

6. PROTEÓMICA CLÍNICA APLICADA

Estudio de la interacción de las porinas PorA y PorB de *Neisseria* por incorporación en liposomas y “Blue Native Electrophoresis”

Abel AM, Sánchez S, Marzoa J, Criado MT, Ferreirós C.

Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. USC

Introducción

En *Neisseria meningitidis* las proteínas mayoritarias de la membrana externa, las porinas PorA y PorB, son los principales componentes de las actuales vacunas desarrolladas contra el meningococo de serogrupo B. Hasta la actualidad se ha establecido que ambas porinas poseen una estructura homotrimérica y que de forma minoritaria podrían estar formando heterotrimeros PorA/PorB. Esta hipótesis está basada en estudios con porinas recombinantes en los que únicamente se utiliza uno de los dos tipos de proteínas (Derrick, 1999). En este trabajo se utilizaron de manera conjunta las dos porinas recombinantes con el fin de estudiar la interacción entre ambas. El entorno de la membrana externa se simuló mediante su reconstitución e incorporación en liposomas y la caracterización de los complejos formados se llevó a cabo utilizando la denominada “Blue Native Electrophoresis” (Shägger y von Jagow, 1991).

Material y métodos

El clon de expresión de la porina recombinante PorA fue amablemente cedido por el grupo del Dr. Feavers del NIBSC, Reino Unido. La porina recombinante PorB fue cedida por el grupo del Dr. Gorringer de la HPA, Reino Unido.

- Expresión y purificación de las proteína recombinante PorA: las células transformadas de *Escherichia coli* conteniendo el plásmido de expresión se hicieron crecer en medio YTX2 con kanamicina. La expresión de la proteína se indujo añadiendo IPTG y se solubilizó con tampón de lisis (urea 8 M, NaH₂PO₄ 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e imidazol 20 mM) y posterior sonicación. Finalmente, la rPorA se purificó por IMAC (immobilised metal affinity chromatography) con una columna de Ni-NTA.

- Renaturalización de las proteínas recombinantes por incorporación en liposomas: las láminas lipídicas para la obtención de los liposomas se prepararon en un rotavapor a 25°C disolviendo en cloroformo L- α -fosfatidilcolina y colesterol, en una proporción de 7:2. La incorporación en los liposomas de la rPorA, de la rPorB o de ambas a la vez, se realizó disolviendo la lámina lipídica en HEPES 10 mM (pH 7.2) con octyl- β -D-glucopiranosido y la/s proteína/s a una concentración de 1 mg ml⁻¹. Las vesículas unilaminares se obtuvieron por diálisis frente a PBS con 0.0001% de timerosal y, posterior sonicación.
- Caracterización de los complejos de las porinas por electroforesis 2D BN/SDS-PAGE: la primera dimensión en “blue native electrophoresis” se llevó a cabo utilizando el sistema de geles NativePAGE™ Novex® Bis-Tris de Invitrogen. La muestra se preparó en Bis-Tris 50mM con ácido amino caproico 1M, dodecil-maltosido al 10% y Coomassie® G-250 al 5% y se cargó en geles con un gradiente de poliacrilamida del 3-12%. Tras el tratamiento a 85°C de la primera dimensión en tampón de muestra con DTT, la caracterización de los complejos se realizó en SDS-PAGE utilizando un gel del 10% y tinción con Coomassie.

Resultados

Los homocomplejos constituidos exclusivamente por la porina rPorA son complejos con tres movilidades electroforéticas y probablemente originados por la asociación de un número diferente de monómeros. De igual modo, la asociación de subunidades de la porina rPorB da lugar a homocomplejos con diferentes movilidades electroforéticas, pero en este caso son dos los tipos de homocomplejos

detectados. Sin embargo, cuando ambas porinas son utilizadas conjuntamente, únicamente se obtiene un tipo de complejo heteromérico (Figura 1).

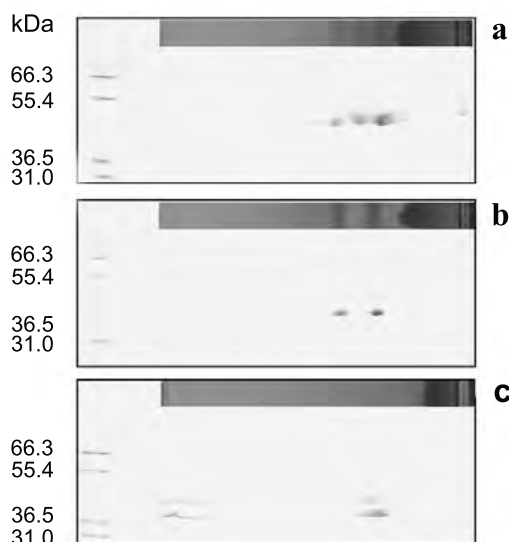


Figura 1. Análisis por 2D BN/SDS-PAGE de los complejos de porinas recombinantes de *Neisseria* incluidas en

liposomas. (a) Caracterización de homocomplejos de rPorA; (b) Caracterización de homocomplejos de rPorB; (c) Análisis de la interacción entre entre la rPoA y la rPorB. Encima de cada gel se muestra la correspondiente primera dimensión por “blue native electrophoresis”. Las imágenes se corresponden a tinciones con Comassie.

Conclusiones

El análisis por electroforesis 2D BN/SDS-PAGE de los complejos formados al incluir en liposomas los dos tipos de porinas de *Neisseria*, permitió comprobar que cuando ambas porinas están presentes en la membrana lipídica, éstas interaccionan para reorganizarse formando únicamente heterocomplejos PorA/PorB.

Bibliografía

Derrick J P, Urwin R, Suker J, Feavers IM, et al. 1999. *Infection and Immunity*. 67: 2406–2413.
 Shägger H and von Jagow G. 1991. *Analytical Biochemistry*. 199: 223-231.

El gen *NcGRA7* codifica el antígeno inmunodominante de 17-KDa de *Neospora caninum*

Álvarez-García G¹, Pitarch A², Fernández-García A¹, Zaballos A³, Gil C², Gómez-Bautista M¹, Aguado-Martínez A¹, Ortega-Mora L.M¹.

¹Grupo SALUVET. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain. ²Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n 28040-Madrid, Spain. ³Dpto. de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología. U.A.M. Campus de Cantoblanco. 28049. Madrid. Spain.

Introducción

La fracción antigénica de 17-19 kDa (p17) de *Neospora caninum* es el principal antígeno inmunodominante reconocido por sueros de bovinos infectados naturalmente con *N. caninum* en geles de poliacrilamida unidimensionales (SDS-PAGE) (Álvarez-García et al., 2002).

Material y métodos y resultados

Con el objetivo de identificar las proteínas que componen la fracción p17, en primer lugar, se

construyó una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* la cual, posteriormente, se enfrentó a un anticuerpo purificado por afinidad que reconocía la fracción p17 (APA17). Se aislaron varios clones de cDNA cuya secuencia presentó un 100% de identidad con el gen *NcGRA7* que codifica la proteína *NcGRA7* de 33 kDa (Lally et al., 1997). A continuación se realizó un abordaje proteómico en el cual se combinó la electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida (2D-PAGE), el western blot y la espectrometría de masas con la finalidad de caracterizar la fracción p17. Tanto el anticuerpo APA17 como los sueros