

ÁNGEL LUIS CABA MARCHÁN

**Estudo estrutural e funcional de dois efetores
putativos do sistema de secreção tipo II de
*Leptospira interrogans***

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

São Paulo

2022

ÁNGEL LUIS CABA MARCHÁN

**Estudo estrutural e funcional de dois efetores
putativos do sistema de secreção tipo II de
*Leptospira interrogans***

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo
Carvalho

Versão corrigida.

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Caba Marchán, Ángel Luis

Estudo estrutural e funcional de dois efetores putativos do sistema de secreção tipo II de *Leptospira interrogans* / Ángel Luis Caba Marchán; orientadora Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho. -- São Paulo, 2022.

77 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Leptospira interrogans*. 2. Leptospirose. 3. Peptidase M23. 4. Efetores. 5. T2SS. I. Rodrigues Guzzo Carvalho, Cristiane, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO **1186/2021 - ERRATA**

Certificamos que o Protocolo CEP - ICB nº **1186/2021**, referente ao projeto intitulado: "**Estudo estrutural e funcional de dois efetores putativos do sistema de secreção tipo II de Leptospira Interrogans**", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) "**Ángel Luis Caba Marchán**", e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) "**Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho**", do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 19 de Julho de 2022.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família que tem me apoiado de todas as formas possíveis desde sempre. Obrigado mãe, por lutar por uma vida melhor para a gente.

Aos meus colegas e amigos do Leep do Instituto de Ciências Biomédicas que tem feito meus dias mais leves e felizes, além de ter me ajudado a crescer como profissional e pessoa. Obrigado Tania, Ana Paula, Camila, Gabriel, Aline, Anielle, Daniel, Stephanie, Julia.

À minha orientadora, Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho, por ter me ajudado no desenvolvimento do presente projeto de mestrado e ter sido um apoio tanto acadêmico quanto pessoal.

À Professora Angela Silva Barbosa e ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan por me acolher e ser extremamente generosos comigo. Dani e Luan, vocês são maravilhosos.

Ao Professor Giuseppe Palmisano e à aluna de doutorado Verônica Feijoli Santiago do Laboratório de Glicoproteômica do ICB pelas análises de espectrometria de massas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Também gostaria de agradecer à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para compra de matérias para o laboratório (Projeto FAPESP 2019/00195-2, 2020/04680-0 e 2016/8414-7).

RESUMO

CABA-MARCHAN, A. L. **Estudo estrutural e funcional de dois efetores putativos do sistema de secreção tipo II de *Leptospira interrogans***. 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A leptospirose é uma doença infecciosa negligenciada transmitida pelo contato com urina de animais infectados ou água e lama contaminadas pela bactéria, causando mais mortes por ano que a dengue. O homem é hospedeiro terminal e acidental da doença. Esta zoonose é causada por bactérias Gram-negativas do tipo espiroqueta do gênero *Leptospira*, sendo *Leptospira interrogans* Copenhageni, o objeto de estudo deste projeto. *L. interrogans* apresenta o sistema de secreção Tipo II (T2SS – Type II Secretion System). O T2SS está descrito na literatura por ser responsável pela secreção de efetores para o meio externo e está implicado na secreção de uma vasta quantidade de proteínas que apresentam distintas características funcionais. Dentre essas enzimas exportadas através do envelope bacteriano, proteases capazes de degradar componentes da matriz extracelular e do sistema complemento já foram detectadas em secretados de leptospiros patogênicas. Desta forma, o T2SS de *L. interrogans* pode estar relacionado com a patogenicidade da bactéria. No cluster gênico que contém os genes codificadores para a montagem do T2SS em *Leptospira interrogans* Copenhageni há dois genes que chamam a atenção: LIC_11567, por ser uma lipoproteína com similaridade estrutural com Est12 de *M. tuberculosis*, proteína ativadora do inflamassoma NLRP3, e LIC_11568 por conter domínios que a faria ser uma enzima capaz de degradar moléculas do hospedeiro, isso poderia ser importante para a colonização no hospedeiro e, portanto, para a patogenicidade. Visto que o T2SS é um dos dois únicos sistemas de secreção anotados no genoma de *Leptospira interrogans*, e pouco se sabe sobre seu papel funcional e estrutural. Este projeto de mestrado teve como objetivo o estudo estrutural e funcional das proteínas codificadas por LIC_11567 e LIC_11568 que estão localizadas no início do cluster do T2SS.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*. Leptospirose. Peptidase M23. Efetores. T2SS.

ABSTRACT

CABA-MARCHAN, A. L. **Structural and functional study of two putative effectors of the *Leptospira interrogans* type II secretion system.** 2022. 77 f. Dissertation (Master thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Leptospirosis is a neglected infectious disease transmitted by contact with urine from infected animals or water and mud contaminated by the bacteria, causing more deaths per year than dengue fever. Humans are terminal and accidental hosts of the disease. This zoonosis is caused by Gram-negative bacteria of the spirochete type of the genus *Leptospira*, being *Leptospira interrogans* Copenhageni, the object of study of this project. *L. interrogans* has a Type II Secretion System (T2SS). T2SS is described in the literature for being responsible for the secretion of effectors to the external environment and is implicated in the secretion of a vast amount of proteins that present distinct functional characteristics. Among these enzymes exported through the bacterial envelope, proteases capable of degrading components of the extracellular matrix and the complement system have already been detected in secretomes of pathogenic leptospires. Thus, the T2SS of *L. interrogans* may be related to the pathogenicity of the bacterium. In the gene cluster containing the encoding genes for T2SS assembly in *Leptospira interrogans* Copenhageni there are two genes that draw attention: LIC_11567, for being a lipoprotein with structural similarity with Est12 of *M. tuberculosis*, an activator protein of the NLRP3 inflammasome, and LIC_11568 for containing domains that would make it an enzyme able to degrade host molecules, this could be important for colonization in the host and therefore for pathogenicity. Since T2SS is one of the only two secretion systems annotated in the *Leptospira interrogans* genome, and little is known about its functional and structural role. This masters project aimed to study the structural and functional role of the proteins encoded by LIC_11567 and LIC_11568 that are located at the beginning of the T2SS cluster.

Keywords: *Leptospira interrogans*. Leptospirosis. M23 peptidase. Effectors. T2SS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Genes pertencentes ao cluster do T2SS de <i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni.....	18
Figura 2 – Representação das diferentes construções de LIC_11568 clonadas em pBRA com e sem pelB.....	22
Figura 3 – Representação das diferentes construções dos genes LIC_11567 e LIC_11568 clonadas em pETDuet-1 e pET-28a(+).	24
Figura 4 – Geração de mutações sítio-dirigidas pela técnica <i>overlap extension PCR</i>	29
Figura 5 – Modelo de estrutura terciária de LIC_11567.....	36
Figura 6 – Árvore filogenética com base na comparação de sequências de aminoácidos traduzidas do gene LIC_11567 de <i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni Fiocruz L1-130.....	37
Figura 7 – Amplificação de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	38
Figura 8 – Testes de expressão de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	38
Figura 9 – Purificação de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	39
Figura 10 – Determinação do título de anticorpos para reconhecimento de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄ produzidos em coelho.....	40
Figura 11 – Citotoxicidade de macrófagos THP-1.....	41
Figura 12 – Alinhamento das sequências das proteínas identificadas como semelhantes pelo servidor Phyre2, com a sequência do domínio Peptidase M23 de LIC_11568.....	43
Figura 13 – Representação das construções contendo diferentes domínios da toxina putativa codificada por LIC_11568.....	44
Figura 14 – Modelos de estrutura terciária de LIC_11568.....	45
Figura 15 – Proteínas contendo domínios Peptidases M23 identificadas no genoma de <i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni Fiocruz L1-130.....	46
Figura 16 – Peptidases M23 identificadas em <i>L. interrogans</i> vs <i>L. biflexa</i>	48
Figura 17 – Árvore filogenética com base na comparação de sequências de aminoácidos traduzidas do fragmento do gene LIC_11568 de <i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni Fiocruz L1-130.....	49
Figura 18 – Clonagem de LIC_11568 no vetor pBRA.....	50
Figura 19 – Atividade tóxica de LIC_11568 em <i>E. coli</i> DH5 α	51
Figura 20 – Clonagem de LIC_11568 em vetor de expressão.....	52

