

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE QUIMERA RECOMBINANTE COMO ALVO VACINAL CONTRA *Acinetobacter baumannii*

SCARAFFUNI CABALLERO, PAMELA¹; SEIXAS NETO,AMILTON²; FREITAS,
STELLA³; DA SILVA PINTO, LUCIANO⁴; HARTWIG, DAIANE⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – pamelascaraffuni@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – stellafreitas@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – dmpluc@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* comprehende um grupo de bactérias Gram-negativas, coco-bacilos, catalase positivas, não móveis e não fermentáveis da família Moraxellaceae, ordem Gammaproteobacteria (PELEG et al., 2008; MARTINS, 2013). Dentro das espécies que o compõem, *Acinetobacter baumannii* é considerada a mais importante clinicamente (PELEG et al., 2008), devido à causa de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS) (SHEWEITA et al., 2019), e sua multirresistência a drogas.

Este patógeno causa pneumonia, bacteremia, meningite e infecções do trato urinário e tecidos moles (BOLOURCHI et al., 2019), apresentando maior incidência em indivíduos imunocomprometidos (EZE et al., 2018) e hospitalizados, totalizando cerca de 20% das infecções em unidades de terapia intensiva (UTI) no mundo (HASHEMZEHI et al., 2018; VALENTINE et al., 2008). Além disso, sua alta capacidade de sobrevivência em superfícies secas bióticas e abióticas, associado à rápida evolução de fatores de resistência, o tornam um patógeno crítico (HARDING et al., 2018; SINGH et al., 2016), contribuindo para a geração de cepas multirresistentes.

A terapia antibiótica é o principal tratamento contra infecções bacterianas, porém, este tem contribuído para a geração de novas cepas multirresistentes, o que dificulta o controle das doenças (SINGH et al., 2017). Os mecanismos de resistência a antibióticos juntamente com os fatores de virulência de *A. baumannii* contribuem para a maior proteção contra antibióticos, defesa imunológica do hospedeiro e condições do ambiente, tornando-os alvos antigênicos promissores (SINGH et al., 2017).

A vacinação mostra-se eficaz na prevenção de doenças infeciosas (LEI et al., 2019), assim como, em infecções multirresistentes ou pan-resistentes (HASHEMZEHI et al., 2018). Diversas pesquisas estão sendo conduzidas visando o desenvolvimento de uma vacina contra *A. baumannii*, e os antígenos usados nos estudos incluem células inteiras inativadas, componentes celulares, vesículas de membranas externas (OMVs), complexos de membrana (OMCs), polissacarídeos e proteínas de membrana externa (LEI et al., 2019; SHEWEITA et al., 2019). Alguns destes antígenos tem mostrado eficiência na proteção contra o desafio com *A. baumannii* virulento em modelos animais, porém, até o momento, nenhum estudo avançou para testes clínicos em humanos (LEI et al., 2019; PULIDO et al., 2020). O presente estudo visa a produção e avaliação de uma quimera recombinante combinando epítopes imunogênicos de duas proteínas fimbriais importantes na virulência de *A. baumannii*, para posterior uso como vacina recombinante.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepas e condições de cultivo: para a produção da quimera recombinante foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 Star (DE3). O preparo do cultivo foi realizado a 37°C em caldo Luria-Bertani (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1% de triptona) e ágar Luria-Bertani adicionando 2% de ágar ao caldo e adicionados 100 µg/mL de ampicilina ao preparo do cultivo.

2.2 Análises *in silico* e desenho da quimera: para a construção da quimera, foram realizadas análises *in silico* utilizando os programas de bioinformática e a sequência genômica de *A. baumannii* (WP_029423918.1) obtida do banco de dados GeneBank. Assim os epítopes imunogênicos das proteínas alvo foram identificados e foi realizada a construção da quimera recombinante. Posteriormente, a sequência nucleotídica da quimera foi enviada para síntese química e clonagem no vetor de expressão pAE na empresa Epoch Life Science (EUA).

2.3 Clonagem e expressão da quimera recombinante: a expressão da quimera recombinante foi realizada utilizando sistema de expressão *Escherichia coli*. O plasmídeo foi inserido através de transformação por choque térmico em células competentes de *E. coli* cepas BL21 (DE3) Star. Posteriormente, inóculo bacteriano foi realizado a partir de colônias transformadas crescidas em meio Luria Bertani (LB) acrescido do antibiótico seletivo ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C. Na expressão em larga escala foi realizado o inóculo em 500 mL meio LB acrescido de ampicilina até atingir uma densidade ótica $DO_{600} = 0,8$, sob agitação de 130 rpm a 37°C, onde, ao atingir a densidade ótica adequada, foi induzida a expressão com a adição de 0,5 mM de isopropil-β-1-D-tiogalactopiranósideo (IPTG) ao cultivo por 4h. A proteína expressa foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap sepharose (HP) carregada com níquel em AKTA Purifer 10 FPLC (GE), e sua quantificação foi realizada através do kit de BCA (Pierce, Thermo Scientific). Para confirmação da expressão e purificação da proteína recombinante foi realizada uma eletroforese de 2 géis de poliacrilamida SDS-PAGE, utilizando tampão de corrida 1× e um dos géis foi corado com *Comassie blue* e outro foi eletrotransferido e submetido a técnica de *Western blot* utilizando membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (GE Healthcare Life Science – Amersham Protran) para avaliar se a proteína é reconhecida pelo anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase diluído 1:5000 (Sigma-Aldrich), já que a quimera recombinante possui uma cauda composta por 6 histidinas em sua estrutura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a expressão da proteína recombinante, obteve-se sucesso na transformação por choque térmico. As colônias bacterianas cresceram no meio seletivo com ampicilina, evidenciando que elas continham o plasmídeo com gene de resistência ao antibiótico. A partir dessas colônias, a expressão em larga escala da proteína quimérica foi realizada permitindo sua purificação através de cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap sepharose (HP) carregada com níquel no equipamento AKTA Purifer 10 FPLC (GE). A expressão proteica foi analisada por SDS-PAGE demonstrando que a cultura bacteriana induzida apresentou a expressão da proteína adequadamente (Figura 1A). Dessa forma, a banda observada no gel

