

PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE ALVOS VACINAIS CONTRA LEPTOSPIROSE

JÚLIA COUGO DOS SANTOS¹; FREDERICO SCHMITT KREMER²; ANDRÉ ALEX GRASSMANN³; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – juliapetrarca@gmail.com

²Laboratório de Bioinformática, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – fred.s.kremer@hotmail.com

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

⁴Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose mundialmente distribuída, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. É transmitida através do contato com solo e água contaminados com a urina de animais carreadores desta bactéria. Os sinais clínicos da doença variam desde uma forma leve, semelhante à gripe, até uma forma grave, com falência de diversos órgãos (KO et al., 1999). É considerada a zoonose bacteriana mais comum no mundo e reconhecida como uma doença infecciosa emergente. Mais de 873 mil casos de Leptospirose grave e 49 mil óbitos são relatados ao ano (PICARDEAU et al., 2014), com a taxa de mortalidade em torno de 10 até >50% dos casos (MCBRIDE et al., 2005).

A vacinação é uma das ferramentas mais eficazes para a prevenção de doenças infecciosas. A disponibilidade de sequências do genoma completo, juntamente com a progressão de tecnologias de alto rendimento, como a genômica funcional e estrutural, tem levado a um novo paradigma para o desenvolvimento de vacinas. A vacinologia reversa, com a comparação de dados de sequência de vários isolados de um mesmo patógeno, aumenta a oportunidade de identificação de novos candidatos a vacinas (BAMBINI e RAPPUOLI, 2009). A identificação de proteínas expostas na superfície do patógeno e que podem estar envolvidas nas interações com o hospedeiro facilitam a busca de antígenos protetores contra a doença (VIEIRA et al., 2009).

O presente trabalho teve como objetivo a análise da sequência do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, para a identificação de novos alvos vacinais que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose.

2. METODOLOGIA

A sequência completa do genoma de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi acessada no GenBank (número de acesso AE016823 e AE016824, respectivamente para os cromossomos I e II) e as sequências de proteína correspondentes a este genoma foram obtidas em um arquivo FASTA, utilizando o software Artemis (CARVER et al., 2012). Em seguida foi feita a análise do genoma com algumas ferramentas computacionais, que foram escolhidas de acordo com as características importantes para o desenvolvimento de uma vacina.

Os softwares utilizados foram: Colombo/SIGI-HMM para a identificação de ilhas genômicas ou ilhas de patogenicidade, que permite avanço no entendimento sobre a patogenicidade (WAACK et al., 2006); SignalP que identifica a presença de

peptídeo sinal, assim sabendo-se que a proteína pode ser enviada para a membrana externa sendo um bom alvo vacinal (PETERSEN et al., 2011); TMHMM que faz a topologia da proteína da membrana, especificando quantas hélices transmembrana elas possuem (KROGH et al., 2001); PSORT que indica a localização subcelular da proteína, utilizado visando a identificação de proteínas de membrana externa (YU et al., 2010); e LipoP que identifica lipoproteínas (JUNCKER et al., 2003). A Tabela 1 contém um resumo das ferramentas escolhidas.

Tabela 1. Ferramentas computacionais usadas para a análise do genoma de *Leptospira interrogans*.

Programa	Categoria	Descrição	URL
Colombo/SIGI-HMM	Ilhas genômicas	Previsão de ilhas genômicas em genomas procaríotos	http://www.tcs.informatik.uni-goettingen.de/colombo-sigihmm
SignalP	Peptídeo sinal	Baseado em duas redes neurais, uma para determinar a probabilidade de um peptídeo sinal em um aminoácido e o outro para o reconhecimento de local da clivagem	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
TMHMM	α - Hélice transmembrana	Predição da topologia da proteína da membrana	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
PSORT	Localização subcelular	Combina seis modos analíticos para gerar uma localização final, baseada no desempenho de cada módulo	http://www.psort.org/p-sortb/
LipoP	Lipoproteínas	Prevê peptídeos sinal de lipoproteína	http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/

A análise dos resultados dos diferentes preditores foi facilitada por um script escrito em linguagem Python (FRIEDRICH et al., 2014), que teve como objetivo, juntar os diferentes resultados dos softwares e transferi-los para um arquivo CSV e XLS com os dados de cada proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ferramenta Artemis encontrou 3.659 proteínas codificadas no genoma, essas proteínas foram analisadas pelo software Colombo/SIGI-HMM que não identificou ilhas de patogenicidade no genoma deste patógeno. Foram preditas através do SignalP, 110 proteínas com presença de peptídeo sinal, entre elas a LipL21, LigA, LigB, OmpL1, LipL31, LipL32, LipL36 e LipL41. O TMHMM apontou 541 proteínas com uma ou mais hélices transmembrana. Com o preditor da localização subcelular foram destacadas 129 proteínas, entre essas 65 na membrana externa e 64 secretadas. E nas análises feitas com o LipoP, foram encontradas 163 lipoproteínas (Figura 1).