Figura 21 – Testes de expressão de LIC_11568.....	54
Figura 22 – Purificação de LIC_11568 ₅₅₋₃₃₆	56
Figura 23 – Purificação de LIC_11568 ₁₂₇₋₃₃₆	56
Figura 24 – Degradação de moléculas do hospedeiro por LIC_11568 ₁₂₇₋₃₃₆	59
Figura 25 – Alinhamento das sequências das metaloproteases M23 mais estudadas com a sequência do domínio peptidase M23 de LIC_11568.....	60
Figura 26 – Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	63
Figura 27 – Possíveis cenários de processamento, localização subcelular e função de LIC_11567.....	65
Figura 28 – Possíveis cenários de processamento, localização subcelular e função de LIC_11568.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes do cluster do T2SS de <i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni sem função anotada.....	19
Tabela 2 – Vetores de expressão e suas resistências a antibióticos.....	72
Tabela 3 – Primers desenhados para clonagem.....	72
Tabela 4 – Cepas de <i>E. coli</i> usadas nos testes de expressão e suas respectivas resistências e concentrações de antibióticos.....	72
Tabela 5 – Anticorpos primários e secundários, e suas respectivas diluições, usados nos ensaios de degradação de proteínas de matriz extracelular e plasma sanguíneo.....	73
Tabela 6 – Proteínas identificadas no secretado de <i>Leptospira interrogans</i> por espectrometria de massas.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN – “Acetonitrila”
- BCA – “bicinchoninic acid”
- BSA – “bovine serum albumin”
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CHAPS – “3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate”
- CV – “column volumes”
- DTT – “Ditiotreitol”
- ECM – “extracellular matrix”
- EDTA – “ethylenediaminetetraacetic acid”
- EMJH – “Ellinghausen-McCullough Johnson-Harris”
- EUA – “Estados Unidos da América”
- GSP – “general secretory pathway”
- HEPES – “2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid”
- IAA – “Iodoacetamida”
- IPTG – “Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside”
- KEGG – “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
- LBF – *Leptospira biflexa*
- LC-MS/MS – “Liquid chromatography–tandem mass spectrometry”
- LDH – “Lactate dehydrogenase”
- LIC – “*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni”
- LPS – “Lipopolysaccharides”
- OPD – “o-phenylenediamine dihydrochloride”
- PBS – “Phosphate-buffered saline”
- PCR – “Polymerase Chain Reaction”
- PMA – “phorbol 12-myristate 13-acetate”
- RMSD – “root-mean-square deviation”
- RPMI – “Roswell Park Memorial Institute”
- Sec – “general Secretion”
- SDS-PAGE – “sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis”
- SLRP – “small leucine-rich proteoglycan”
- T1SS – “type 1 secretion system”
- T2SS – “type 2 secretion system”
- Tat – “Twin-Arginine Translocation”
- TFA – “Trifluoroacetic acid”
- UFC – Unidade Formadora de Colónias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Leptospirose.....	15
1.2. <i>Leptospira</i> spp.	15
1.3. Sistema de secreção tipo II	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Análises de bioinformática	20
3.2. Escolha do vetor para ensaio de toxicidade de LIC_11568 em <i>E. coli</i>	21
3.3. Avaliação da toxicidade de LIC_11568 em <i>E. coli</i>	22
3.4. Escolha do vetor expressão e clonagem.....	23
3.5. Testes de expressão	25
3.6. Expressão das proteínas de interesse em larga escala	26
3.7. Purificação das proteínas: cromatografia de afinidade.....	26
3.8. Dosagem das proteínas	27
3.9. Produção de soro policlonal para reconhecimento da proteína LIC_11567 em coelho	27
3.10. Determinação do título de anticorpos	28
3.11. Mutagênese de LIC_11568 ₅₅₋₃₃₆	28
3.12. Avaliação da atividade proteolítica de LIC_11568 sobre componentes da matriz extracelular e do plasma humano	30
3.13. Cultivo e manutenção das linhagens celulares	31
3.14. Estimulação dos macrófagos	31
3.15. Citotoxicidade de macrófagos: Azul de Tripán.....	31
3.16. Citotoxicidade de macrófagos: Liberação de LDH (Lactato desidrogenase) ...	32
3.17. Cultivo de <i>Leptospira interrogans</i>	32
3.18. Espectrometria de massas e identificação de proteínas.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Análise de Bioinformática de LIC_11567	35
4.2. Clonagem de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	37
4.3. Testes de expressão de LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	38
4.4. Purificação de proteínas: LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	38
4.5. Determinação do título de anticorpos contra LIC_11567 ₁₇₋₁₂₄	40

4.6.	Citotoxicidade de macrófagos THP-1.....	40
4.7.	Análise de bioinformática de LIC_11568.....	42
4.8.	Clonagem de LIC_11568 no vetor pBRA.....	49
4.9.	Toxicidade de LIC_11568 em <i>E. coli</i>	50
4.10.	Clonagem de LIC_11568	51
4.11.	Testes de expressão de LIC_11568	53
4.12.	Purificação das proteínas: LIC_11568 ₅₅₋₃₃₆ e LIC_11568 ₁₂₇₋₃₃₆	55
4.13.	Degradação de proteínas de matriz extracelular e plasma sanguíneo	57
4.14.	Mutagênese de LIC_11568 ₅₅₋₃₃₆	60
4.15.	Secretoma de <i>Leptospira interrogans</i>	61
5.	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose negligenciada transmitida principalmente pelo contato com urina de animais infectados ou água e lama contaminadas por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A bactéria causadora da leptospirose infecta mais de um milhão de pessoas com aproximadamente 60.000 mortes anualmente no mundo (CAGLIERO; VILLANUEVA; MATSUI, 2018; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Um amplo espectro de animais domésticos e selvagens, servem como “reservatório”, denominado hospedeiro intermediário. No meio urbano, os principais reservatórios são os roedores (especialmente o rato de esgoto) nos quais a infecção é assintomática (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010); outros reservatórios são os suínos, bovinos, equinos, ovinos e cães (TILAHUN; RETA; SIMENEW, 2013). O homem é hospedeiro terminal e acidental da doença. A entrada do microrganismo ocorre através da pele lesionada, a pele íntegra ou mucosas quando imersas em água contaminada por longo período (MONIZ, 2009).

Em humanos, as manifestações são muito variáveis, podendo causar desde sintomas semelhantes aos da gripe a uma infecção grave com insuficiência renal e hepática, insuficiência pulmonar e morte, conhecida como doença de Weil (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Contudo, as manifestações mais leves se resolvem em 90% dos casos sem medicação. Apenas ~10% dos infectados desenvolvem formas mais graves da doença que podem ter uma taxa de mortalidade de 4-60% dependendo da idade e das comorbidades do paciente (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; TAYLOR; PARIS; NEWTON, 2015).

1.2. *Leptospira* spp.

A leptospirose é uma doença de relevância de saúde pública e veterinária causada por bactérias com formato de espiroqueta pertencentes ao gênero *Leptospira*. Vale a pena ressaltar que nem todas as espécies de *Leptospira* são patogênicas. Dentro do gênero de *Leptospira* foram descritas 66 espécies e mais de 300 sorovares divididos em ao menos 26 sorogrupos diferentes (CAIMI; RUYBAL, 2020; GUGLIELMINI et al., 2019; VINCENT et al., 2019). A diversidade de sorovares reside na heterogeneidade dos carboidratos que constituem a camada de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana bacteriana (CAIMI; RUYBAL, 2020).

Leptospira spp. são bactérias helicoidais finas com diâmetro de 0,15 µm e comprimento que varia de 10 a 20 µm (PICARDEAU, 2017). Apresentam uma membrana dupla e dois endoflagelos periplasmáticos, cada uma surgindo em uma extremidade da espiroqueta, que se estendem em torno do peptidoglicano da parede celular. No entanto, a membrana externa apresenta uma superfície muito diferente daquela encontrada em outras espiroquetas, como *Treponema pallidum* e *Borrelia* spp. pois as leptospiros possuem lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas transmembrana anfipáticas de folha-β que tem homólogos claros em bactérias Gram-negativas, assim como lipoproteínas expostas na superfície membranar (HAAKE; MATSUNAGA, 2010; PICARDEAU, 2017).

Como citado anteriormente, o LPS é um importante componente da membrana externa de leptospiros e uma interface chave entre a bactéria e o meio ambiente e a bactéria e seu hospedeiro (CHAN; SHERMAN; BOURKE, 2006). A presença de LPS é característico de bactérias Gram-negativas sendo uma endotoxina tóxica para os mamíferos. Além disso, o LPS tem sido estudado como uma maneira de prevenção contra a leptospirose. O pré-tratamento com LPS aumentou a taxa de sobrevivência de hamsters para 80%, evitando assim as tempestades de citocinas e formas mais graves da doença (CAGLIERO; VILLANUEVA; MATSUI, 2018; CHEN et al., 2020), lembrando que hamsters são usados como modelo de infecções acidentais observadas na natureza em muitos mamíferos, incluindo humanos (HAAKE, 2006).

Outra característica encontrada nas bactérias Gram-negativas é a presença de duas membranas celulares, o que torna o processo de secreção de proteínas mais complexo uma vez que o maquinário secretório necessita atravessar as duas membranas bacterianas.

1.3. Sistema de secreção tipo II

Os sistemas de secreção bacteriano constituem os mecanismos pelos quais as bactérias translocam proteínas do citosol para o meio externo ou diretamente para dentro da célula hospedeira. Nas bactérias Gram-negativas foram bem descritos oito sistemas classificados de acordo com a natureza molecular e funcionalidade: Sistemas de Secreção Tipo I, II, III, IV, V, VI, VII e IX (COSTA et al., 2015; DEPLUVEREZ; DEVOS; DEVREESE, 2016; GORASIA; VEITH; REYNOLDS, 2020; LAUBER et al., 2018). Alguns são sistemas de secreção de uma etapa, reconhecendo seus substratos no citoplasma e transportando-os simultaneamente através de ambas as membranas bacterianas, enquanto outros dependem das vias *Sec* e/ou *Tat* para

primeiro translocar os substratos para o periplasma (os chamados mecanismos de duas etapas). (DENISE; ABBY; ROCHA, 2020; GREEN; MECSAS, 2016). Além desses, existem outros dois mecanismos responsáveis pela identificação e transporte de proteínas do citoplasma para o periplasma, chamados de sistemas *Sec* (do inglês: *general Secretory pathway*) e *Tat* (do inglês: *Twin-Arginine Translocation pathway*). O sistema *Sec* transloca proteínas desenoveladas enquanto o sistema *Tat* transloca proteínas enoveladas. Alguns sistemas secretórios são dependentes do sistema *Sec* ou *Tat* para a translocação de seus efetores (proteínas) do citoplasma para o meio periplasmático (COSTA et al., 2015; GREEN; MECSAS, 2016).

