

ESTUDO DA ADAPTAÇÃO DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* AO HOSPEDEIRO NA BUSCA DE ALVOS VACINAIS

ANDRE ALEX GRASSMANN¹; MELISSA J. CAIMANO²; ANNA ALLARD³;
SATHESH K. SIVASANKARAN⁴; JARLATH NALLY⁵; ALAN J. A. MCBRIDE⁶

¹Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, UFPEL, Brasil – grassmann.aa@gmail.com

²University of Connecticut Health Center, USA – mcaima@up.uchc.edu

³University of Connecticut Health Center, USA – aallard@uchc.edu

⁴Trinity College Dublin, Irlanda – sivasans@tcd.ie

⁵Trinity College Dublin, Irlanda – jarlath.nally@ucd.ie

⁶Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, UFPEL, Brasil – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As leptospiros, agentes causadores da leptospirose, sobrevivem em uma grande variedade de condições ambientais durante a transmissão e infecção. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos regulatórios e produtos gênicos que promovem a adaptação ao hospedeiro e permitem às leptospiros estabelecerem a infecção (KO et al. 2009).

Neste estudo, padronizamos um novo sistema onde as leptospiros são cultivadas em câmaras de membrana de diálise (DMC, do inglês *Dialysis Membrane Chamber*) implantadas no peritônio de ratos, permitindo a adaptação ao hospedeiro, e a comparação do perfil de expressão de genes nesta condição àquele das cultivadas *in vitro* (CIV). Esta técnica foi originalmente descrita para estudos com outra espiroqueta, a *Borrelia burgdorferi* (agente da Doença de Lyme), permitindo a identificação de genes diferencialmente expressos e a caracterização de mudanças transcricionais e fisiológicas envolvidas no processo de adaptação ao hospedeiro desta bactéria (AKINS et al. 1998; CAIMANO, 2005). Dentre os genes cuja expressão é aumentada durante a infecção, os de maior interesse para a profilaxia da doença são os que codificam proteínas expostas na superfície, característica fundamental para seleção de alvos para desenvolvimento de vacinas recombinantes.

Recentemente, o sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-Seq) substituiu técnicas de microarranjos como o método de escolha para avaliação do perfil transcricional de genomas completos. Diferentemente de microarranjos, RNA-Seq permite estudos ao nível de nucleotídeos únicos enquanto quantifica o número absoluto de RNAs transcritos (CROUCHER, THOMSON, 2010).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter leptospiros adaptadas ao hospedeiro (dentro de DMCs), avaliar a expressão diferencial de genes em leptospiros cultivadas em DMC e *in vitro* através de RNA-Seq, bem como identificar a localização de proteínas codificadas por alguns destes genes.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e com o protocolo ACC#100570-0116 revisado e aprovado pela *University of Connecticut Health Center Institutional Animal Care and Use Committee*. *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em

meio EMJH suplementado com 1% de soro de coelho e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 5-fluorouracil. Para preparo das DMCs, tubos de diálise de 8 polegadas de comprimento, com porosidade de 8000 Da, foram fervidos por 20 min em 1 mM de EDTA seguido por duas fervuras em água. Os tubos foram preenchidos com 8-10 mL de EMJH suplementado com 10% de albumina sérica bovina, contendo 10^4 leptospiras/mL. Os tubos foram atados nas duas extremidades e implantados no peritônio de ratos (propriamente anestesiados). Os animais receberam analgésico nos dois primeiros dias pós-implante. As DMCs foram explantadas após 8-12 dias, para definir o melhor momento para uso da cultura nas análises subsequentes.

