

GABRIEL SOARES GUERRA

**Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC
utilizando anticorpos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Balan

Versão Original

RESUMO

GUERRA, G. S. **Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC utilizando anticorpos** 2019. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP Binding Cassette*), estão entre os principais complexos proteicos responsáveis pelo fluxo de moléculas contra um gradiente de concentração pela membrana plasmática. As funções atribuídas à esta família proteica vão desde o transporte *per se*, como nutrição, virulência, patogênese até resistência à drogas, em procariotos e eucariotos. Devido à pluralidade de funções, tais complexos têm sido alvo de extensos estudos para a compreensão do seu papel, funcional e estrutural, nos mecanismos de resistência. Transportadores ABC do tipo importadores, presentes somente em procariotos, são constituídos de duas permeases formadoras de um poro na membrana, duas ATPases que fornecem energia para a quebra do ATP e um componente adicional quando comparado aos exportadores, que é uma proteína ligadora de substrato responsável pela captura e entrega do substrato a ser transportado nas permeases na membrana. Esta interação é essencial e fundamental para a especificidade e velocidade do transporte, além de induzir mudanças conformacionais que ativam o transporte. Sem a interação da proteína ligadora, não há transporte. Baseados neste dado e no fato que importadores estão presentes somente em procariotos, este projeto visa definir um modelo de inibição desses sistemas baseado na produção de anticorpos contra diferentes transportadores ABC das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de forma a bloquear a interação entre permeases e proteínas ligadoras de substrato. Para tal, regiões de permeases que devem interagir com as proteínas ligadoras foram expressas utilizando o sistema *Rad Display* para posterior produção de anticorpos contra as mesmas. Neste sistema, as sequências de interesse foram extensivamente analisadas por bioinformática e posteriormente clonadas no interior do gene *radA* de *Pyrococcus furiosus*, sendo expressas como proteínas quiméricas sempre solúveis. As proteínas, doravante denominadas “RAD-loops”, foram então purificadas por meio de cromatografia de troca catiônica seguida de exclusão molecular e usadas para produção de anticorpos. Ensaios de ELISA indireto foram realizados para determinar o título de anticorpos nos soros de animais imunizados com as proteínas Rad+loop e, posteriormente, uma série de ensaios incluindo *western blotting*, *whole cell elisa* e imunofluorescência caracterizaram a interação dos anticorpos com seus respectivos alvos ABC. Por fim, foi realizado ensaio de inibição utilizando meio mínimo de crescimento na presença das igGs para determinar a influência das mesmas no crescimento bacteriano. Os resultados apresentados neste trabalho são de grande importância uma vez que são inéditos devido ao uso de permeases como alvo para inibição de ABCs, o que será extremamente relevante para o desenvolvimento de novas estratégias que visem bloquear ação desses complexos proteicos vitais para a manutenção da homeostase celular e vastamente disseminados tanto em procariotos como eucariotos.

Palavras chave: Transportadores ABC. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Inibição mediada por anticorpos. Proteína de membrana.

ABSTRACT

GUERRA, G. S. **Development of an inhibition strategy for ABC transporters utilizing antibodies.** 2019. 92 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ABC transporters (*ABC binding cassette*) are among the main protein complexes responsible for the traffic of molecules against a concentration gradient across the plasmatic membrane. The roles given to this protein family go from transport itself to nutrition, virulence, pathogenesis and even drug resistance, in prokaryotic and eukaryotic organisms. Due to its plurality of functions, they have been targets for several studies aiming the comprehension of its role, functional and structural, regarding the resistance mechanisms. ABC transporters from the importação class, which are found only in prokaryotic organisms, are formed by two permease proteins that together create a pore in the membrane, two ATPase proteins that give the necessary energy for the ATP breakdown and an additional component when compared to ABC exporters, which is a substrate binding protein responsible for the capture and delivery of the substrate to be transported by the permeases in the membrane. This interaction is essential and fundamental for the velocity and specificity of the transport, aside the fact that it induces conformational changes in the whole system that allows it to work properly. Without the interaction of the binding protein, there is no transport. Based in this assumption and on the fact that ABC importação are present only in prokaryotic organisms, this project aims to define a model of inhibition of this systems based on antibodies production against different ABC transporters from the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in a way that blocks the interaction between the permeases and the substrate binding proteins. For this purpose, permease regions which are supposed to interact with the binding proteins were expressed utilizing the *RAD display* system and then used to produce antibodies against them. In this system, the interest sequences were extensively analyzed by bioinformatics and afterwards cloned inside the gene *radA* from *Pyrococcus furiosus*, being expressed as chimeric proteins, always exposed and soluble. The proteins now called "pRAD-loops" were then purified utilizing ion exchange chromatography and size exclusion chromatography and used for antibody production. Indirect ELISA assays were performed to determine the antibody titer in the serum of animals immunized with the Rad+loop proteins and afterward a series of assays including *western blotting*, *whole cell elisa* and immunofluorescence characterized the interaction between the antibodies with their respective ABC targets. Finally, it was performed an inhibition assay utilizing minimum media of growth on the presence of the IgGs. The results presented in this work are of great importance considering that it is the first the permeases are used as targets of ABCs inhibition, what is extremely relevant for the development of new strategies that aim blocking the action of these protein complexes vital for the cellular homeostasis and vastly disseminated among prokaryotes and eukaryotes.

