tamara Menéndez Medina,¹ Antonieta Herrera Busch,¹ María Cristina de la Rosa Graell,¹
Félix Álvarez Gil,¹ Verena Lucila Muzio González,¹ Dagmara Pichardo Díaz¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa. Ciudad de La Habana. AP 6162, CP 10600, Cuba. Tel.: (53-7) 271 6022; Fax: (53-7) 271 4764; E-mail: alexis.musacchio@cigb.edu.cu ²Centro de Inmunología Molecular. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

La proteína Opc es uno de los antígenos mayoritarios de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Esta proteína se encuentra presente en los preparados vacunales existentes contra esta bacteria y los anticuerpos específicos generados después de la inmunización con los mismos han mostrado actividad bactericida y opsónica contra *N. meningitidis*. Opc facilita la adhesión e invasión del meningococo a células epiteliales y endoteliales. El gen *opc* se clonó y expresó en la bacteria *Escherichia coli* y en la levadura *Pichia pastoris* y la proteína recombinante obtenida se purificó y se caracterizó bioquímica e inmunológicamente. Opc obtenida en ambos sistemas hospederos resultó ser antigénica e inmunogénica en ratones. Los anticuerpos murinos generados contra este antígeno reconocieron la proteína natural presente en el meningococo y tuvieron actividad funcional (bactericida y opsónica). Adicionalmente, se evaluó la capacidad de Opc de acomplejar ADN plasmídico para potenciar la respuesta inmune en inmunización con ADN. Se obtuvieron complejos ADN-proteína, los cuales fueron caracterizados bioquímicamente. Se demostró expresión transciente del gen reportero (β -galactosidasa) en células COS-7. Después de la inmunización de ratones por vía intranasal, estos complejos generaron una respuesta humoral y celular contra la proteína expresada por dicho gen. En otro estudio se prepararon complejos de Opc-ADN (plásmidos codificantes para hemaglutinina y la nucleoproteína del virus de influenza). Estos fueron utilizados para la inmunización primaria de ratones por vía intranasal. Seguidamente los ratones recibieron una dosis de refuerzo con virus inactivado. En los ratones sensibilizados con los complejos Opc-ADN se apreció una potente respuesta celular contra los antígenos del virus de influenza.

Resultados y discusión

Purificación y plegamiento *in vitro* de la proteína Opc derivada de *Escherichia coli*

La proteína Opc se purificó por métodos cromatográficos convencionales a partir de células de *E. coli* transformadas con el gen que expresa esta proteína [1].

Para la generación de una respuesta funcional y teniendo en cuenta que la proteína recombinante se obtenía formando cuerpos de inclusión en la célula hospedera, fue necesario llevar a cabo un proceso de renaturalización *in vitro*. Este proceso se estudió incubando la proteína en 88 soluciones que contenían detergentes, agentes caotrópicos, amino ácidos, entre otros compuestos; y monitoreando el grado de renaturalización, mediante inmunoidentificación con un anticuerpo monoclonal humano que reconoce un epitopo conformacional en la proteína natural. En 2 de estas soluciones se detectó reconocimiento de la proteína por este anticuerpo después de 120h de plegamiento *in vitro* [2].

Antigenicidad e inmunogenicidad de la proteína Opc recombinante

La proteína obtenida mediante las 2 variantes de plegamiento seleccionadas resultó antigénica, ya que fue identificada por anticuerpos monoclonales (que reconocen epitopos lineales y conformacionales en la proteína natural) tanto en Western blot como en ensayos enzimáticos en fase sólida (ELISA) [2].

