Desenvolvimento e caracterização de proteínas quiméricas recombinantes multi-epítopos para uso no controle de *Acinetobacter baumannii*

BEATRIZ BATISTA BRITES[1]; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ[2]; AMILTON SEIXAS NETO[3]; DAIANE DRAWANZ HARTWIG[4]

[1]Universidade Federal de Pelotas – beatriz.batista.brites@gmail.com
[2]Universidade Federal de Pelotas – trotadeborah@gmail.com
[3]Universidade Federal de Pelotas - amiltonseixas@gmail.com
[4]Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista importante na causa de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) (ASIF et al., 2018). Sua resistência a múltiplos antibióticos e capacidade de sobreviver em ambientes hospitalares por períodos prolongados tornam o controle deste patógeno um grande desafio (PELEG et al., 2008). Os fatores de virulência de *A. baumannii*, como os associados à formação de biofilme e proteínas de membrana externa, contribuem para sua evasão do sistema imunológico, elevando os riscos à saúde humana (ROCA et al., 2012). O aumento alarmante da resistência antimicrobiana ressalta a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas.

Neste estudo propomos o uso de imunoinformática para identificar alvos terapêuticos e desenvolver proteínas quiméricas multi-epítopos, que possam induzir respostas imunológicas protetoras contra *A. baumannii* (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2016; CHEN et al., 2016). A abordagem envolve a identificação de epítopos candidatos, utilizando algoritmos e bancos de dados para prever as propriedades estruturais e funcionais das proteínas (RAPPUOLI et al., 2016; CHEN et al., 2018). A eficácia dessas proteínas depende de sua capacidade de gerar respostas imunológicas sem causar efeitos adversos, sendo crucial a análise *in silico* de antigenicidade, alergenicidade e toxicidade (AYYAGARI, 2023). Assim, esta pesquisa visa projetar e caracterizar duas proteínas quiméricas, para serem avaliadas futuramente como novas estratégias no controle de *A. baumannii.*

2. METODOLOGIA

2.1 Seleção de proteínas: os antígenos-alvo para a construção de quimeras multi-epítopos de *A. baumannii* foram selecionados com base em uma revisão abrangente da literatura científica. Proteínas com relevância clínica no processo de infecção do hospedeiro por *A. baumannii* foram especificamente escolhidas e as sequências foram recuperadas do banco de dados UniProt (https://www.uniprot.org/).

2.2 Predição de epítopos nas proteínas selecionadas: epítopos potenciais capazes de estimular respostas imunológicas foram preditos dentro das sequências de proteínas selecionadas usando os seguintes servidores: NetMHCpan v. 4.1, NetMHCIIpan v. 4.0 (REYNISSON et al., 2020) e BepiPred v. 3.0 (CLIFFORD et al., 2022).

2.3 Construção de quimera multi-epítopo: para construir a proteína multi-epítopo, todos os epítopos selecionados foram ligados usando conectores de poliglicina (GGGGG). Esses conectores foram escolhidos devido à sua flexibilidade e estabilidade, o que ajuda a manter a integridade estrutural da ligação proteína-

proteína (REDDY CHICHILI et al., 2013). O AlphaFold2 foi usado para prever a estrutura terciária das proteínas. A visualização e análise adicional das estruturas 3D preditas foram realizadas usando o PyMOL v2.5.0.

2.4 Avaliação da antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e propriedades físico-químicas: a antigenicidade das sequências de proteínas foi predita usando o servidor VaxiJen v. 2.0 (DOYTCHINOVA et al., 2007), com bactérias selecionadas como organismo alvo e um limiar de 0,5 estabelecido para determinar a potencial antigenicidade. A natureza não alergênica das quimeras foi avaliada usando o servidor AllerTOP v. 2.0 (DIMITROV et al., 2014). Para avaliar o potencial de toxicidade das sequências, foi utilizado o servidor ToxinPred2 (SHARMA et al., 2022). As propriedades físico-químicas das proteínas foram analisadas usando a ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005), que avaliou parâmetros como a média global de hidropatia (GRAVY), índice de instabilidade (II), meia-vida (HL), ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (MW). Além disso, a solubilidade das proteínas foi predita usando o programa SOLpro (MAGNAN et al., 2009).