A composição polipeptídica de leptospiras cultivadas *in vitro* a 30 °C e em DMCs foram comparadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em uma ou duas dimensões (1D e 2D SDS-PAGE). A avaliação da transcrição em CIV e DMCs foram comparadas por RNA-Seq utilizando bibliotecas de RNA obtidas de triplicatas de culturas nas duas condições (uma amostra = 2 ratos para DMCs). O material proveniente de explantes após 10 dias foi lavado 3 vezes em PBS para remoção de meio e resíduos extracelulares, e as células foram processadas para obtenção de RNA purificado utilizando Trizol. O RNA purificado foi tratado com DNase e analisado utilizando *Agilent Bioanalyzer RNA NanoChip*. Foi utilizado 100 ng de RNA para obtenção de cDNA, de acordo com o protocolo padrão Illumina para obtenção de biblioteca de RNA (*TruSeq RNA Sample Preparation Guide*). O sequenciamento de RNA total foi realizado em uma plataforma Illumina Genome Analyzer Iix, de acordo com as recomendações do fabricante. As leituras obtidas foram mapeadas contra ambos os cromossomos de *L. interrogans* sv. Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 utilizando a ferramenta Segemehl (HOFFMANN et al. 2009) com acurácia de 100%. A análise de genes diferencialmente expressos e a análise estatística foi realizada por DESeq como previamente descrito (ANDERS, HUBER, 2010). A busca por proteínas ortólogas foi realizada por BlastP contra as sequências de genomas de *Leptospira* spp. publicadas. A similaridade das proteínas entre os diferentes genomas foi calculada utilizando GLSEARCH (PEARSON, 2000). Domínios conservados foram identificados utilizando *NCBI Conserved Domain Database*.

Os resultados de RNA-Seq foram validados por qRT-PCR utilizando *primers* para 14 genes e normalizado por *lipL32*. Cada reação foi otimizada para garantir eficiência de amplificação maior que 90%.

Os genes diferencialmente expressos selecionados para análises subsequentes foram amplificados por PCR e clonados em vetor TOPO. Deste, os genes foram digeridos e clonados em vetor pAE de expressão em *E. coli*. As proteínas selecionadas foram expressas, purificadas por cromatografia de afinidade e avaliadas por SDS-PAGE. Dois ratos foram imunizados com 3 doses de 100 μg de cada proteína recombinante com adjuvante completo (1 dose) e incompleto (duas doses) de Freund. Os ratos foram eutanasiados e o sangue coletado por punção cardíaca. O soro foi separado, alíquotado e testado em WB contra proteína recombinante e lisados de CIV e DMCs.

Para estudo da localização de proteínas de leptospiras, estas foram aprisionadas em esferas de agarose de baixa temperatura de fusão, conforme descrito anteriormente (COX et al. 1995). Estas esferas permitem a manipulação cuidadosa das espiroquetas, garantindo a integridade da membrana externa. Estas esferas foram avaliadas por imunofluorescência (IFA) utilizando DAPI para marcação do DNA e os anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes selecionadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *L. interrogans* em DMCs resultou em células viáveis e móveis atingindo densidade máxima de $\sim 10^8$ leptospiiras/mL após 8 dias. O perfil de polipeptídeos de 9 a 12 dias não apresentou diferenças observáveis, sendo escolhidos 10 dias como padrão para manutenção do implante intraperitoneal. Foram observadas diferenças na composição polipeptídica de leptospiiras cultivadas *in vitro* e dentro de DMCs através de 1D e 2D SDS-PAGE.

O número total de leituras no RNASeq variou de 8 a 14 milhões por biblioteca de RNA, das quais 79-94% das leituras mapearam o genoma de *L. interrogans* L1-130. A maioria das leituras foram mapeadas como cromossomo 1 e 2, e 13-20% das leituras foram identificadas como regiões não codificantes que representam candidatos a *small regulatory RNAs* (sRNA).

