



PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CAM87009.1 DE *Acinetobacter baumannii*

THAYNÁ LANER CARDOSO¹; STELLA BUCHHORN DE FREITAS²; AMILTON
SEIXAS NETO³; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK⁴; MARTA GONÇALVES
AMARAL⁵; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stellafreitas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – martagamaral@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* é composto por bactérias Gram-negativas aeróbicas, catalase-positivas, imóveis e de morfologia característica de coccobacilos, sendo constituído por mais de 50 espécies, em sua maioria patogênicas (MARTINS; BARTH, 2013; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Este gênero apresenta 15 espécies de grande importância clínica, típicos patógenos oportunistas em humanos e dentre estas, *Acinetobacter baumannii* é a espécie melhor caracterizada, além de ser considerada a mais importante em aspectos clínicos e epidemiológicos (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

A. baumannii apresenta baixa virulência quando comparado a outros patógenos Gram-negativos. Entretanto, em função de sua elevada capacidade de adquirir mecanismos de resistência, tornou-se um importante patógeno associado a infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS) no mundo inteiro (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; MARTINS; BARTH, 2013). Dentre as manifestações clínicas causadas por esta bactéria, destacam-se pneumonias, septicemias, infecções no trato urinário, sepse, endocardites e meningites, sendo os indivíduos imunocomprometidos os mais acometidos (WAUTERS et al., 2015). Na grande maioria, esses casos de infecção são associados a internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), prolongando significativamente o tempo de permanência hospitalar dos pacientes (VIEIRA; PICOLI, 2015).

Uma das grandes preocupações atuais é o aumento da incidência de infecções causadas por cepas multidroga-resistentes (ISLER et al., 2019). Esta resistência tem diferentes origens, podendo ser intrínseca ou adquirida de outras cepas por meio de mecanismos genéticos (TURTON et al., 2006). Atualmente, os antibacterianos da classe dos carbapenêmicos são as drogas de escolha no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). Todavia, um elevado número de cepas tem sido identificadas como resistentes aos carbapenêmicos, tornando as opções terapêuticas limitadas e resultando em um grande problema de saúde pública (ALEKSIC SABO et al., 2020).

Diante da atual falta de antibacterianos efetivos, imunoterapias vêm sendo avaliadas como estratégias no controle desse patógeno. A imunoterapia pode ser utilizada no tratamento e na profilaxia de doenças, pois influencia o sistema imunológico. É, essencialmente, um reforço dos mecanismos de defesa próprios, podendo induzir imunidade de forma ativa, como no caso das vacinas, ou atuar de forma passiva, utilizando anticorpos pré-formados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O desenvolvimento de estratégias de imunoterapia tem focado em fatores de colonização e virulência, localizados na superfície bacteriana, como as proteínas de membrana externa que atuam na adesão as células do hospedeiro

(KWON et al., 2009). Em *A. baumannii*, diversos antígenos já foram identificados para o desenvolvimento de imunoterapias, dentre eles, proteínas fimbriais e adesinas, que são moléculas extracelulares relacionadas com os processos de adesão e início da colonização. CAM87009.1 é descrita como uma proteína hipotética fimbrial do tipo adesina, conservada dentro da espécie *A. baumannii*, não homóloga com proteínas humanas e apresenta um elevado potencial de adesão (NI et al., 2017). Contudo, ainda não foi avaliada quanto às suas propriedades antigênicas e imunogênicas *in vitro* e *in vivo*, demonstrando ser um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas e anticorpos para imunização passiva.

Diante disso, o presente estudo objetivou a produção desta proteína em sua versão recombinante e avaliou seu potencial antigênico através do reconhecimento por soro de humano naturalmente infectado, visando a futura aplicação desta proteína no desenvolvimento de estratégias de imunização passiva e ativa no controle de *A. baumannii*.

2. METODOLOGIA

Cepas e condições de cultivo: a cepa *Escherichia coli* BL21 Star (D3) foi utilizada neste estudo como maquinaria celular na produção heteróloga da proteína recombinante. A cepa foi estocada à -20 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 10% glicerol (v/v). O cultivo foi realizado à 37 °C em caldo Luria-Bertani (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl) e ágar LB (2% de ágar bacteriológico), com adição de 100 µg/mL de ampicilina, quando necessário.

Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante: o gene *cam87009.1* foi amplificado através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando DNA genômico da cepa padrão *A. baumannii* ATCC 19606 e os *primers* correspondentes (previamente desenhados). O gene foi clonado em vetor de expressão pAE após digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*II e ligação com T4 DNA ligase. O plasmídeo pAE contendo o gene foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 Star (DE3) por eletroporação. O cultivo transformado foi plaqueado em ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para triagem dos clones recombinantes. Após seleção de uma colônia recombinante, foi realizado um inóculo em 500 mL de caldo LB até atingir DO₆₀₀ = 0,8 sob agitação de 130 rpm à 37 °C. Ao atingir a densidade óptica adequada, a expressão foi induzida por 4h através da adição de 0,5 mM de isopropil-β-1-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao cultivo. As células foram separadas por centrifugação (7.000 x g, 4 °C, 15 min) e suspensas em tampão de lise contendo 1 mg/mL de lisozima. As células foram sonicadas, centrifugadas e alíquotas do *pellet* e do sobrenadante foram avaliadas para determinar a presença da proteína recombinante em sua forma solúvel ou insolúvel, aplicando protocolo específico para recuperação de proteína. A proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade, utilizando colunas HisTrap carregadas com níquel e a quantificação feita através de kit *BCA Protein Assay* (Pierce, USA). A confirmação da expressão da proteína recombinante foi feita através da técnica de *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-histidina.