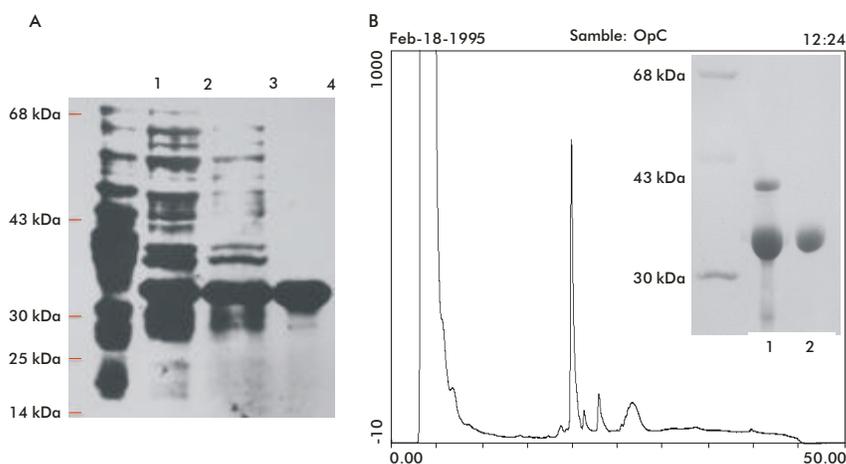


Figura 1. (A) SDS-PAGE al 10% de las muestras tomadas durante el proceso de semi-purificación de la proteína recombinante Opc. 1. Proteínas totales de la cepa de *E. coli* W 3110 (control negativo), 2. Proteínas totales de la cepa W3110 expresando la proteína recombinante (PM-104), 3. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de ruptura celular, 4. Proteínas en la fracción insoluble después del lavado con Urea 4 M/TE. Los patrones de peso molecular están indicados. (B) Purificación de la proteína recombinante Opc. Cromatograma tipo donde se muestra la elución de la proteína de interés SDS-PAGE al 10%. 1. Proteína recombinante Opc después del procedimiento de lavado del precipitado celular y extracción. 2. Fracción principal de la elución de la cromatografía. Los patrones de peso molecular se indican en la figura.

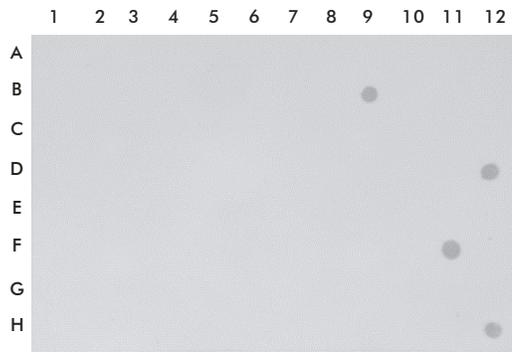


Figura 2. Identificación en inmunodot de la proteína Opc plegada en diferentes preparaciones, por el anticuerpo monoclonal humano LuNm03. Pocillos A1-D8, muestras en Urea 1 M, conteniendo: A1-A6: L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), A7-A12: PEG (100 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), B1-B6: PEG (200 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), B7-B12: PEG (400 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), C1-C6: PEG (800 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), C7-C12: PEG (1600 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), D1: Tween-20 1%, D2: NP-40 1%, D3: Triton X-100 1%, D4: SDS 1%, D5: MES 1%, D6: HEPES 1%, D7: PIPES 1%, D8: Sarkosyl 1%, D12 Proteína recombinante Opc, dos meses a 4°C en PBS (a 100 µg/mL). Pocillos E1-H8, muestras en GuHCl 0,5M, conteniendo: E1-E6: L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), E7-E12: PEG (100 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), F1-F6: PEG (200 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), F7-F12: PEG (400 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), G1-G6: PEG (800 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), G7-G12: PEG (1600 µg) y L-Arginina (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M), H1: Tween-20 1%, H2: NP-40 1%, H3: Triton X-100 1%, H4: SDS 1%, H5: MES 1%, H6: HEPES 1%, H7: PIPES 1%, H8: Sarkosyl 1%, H12: 5 µg PME de la cepa de *N.meningitidis* H44/76.

Se inmunizaron 2 grupos de ratones Balb/c con la proteína plegada *in vitro* (por ambos procedimientos) y los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer la proteína natural por inmunoidentificación de colonias de meningococos, así como por ELISA. De igual forma, en experimentos de inhibición, los anticuerpos generados tras la inmunización con la proteína plegada *in vitro* fueron capaces de bloquear el reconocimiento de la proteína natural por anticuerpos monoclonales murinos y humanos generados contra esta proteína y viceversa. Se realizó la localización de epitopos de células B presentes en Opc, reconocidos por los antisueros generados tras la inmunización, mediante un sistema ELISA con péptidos sintéticos sobrelapados que cubren toda la proteína (tecnología de pines)[5].

Actividad funcional

La actividad funcional de los anticuerpos generados después de la inmunización con la proteína plegada *in vitro* fue evaluada en el ensayo bactericida y de opsonización contra *N. meningitidis*. Los anticuerpos específicos contra Opc generados por la proteína plegada *in vitro* mostraron capacidad de mediar la lisis de los meningococos, en presencia de una fuente de complemento exógena (actividad bactericida) [2].

Proteína Opc recombinante en liposomas

La proteína Opc recombinante fue plegada *in vitro* utilizando vesículas multilamelares (liposomas) con una

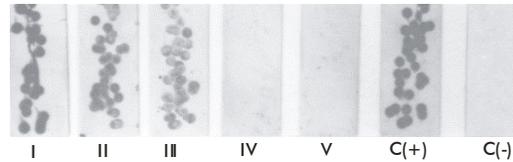


Figura3. Inmunoidentificación de colonias que muestra el reconocimiento de la proteína nativa presente en meningococos. I. Antisuero generado por la proteína Opc conservada 2 meses a 4°C en PBS a 100 µg/mL, II. Antisuero generado por Opc plegada en Urea 1 M – PEG (400 µg/mL)-L-Arginina 0,2 M, III. Antisuero generado por Opc plegada en GuHCl 0,5 M – PEG (400 µg/mL) -L-Arginina 0,4 M. IV. Antisuero generado por Opc plegada en Urea 1 M, V. Antisuero generado por Opc plegada en GuHCl 0,5 M. C(+)- mAb LuNm03, C(-) Suero preinmune