Usando o método DESeq foram identificados 166 genes cuja expressão foi positivamente ou negativamente regulada 2 ou mais vezes no interior do hospedeiro. Destes, 110 genes tiveram a expressão aumentada e com exceção de três, os demais aparentam ser específicos a espécies patogênicas. Quase a metade destes genes (49/110) codifica para proteínas hipotéticas enquanto 16 codificam prováveis lipoproteínas. Além destes, foram identificados genes associados à patogênese, captura e utilização de ferro, motilidade, genes relacionados ao stress térmico e oxidativo, e reguladores de transcrição. Dentre estes genes destacam-se transportadores TonB, reguladores de transcrição da família *fur*, genes relacionados a virulência como *sph1*, *sph2* e *sph3*, *ligA*, dentre outros. Todos os 56 genes cuja expressão foi diminuída dentro de DMCs são específicos para espécies patogênicas. Destes, 26 são únicos para *L. interrogans* e 35 codificam proteínas hipotéticas. Merece destaque a diminuição de expressão de genes relacionados com a via de síntese de heme, indicando que as leptospiiras consomem ferro oriundo do hospedeiro durante a infecção.

Foram detectadas 11 regiões no genoma que não codificam proteínas. Estes transcritos de RNA não codificadores são possíveis sRNAs. Um destes sRNAs, *LIC1nc80*, teve a expressão aumentada em DMCs.

Os dados de RNA-Seq foram confirmados pelos resultados obtidos no qRT-PCR para os 14 genes selecionados com extrema concordância ($R^2=0.8881$), da mesma forma que dois sRNAs, selecionados posteriormente.

Foram clonados os genes que codificam para todas as lipoproteínas de expressão aumentada em DMCs, 4 proteínas relacionadas a patogênese e 3 proteínas hipotéticas, selecionadas de acordo com a predição de suas localizações na membrana externa. Destes, 8 foram expressos, e as proteínas foram purificadas e utilizadas para produção de soro policlonal em rato. Os soros produzidos foram eficientes no reconhecimento da proteína recombinante, bem como do lisado de leptospiiras cultivadas *in vitro*, com exceção de LIC12986.

As leptospiiras crescidas *in vitro* foram eficientemente aprisionadas em esferas de agarose, conforme evidenciado por coloração do DNA e marcação de antígenos que são reconhecidos por anticorpo policlonal produzido contra a célula inteira. No entanto, o estudo da localização das proteínas de expressão aumentada em DMCs não foi possível devido ao não reconhecimento dos respectivos antígenos pelos anticorpos produzidos, sendo necessária uma melhor padronização desta técnica.

4. CONCLUSÕES

O sistema de cultivo de *L. interrogans* em DMCs implantadas no peritônio de ratos proporciona a adaptação desta espiroqueta ao hospedeiro, permitindo a obtenção de material necessário para diferentes análises. Esta adaptação permitiu a identificação de genes importantes ao processo de patogênese e que agora são alvos em potencial para aprofundar estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose e ao entendimento da doença. A técnica de aprisionamento de leptospiras em esferas de agarose é promissora para o estudo de localização de proteínas nesta espiroqueta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v.11, p106-130, 2010.

AKINS, D.R.; BOURELL, K.W.; CAIMANO, M.J.; NORGDARD, M.V.; RADOLF, J.D. A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host adapted state. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.101, p. 2240–2250, 1998.

CAIMANO, M.J. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* in dialysis membrane chambers in rat peritonea. **Current Protocols in Microbiology**, v.12, n.12C 13, p. 340-375, 2005.

CROUCHER, N.J.; THOMSON, N.R. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.619–624, 2010.

HOFFMANN, S.; OTTO, C.; KURTZ, S.; SHARMA, C.M.; KHAITOVICH, P. Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures. **PLoS Computational Biology**, v5, e1000502, 2009.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**. v.7, n.10, p.736-747, 2009.

PEARSON, W.R. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p.185-200, 2000.

COX, D. L.; AKINS, D.R.; PORCELLA, S. F.; Norgard, M.V.; RADOLF, J.D. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture. **Molecular Microbiology**, v.15, n.6, p.1151-1164, 1995.