

B5. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO TRANSGLICOSILASE DA PBP2 DE *Staphylococcus aureus*.

Amanda Maria Nunes Peres¹; Ana Paula Corrêa Argondizzo¹; Anna Erika Vieira de Araujo¹; Mariana Tardelli Garcia Miguez¹; José Procópio Moreno Senna¹.

¹ Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Tecnologia Recombinante.

INTRODUÇÃO *Staphylococcus aureus* é uma bactéria grampositiva comumente encontrada na superfície da pele e trato respiratório superior. Infecções comunitárias e hospitalares causadas por *S. aureus* têm aumentado e seu tratamento dificultado devido ao surgimento de cepas resistentes, como MRSA. Proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) são enzimas essenciais na biossíntese do peptidoglicano. Somente encontradas em bactérias, estas macromoléculas são consideradas um excelente alvo para o desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle bacteriano. *S. aureus* possui 4 PBPs e apenas a PBP2 apresenta atividade de transglicosilação, sendo um bom modelo para avaliar se o bloqueio deste domínio poderia levar à inviabilidade funcional bacteriana.

OBJETIVO Clonar, expressar e purificar a região transglicosilase da PBP2 de *S. aureus*.

METODOLOGIA A sequência nucleotídica do gene que codifica o domínio transglicosilase da proteína PBP2 de *S. aureus* e dos aminoácidos que o constituem foi consultada no GenBank. Análises *in silico* foram realizadas para avaliar estrutura 3D e regiões transmembranares. O ADN total da cepa sensível à metilicina (MSSA) ATCC25923 foi extraído, o gene codificante da PBP2T amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pET100-D/TOPO. Os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* TOP10, extraídos e os clones recombinantes confirmados por PCR e sequenciamento nucleotídico. Para a expressão, células de *E. coli* BL21 (DE3) *Star* contendo o plasmídeo recombinante foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM) e cultivadas em diferentes temperaturas após a indução (19, 23, 30 e 37°C). Corpos de inclusão foram lisados por sonicação em tampão contendo uréia, e a PBP2T foi purificada por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC). O *refolding* da proteína foi realizado através de diálise em PBS, empregando concentrações decrescentes de uréia e aditivos para permitir sua solubilização e estabilização.

RESULTADOS O gene codificante para a proteína PBP2T foi amplificado e clonado no vetor pET100-D/TOPO e a proteína recombinante expressa em *E. coli* BL21 (DE3) Star. Nenhuma das condições testadas foi capaz de aumentar a solubilidade protéica, sendo a proteína expressa na forma de corpos de inclusão. Para solubilizar a PBP2T empregou-se o agente desnaturante uréia a 5M. A PBP2T foi purificada em gradiente linear de 5 a 500 mM de imidazol, sendo a proteína eluída em torno de 120 a 200 mM de imidazol. O *refolding* foi realizado através de diálise em PBS, gradiente decrescente de uréia e utilização de aditivos como sacarose e glicerol; no entanto a maior parte da proteína precipitou nesta etapa.

CONCLUSÃO O presente estudo demonstrou que foi possível expressar e purificar a proteína recombinante PBP2T. Entretanto, dada a intensa precipitação durante a etapa de *refolding*, diferentes aditivos (detergentes, açúcares, sais) devem ser testados a fim de estabelecer um correto reenovelamento proteico após a retirada do agente caotrópico.

PALAVRAS-CHAVE *Staphylococcus aureus*, MRSA, PBP2, domínio transglicosilase.