Key words: ABC transporters. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Antibody mediated inhibition. Membrane protein.

INTRODUÇÃO

Os transportadores ABC (Do inglês ATP Binding Cassette) estão entre um dos mais importantes grupos protéicos responsáveis por importar e exportar pela membrana plasmática de células procarióticas e eucarióticas uma grande variedade de solutos, contra um gradiente de concentração. O transporte ativo de substâncias requer uma fonte de energia livre para o funcionamento dos transportadores, e se tratando dos transportadores ABC, a energia é obtida por meio da hidrólise de ATP que ocorre no domínio intracelular. Acoplada ao domínio transmembrana do transportador, a energia fornecida pelo fosfato liberado é capaz de desencadear a mudança conformacional do domínio transmembrana, permitindo assim o transporte de soluto para o interior ou exterior da célula (OLDHAM; CHEN, 2011).

Por conta das diversas funções relacionadas aos transportadores na manutenção do metabolismo celular não é surpreendente que cerca de 4 a 5% do genoma de *Escherichia coli* codifique proteínas destes transportadores (LOCHER, 2004). Dessa forma, torna-se cada vez mais interessante o estudo dos mais diversos tipos de transportadores ABC e de eventos celulares relacionados aos mesmos como os fenômenos de virulência, patogenicidade e resistência á drogas mediada pelos mesmos. Transportadores do tipo importadores, presentes somente em procariotos, apresentam um componente adicional quando comparados com exportadores, que é a proteína ligadora de substrato, SBP (Substrate Binding Protein), estando a mesma difusa de forma livre no periplasma de células gram negativas e ancorada á membrana plasmática em gram positivas.

A SBP tem como função específica conferir afinidade e especificidade ao sistema de transporte, o qual é induzido somente após a interação desta com as permeases na membrana. Vários transportadores do tipo importadores têm sido relacionados como essenciais para o crescimento e infecção bacterianas de forma que se tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de inibidores (GARMORY; TITBALL, 2004). No caso de exportadores, o fenômeno de resistência múltipla a drogas (MDR, do inglês Multiple Drug Resistance) é intimamente ligado aos mesmos que funcionam como bombas de efluxo de antibióticos e outras drogas, tanto em procariotos

como em eucariotos (LUBELSKI; KONINGS; DRIESSEN, 2007).

Uma forma de bloqueio ou inativação destes transportadores pode atenuar o crescimento bacteriano ou até reverter os efeitos da resistência à antibióticos ou drogas. Adicionalmente, dado que os domínios transmembrana são os que apresentam maior diversidade entre ortólogos, é possível que, se usados como alvo, a inibição seja feita de forma específica, com alvos direcionados para um ou poucos tipos de transportadores.

Este trabalho propõe o desenvolvimento de uma estratégia de bloqueio de transportadores ABC utilizando anticorpos cujos epítomos sejam as regiões das permeases expostas ao ambiente periplasmático ou extracelular. Desta forma, ao se ligarem às regiões alvo explicitamente formadoras do poro de passagem, os anticorpos seriam capazes de bloquear a saída ou entrada de moléculas. Para contornar o problema da expressão de proteínas de membrana, e devido à alta solubilidade e facilidade para a purificação, escolhemos a técnica *RAD Display* para a produção de proteínas quiméricas compostas por fragmentos das permeases de interesse em associação à proteína RadA, uma recombinase de *Pyrococcus furiosus* que apresenta alta estabilidade térmica (LAU et al., 2014; ROSSMANN et al., 2017). A metodologia de clonagem no sistema *RAD Display* é baseada no protocolo independente de ligase LIC, (Ligase Independente Cloning) (ASLANIDIS; DE JONG, 1990), o que gera resultados mais rápidos e menos onerosos.