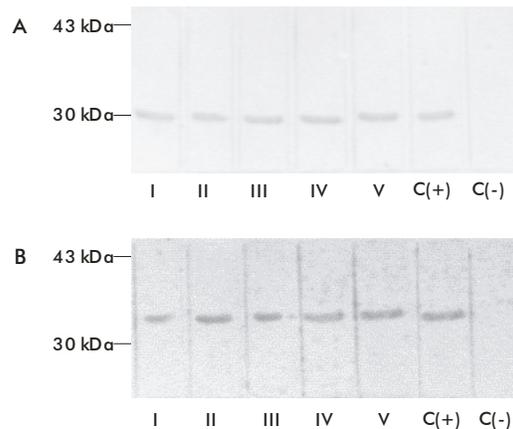


Figura 4. Reconocimiento en inmunoblot de la proteína Opc presente en PME de la cepa H44/76 de *N. meningitidis* (A) y de la proteína recombinante Opc (B), por los anticuerpos generados en ratones con las variantes de inmunización ensayadas. I. Antisuero generado por la proteína Opc conservada, 2 meses a 4°C en PBS a 100 µg/mL, II. Antisuero generado por Opc plegada en Urea 1M – PEG 400 µg/mL - L-Arginina 0,2 M, III. Antisuero generado por Opc plegada en GuHCl 0,5 M-PEG 400 µg/mL -L-Arginina 0,4 M. IV. Antisuero generado por Opc plegada en Urea 1 M, V. Antisuero generado por Opc plegada en GuHCl 0,5 M, C(+)- mAb 279/5C, C(-) Suero preinmune.

Tabla 1. Títulos bactericidas y opsonicos de los antisueros en estudio, contra *N. meningitidis* H44/76.

Antisueros	Títulos bactericidas ^a	Títulos opsonizantes ^b
I	9	7
II	10	8
III	8	7
IV	< 2	< 3
V	< 2	< 3
Preinmune	< 2	< 3

a Los títulos bactericidas se expresan como el Log2 de la última dilución del suero capaz de matar el 50% del inóculo inicial de bacteria.

b Los títulos opsonizantes se expresan como el Log2 de la última dilución del suero donde el porcentaje de PMN en el estallido respiratorio es el doble con respecto a los controles utilizados en el ensayo.

mezcla de dipalmitoil-fosfatidil colina y colesterol [3]. La preparación obtenida fue caracterizada bioquímicamente teniendo en cuenta la localización de Opc recombinante dentro del liposoma, restauración de los epitopos

funcionales en su conformación nativa, pureza de la preparación y determinación de la sensibilidad a proteasas.

Estas preparaciones liposomales se emplearon en la inmunización de ratones Balb/c por vía subcutánea e intranasal. Los anticuerpos específicos generados contra Opc presentada en liposomas reconocieron la proteína nativa en ensayos de inmunoidentificación de colonias de meningococo, ELISA (contra las proteínas de la membrana externa del meningococo y proteína Opc recombinante) y *Western blot* [4]. La actividad funcional de estos anticuerpos fue evaluada en un ensayo bactericida y de opsonización contra *N. meningitidis*. Los anticuerpos generados mostraron actividad opsonizante contra los meningococos en presencia de complemento exógeno, aunque no fueron bactericidas [4].

Clonación y expresión del gen *opc* en la levadura *Pichia pastoris*

El gen *opc* que codifica para la proteína Opc se clonó en la levadura *Pichia pastoris* [5]. La correcta estrategia de clonación fue chequeada por digestión enzimática específica y secuenciación de ADN del fragmento correspondiente al gen *opc* y sus regiones flanqueantes con el vector de integración. La integración del “cassette” de expresión por recombinación homóloga en la levadura *P. pastoris* fue estudiada por *Southern blot* [5].

Purificación y caracterización bioquímica

Después del estudio de expresión de la proteína Opc en la levadura transformada genéticamente, dicha proteína recombinante fue purificada por métodos cromatográficos convencionales y por cromatografía de afinidad a heparina. Dos variantes de la proteína recombinante fueron purificadas, una monomérica y otra agregada. Ambas fueron caracterizadas bioquímicamente, teniendo en cuenta su peso molecular según migración aparente en geles de poliacrilamida en diferentes condiciones y el

determinado por cromatografía de exclusión molecular [5].

Inmunogenicidad de la proteína derivada de la levadura *Pichia pastoris*

La antigenicidad de la proteína obtenida en sus 2 conformaciones se estudió por ELISA y *Western blot* siendo reconocida por anticuerpos monoclonales generados contra la proteína natural. Estos anticuerpos reconocen epítomos lineales y conformacionales [5].