No caso de *Leptospira interrogans* apenas dois sistemas de secreção foram identificados, o Sistema de Secreção Tipo I (T1SS) e II (T2SS) (PICARDEAU, 2017; ZÜCKERT, 2019). O T2SS é composto por um complexo proteico que forma uma nanomáquina que atravessa as duas membranas bacterianas. Esse complexo é formado por proteínas descritas como Gsp (*General Secretory Pathway*) como GspC, GspD, GspE, GspF, GspG, GspH, GspI, GspJ, GspK, GspL, GspM, GspO e GspS. O modo de transporte dos efetores do T2SS é via duas etapas: na primeira etapa, os precursores proteicos contendo um peptídeo sinal na extremidade N-terminal são reconhecidos e transportados através da membrana interna via o sistema *Sec* ou *Tat* (COSTA et al., 2015; NIVASKUMAR; FRANCETIC, 2014; a segunda etapa é um período extremamente curto, que consiste na quebra do peptídeo sinal e mudanças conformacionais antes da exoproteína enovelada ser transportada do periplasma para fora da membrana externa. Em bactérias Gram-negativas, o T2SS é composto por uma plataforma de montagem do pseudopilus na membrana interna e um complexo de secretina na membrana externa (COSTA et al., 2015; KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

A organização gênica do cluster que codifica as proteínas envolvidas na montagem do sistema de T2SS em *Leptospira interrogans* Copenhageni está ilustrado na **Figura 1** e é composta por 17 genes: LIC_11567 até LIC_11583. Os genes LIC_11569 até LIC_11579 codificam as proteínas que montam o T2SS. Apenas dois genes estão ausentes, o gspO, prepilina peptidase, que provavelmente é suprido pela LIC_12423 (uma proteína com características de prepilina peptidase homóloga ao gspO) e o gspS que codifica a pilotina permitindo a oligomerização e localização da secretina na membrana externa (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012). Experimentos preliminares do nosso grupo junto com o fato da secretina ser uma lipoproteína (HAAKE; MATSUNAGA, 2010) sugerem que a pilotina não é essencial para a montagem do T2SS em *Leptospira interrogans* e colabora com outros trabalhos

que mostram que algumas secretinas conseguem se automontar de forma independente da pilotina (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

O T2SS está implicado na secreção de uma vasta quantidade de proteínas que apresentam distintas características funcionais. Além de exportar enzimas, também podem secretar toxinas através do envelope bacteriano. Desta forma, pode estar relacionado com a patogenicidade bacteriana, e por isso é considerado um fator de virulência de vários microrganismos, esse sistema está envolvido nos processos de adesão, motilidade, formação de biofilme, entre outros (BALDI et al., 2012; COSTA et al., 2015; GREEN; MECSAS, 2016; KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012). O *Vibrio cholerae* é o agente causador da cólera e utiliza o sistema T2SS para a secreção de pelo menos 19 proteínas, incluindo a toxina colérica (SIKORA, 2013; SIKORA et al., 2011).

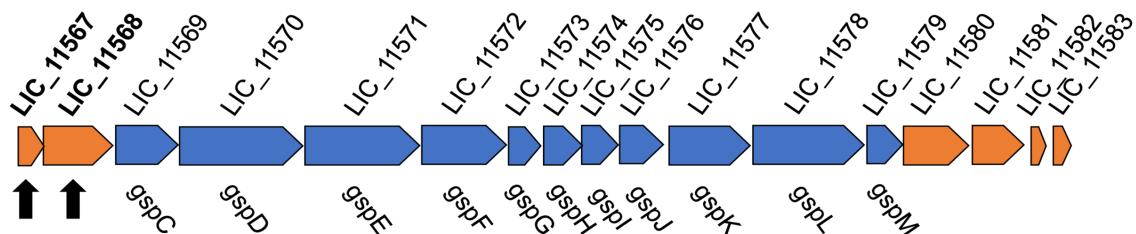


Figura 1 – Genes pertencentes ao cluster do T2SS de *Leptospira interrogans* Copenhageni envolvidos na montagem de T2SS (em azul) e sem função biológica conhecida (em laranja). As setas indicam os genes LIC_11567 e LIC_11568 que codificam para as proteínas alvo deste trabalho.

No caso de *L. interrogans*, chama a atenção que além dos genes codificadores a maquinaria do T2SS, há mais seis genes, dois no começo do cluster, LIC_11567 e LIC_11568, e quatro no final, LIC_11580 a LIC_11583 (**Figura 1**). A maioria destes genes parecem não estar relacionados com a montagem ou a maquinaria do T2SS. A análise preliminar de domínios destes genes possibilitou a predição de suas possíveis funções como listado na **Tabela 1**. O que mais chama a atenção são os seguintes genes: LIC_11567 por ser uma lipoproteína e LIC_11568 por conter domínios que a faria ser uma enzima capaz de degradar peptidoglicano ou proteínas de matriz extracelular do hospedeiro, isso poderia ser importante para a sobrevivência da bactéria quando presente com outras bactérias, pois poderia matar outras bactérias (competição bacteriana) ou ser relevante no processo de invasão no hospedeiro. No entanto, a compreensão do papel funcional do cluster do T2SS e o papel funcional das proteínas que flanqueiam os genes envolvidos na montagem da maquinaria do T2SS deve ser estudada com mais detalhe.

Vale a pena ressaltar que as espécies patogênicas de *Leptospira* secretam proteases capazes de degradar moléculas do sistema complemento, permitindo a evasão do sistema imune inato, da mesma maneira que clivam moléculas da matriz extracelular e da cascata de coagulação, como fibronectina plasmática, gelatina, proteoglicanas e fibrinogênio contribuindo assim para a invasão e destruição de tecido das células de hospedeiro pela ação da leptospirose (DA SILVA et al., 2018; FRAGA et al., 2014).

Estas proteases provavelmente são secretadas via o T1SS ou T2SS, já que são os únicos sistemas de secreção no genoma de *Leptospira*. Provavelmente, o T2SS tenha um papel central na secreção de proteínas envolvidas tanto na sobrevivência da bactéria em diferentes habitats quanto no processo de invasão e colonização em organismos eucarióticos. Desta forma, o estudo das bases moleculares e a elucidação do mecanismo de funcionamento do T2SS em *Leptospira interrogans* terá um impacto grande na compreensão da biologia desta bactéria.

Tabela 1 – Genes do cluster do T2SS de *Leptospira interrogans* Copenhageni sem função anotada.

Listagem dos genes que flanqueiam os genes pertencentes ao T2SS. Estão representados a anotação descrita no KEGG (KANEHISA, 2002), a arquitetura de domínios das proteínas segundo Pfam (MISTRY et al., 2021), assim como seu tamanho em aminoácidos (aa) e uma predição de sua possível função a partir de ferramentas de bioinformática como PSORTb, que mostra a localização predita da proteína (EFTEKHAR, 2020), em conjunto com as informações observadas usando Pfam, NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2015) e KEGG.

Proteína	Anotação-KEGG	Domínios-Pfam (aa)	Descrição
LIC_11567	Lipoproteína putativa	(124)	Lipoproteína
LIC_11568	Peptidase de membrana	LysM-peptidaseM23 (336)	Domínio de ligação a peptidoglicano e atividade de degradação de parede bacteriana. Possível toxina do sistema
LIC_11580	Hipotética	AsmA_2 (313)	Proteína do citoplasma (PSORTb)
LIC_11581	Hipotética	(240)	Localização celular desconhecida (PSORTb)
LIC_11582	Hipotética	BTB/POZ (75)	POZ é um domínio encontrado em fatores de transcrição e está envolvido em interação proteína-proteína (BARDWELL; TREISMAN, 1994)
LIC_11583	Hipotética	HNH_4 (88)	Endonuclease

2. OBJETIVOS

Este projeto de mestrado tem como objetivo o estudo funcional e estrutural das proteínas codificadas pelos genes LIC_11567 e LIC_11568, situados no início do cluster que contém os genes que codificam as proteínas envolvidas na montagem do sistema de secreção tipo II de *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (estirpe Fiocruz L1-130)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises de bioinformática

Na base de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), foram localizadas as sequências dos genes LIC_11567 e LIC_11568 no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Domínios conservados nas proteínas foram identificados pelas ferramentas InterPro (BLUM et al., 2021), NCBI Conserved Domain Search (MARCHLER-BAUER et al., 2015) e KEGG Motif Search (que se conecta a diferentes bases de dados como Pfam) (KANEHISA, 2002; MISTRY et al., 2021). A presença de peptídeos sinal e predição de localização subcelular foi testada com as ferramentas SignalP (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019), LipoP (JUNCKER et al., 2003), Phobius (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2004), e PSORTb (EFTEKHAR, 2020), entre outras. Complementando isto, o servidor TMHMM (KROGH et al., 2001) foi utilizado para a predição de hélices transmembranas.

O servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015) foi utilizado para predição de estrutura secundária (baseada na homologia de sequências) e modelagem da estrutura terciária das proteínas por homologia com outras proteínas com suas estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente. A predição de estrutura tridimensional também foi feita pelos programas RaptorX (KÄLLBERG et al., 2012) e I-TASSER (ZHANG, 2008) a partir das sequências primárias. O servidor DALI (HOLM, 2020) foi utilizado para analisar quais proteínas têm similaridade estrutural com as estruturas tridimensionais preditas.

Árvores filogenéticas foram feitas usando o software MEGA X (KUMAR et al., 2018) de acordo com o protocolo descrito por Hall, B. G. e colaboradores (HALL, 2013). As sequências dos genes de LIC_11567 e LIC_11568 e dos seus ortólogos em outras espécies de *Leptospira* foram selecionadas usando BlastP (CAMACHO et al., 2009) e alinhadas para a construção das árvores filogenéticas. No caso de LIC_11568 e seus ortólogos, as sequências foram alinhadas sem levar em consideração o extremo N-terminal (resíduos 1-42) devido a sequências mal anotadas nas bases de dados. Parálogos do gene LIC_11568 foram identificados a partir de bases de dados disponíveis em KEGG Database.

3.2. Escolha do vetor para ensaio de toxicidade de LIC_11568 em *E. coli*

Para clonagem de LIC_11568, o gene foi amplificado com enzima de alta fidelidade Phusion (Thermofisher Scientific) a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130) usando os primers mostrados na **Tabela 3** do APÊNDICE, seguindo o protocolo descrito abaixo no ponto **3.4. Escolha do vetor expressão e clonagem**. O produto da amplificação foi inserido no vetor pBRA (adicionado do peptídeo sinal de localização periplasmática PelB, excisado de um plasmídeo comercial pET22) utilizando as enzimas restrição *NcoI* e *SalI* e a enzima T4 ligase (Thermofisher Scientific). A clonagem foi realizada com adição de 0,6 % de D-glicose ao meio para evitar vazamento de expressão do gene potencialmente tóxico às células. Diferentes construções contendo diferentes domínios da proteína foram obtidas desta forma, incluindo versões truncadas com ou sem o peptídeo sinal, nomeadas: LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆. Além disso, os fragmentos de DNA correspondentes a LIC_11568₁₋₃₃₆ e LIC_11568₅₅₋₃₃₆ também foram clonados em uma construção de pBRA sem o peptídeo sinal PelB (**Figura 2**).

O vetor pBRA tem o promotor PBAD induzível por L-arabinose 0,2 %, reprimível por D-glicose 0,2 % e expressando resistência a estreptomicina 50 µg/mL (BAYER-SANTOS et al., 2019).

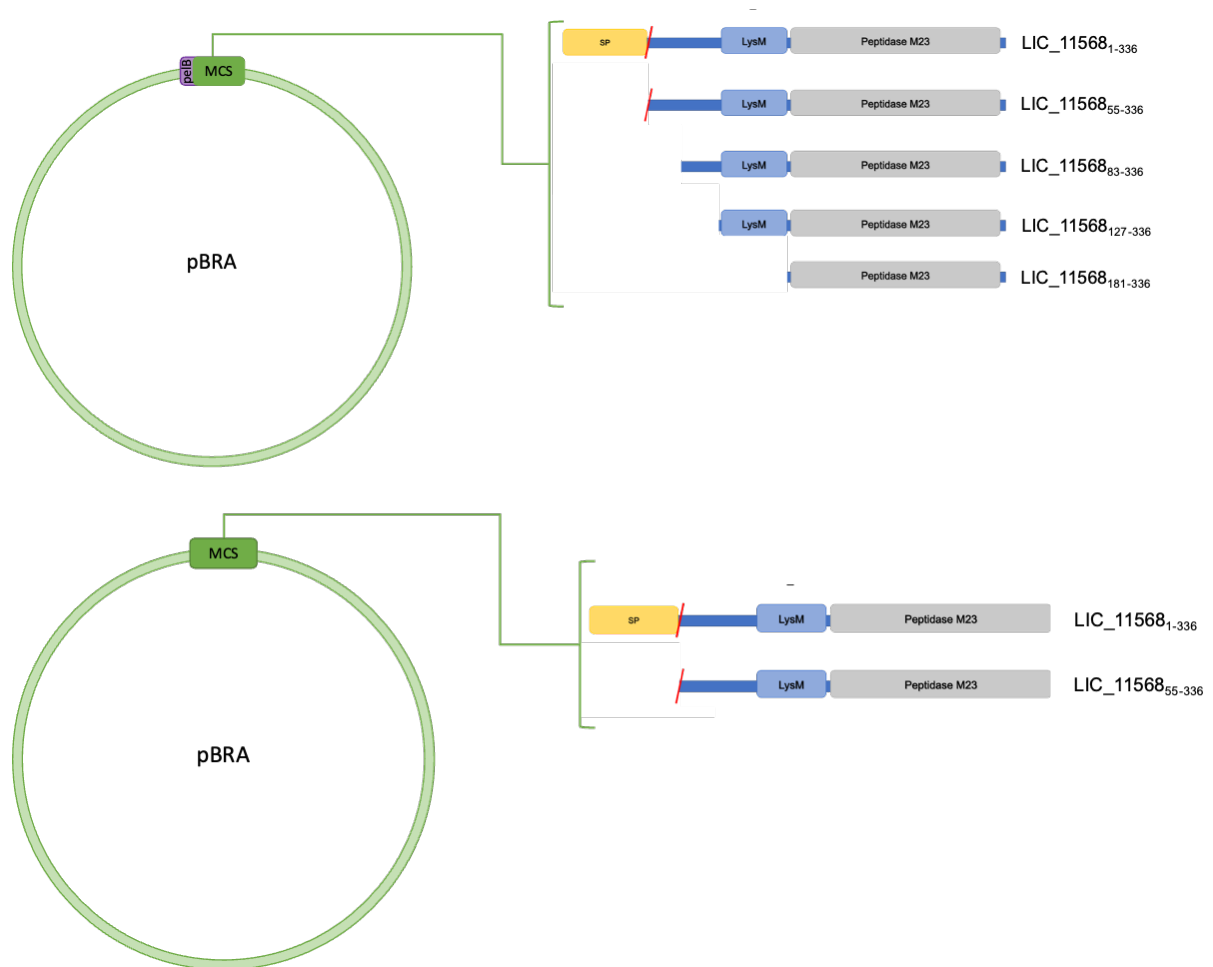


Figura 2 – Representação das diferentes construções de LIC_11568 clonadas em pBRA com e sem pelB. Os resíduos correspondentes de cada construção estão descritos na figura em aminoácidos. Os domínios são representados por quadrados. Quadrados amarelos indicam a presença de peptídeo sinal (SP). Quadrados azuis e cinza denotam domínios funcionais: LysM e peptidase M23, respectivamente. Linha vermelha indica possível sítio de clivagem. Os tamanhos dos domínios são proporcionais aos seus tamanhos em aminoácidos. *MCS – Sítio Múltiplo de Clonagem.

3.3. Avaliação da toxicidade de LIC_11568 em *E. coli*

Para avaliar a toxicidade de LIC_11568 em bactérias Gram-negativas, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico com as diferentes construções de LIC_11568 clonadas no plasmídeo pBRA. Culturas *overnight* (adicionadas com 0,2 % de D-glicose) de células transformadas foram serialmente diluídas e incubadas em placa por 16 horas. Cada experimento foi levado a cabo em duas placas: uma placa contendo estreptomicina e arabinose (o agente indutor) e outra placa controle contendo estreptomicina e D-glicose (o repressor). Adicionalmente, *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pBRA (com peptídeo sinal direcionado ao periplasma) com a toxina STM14_0336, fornecida pela Dra. Ethel

Bayer-Santos, foi usado como controle positivo. O plasmídeo pBRA sem inserto foi utilizado como controle negativo (sem toxicidade).

Para desestabilizar a membrana externa e permitir a lise celular após uma possível degradação ou modificação de peptidoglicano causada por LIC_11568, meios LB foram adicionados com Triton X-100 1 % e EDTA 1 mM. Além disto, foram utilizadas também placas de meio mínimo M9 (M9-*salt solution* 10X, Glicerol 20 %, MgSO₄ 1 M, CaCl₂ 1 M, 15 g de ágar bacteriológico por litro) e de ágar LB “Low Salt” (10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 30 g de ágar bacteriológico por litro) para crescimento com carência de nutrientes e para reduzir a osmolaridade, respectivamente, a fim de suscetibilizar as células à lise.