Deteção de CAM87009.1 recombinante por soro de humano naturalmente infectado por *A. baumannii*: a proteína recombinante foi submetida a um SDS-PAGE 10% e, após a eletroforese, foi transferida para membrana de nitrocelulose (*overnight* à 30V). A membrana foi bloqueada com soro fetal bovino 1% (SFB) por 1h sob agitação (50 rpm), lavadas com PBS-T e um pool de soros coletados em diferentes dias de internação de um paciente foi adicionado na diluição. Após 1h

de agitação, o soro foi removido, a membrana foi lavada com PBS-T e anticorpos conjugados anti-IgG humanos foram adicionados na diluição 1:10.000 em PBS. A revelação foi realizada através da adição de solução substrato/cromógeno (6mg de diaminobenzidina, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris HCl pH 8,0 e 0,03% de peróxido de hidrogênio) para a visualização das bandas correspondentes ao tamanho da proteína.

3. RESULTADOS

Os *primers* desenhados e sintetizados para amplificação do gene que codifica para a proteína CAM87009.1, foram eficientes, amplificando o gene alvo a partir do DNA genômico da cepa padrão de *A. baumannii* ATCC 19606, no tamanho esperado de 1027 pb (Fig. 1).

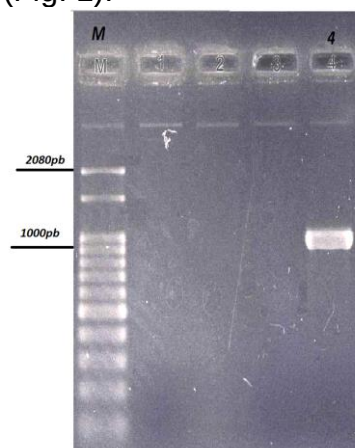


FIGURA 1: Amplificação do fragmento de 1027 pb referente ao gene *cam87009.1* de *A. baumannii*. (M) Marcador 100 pb (Ludwig); (4) fragmento correspondente ao gene *cam87009.1*.

O gene que codifica a proteína CAM87009.1 foi clonado com sucesso no vetor pAE e a proteína recombinante expressa, apresentando o tamanho esperado de 34 kDa. A confirmação da expressão se deu por WB, com o reconhecimento da proteína rCAM87009.1 pelo anticorpo anti-6xHis no tamanho esperado (Fig. 2A).

A proteína rCAM87009.1 mostrou-se antigênica reagindo com os anticorpos presentes no *pool* de soros coletados em diferentes dias de internação de um paciente naturalmente infectado por *A. baumannii* (Fig. 2B).

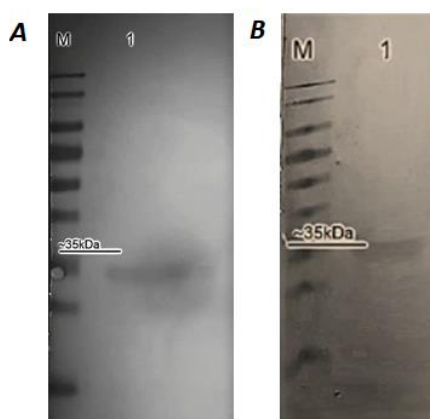


FIGURA 2: Avaliação da expressão e antigenicidade da proteína rCAM87009.1. (A) WB com anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (Sigma Aldrich); (B) WB com soro de paciente



infectado por *A. baumannii*; (M) Marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

4. CONCLUSÕES

A proteína rCAM87009.1 foi expressa e purificada com sucesso utilizando sistema de expressão heteróloga baseado *Escherichia coli*. A proteína rCAM87009.1 foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de paciente infectado por *A. baumannii*, indicando que a versão recombinante da proteína mantém os epítomos antigênicos da proteína nativa. Diante desses resultados, há evidências que a proteína rCAM87009.1 possui potencial no desenvolvimento de estratégias de imunização para controlar infecções por *A. baumannii*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. N., et al. Adhesion and Colonization. **Molecular Medical Microbiology**. Elsevier, 2015. p. 409-421.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2. **Elsevier Editora Ltda**, 2015.
- ALEKSIC SABO, V. et al. Anti-*Acinetobacter baumannii* activity of *Rumex crispus* L. And *Rumex sanguineus* L. extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2020.
- HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.
- ISLER, B. et al. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2019.
- KWON, S. O. et al. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. **FEMS Microbiology Letters**, 2009.
- MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, 2013b.
- NI, Z. et al. Antibiotic resistance determinant-focused *Acinetobacter baumannii* vaccine designed using reverse vaccinology. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, 2008.
- RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiologia**, 2018.
- TURTON, J. F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, 2006.
- VIEIRA, P.; PICOLI, S. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151–156, 2015.
- WAUTERS, G. et al. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 11th Edition. [s.l: s.n.].