La inmunogenicidad del antígeno obtenido se estudió mediante la inmunización de ratones Balb/c. El suero de los ratones inmunizados con ambas variantes de la proteína Opc, reconoció la proteína natural presente en el meningococo, tanto por inmunoidentificación de colonias de meningococo, ELISA (contra las proteínas de la membrana externa del meningococo y proteína Opc recombinante) así como por *Western blot*. De igual forma, se realizó la localización de epítomos de células B presentes en Opc, reconocidos por los antisueros generados tras la inmunización, mediante un sistema ELISA con péptidos sobrelapados que cubren toda la proteína sintetizados en pines [5].

Actividad funcional de los anticuerpos generados

La actividad funcional de estos anticuerpos se estudió en el ensayo bactericida y de opsonización contra *N. meningitidis*. Los anticuerpos generados por la proteína en sus 2 conformaciones mostraron actividad bactericida y opsonizante en presencia de suero humano como fuente de complemento exógeno [5].

Opc como vehículo para inmunización con ADN

Se realizaron 2 estudios fundamentales, el primero utilizando como modelo el plásmido pCMVb-gal, codificante para la enzima b-galactosidasa y el segundo con plásmido vacuales (p1.17 HA y p1.18 NP), codificantes para

1. Carmenate T. Purificación y evaluación de la inmunogenicidad de la proteína recombinante 5C de *Neisseria meningitidis*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba; 1993.

2. Musacchio A, Carmenate T, Delgado M, González S.. Recombinant Opc meningococcal protein, folded *in vitro*, elicits bactericidal antibodies after immunization. *Vaccine* 1997;15: 751-8.

3. Mesa, C. Renaturalización *in vitro* de la proteína recombinante Opc y su evaluación inmunológica. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba; 1997.

4. Carmenate T, Mesa C, Menéndez T, Falcón V, Musacchio A. Recombinant Opc protein from *Neisseria meningitidis* reconstituted into liposomes elicits opsonic antibodies following immunization. *Biotechnol Appl Biochem* 2001;34:63-9.

5. Musacchio A. Obtención y caracterización inmunológica de la proteína recombinante Opc de *Neisseria meningitidis*. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Haban, Cuba; 2001.

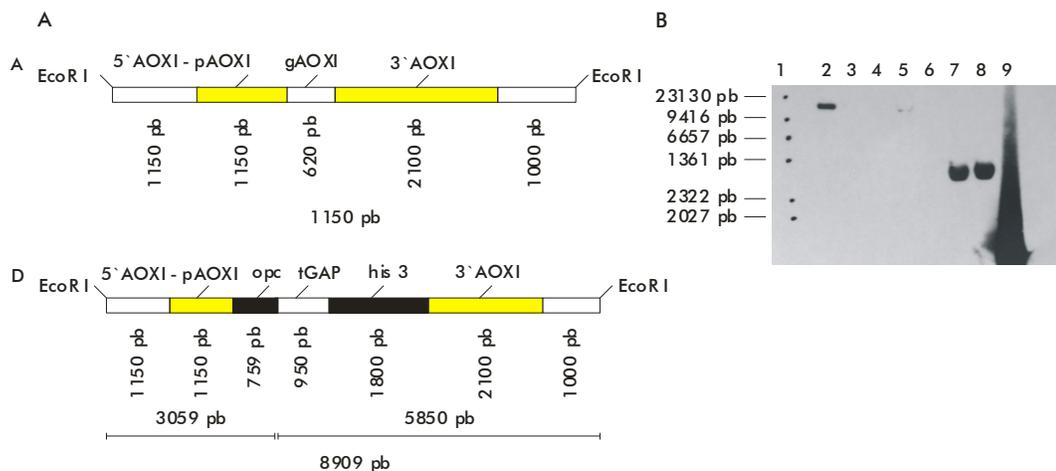


Figura 5 A. Representación del locus AOX1 en la cepa MP-36 (A) y en la cepa obtenida por recombinación (B). B. Resultados de la hibridación por Southern-blot. Digestión EcoRI. Sonda *opc*. Líneas 1 ADN λ -Hind III, 2. ADN pAL-3, 3. ADN pDAO-22 (control negativo, *P. pastoris* portando el gen codificante para el antígeno HBsAg), 4. ADN de la cepa *P. pastoris* MP-36, 5-8. ADN de las 4 colonias analizadas. 9. Banda de RCP del gen *opc*.