2.5 Produção da quimera multi-epítopo: a produção do gene projetado *in silico* que codifica a quimera multi-epítopo foi feita por síntese química pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil). O gene quimérico foi clonado no vetor de expressão pET e transformado em células competentes de *Escherichia coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) por meio de choque térmico. As células transformadas foram cultivadas em 250 mL de caldo 2× *Yeast Extract Tryptone* (2YT) suplementado com canamicina. A cultura foi incubada a 37°C até atingir uma densidade óptica de 0,6-0,8, momento em que a expressão da proteína foi induzida com IPTG (1mM) e incubada por mais 4 horas. Após a indução, as células foram centrifugadas e lavadas com tampão de lavagem, sendo o pellet mantido a -20°C por 12 horas. Após este período o pellet foi suspenso em tampão de solubilização contendo lisozima e PMSF, seguido por incubação a 37°C por 1 hora e resfriamento em banho de gelo. A lise celular foi realizada por sonicação, e a fração solúvel foi separada por centrifugação. A porção insolúvel foi solubilizada com ureia e agitada por 16 horas a 4°C. Ambas as frações (solúvel e insolúvel) foram purificadas usando cromatografia de afinidade em colunas HisTrap FF carregadas com níquel. A fração insolúvel passou por diálise para redução de ureia, e a concentração proteica foi determinada pelo ensaio BCA. A proteína expressa foi armazenada a -20°C e analisada por SDS-PAGE, com confirmação da expressão por *DOT Blotting* (DB) e *Western Blotting* (WB) utilizando um anticorpo monoclonal anti-6×his (Sigma-Aldrich, EUA).

2.6 Avaliação da antigenicidade da proteína quimérica: a avaliação da antigenicidade da proteína quimérica foi feita por ensaio WB. Inicialmente, uma alíquota de 5 µL da quimera purificada foi carregada em um gel SDS-PAGE a 12% para separação das proteínas, seguida de transferência para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences) utilizando o sistema Trans-Blot Turbo™. A membrana foi bloqueada com uma solução de PBS e 5% de leite em pó por uma hora para evitar ligações inespecíficas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 16-18 horas com anticorpo monoclonal anti-6×His-tag (Sigma-Aldrich, EUA) em uma diluição de 1:5.000, sob agitação. As bandas de proteínas foram então visualizadas após lavagem com PBS 1× e incubação com uma solução cromogênica/substrato contendo diaminobenzidina, sulfato de níquel, Tris-HCl (pH 7,6) e peróxido de hidrogênio. O ensaio DB foi realizado para complementar a análise, utilizando a quimera purificada aplicada em membranas de nitrocelulose. Essas membranas foram secas, bloqueadas com PBS e 5% de

leite em pó, e incubadas individualmente com anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-6×His-tag (Sigma-Aldrich, EUA) a 1:5.000, soro de camundongo a 1:50, e soro humano a 1:50. Após uma incubação de 16-18 horas sob agitação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários específicos para humanos e camundongos, ambos conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA). A visualização das bandas de proteínas foi realizada com a mesma solução cromogênica/substrato utilizada no WB, confirmando a antigenicidade da quimera.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Predição de epítopos, design e construção das quimeras: foram selecionadas e incluídas neste estudo oito proteínas de *A. baumannii*, sendo elas: Ata, BauA, Bap, FhaC, BamA, Oxa-143, OmpA e Omp33-36. De cada uma dessas proteínas, um epítopo com tamanho variando de 21 a 153 aminoácidos foi selecionado e cada uma das quimeras foi desenhada contendo quatro destes epítopos. Os epítopos foram conectados usando três *linkers* flexíveis, cada um composto por cinco resíduos de glicina (GGGGG), para manter o espaçamento e a flexibilidade adequados entre os diferentes epítopos. Esse design garante uma apresentação de antígeno e um reconhecimento imunológico ótimos. A Quimera 1 contém os epítopos de Ata, BauA, Bap e FhaC, e a Quimera 2 contém os epítopos de BamA, Oxa-143, OmpA e Omp33-36.