3.4. Escolha do vetor expressão e clonagem

Para a clonagem, expressão e subsequente purificação dos genes de interesse foram utilizados os vetores pET-28a(+) e pETDuet-1, ambos têm promotor T7 e uma região para fusão na proteína de interesse de uma cauda contendo 6 resíduos de histidina (His) na extremidade amino-terminal da proteína recombinante para a futura purificação por cromatografia de afinidade. Além disso, os plasmídeos pET-28a(+) e pETDuet-1 codificam genes que fornecem resistência a canamicina (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL), respectivamente (**Tabela 2**, APÊNDICE).

As clonagens foram realizadas com adição de 0,6 % de D-glicose ao meio das células transformadas para evitar vazamento de expressão do gene. Com pET-28a(+), clonamos apenas LIC_11567₁₇₋₁₂₄ (**Figura 3**), como também o fragmento de DNA que contém os genes LIC_11567 e LIC_11568 com a sequência completa de ambos os genes (**Figura 3**). Com pETDuet-1, foram clonadas cada uma das construções da metaloprotease LIC_11568 tanto isoladas como com LIC_11567 (**Figura 3**). As diferentes construções de LIC_11568 foram inseridas no MCS 1 (*Multiple Cloning Site* 1, MCS 1), que fusiona a cauda de histidina ao gene, e LIC_11567₁₇₋₁₂₄ foi inserido no MCS 2 do vetor.

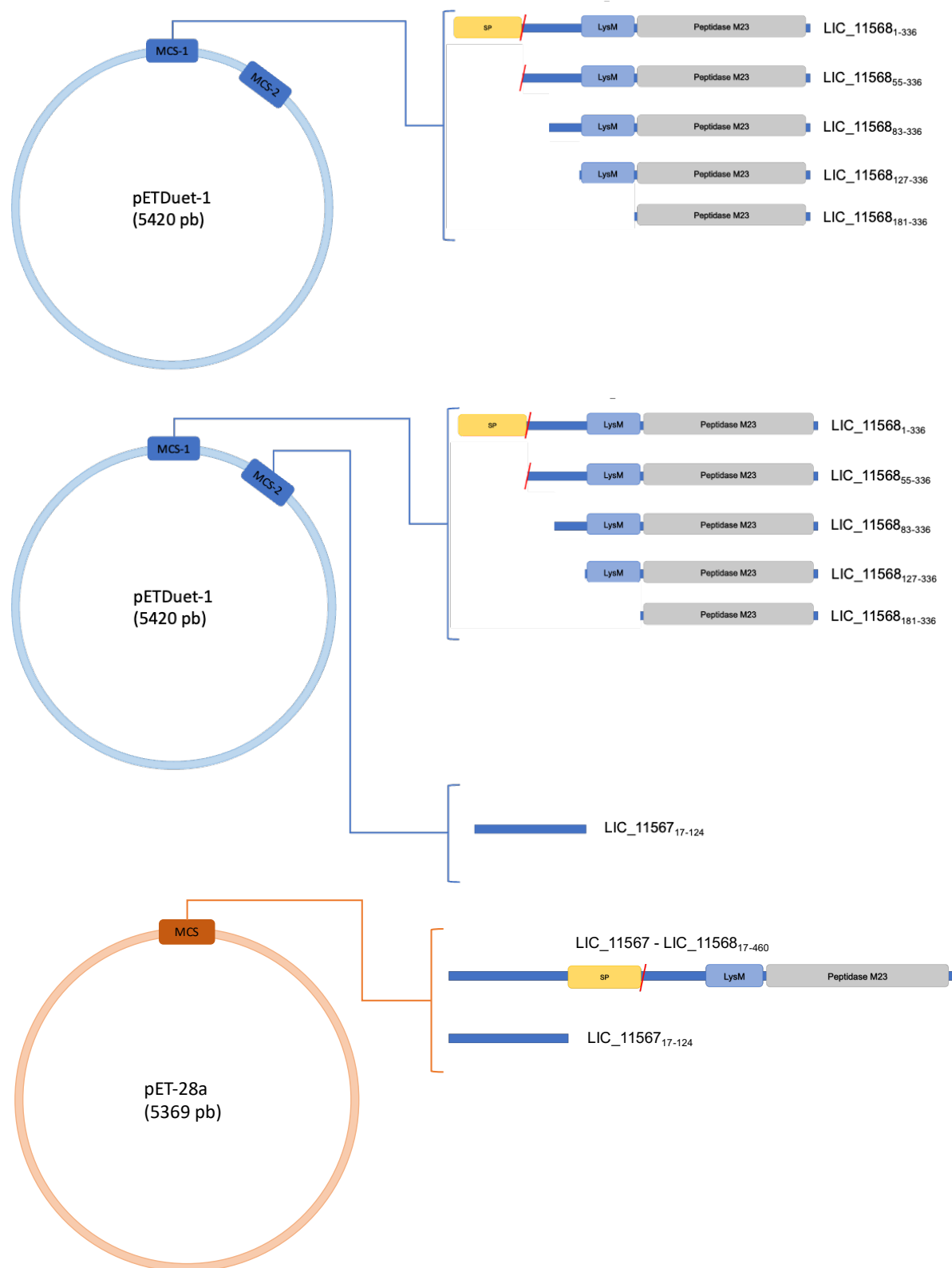


Figura 3 – Representação das diferentes construções dos genes LIC_11567 e LIC_11568 clonadas em pETDuet-1 e pET-28a(+). Os resíduos correspondentes de cada construção estão descritos na figura em aminoácidos. Os domínios são representados por quadrados. Quadrados amarelos indicam a presença de peptídeo sinal (SP). Quadrados azul e cinza denotam domínios funcionais: LysM e peptidase M23, respectivamente. Linha vermelha indica possível sítio de clivagem. Os tamanhos dos domínios são proporcionais aos seus tamanhos em aminoácidos. *MCS – Sítio Múltiplo de Clonagem.

Os genes correspondentes a cada proteína e suas diferentes construções foram amplificados com enzima de alta fidelidade Phusion (ThermoFisher Scientific) a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (cepa Fiocruz L1-130) usando os primers mostrados na **Tabela 3** do APÊNDICE. Depois esse produto da amplificação foi purificado usando o GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) e digeridos com enzimas de restrição (**Tabela 3**, APÊNDICE). As bandas correspondentes ao produto da digestão foram purificadas do gel de agarose 1% utilizando-se o GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). A ligação dos plasmídeos e os insertos digeridos e purificados foi mantida 1 hora a 22 °C por 16 horas a 16 °C usando-se T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific). Depois, os 10 µL do produto da ligação foram usados para transformar 50 µL de células competentes de *E. coli* DH5α. Para isso, as células competentes contendo a mistura da ligação foram incubadas no gelo por 10 minutos. Após esse período, um choque térmico (temperatura de 42 °C) foi dado por 1 minuto, e foram incubadas no gelo por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de LB (sem antibióticos). Transferimos os tubos para uma incubadora a 37 °C e incubamos durante 1 hora. 100 µL da amostra de células foram plaqueadas em ágar LB suplementadas com o antibiótico correspondente e 0,6 % de D-glicose e assim incubadas por 16 horas a 37 °C. Colônias isoladas de DH5α foram inoculadas em meio líquido LB com os antibióticos correspondentes contendo 0,6 % de D-glicose pelo período de 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. As culturas contendo as células com os plasmídeos recombinantes foram centrifugadas para a extração dos plasmídeos utilizando-se o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). As construções foram analisadas por sequenciamento de DNA (Sanger) no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os clones corretos foram selecionados para a posterior expressão. Diferentes construções contendo as construções dos genes de interesse foram obtidas desta forma.

3.5. Testes de expressão

Para avaliar a melhor condição em que as proteínas são expressas, foi feito um estudo preliminar de indução no qual foram usadas diferentes cepas de *Escherichia coli*: BL21 (DE3), BL21 StarTM (DE3), BL21-Codon Plus (DE3)-RIL e Lemo21 (DE3). Os antibióticos usados com as diferentes cepas estão descritos na **Tabela 4** do APÊNDICE.

As células transformadas com os plasmídeos de expressão (conforme descrito acima) foram incubadas em meio líquido LB (contendo os antibióticos correspondentes às linhagens de *E. coli* e aos plasmídeos) a 37 °C, 180 rpm até atingir uma DO de 0,8 (DO_{600nm}). Depois disto, as proteínas foram induzidas pela adição de IPTG 0,5 mM, que induz a expressão do gene clonado. Após quatro horas de indução, as células foram recolhidas por centrifugação e a expressão das proteínas foi confirmada por gel de eletroforese SDS-PAGE 15% de poliacrilamida e por Western Blot para a detecção da cauda de histidina. Um controle pré-indução foi utilizado. A cepa de *Escherichia coli* que expressou mais proteína foi usada para a expressão da proteína em larga escala.

3.6. Expressão das proteínas de interesse em larga escala

Após serem escolhidas as cepas e as condições mais adequadas para a expressão da proteína de interesse, as proteínas recombinantes foram expressas em maior escala para posterior purificação, seguindo o protocolo dos testes de expressão, usando um volume maior de cultura. Um controle pré-indução foi utilizado.