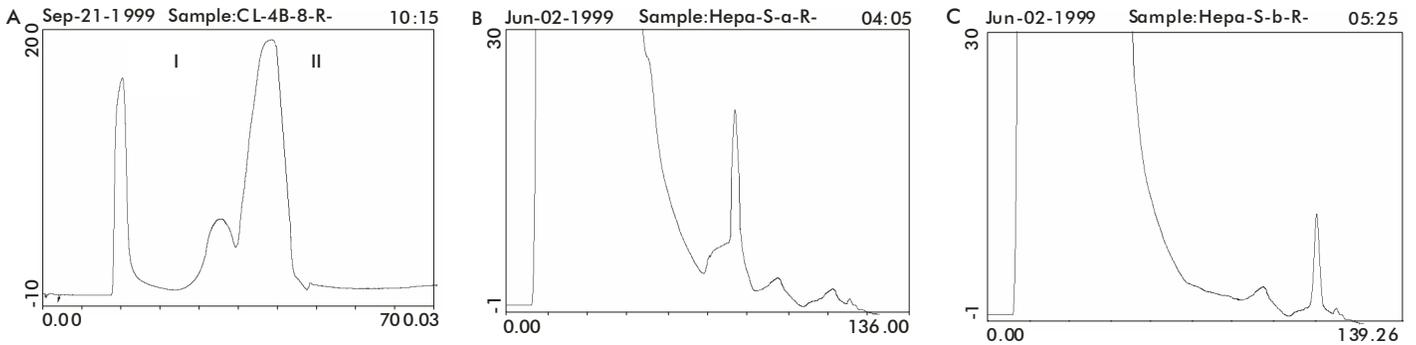


Figura 6. (A) Cromatografía de exclusión molecular, Sepharosa CL-4B (B) Cromatografía de afinidad sobre Heparina-Sepharosa CL-4B de la fracción de alto peso molecular (I en el cromatograma A), y (C) de la fracción de bajo peso molecular (II en el cromatograma A).

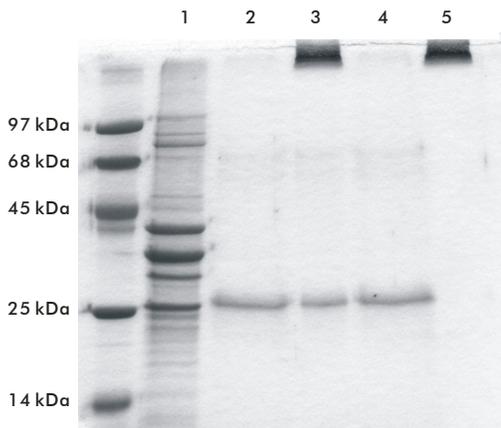


Figura 7. SDS-PAGE de las muestras después del proceso de purificación. 1. PME de *N. meningitidis* H44/76, 2. Opc-“monomérica”, purificada a partir de la fracción B (Figura 15), 3. Opc-“agregada”, purificada a partir de la fracción A (Figura 15), 4. Muestra (2), aplicada con solución de muestra sin β -mercapto-etanol, sin calentar, 5. Muestra (3) aplicada con solución de muestra sin β -mercapto-etanol, sin calentar.

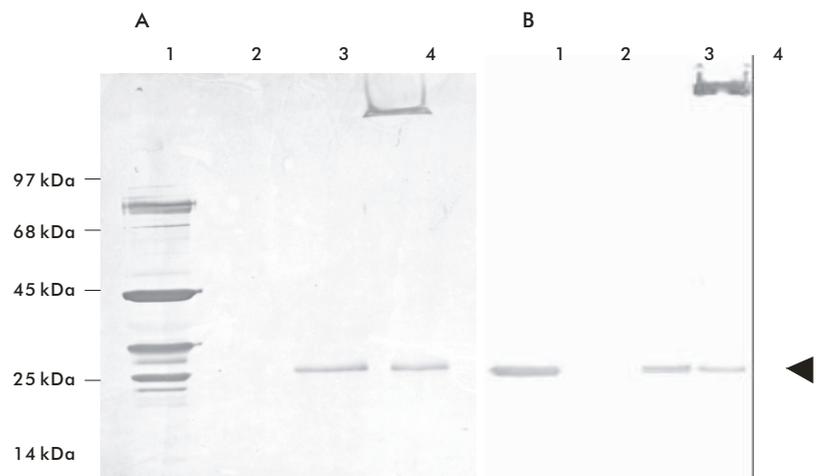


Figura 8. Reconocimiento en inmunoblot de la proteína Opc purificada, utilizando un suero de vacunado (A) y el mAb 279/5C (B). 1. PME de *N. meningitidis* H44/76, 2. Células totales de *P. pastoris* MP36, 3. Opc-“monomérica” purificada, 4. Opc-“agregada” purificada.

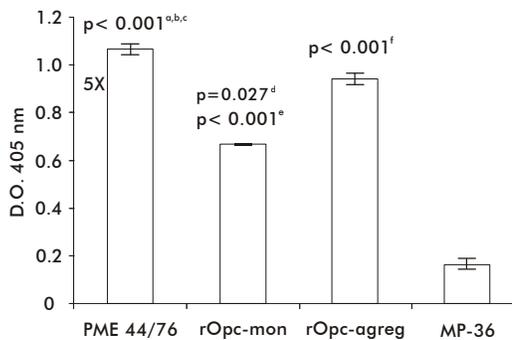


Figura 9. Reconocimiento de Opc, determinado por ELISA, contra PME *N. meningitidis* H 44/76. Anticuerpos generados después de la inmunización de ratones con: (1) PME de *N. meningitidis* H 44/76, (2) proteína Opc-“monomérica”, (3) proteína Opc-“agregada” y (4) *P.pastoris* MP-36. Dilución de los anticuerpos 1:1000. Se inmunizaron 10 ratones Balb/c por grupo. La significación estadística entre los valores se determinó según el ensayo t de rangos múltiples de Bonferroni. Para $p > 0,05$ (diferencias no significativas). a. diferencias entre PME 44/76 y Opc-“monomérica”, b. diferencias entre PME 44/76 y Opc-“agregada”, c. diferencias entre PME 44/76 y MP-36, d. diferencias entre Opc-“monomérica” y Opc-“agregada”, e.