3.2 Avaliação da antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e propriedades físico-químicas: as predições de antigenicidade para as quimeras 1 e 2 resultaram em escores de 0,7196 e 0,7074, respectivamente, indicando que essas proteínas são antigênicas e capazes de induzir uma resposta imunológica. Ambas as quimeras demonstraram propriedades não alergênicas, sugerindo que elas não induzem reações alérgicas ou respostas inflamatórias. Além disso, nenhuma região tóxica foi identificada nas sequências quiméricas, confirmando a segurança dessas construções. A Quimera 1 é composta por 424 aminoácidos e tem um peso molecular de 46 kDa, enquanto a Quimera 2 consiste em 442 aminoácidos e tem um peso molecular de 48 kDa. Os pontos isoelétricos (pI) de ambas as quimeras foram ácidos, com valores de 5,12 e 4,86, respectivamente. De acordo com DOYTCHINOVA et al. (2007), proteínas com um índice de instabilidade abaixo de 40 são consideradas estáveis. Assim, ambas as quimeras foram consideradas estáveis, com valores de índice de 33,43 para a Quimera 1 e 25,44 para a Quimera 2. A vida útil média estimada para ambas as quimeras foi de 30 horas. Os escores GRAVY foram negativos, -0,508 para a Quimera 1 e -0,432 para a Quimera 2, indicando que as 7 proteínas são hidrofílicas. O índice alifático, que é indicativo da estabilidade térmica da proteína, foi de 79,29 para a Quimera 1 e 76,83 para a Quimera 2. As predições de solubilidade usando o software SOLpro sugeriram que a Quimera 1 é solúvel, enquanto a Quimera 2 é insolúvel.

3.3 Produção, purificação e avaliação da antigenicidade das quimeras multi-epítopos: a expressão e purificação das quimeras usando *E. coli* como sistema heterólogo foram realizadas com sucesso, com a Quimera 1 e a Quimera 2 sendo expressas em forma insolúvel. Após a purificação, a concentração da Quimera 1 foi de 506,7 ng/µL, enquanto a Quimera 2 teve uma concentração de 584,8 ng/µL. A expressão das proteínas quiméricas foi confirmada pelo ensaio de WB usando anticorpos anti-histidina, revelando bandas correspondentes às massas moleculares previstas de 46 kDa para a Quimera 1 e 48 kDa para a Quimera 2. Além disso, os ensaios de DB confirmaram a capacidade das quimeras

serem reconhecidas por anticorpos presentes no soro de humanos e de camundongos infectados por *A. baumannii*.

4. CONCLUSÕES

As descobertas deste estudo têm implicações significativas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra *A. baumannii*. As quimeras multi-epítopos projetadas e validadas aqui representam uma abordagem promissora para induzir uma resposta imunológica ampla e eficaz contra esse patógeno. A integração de técnicas de bioinformática e biologia molecular destaca o potencial dos métodos *in silico* para acelerar o desenvolvimento de novas terapias, reduzindo custos e tempo associados aos métodos tradicionais. Estudos futuros devem se concentrar em avaliações *in vivo* dessas quimeras para confirmar sua eficácia e segurança em um contexto biológico. A abordagem descrita neste estudo pode ser estendida a outros patógenos, fornecendo um modelo para o desenvolvimento rápido de vacinas e soros eficazes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1249–1260, 2018.

AYYAGARI, V. S. Design of linear B cell epitopes and evaluation of their antigenicity, allergenicity, and toxicity: An immunoinformatics approach. Em: C**omputational Vaccine Design**. New York, NY: Springer US, 2023. p. 197–209.

CHEN, C. et al. Designing, expression and immunological characterization of a chimeric protein of *Mycoplasma pneumoniae*. **Protein and peptide letters**, v. 23, n. 7, p. 592– 596, 2016.

CLIFFORD, J. N. et al. BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 31, n. 12, 2022.

DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens**. Journal of molecular modeling,** v. 20, n. 6, 2014.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, 2007.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

RAPPUOLI, R. et al. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. **The journal of experimental medicine**, v. 213, n. 4, p. 469–481, 2016.

REDDY CHICHILI, V. P.; KUMAR, V.; SIVARAMAN, J. Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 22, n. 2, p. 153–167, 2013.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W449–W454, 2020.

ROCA, I. et al. ***The Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace**., [s.d.]. Disponível em: <https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/138641/1/628329.pd>

SHARMA, N. et al. ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins. **Briefings in bioinformatics**, v. 23, n. 5, 2022.

THE UNIPROT CONSORTIUM et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic acids research,** v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021.