Como alvo, escolhemos transportadores de duas bactérias com envoltório diferenciado: primeiramente a bactéria *E. coli*, gram negativa, pela facilidade de crescimento e utilização para expressão de proteínas heterólogas, bem como por ser a espécie que têm o maior número de componentes de transportadores com estrutura resolvida e estudados funcionalmente. Dentre os ABCs presentes em *E. coli*, escolhemos os complexos importadores relacionados ao transporte de maltose (KHARE et al., 2009), molibdato (GERBER et al., 2008) e vitamina B12 (HVORUP et al., 2007). Também foi usada como alvo a gram positiva *Staphylococcus aureus* por ser um problema central na resistência à antibióticos e disseminação de infecções nosocomiais em todo o mundo, além de ser a portadora do exportador Sav1866, um complexo intimamente relacionado à MDR que já

teve sua estrutura resolvida (DAWSON; LOCHER, 2007; OTTO; GÖTZ, 2001). Espera-se o bloqueio estérico das regiões das permeases da membrana, que são expostas à região externa impedindo a ligação da proteína periplasmática no caso de importadores, e impedindo o efluxo de drogas no caso de exportadores, bloqueando o transporte como um todo.

A inativação de transportadores ABC por meio de anticorpos contra a SBP é amplamente utilizada (TANAKA et al., 2018) e já foi recentemente reportada pelo nosso grupo, mostrando resultados promissores (FERREIRA et al., 2016). Contudo, na abordagem atual temos como alvo as permeases, de forma que o sucesso obtido neste trabalho poderia abrir a perspectiva de utilização para o bloqueio de transportadores do tipo exportador também, além de abrir margem para o desenvolvimento de metodologias alternativas de alta eficiência na inibição de ABCs.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de vacinas utilizando os transportadores ABC do tipo importadores tem, especificamente, focado nas SBPs como os alvos primários (TANAKA et al., 2018). Estudos envolvendo SBPs de diversos organismos como *Yersinia pestis* (TANABE et al., 2006), *Moraxella catarrhalis* (YANG; JOHNSON; MURPHY, 2011), *S. aureus* (YANG et al., 2016) dentre outros, mostram alta imunogenicidade das mesmas, além de conferirem proteção quando usadas em imunizações *in vivo*. Todavia, o uso de alvos alternativos às proteínas periplasmáticas, como as permeases, é pouco explorado para essa finalidade, principalmente devido à difícil obtenção dessas proteínas para estudos, por se tratarem de proteínas de membrana, e também, por sua imunogenicidade questionável.

Apesar de não serem complexos proteicos presentes na superfície celular, componentes de transportadores ABC têm sido apresentados com alta imunogenicidade. A ATPase do transportador ABC que apresenta alta homologia com o exportador YkpA de *Bacillus subtilis* tem sido descrita como a proteína mais imunogênica em soros de pacientes acometidos por sepse devido à infecção de cepas de *S. aureus* resistente à meticiclina EMRSA-15. Anticorpos direcionando especificamente aos epítomos dessa ATPase quando utilizados

em modelo murino de infecção resultaram, inclusive, em decaimento logarítmico no número de CFUs contabilizadas para colonização do baço, fígado e rim dos animais (BURNIE et al., 2000).

Em outro estudo, soro colhido de coelhos infectados com *Y. pestis* mostrou reatividade contra à proteína SBP do importador de oligopeptídeos OppA, evidenciando a imunogenicidade dessa proteína. Em estudos em camundongos infectados com *Y. pestis* previamente imunizados com anticorpos anti-OppA recombinante houve um aumento da sobrevivência dos animais em teste de desafio sendo proposto que o bloqueio da SBP inviabilizou o ABC e comprometeu a patogênese (TANABE et al., 2006).