hemaglutinina H₃ y la nucleoproteína N₂ del virus de influenza, de la cepa A/Sichuan/12/87 (H₃N₂).

Formación y caracterización de los complejos proteína-ADN

La interacción de Opc con pCMVb-gal y la formación de los complejos se estudió por cromatografía en geles de agarosa al 1%, visualizándolos por tinción con bromuro de etidio y azul de Coomassie [6].

De igual forma los complejos se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión, y se observó la formación de estructuras homogéneas empaquetadas con un tamaño que osciló entre 0.3-0.4 μ m [6].

Los complejos obtenidos fueron evaluados en experimentos de transfección *in vitro*. Las células COS-7 fueron transfectadas con estos complejos, detectándose posteriormente actividad de β -galactosidasa en 15-20 % de las células transfectadas con los complejos [6].

Inmunogenicidad de los complejos proteína-ADN

Después de la caracterización de los complejos, los mismos se emplearon en la inmunización de ratones

6. Musacchio A, Quintana D, Herrera A, Sandez B, Alvarez JC, Falcón V et al. Plasmid DNA-recombinant Opc protein complexes for nasal immunization. *Vaccine* 2001;19: 3692-9.

Tabla 2. Títulos bactericidas y opsonicos de los antisueros en estudio, contra *N. meningitidis* H44/76.

Antisueros	Títulos bactericidas ^a	Títulos opsonizantes ^b
1	10	9
2	7	6
3	10	8
4	< 2	< 3
Preimmune	< 2	< 3
mAb 154, D-11	8	> 9
mAb 144, H-3	< 2	< 3
mAb 189, C-4	10	> 9

^a Los títulos bactericidas se expresan como el Log₂ de la última dilución del suero capaz de matar el 50% del inóculo inicial de bacteria.

^b Los títulos opsonizantes se expresan como el Log₂ de la última dilución del suero donde el porcentaje de PMN en el estallido respiratorio es el doble con respecto a los controles utilizados en el ensayo. 1. Antisuero generado por PME de la cepa H44/76 de *N. meningitidis*, 2. Antisuero generado por Opc- "monomérica", 3. Antisuero generado por Opc- "agregada". 4. Antisuero generado contra el extracto de proteínas de la cepa MP-36. Como controles del experimento se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: mAb 154, D-11 contra Opc, mAb 144, H-3 contra una proteína ribosomal (control negativo), mAb 189, C-4 contra PorA (P1.16 como control positivo).

Balb/c, por vía intranasal. Se detectaron anticuerpos séricos específicos contra b-galactosidasa, de clase IgG, así como anticuerpos de clase IgA en los lavados pulmonares de los ratones inmunizados. De igual forma, se detectó respuesta linfoproliferativa específica contra la b-galactosidasa en los esplenocitos de los ratones inmunizados con estos complejos de Opc-ADN [6].

Caracterización de los complejos Opc-ADN(p1.17 HA y p1.18 NP)

La interacción de Opc con el ADN de los plásmidos p1.17 HA y p1.18 NP y la formación de los complejos se estudió por cromatografía en geles de agarosa al 1%. En estos estudios se definió la cantidad óptima de ambos componentes para la formación de dichos complejos.

Evaluación de la respuesta inmune

La generación de la respuesta inmune se estudió tras la inmunización de ratones Balb/c con 3 dosis de complejos Opc-ADN (p1.17 HA y p1.18 NP), por vía intranasal. Posteriormente, se suministró a los ratones una dosis de refuerzo con virus inactivado, con preparados vacunales que contenían en un caso la misma secuencia aminoacídica codificante para la nucleoproteína N₂ y en otro caso para hemaglutinina H₃. Se detectó una potente respuesta celular en los ratones sensibilizados con los complejos Opc-ADN, que recibieron una dosis de refuerzo con virus inactivado, no siendo así para los ratones inoculados solamente con la dosis de refuerzo de virus.