3.7. Purificação das proteínas: cromatografia de afinidade

Após a indução, as células foram centrifugadas a 8500 rpm por 15 minutos a 4 °C, e o pellet resultante foi solubilizado em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 20% (w/v) sacarose, 0,03% (v/v) Tween-20, 0,03% (v/v) Triton X-100). As células foram lisadas em um sonicador Vibracell VCX750 Ultrasonic Cell Disrupter (Sonics, Newtown, CT, USA) a 4 °C por 30 minutos, com pulsos *on* de 10 segundos e intervalos *off* de 45 segundos, em amplitude de 35 mA. As células foram centrifugadas a 17.000 rpm por 45 min a 4 °C. Controles da fração solúvel e insolúvel foram usados.

A fração solúvel foi aplicada na coluna HisTrap Chelating HP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) previamente equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 200 mM NaCl e 20 mM imidazol) usando o sistema de cromatografia ÄKTA Pure (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). A proteína ligada foi eluída da coluna após 5 CV (*Column Volume* ou volume de coluna) de lavagem com tampão A seguida por 20 CV de gradiente isocrático de 20 à 500 mM de imidazol. Para fazer o gradiente foi usado o tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 200 mM NaCl, 500 mM imidazol). O grau de pureza das proteínas foi monitorado por

eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e análises por Western Blot via detecção da cauda de histidina. As frações eluídas com as proteínas foram juntadas e concentradas com filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, Ma, EUA) com um tamanho de poro de 3 kDa. As frações eluídas mais puras de LIC_11568 foram dialisadas em tampão PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 8,5).

As frações de LIC_11567 foram aplicadas na coluna de exclusão por tamanho (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg) previamente equilibrada com PBS pH 7,4, já que será usada em cultura de células, usando o sistema de cromatografia ÄKTA Pure (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). A proteína foi eluída usando 2 CV de tampão PBS pH 7,4.

As frações com as proteínas de interesse, observadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e confirmadas por Western Blot, foram concentradas novamente usando tubos de centrífuga Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, Ma, EUA) com um tamanho de poro de 3 kDa.

3.8. Dosagem das proteínas

A concentração total de proteínas recombinantes foi estimada por dois métodos: pelo Kit BCA Protein Assay (Pierce), e medindo a absorvância a 280 nm usando um espectrofotômetro BioSpectrometer (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) calibrado com o coeficiente de extinção de proteínas purificadas. Os coeficientes de absorção molar para cada construção de proteína foram estimados usando o ProtParam ExPASy Bioinformatics Resource Portal (GASTEIGER et al., 2005).

3.9. Produção de soro policlonal para reconhecimento da proteína LIC_11567 em coelho

Um coelho (linhagem Nova Zelândia com aproximadamente 60 dias de idade) foi utilizado para a produção de anticorpos para reconhecimento da proteína LIC_11567. Foram feitas três imunizações de 1 mL via intramuscular com 75 µg de proteína recombinante e 2,5 mg de hidróxido de alumínio como adjuvante. As imunizações foram feitas com intervalos de 15 dias. Uma sangria pré-imune foi realizada via plexo auricular como controle do soro (pré-imune). A sangria final foi feita quinze dias após a terceira dose por punção cardíaca. Depois

de cada coleta, o sangue foi centrifugado por 15 min a 1200 rpm, a temperatura ambiente, para obter o soro. O protocolo para obtenção de antissoro foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA Nº 9452010316). A produção do soro policlonal de LIC_11567 foi realizada pela equipe da Professora Angela Silva Barbosa e posteriormente doado para o desenvolvimento de experimentos futuros do presente projeto.

3.10. Determinação do título de anticorpos

Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA. Em placa de 96 poços foram incubados 0,5 µg/poço de proteína purificada LIC_11567 com 100 µL de coating buffer (3,7 g de NaHCO₃ e 0,64 g de Na₂CO₃ em 1 L de água destilada) por 16 horas a 4 °C. Após lavar a placa 3 vezes com Wash Buffer (PBS contendo Tween 0,05 %), esta foi incubada com solução de bloqueio (PBS contendo Tween 0,05 %, leite em pó desnatado 10 %) por 2 horas a 37 °C. A placa foi novamente lavada com Wash Buffer e o antissoro e o soro pré-imune foram aplicados em diluições seriadas (1:50 até 1: 209.715.200) com PBS por 1 hora a 37 °C. Após 3 lavagens, o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, foi adicionado à placa na diluição de 1:5.000 com PBS e incubado por 1 hora a 37 °C. A placa foi novamente lavada e revelada com 100 µL/poço de solução de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) 0,4 mg/mL e H₂O₂ 0,015 % diluídos em tampão citrato-fosfato 0,05 M por aproximadamente 10 minutos no escuro. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4 N e a cor gerada foi analisada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm. O título de anticorpos foi considerado como a diluição do soro que é 2 vezes o soro pré-imune.

3.11. Mutagênese de LIC_11568₅₅₋₃₃₆

Foram desenhados dois mutantes dos motivos conservados HxxxD e HxH de LIC_11568: D225A e H300A respectivamente. Estes mutantes foram gerados por mutagênese sítio-dirigida fazendo uso da técnica *overlap extension PCR* que permite substituição, inserção e deleção de bases sem a necessidade de enzimas de restrição (HIGUCHI; KRUMMEL; SAIKI, 1988; URBAN; NEUKIRCHEN; JAEGER, 1997). Em duas reações de PCR separadas, dois fragmentos da sequência de DNA que codifica para LIC_11568₅₅₋₃₃₆ inserido em pETDuet-1 foram amplificados usando, para cada reação, um dos *primers* (oligonucleotídeos) utilizados para a amplificação de LIC_11568₅₅₋₃₃₆ e um primer que contém a mutação a ser inserida (5'-GGCTTCCATACCGGTTTGGCTTTTGCTGGGGCTCAAGGC-3' e 5'-

GACTTCAAATGAAGAGCAGGTCCCGTAGCCGA-3' para o um fragmento, e 5'-TCGGCTACGGGACCTGCTCTTCATTTTGAAGTC-3' e 5'-GCCTTGAGCCCCAGCAAAAGCCAAACCGGTATGGAAGCC-3' para a amplificação do outro fragmento) e a enzima de alta fidelidade Phusion (Thermofisher Scientific). Os dois produtos intermediários foram purificados usando o GeneJET PCR Purification Kit (Thermofisher Scientific) e posteriormente misturados na proporção 1:1 para serem usados como *template* (molde) de uma nova PCR. Durante esta reação os fragmentos com extremos coesivos (“*overlapping ends*”) vão anelar e permitir a amplificação da sequência com a mutação sítio-dirigida. O produto fundido é amplificado com a ajuda dos dois *primers* “originais” de LIC_11568₅₅₋₃₃₆ (5'-GGCTTCCATACCGGTTTGGCTTTTGGCTGGGGCTCAAGGC-3' e 5'-GCCTTGAGCCCCAGCAAAAGCCAAACCGGTATGGAAGCC-3'). O esquema para a obtenção da mutação sítio dirigida de LIC_11568₅₅₋₃₃₆ está esquematizada na **Figura 4**.

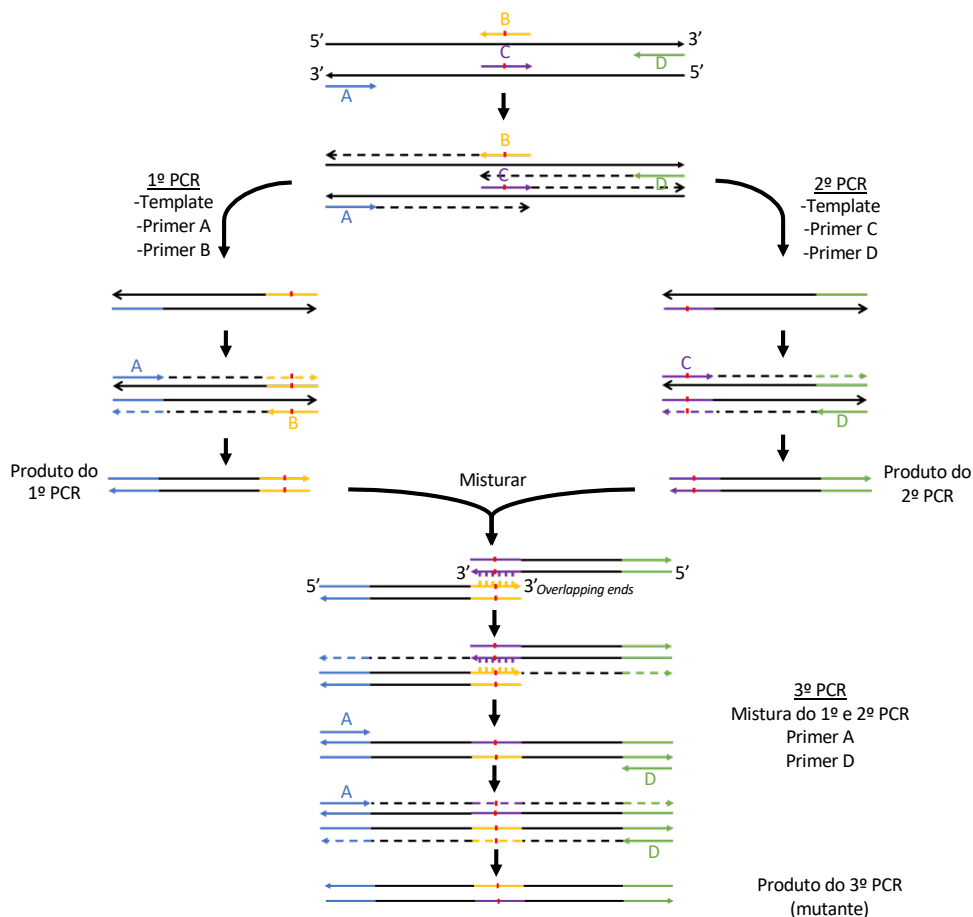


Figura 4 – Geração de mutações sítio-dirigidas pela técnica *overlap extension PCR*. As reações de PCR primárias (1º e 2º PCRs) seguem uma reação de PCR padrão, mas com a adição de primers mutagênicos (B y C). As reações PCR primárias produzem fragmentos de DNA mutagênico de dupla fita que possuem extremos coesivos (“*overlapping ends*”). Na reação de PCR secundária, os produtos da reação de PCR primária são misturados em proporção 1:1 e amplificados em uma nova reação de PCR (3º PCR) para produzir o DNA

mutagênico de fita dupla de comprimento total. *A (azul): primer específico do gene *forward*; D(verde): primer específico do gene reverso; C(roxo): primer mutagênico *forward*; B(amarelo): primer mutagênico reverso.