Neste trabalho, mostramos uma eficiente alternativa para a expressão das proteínas de membrana completas, que foi o uso da técnica *RAD display* (ROSSMANN et al., 2017). Essa metodologia possibilita a fácil produção de epítopos para obtenção de anticorpos contra regiões específicas de proteínas, com sucesso. Outro ponto interessante que vale a pena ressaltar, é a baixa imunogenicidade apresentada pela proteína *Rad Scaffold*, permitindo que as respostas sejam essencialmente decorrentes da presença de epítopos

As análises de bioinformática se mostraram muito eficazes na escolha dos *loops* alvo, uma vez que os mesmos puderam ser reconhecidos posteriormente pelos anticorpos em ensaios de *Western Blot*, WCE e imunofluorescência na maior parte dos casos. Adicionalmente, os resultados de imunofluorescência foram determinantes, ao passo que mostraram experimentalmente serem mais eficientes e confiáveis para demonstrar a formação do complexo anticorpo-epítipo em células não lisadas do que os obtidos nos ensaios de WCE.

Diferentemente do que foi reportado no estudo de Yang, Johnson e Murphy (2011) em que a SBP periplasmática do transportador de peptídeos OppA do gram negativo *M. catarrhalis* foi anotada como acessível aos anticorpos por meio de WCE, o presente trabalho mostra, por meio dos resultados de imunofluorescência, que a membrana externa foi, de fato, uma barreira eficaz para minar a chegada do anticorpo ao seu alvo. A ligação dos anticorpos aos respectivos epítopos só foi possível em *E. coli* quando auxiliada pelo uso de detergente que permeabilizou a membrana, demonstrando a ineficiência funcional de anticorpos produzidos contra regiões periplasmáticas de permeases de microrganismos gram negativos tendo esse organismo como modelo.

Durante o crescimento da bactéria gram positiva *S. aureus* em meio mínimo suplementado somente com maltose como fonte de carbono, em contato com anticorpos direcionados contra a região periplasmática das permeases do transportador ABC responsável pela importação desse açúcar, notou-se uma diferença discreta no crescimento bacteriano em meio em que os anticorpos foram inoculados. Essa diferença reflete o número de CFUs contabilizados em curto prazo. Esse resultado sugere fortemente que os anticorpos sejam os responsáveis pela diminuição no número de CFUs, provavelmente, como esperado, por meio do impedimento estérico à importação de açúcar. Por outro lado, evidenciamos que o título dos anticorpos provavelmente não acompanha a velocidade com que as células se propagam.

Curiosamente, em estudo semelhante utilizando anticorpos produzidos contra as SBPs PiaA e PiuA do transportador de ferro de *Streptococcus pneumoniae*, que mostraram proteção *in vivo* contra a infecção desse patógeno (BROWN et al., 2001), demonstrou-se que os anticorpos não foram capazes de afetar o crescimento da bactéria *in vitro*, em meio mínimo em restrição de ferro. O mecanismo de proteção reportado *in vivo* é a opsonofagocitose mediada pelas IgGs anti-PiuA e anti-PiaA (JOMAA et al., 2005). A opsonofagocitose também é apontada como o mecanismo de ação de anticorpos contra a SBP MntC do importador de manganês de *S. aureus* em ensaios *in vivo* (YANG et al., 2016).

MntC já foi usada em combinação com outras proteínas na vacina multi-antigênica SA4Ag contra *S. aureus*, que obteve sucesso em ensaios clínicos de fase 1 e 2. A vacina se mostrou-se segura para manipulação e indutora de produção de resposta imune eficaz em indivíduos saudáveis adultos, sobretudo por meio dos efeitos opsonofagocíticos dos anticorpos (BEGIER et al., 2017). Atualmente, um ensaio de fase 2B vem sendo conduzido para analisar a eficiência dessa vacina no combate ao *S. aureus*, com fim previsto para agosto de 2019 (Clinicaltrials.gov: NCT02388165).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a estratégia é promissora, porém, se faz necessária, a investigação da influência de anticorpos direcionados contra as permeases no crescimento bacteriano usando outros elementos de transportadores ABCs como alvo, em novos testes *in vitro*, além de realizar ensaios que analisem o papel da opsonofagocitose como método de combate ao patógeno *in vivo*. Adicionalmente, devemos ressaltar que talvez a

estratégia seja mais eficiente quando voltada para transportadores essenciais, cuja inativação sejam realmente um problema para o crescimento, o que não foi abordado neste trabalho.