Una de las proteínas mayoritarias de la membrana externa de la bacteria *Neisseria meningitidis*, es Opc. Además, ésta forma parte de los antígenos presentes en las preparaciones vacunales contra la meningitis meningocócica. Después de la vacunación de individuos sanos con estos preparados se ha observado un aumento en los niveles de anticuerpos específicos contra Opc. Estos anticuerpos generados tras la inmunización fueron bactericidas contra meningococos que expresaban altos niveles de esta proteína. Esto permitió establecer una correlación lineal entre los títulos bactericidas y las unidades de IgG contra Opc, determinadas en los sueros estudiados. De igual forma, los anticuerpos contra esta proteína fueron detectados en individuos portadores de la bacteria y en pacientes con enfermedad meningocócica sistémica. Al suministrar estos preparados por vía intranasal, se observó que los individuos inmunizados desarrollaron también anticuerpos contra Opc, detectándose un aumento de los títulos bactericidas de los anticuerpos, de forma persistente, contra la cepa homóloga utilizada para la producción de la vacuna.

El gen *opc*, codificante para esta proteína, está ampliamente distribuido entre las cepas endémicas y epidémicas de la especie, aunque algunas cepas de

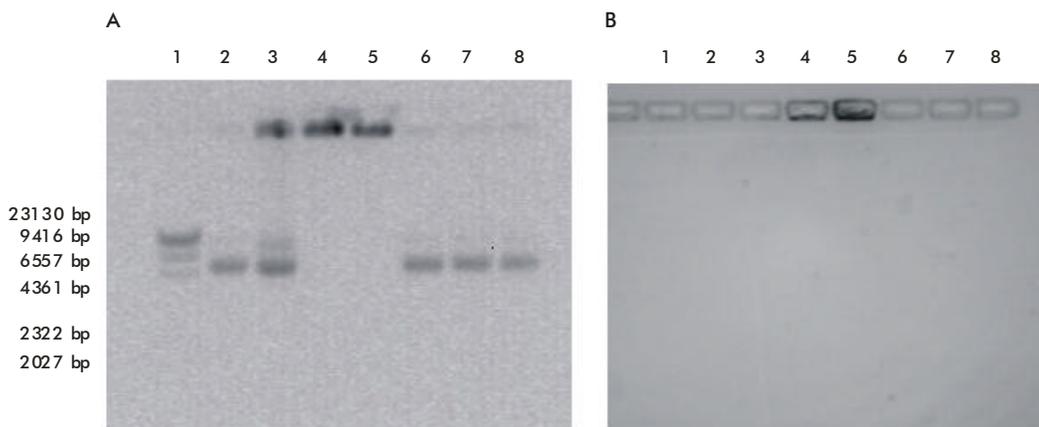


Figura 10. Gel de agarosa al 0,8% mostrando la formación de los complejos ADN-proteína, (A) visualizados con bromuro de etidio y (B) con azul de Coomassie. Líneas: 1. Marcador λ -ADN-Hind III, 2. ADN del plásmido pCMV β -gal, 3-5. Complejos ADN pCMV β -gal-proteína Opc en las relaciones 1:1, 1:2 y 1:10 (a pH 2,6), 6-8. Complejos ADN pCMV β -gal-proteína Opc en las relaciones 1:1, 1:2 y 1:10 (a pH 10,6).

ciertos clones epidémicos (complejo enzimático ET-37, "cluster" A4) y algunos aislamientos endémicos no poseen el gen.

Existen hechos que indican que Opc facilita la adhesión e invasión de *N. meningitidis* a células epiteliales y endoteliales a través del reconocimiento de receptores celulares específicos en el huésped, estas son: [1] la internalización de meningococos que no poseen cápsula ni pili y exhiben un LPS de bajo peso molecular, en cultivos primarios de células nasofaríngeas ha sido correlacionada con la expresión de Opc. [2] Las interacciones de meningococos no encapsulados con células endoteliales de vena del cordón umbilical (Huvecs) polarizadas se produce a través de la formación de complejos de compuestos séricos-Opc, los cuales reconocen a un receptor en estas células. Este pertenece a la familia de integrinas alfa V beta. Las células Huvecs no polarizadas parecen exponer receptores específicos que unen directamente los meningococos que expresan Opc. [3] El receptor de este antígeno en células epiteliales se corresponde con el proteoglicano sulfato de heparano. De ahí que este antígeno se comporte como una proteína de unión a heparina. Los meningococos que expresan Opc, explotan estos proteoglicanos en la superficie de las células, para ganar el acceso al interior de las células epiteliales.

En la División de Vacunas del CIGB se aisló previamente el gen *opc* que codifica para la proteína de membrana externa Opc a partir de ADN genómico de un aislamiento de *Neisseria meningitidis*, con vistas al empleo de la proteína recombinante como posible candidato vacunal contra la meningitis meningocócica.

Los altos niveles de expresión de la proteína recombinante Opc alcanzados en *Escherichia coli*, su proceso de purificación y la obtención de una molécula "funcional", después de su plegamiento *in vitro*, son los primeros resultados obtenidos a nivel internacional que demuestran la funcionalidad de este antígeno recombinante.