Os produtos da amplificação de D225A e H300A foram purificados usando o GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) e inseridos no plasmídeo pETDuet-1, para isso ambos os fragmentos e o vetor foram digeridos usando o par de enzimas *BamHI* e *Sall* e posteriormente ligados usando a enzima T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific). O plasmídeo pETDuet-1 possui o promotor T7 e uma região de fusão na proteína de interesse de 6 resíduos de histidina (His) na extremidade amino-terminal para a futura purificação por cromatografia de afinidade.

As mutações foram confirmadas por sequenciamento de DNA (Sanger) no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os clones corretos foram selecionados para a posterior expressão. Em seguida, os plasmídeos contendo as construções dos mutantes, foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) e foi testada sua expressão na cepa.

Após a confirmação por Western Blot da expressão das células transformadas com LIC_11568 mutantes, foram usadas para a expressão em larga escala e posterior purificação de proteínas seguindo o protocolo descrito no **tópico 3.7 Purificação das proteínas: cromatografia de afinidade**.

3.12. Avaliação da atividade proteolítica de LIC_11568 sobre componentes da matriz extracelular e do plasma humano

As duas construções de LIC_11568 escolhidas (LIC_11568₅₅₋₃₃₆ e LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆) foram incubadas com as seguintes proteínas purificadas: lumiscam (0,5 µg), fibrinogênio (10 µg), fibronectina plasmática (5 µg), vitronectina (1 µg) e laminina (1 µg). Para a observação da degradação dos diferentes substratos, concentrações de 50 nM, 100 nM e 500 nM de proteína purificada foram incubadas com os diferentes componentes a 37 °C por 4 horas em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM e 0,05% de CHAPS, pH 7,4. Um controle de cada substrato sem adição de proteína foi usado. Também, os inibidores de metaloproteases EDTA (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*) e 1,10-fenantrolina foram usados. 500 nM de proteína recombinante foram incubados com 10 mM de EDTA e 5 mM de 1,10-fenantrolina a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados os substratos e incubados por 4 horas como mencionado acima. Os produtos das clivagens foram analisados por Western Blot. Os anticorpos e suas diluições estão descritos na **Tabela 5** no APÊNDICE.

3.13. Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As células THP-1 (linha celular de monócitos derivadas de paciente com leucemia aguda) foram mantidas em meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil), 2% de tampão HEPES, 1mM de piruvato (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil) e 2% de uma solução de penicilina e estreptomicina (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil) a 37 °C e 5% CO₂ em garrafas para cultura de 75 cm². O meio foi trocado a cada três dias e a concentração de células mantida abaixo de 1 x 10⁶ células/mL a cada troca.

3.14. Estimulação dos macrófagos

As células THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1x10⁵ células/mL e estimuladas com 10 ng/mL de PMA (do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) durante 24 horas. Depois disso, o meio foi substituído por novo meio, sem PMA, e as células foram incubadas por 72 horas.

No dia do estímulo com a proteína, o meio das células foi trocado por um meio novo com 5% de soro fetal bovino e diferentes concentrações de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ (0,5 µM, 1 µM, 2 µM e 4 µM) com e sem KCl 70 mM. Controles com somente meio e meio suplementado com nigericina 20 µM foram usados. Além desses, 250 nM da proteína recombinante LIC_11568, purificada nas mesmas condições que LIC_11567, foram usados para descartar uma possível resposta devida a algum contaminante presente durante o processo de purificação da proteína expressa em células de *E. coli*. Os controles também foram analisados na presença de KCl 70 mM. Cada condição foi executada em triplicata. Os macrófagos foram incubados na presença da proteína por 2, 4, 8 e 24 horas.

3.15. Citotoxicidade de macrófagos: Azul de Tripán

Após o estímulo dos macrófagos com LIC_11567₁₇₋₁₂₄, as células foram soltas utilizando TrypLEExpress (Gibco, EUA), coradas com Azul de Tripán (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil) e contadas usando uma câmara de Neubauer.

3.16. Citotoxicidade de macrófagos: Liberação de LDH (Lactato desidrogenase)

A liberação de LDH foi medida utilizando o kit Thermo Scientific™ Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay, conforme descrição do fabricante. Depois da incubação dos macrófagos com LIC_11567₁₇₋₁₂₄, os sobrenadantes foram retirados para quantificar a liberação de LDH das células. A citotoxicidade foi calculada como segue:

$\% \text{ Citotoxicidade} = (\text{Atividade LDH após estímulo} - \text{Atividade LDH espontânea}) / (\text{Atividade LDH máxima} - \text{Atividade LDH espontânea}) \times 100$. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.17. Cultivo de *Leptospira interrogans*

As bactérias *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 foram cultivadas, em aerobiose a 30 °C, em meio de cultura EMJH para *Leptospira* spp, contendo 0,23% de EMJH base (Difco, Maryland, Estados Unidos) suplementado com 10% de BSA (albumina bovina) (Difco), 1,25% de Tween-80 e vários sais minerais e vitaminas, conforme descrito em HAAKE; MATSUNAGA, 2010. A cada sete dias, 10% da cultura era transferido para um novo meio. As bactérias patogênicas foram cedidas pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann da Faculdade de Medicina Veterinária e Zoologia da Universidade de São Paulo.

O processo de manutenção de *Leptospira* no laboratório não teria sido possível sem a ajuda da aluna de doutorado Anielle Ferrari.

3.18. Espectrometria de massas e identificação de proteínas

Para entender melhor a função de LIC_11567 e LIC_11568 e tentar demonstrar que são efetores secretados por *Leptospira interrogans*, foram identificadas por espectrometria de massas as proteínas do secretado de *Leptospira interrogans*. Para isso, 50 mL de cultura de *L. interrogans* (10^9 bactérias) em meio EMJH a 30 °C foram peletizados por centrifugação a $3.200 \times g$ durante 15 minutos, e lavados três vezes com PBS, pH 7,4. As bactérias foram ressuspendidas em meio EMJH (sem soro fetal bovino) e incubadas a 30°C por 4h para permitir a secreção de proteínas, e centrifugadas a $3.200 \times g$ por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, passados por um filtro 0,22 μm (Merck Millipore, Billerica, Ma, EUA) e

concentrados utilizando filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, Ma, EUA).

Para a identificação das proteínas secretadas por *Leptospira*, 25 µL do secretado de proteínas derivadas do sobrenadante da cultura *L. interrogans* foram carregados em gel SDS-PAGE e cortadas as bandas dos tamanhos aproximados esperados para as proteínas LIC_11567 e LIC_11568 (~13 kDa e ~31 kDa, respectivamente). Essas bandas foram processadas pelo Laboratório de Glicoproteômica do Prof. Giuseppe Palmisano no ICB com a ajuda da aluna de doutorado Verônica Feijoli Santiago como descrito abaixo.

As bandas do gel de poliacrilamida foram cortadas em pedaços (1 mm³), transferidas para um tubo *low binding* limpo de 1,5 mL e lavadas com solução de lavagem (40% de acetonitrila, 50 mM de bicarbonato de amônio) até que as bandas ficaram completamente desmanchadas. Em seguida, as proteínas foram reduzidas com 10 mM de ditioneitol (DTT) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubadas por 45 minutos a 56 °C. A alquilação proteica foi realizada com iodoacetamida 55mM (IAA) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. As proteínas foram digeridas em peptídeos através de uma reação de tripsina *overnight* a 37° C. A reação da tripsina foi interrompida com 10% de ácido trifluoroacético (TFA) (TFA 1% na concentração final). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, o tampão de extração (acetonitrila 40% / TFA 0,1%) foi adicionado aos pedaços de gel e incubado por 15 minutos em um thermomixer à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para o mesmo tubo. A extração do peptídeo foi realizada duas vezes e depois secado em uma centrífuga concentradora a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em TFA 0,1% para continuar com o protocolo de dessalinização.