apresentou a massa molecular de ~54 kDa para a proteína quimérica e obteve-se um rendimento de 0,52 mg/L de proteína. Posteriormente, a proteína foi submetida a técnica de *Western blot* para confirmação da expressão com anticorpo anti-histidina (Figura 1B). Como controle positivo nos testes de SDS PAGE e *Western Blott* foi incluída uma proteína recombinante já caracterizada em nosso grupo de pesquisa, com massa molecular de ~34 kDa.

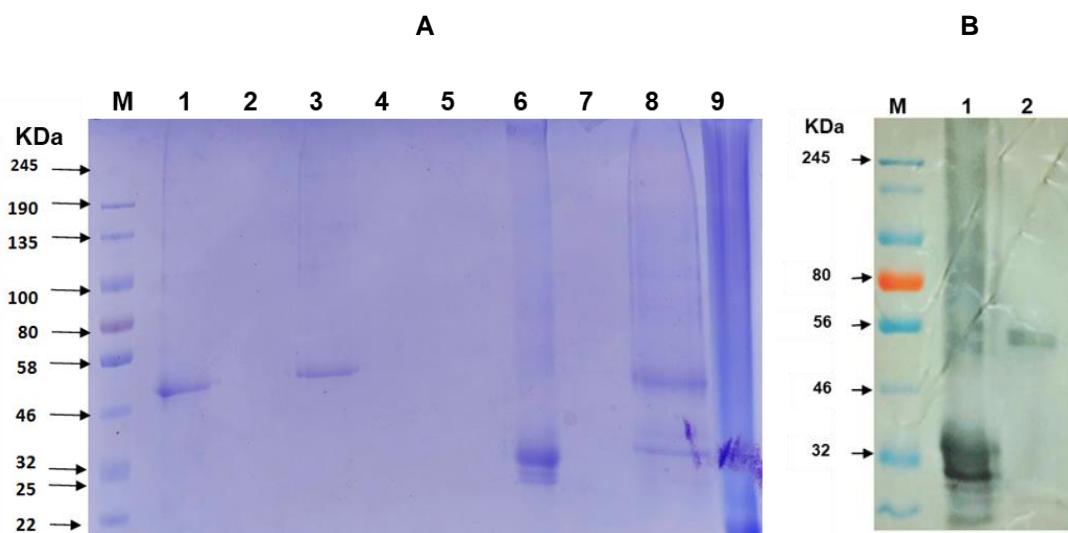


Figura 1– SDS-PAGE 12% para a avaliação da expressão e purificação da proteína quimérica (A). M- Marcador molecular Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England BioLabs, USA); 1 e 3 - expressão da quimera, porção insolúvel com ~54 kDa; 2, 4 e 5 - expressão da quimera, porção solúvel; 6 - proteína controle positivo de ~34 kDa; 9 - Flow do processo de purificação. *Western Blotting* para confirmação da proteína quimérica recombinante utilizando anticorpo anti-histidina (B). M- Macradora molecular Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England BioLabs, USA); 1- proteína controle positivo de ~34 kDa e 2 - proteína quimérica porção insolúvel com ~54 kDa.

4. CONCLUSÕES

Assim, conclui-se que houve sucesso no protocolo utilizado para construção, expressão e purificação da proteína quimérica. A proteína apareceu no SDS-PAGE e *Western blotting* com tamanho esperado. Esta quimera recombinante será avaliada posteriormente quanto a sua antigenicidade, utilizando soro de paciente infectado com *A. baumannii* e também quanto a sua imunogenicidade, em ensaios *in vivo*, para determinação de seu potencial como vacina frente à infecção por *A. baumanii*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLOURCHI, N. et al. Immunogenic reactivity of recombinant PKF and AbOmpA proteins as serum resistance factors against sepsis of *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Pathogen**, v. 131, p. 9-14, Jun 2019.
- EZE, E. C. et al. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 2277-2299, 2018.
- HARDING, C. M. et al. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91-102, Feb 2018.
- HASHEMZEHI, R. et al. Cloning and expression of nlpA gene as DNA vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii*. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 4, p. 395-401, Aug 2018.
- LEI, L. et al. DNA vaccine encoding OmpA and Pal from *Acinetobacter baumannii* efficiently protects mice against pulmonary infection. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 5, p. 5397-5408, Oct 2019.
- MARTINS AF, BARTH AL (2013) *Acinetobacter* multirresistente—um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica** 23:56–62.
- MUNOZ-PRICE LS, WEINSTEIN RA. *Acinetobacter* infection. **The New England Journal of Medicine**. 2008;358(12):1271-1281.
- PELEG, A. Y. et al. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-82, Jul 2008.
- PULIDO, M. R. et al. A lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. **Vaccine**, v. 38, n. 4, p. 719-724, Jan 22 2020.
- SHEWEITA, S. A. et al. A new strain of *Acinetobacter baumannii* and characterization of its ghost as a candidate vaccine. **Journal Infect Public Health**, v. 12, n. 6, p. 831-842, Nov - Dec 2019.
- SINGH, R. et al. Immunoprotective Efficacy of *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Protein, FilF, Predicted In silico as a Potential Vaccine Candidate. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 158, 2016.
- SINGH, R. et al. Immunoprotective potential of BamA, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12411, Sep 29 2017.
- VALENTINE, S. C. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2499-507, Aug 2008.