De igual forma es de alto nivel científico, en el mundo, la obtención de anticuerpos funcionales después de la inmunización de ratones con una proteína transmembránica de organismos Gram-negativos expresada en la levadura *Pichia pastoris*, con posibles fines vacunales.

Por otro lado, teniendo también en cuenta que en la actualidad existe una creciente demanda de proteínas portadoras que puedan ser empleadas en vacunas conjugadas o de otro tipo, y las funciones de este antígeno como mediador de la adhesión a células epiteliales y endoteliales, es novedoso el empleo de esta proteína en la potenciación de la respuesta inmune, generada por la inmunización intranasal con ADN de los plásmidos.

Agradecimiento

Los autores agradecen a Ricardo Silva Rodríguez, Evelin Caballero Menéndez, Belkis Sandez, María de Jesús Leal, Gerardo E. Guillén Nieto, María Elena Fernández de Cossío y Silian Cruz, su participación en la realización de este trabajo.

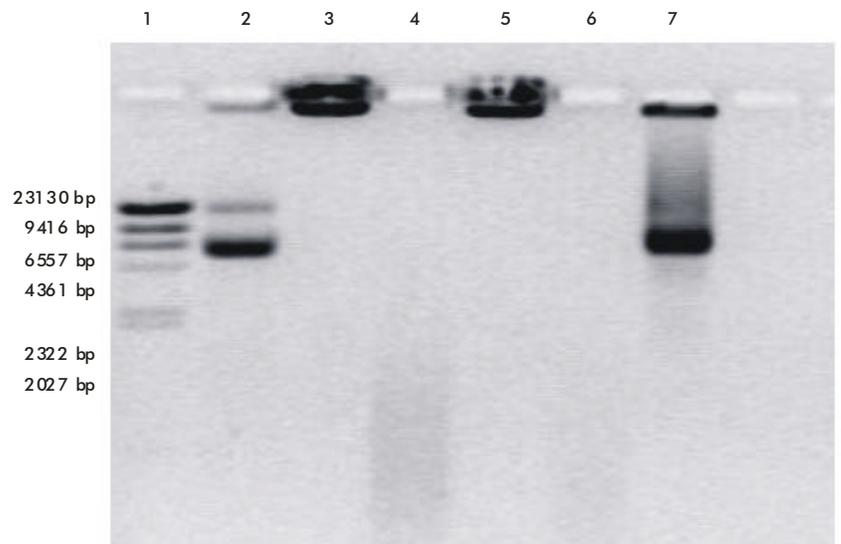


Figura 11. Tratamiento enzimático del plásmido pCMV β -gal y los complejos ADN pCMV β -gal-Opc con desoxirribonucleasa-I. Líneas: 1. Marcador λ -ADN-Hind III, 2. ADN plasmídico pCMV β -gal, 3. Complejo pCMV β -gal-Opc, 4. ADN pCMV β -gal después de tratamiento con desoxirribonucleasa-I, 5. Complejo pCMV β -gal-Opc después de tratamiento con desoxirribonucleasa-I y aplicado con 0,2 N NaOH en la solución de muestra, 6. ADN plasmídico pCMV β -gal después de tratamiento con desoxirribonucleasa-I y aplicado con 0,2 N NaOH en la solución de muestra, 7. Complejo pCMV β -gal -Opc después del tratamiento con desoxirribonucleasa I y aplicado con 0,2 N NaOH en la solución de muestra.

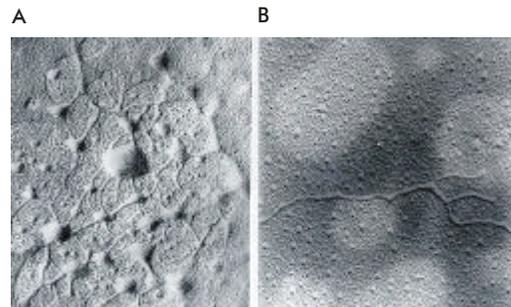


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, A. Complejos de ADN plasmídico pCMV β -gal - proteína Opc, B. ADN plasmídico pCMV β -gal.

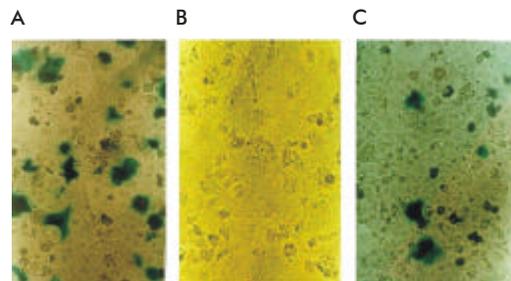


Figura 13. Detección de actividad β -galactosidasa en las células COS-7 transfectadas con: A. ADN plasmídico pCMV β -gal con - DEAE-Dextrana/DMSO, B. ADN plasmídico pCMV β -gal sin DEAE-Dextrana/DMSO, C. Complejos ADN plasmídico pCMV β -gal- proteína Opc sin DEAE-Dextrana/DMSO.