

BIO 05 - Clonagem, expressão e purificação do domínio externo da proteína de membrana externa A (OmpAExt) de *Acinetobacter baumannii*

Anna Erika Vieira de Araújo^{1*}; Geiseane da Conceição Corrêa¹; Marcele da Silva Tamara¹; Haroldo Cid da Silva Junior¹; José Procópio Moreno Senna¹.

¹ Bio-Manguinhos / Fiocruz.

Introdução:

Acinetobacter baumannii é um patógeno nosocomial oportunista presente mundialmente, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo e de difícil eliminação do ambiente hospitalar. A crescente multirresistência deste patógeno limita a terapêutica e abre espaço para a busca de novos tratamentos. Trabalhos anteriores mostram que a proteína de membrana externa A (OmpA) possui alta imunogenicidade, porém dada a sua natureza estrutural, apenas uma parte desta proteína está acessível externamente. Ao direcionar a resposta imune a um alvo mais específico é esperado um aumento na eficiência desta resposta, já que todos os anticorpos gerados serão direcionados para epítomos presentes na porção exposta da proteína, aprimorando a resposta imune para o uso em imunoterapias.

Objetivo:

Clonar, expressar e purificar o domínio externo da OmpA (rOmpAExt).

Metodologia:

A partir da análise computacional da estrutura da OmpA foi isolada uma sequência parcial de 303 bp, correspondente a estruturas externas à membrana. Este gene foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e clonada no vetor pET28a. Após a análise de sequenciamento dos clones obtidos, os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar cepas de *Escherichia coli* BL-21 (DE3). Para expressão, as células foram cultivadas em meio LB a 37 °C, diminuindo a temperatura para 30 °C durante a indução com IPTG na fase exponencial de cultivo. As células foram recuperadas, lisadas por sonicação e a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Ensaios de ELISA e Western Blot foram realizados a fim de analisar a antigenicidade de rOmpAext frente ao soro policlonal anti-rOmpA produzido anteriormente em camundongos.

Resultado:

As análises por SDS-PAGE mostraram a expressão de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, sendo que boa parte desta foi expressa na forma solúvel. Após a etapa de purificação, foi possível obter uma fração da proteína de interesse com homogeneidade aceitável. Os imunoenaios demonstraram que o fragmento rOmpAExt foi reconhecido por anticorpos anti-rOmpA.

Conclusão:

Este estudo mostrou que foi possível obter a proteína recombinante referente à parte externa da OmpA de *A. baumannii*. A rOmpAExt foi obtida de forma solúvel a partir da expressão em *Escherichia coli* e ainda foi identificada pelos anticorpos policlonais anti-rOmpA, demonstrando que essa região deve possuir epítomos imunogênicos. Anticorpos capazes de se ligar a essa proteína rOmpAExt devem ter a habilidade de reconhecer o patógeno de forma íntegra, pois significa que se ligarão à superfície bacteriana, diferentemente de sua forma não modificada (rOmpA) que possui diversos epítomos imunogênicos que não estão expostos. Esta proteína pode servir como ferramenta para a obtenção de anticorpos monoclonais, ou no desenvolvimento de vacinas contra este patógeno.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; proteína recombinante; imunoterapias