Neste sentido, o trabalho abre diversas possibilidades interessantes para utilização da técnica *RAD display* para exposição de permeases ou outros alvos como epítomos para inibição de transportadores ABC. Futuros trabalhos utilizando *S. aureus* ou outros patógenos de interesse, tendo como alvo importadores essenciais, ou ainda exportadores especificamente relacionados ao fenômeno de MDR como Sav1866, trarão importantes perspectivas para a eficácia da técnica testada. Esse é um ponto importante a ser ressaltado, uma vez que não conseguimos a produção da Rad + Sav1866 *loop*. Possivelmente as características da região escolhida afetaram de forma drástica o enovelamento da proteína Rad. Novas construções usando diferentes construções devem ser testadas para a obtenção de regiões desse transportador.

Apesar de não termos evidenciado respostas significativas em relação à inibição, os resultados são promissores e abrem perspectivas para a inibição desses importantes complexos proteicos. Usamos uma abordagem de expressão de epítomos de proteínas de membrana que pode ser aplicada a qualquer proteína desse tipo, com alta eficiência, e adicionalmente, mostramos que a abordagem é mais efetiva em relação à bactérias gram positivas. O uso de diferentes estratégias para apresentação dos anticorpos é também possível, entre outras como o uso de aptâmeros, de nanopátulas, entre outras. Adicionalmente, o projeto levanta a possibilidade de uso de inibidores contra diferentes transportadores ou proteínas de membrana que tenham relevância no tratamento de doenças, especificamente o câncer, onde transportadores ABC têm um papel fundamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLANIDIS, C., DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18 n. 20, p. 6069–6074, 1990.

BEGIER, E. et al. SA4Ag, a 4-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine, rapidly induces high levels of bacteria-killing antibodies. **Vaccine**, v. 35 n. 8, p. 1132-1139, 2017.

BURNIE, J. P. et al. Identification of an Immunodominant ABC Transporter in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Infection and Immunity**, v. 68 n. 6, p. 3200-3209, 2000.

DAWSON, R. J. P., LOCHER, K. P. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP, **Febs Letters** v. 581, n. 5, p. 935–938, 2007.

FERREIRA, E. L. et al. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. **Molecular oral microbiology**, v. 31 n. 5, p. 410–422, 2016.

GARMORY, H. S., TITBALL, R. W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. **Infection and immunity**, v. 72 n. 12, p. 6757–6763, 2004.

GERBER, S. et al. Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. **Science**, v. 321 n. 5886, p. 246–250, 2008.

HVORUP, R. N. et al. Asymmetry in the Structure of the ABC Transporter-Binding Protein Complex BtuCD-BtuF. **Science**, v. 317 n. 5843, p. 1387–1390, 2007.

JOMAA, M. et al. Antibodies to the Iron Uptake ABC Transporter Lipoproteins PiaA and PiuA Promote Opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 73 n.10, p. 6852-6859, 2005.

KHARE, D. et al. Alternating Access in Maltose Transporter Mediated by Rigid-Body Rotations. **Molecular Cell**, v. 33 n. 4, p. 528–536, 2009.

LAU, Y. H., et al. Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. **Chemical Science**, v. 5, p. 1804-1809, 2014.

LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14 n. 4, p. 426–431, 2004.

LUBELSKI, J., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71 n. 3, p. 463–476, 2007.

OLDHAM, M. L., CHEN, J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. **Science**, v. 332 n. 6035, p. 1202-1205, 2011.

OTTO, M., GÖTZ, F. ABC transporters of *staphylococci*. **Research in microbiology**, v. 152, p. 351–356, 2001.

ROSSMANN, M. et al. Development of a multipurpose scaffold for the display of peptide loops. **PEDS**, v. 30 n. 6, p. 419-430, 2017.

TANABE, M. et al. The ABC Transporter Protein OppA Provides Protection against Experimental *Yersinia pestis* Infection. **Infection and immunity**, v. 74 n. 6, p. 3687-3691, 2006.

TANAKA, K. J. et al. Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860 n. 4, p. 868–877, 2018.

YANG, H. et al. Immunisation With Immunodominant Linear B Cell Epitopes Vaccine of Manganese Transport Protein C Confers Protection against *Staphylococcus aureus* Infection. **PloS One**, v. 11 n. 2, p. 1-16, 2016.

YANG, M.; JOHNSON, A.; MURPHY, T. F. Characterization and Evaluation of the *Moraxella catarrhalis* Oligopeptide Permease A as a Mucosal Vaccine Antigen. **Infection and immunity**, v. 79 n. 6, p. 846-857, 2011.