Cruzando os resultados do SignalP, com o LipoP, obtivemos 39 proteínas que satisfazem todos os critérios adotados nesta análise. Dentre essas destaca-se LipL32 e LipL41, duas lipoproteínas estudadas quanto a diferentes aspectos, incluindo localização, função e utilização como antígenos em vacinas recombinantes (DELLAGOSTIN et al., 2011; GRASSMANN et al., 2012). Outras duas destas proteínas, LigA e LigB, são expressas durante a infecção do

hospedeiro, parecem contribuir para a adesão ao hospedeiro e induzem respostas protetoras quando utilizadas em vacinas recombinantes (SILVA et al., 2007).

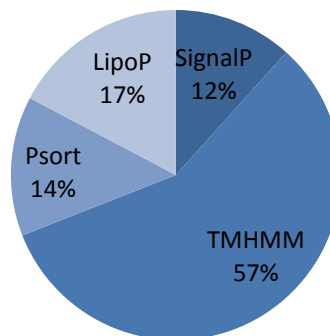


Figura 1. Número de proteínas encontradas de acordo com cada software.

Entre as 65 proteínas da membrana externa, preditas pelo software Psort, apenas seis são lipoproteínas, entre elas LipL71 que já se sabe que é uma lipoproteína da membrana citoplasmática; LIC12690, LIC10713 e LIC20172 são lipoproteínas em sua notação; LIC12048 e LIC11755 que são proteínas hipotéticas.

4. CONCLUSÕES

A análise do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi eficiente para localizar proteínas com características de interesse para o desenvolvimento de uma vacina. Visando aumentar a confiabilidade destas análises, uma nova avaliação está em andamento, mais completa, buscando identificar proteínas expostas na superfície (proteínas de membrana externa e lipoproteínas), bem como identificar in silico os domínios estruturais de dada proteína que estão expostos. O passo seguinte será a comprovação experimental da localização destes domínios, suas implicações na relação com o sistema imune e a utilização destes domínios no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRIEDRICH, P.; VELLA, M.; GULYÁS A. I.; FREUND T. F.; KÁLI. S. A flexible, interactive software tool for fitting the parameters of neuronal models. **Frontiers in Neuroinformatics**, v.8, n.63.2014
- BAMBINI, S. e RAPPUOLI, R. The use of genomics in microbial vaccine development. **Drug Discov Today**, v.14, n.5-6, p. 252-60. 2009.
- CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J. e MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v.28, n.4, p. 464-9. 2012.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F. e MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p. 1215-24. 2011.

GRASSMANN, A. A.; FELIX, S. R.; DOS SANTOS, C. X.; AMARAL, M. G.; SEIXAS NETO, A. C.; FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; CONCEICAO, F. R. e DELLAGOSTIN, O. A. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Clin Vaccine Immunol**, v.19, n.5, p. 740-5. 2012.

JUNCKER, A. S.; WILLENBROCK, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S.; NIELSEN, H. e KROGH, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci**, v.12, n.8, p. 1652-62. 2003.

KO, A. I.; GALVAO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D., JR. e RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v.354, n.9181, p. 820-5. 1999.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G. e SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol**, v.305, n.3, p. 567-80. 2001.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86. 2005.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. e NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Methods**, v.8, n.10, p. 785-6. 2011.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKI, K. e HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p. 6277-86. 2007.

VIEIRA, M. L.; PIMENTA, D. C.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A. e NASCIMENTO, A. L. Proteome Analysis of Leptospira interrogans Virulent Strain. **Open Microbiol J**, v.3, p. 69-74. 2009.

WAACK, S.; KELLER, O.; ASPER, R.; BRODAG, T.; DAMM, C.; FRICKE, W. F.; SUROVCIK, K.; MEINICKE, P. e MERKL, R. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. **BMC Bioinformatics**, v.7, p. 142. 2006.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J. e BRINKMAN, F. S. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v.26, n.13, p. 1608-15. 2010.