Para remover a alta concentração de sal dos peptídeos digeridos, foram utilizadas resinas C18 de fase reversa em pontas de pipeta P200. As resinas C18 foram lavadas com acetonitrila (ACN) de Grau HPLC 100%, seguido de uma lavagem com 50% de ACN. As resinas C18 foram lavadas três vezes com TFA 0,1% antes de carregar as amostras. Em seguida, os peptídeos foram eluídos com ACN 50% / TFA 0,1% em um novo tubo *low binding* e ACN 70% / TFA 0,1% no mesmo tubo. As amostras foram secadas na centrífuga a vácuo para proceder com a análise de espectrometria de massas.

O sistema LC-MS/MS empregado foi um sistema Easy-nano LC 1200 (Thermo Fisher Scientific Corp) acoplado a um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos equipado com uma fonte de nanospray (Thermo Fisher Scientific Corp). As amostras foram carregadas em

uma coluna de retenção (Acclaim PepMap 0,075 mm, 2 cm, C18, 3 µm, 100 Å; Thermo Fisher Scientific Corp.) em linha com uma coluna nano-LC (Acclaim PepMap RSLC 0,050 mm, 15 cm, C18, 2 µm, 100 Å; Thermo Fisher Scientific Corp.). O gradiente usado foi o seguinte: 5-28% do solvente B (A 0,1% FA; B 90% ACN, 0,1% FA) por 25 minutos, 28-40% B por 3 minutos, 40-95% B por 2 minutos e 95% B durante 12 minutos a 300 nL/min. O espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos foi operado em modo positivo. O scan de MS completo com controle de ganho automático (AGC) 5×10^5 íons e tempo máximo de enchimento de 50 ms. Cada scan de MS foi adquirido a 120K de largura total com metade da largura máxima (FWHM) de alta resolução na Orbitrap com faixa de massa m/z 400-1600 Da. Alta resolução de dissociação (HCD) com uma energia de colisão normalizada ajustada a 30 utilizada para fragmentação. Os íons de fragmentação MS/MS resultantes foram detectados no analisador de massa Orbitrap com uma resolução de 30.000. Um AGC 5×10^4 íons e um tempo máximo de injeção de 54 ms foram usados.

Para identificação e quantificação de proteínas, os arquivos crus foram importados para MaxQuant versão 1.6.17.0. Para a identificação de proteínas em MaxQuant, foi utilizado o mecanismo de busca na base de dados Andromeda contra a Uniprot. A base de dados utilizada foi a de *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (estirpe Fiocruz L1-130). Foram utilizados os seguintes parâmetros: carbamidometilação de cisteína (57.021464 Da) como modificação fixa, oxidação da metionina (15.994915 Da) e proteína de acetilação N-terminal (42.010565 Da) foram selecionados como modificações variáveis. A especificidade enzimática foi definida como tripsina completa com no máximo duas clivagens perdidas. O comprimento mínimo do peptídeo foi ajustado para 7 aminoácidos. Para quantificação sem rótulos, foi usado o recurso de "match between runs" no Maxquant, que é capaz de identificar a transferência entre as amostras com base no tempo de retenção e massa precisa, com uma janela de tempo de correspondência de 0,7 minutos e uma janela de tempo de alinhamento de 20 minutos.

A quantificação de proteínas foi obtida com base na quantificação *Label-free*. O algoritmo *Label-free* no Maxquant é baseado em *razor peptides* e peptídeos únicos. A abundância de proteína foi calculada com base na intensidade da proteína espectral normalizada (intensidade LFQ). A análise estatística foi realizada no software Perseus (versão 1.6.14.0). Contaminantes potenciais, proteínas identificadas apenas por local e proteínas identificadas em banco de dados reverso foram excluídas para análise posterior.

Arquivos crus de amostras de rato e humanos foram pesquisados usando a plataforma computacional do software Proteome Discoverer versão 2.3 (Thermo Fisher) usando o mecanismo de busca Sequest. Os dados brutos obtidos das amostras de ratos foram pesquisados em comparação com *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar copenhageni (estirpe Fiocruz L1-130) (3.654 entradas baixadas em março de 2022). Os parâmetros utilizados foram a especificidade total da tripsina; duas clivagens perdidas permitidas, contaminantes comuns e seqüências invertidas incluíram carbamidometilação da cisteína como modificação fixa; oxidação da metionina, e acetilação da proteína N-terminal como modificações variáveis. Foram aceitas identificações de combinações de espectro de peptídeos (PSMs), peptídeos e proteínas com menos de 1% de taxa de falsas descobertas (FDR).

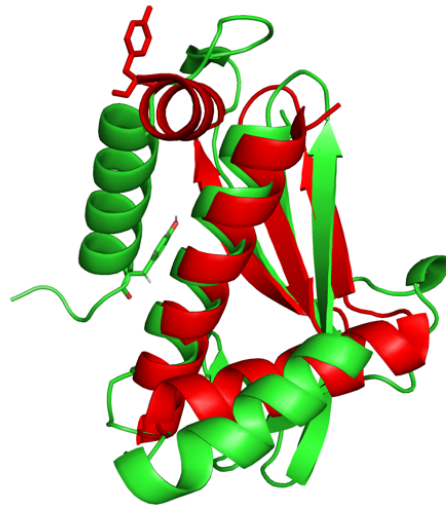
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de Bioinformática de LIC_11567

Somado a uma revisão de literatura, se realizou uma extensa caracterização por bioinformática de LIC_11567 descrita a seguir. A proteína LIC_11567 dispõe de um peptídeo sinal, MFRIAVFLLPSVFIFLAGC, característico das lipoproteínas, com uma sequência hidrofóbica e um lipobox, seguido de um sítio de clivagem e lipidação que no caso de LIC_11567 seria a cisteína. Essa lipoproteína deve ser reconhecida pelo sistema *Sec* da membrana interna e clivada. Posteriormente a cisteína na posição +1 do lipobox é covalentemente modificada por ácidos graxos (lipidação da cisteína) e transferida para a membrana externa já que não possui aminoácidos carregados negativamente nas posições +2 e +4. Essa região negativa após o peptídeo sinal parece funcionar como sinal de retenção da membrana interna em *Leptospira* spp. (HAAKE; MATSUNAGA, 2010; MATSUNAGA et al., 2006; WILSON; BERNSTEIN, 2016). THODUVAYIL e colaboradores já detectou LIC_11567 por espectrometria de massas na fração de detergente de Triton X-114 que representa a membrana externa da bactéria, confirmando as predições. Nossa hipótese é que possivelmente LIC_11567 seja reconhecida na membrana externa por uma flippase que a reposiciona do ambiente periplasmático para a face externa da membrana ou essa mudança de localização de face da membrana externa pode ser feita pelo próprio sistema de secreção tipo II (NAKAYAMA; KUROKAWA; LEE, 2012; RONDELET; CONDEMINE, 2013; WILSON; BERNSTEIN, 2016). Por outro lado, HARTWIG e colaboradores usou LIC_11567 para

inocular camundongos e avaliar a resposta imune humoral subsequente. LIC_11567 induziu uma resposta IgG significativa. Além disso, a proteína recombinante foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes com leptospirose grave, mostrando assim um possível envolvimento com a patogenicidade e tendo um potencial papel como candidata a vacina contra Leptospirose (HARTWIG et al., 2011).

Graças ao programa RaptorX, foi possível prever uma estrutura tridimensional bem enovelada com um RMSD (Root-Mean-Square Deviation) de 4,3 Å (**Figura 5**). Depois, o DALI *server* foi usado para analisar quais proteínas têm similaridade estrutural com a estrutura predita de LIC_11567. Foi assim que descobrimos um possível homólogo estrutural Est12 com aproximadamente um Z-score de 4 (QU et al., 2020), (**Figura 5**). Essa proteína, secretada por *Mycobacterium tuberculosis*, ativa o inflamassoma NLRP3 levando a piroptose de macrófagos (morte celular devida a formação de poros na membrana celular provocando desequilíbrio osmótico e lise) (QU et al., 2020). Ambas as proteínas possuem um extremo N-terminal hidrofóbico e uma tirosina no final da última alfa hélice, que no caso de Est12 atua como um sítio de ligação para RACK1, que promove a conformação ativa de NLRP3 e a montagem do inflamassoma (DUAN et al., 2020).



Est12 MTPINRPLTNDERQLMHELAVQVCSQTGCSPPDAAVEALESFAKDGTLIRGDTENAYLEAGGNVLVHADRDWLAFHASYPGNDPLRDARPIEQDDQAGPPS
 LIC_11567 MFRIAVFLLPSVFIFLAGGNLIRKDAVAQINEHYSEKIYYLTKDKKVSNTETFKKGMLVRIYVESTPSMWKIKCYPADHKREYAIGRMILYQLNDEYSGKKITVEDLKL IANELVEYKKKK

Figura 5 – Modelo de estrutura terciária de LIC_11567 predito pelo programa RaptorX a partir da sequência primária de *L. interrogans*, superposto com a estrutura de Est12 de *M. tuberculosis* em PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). A tirosina de LIC_11567 sublinhada na imagem corresponde ao resíduo 120.

Quanto aos estudos filogenéticos podemos observar que o gene LIC_11567 compartilha ancestrais comuns as espécies que formam o grupo patogênico, sugerindo uma possível relação

com a patogenicidade de *Leptospira* (**Figura 6**) ou apenas uma correlação evolutiva pelo fato de ela estar presente em uma espécie patogênica.

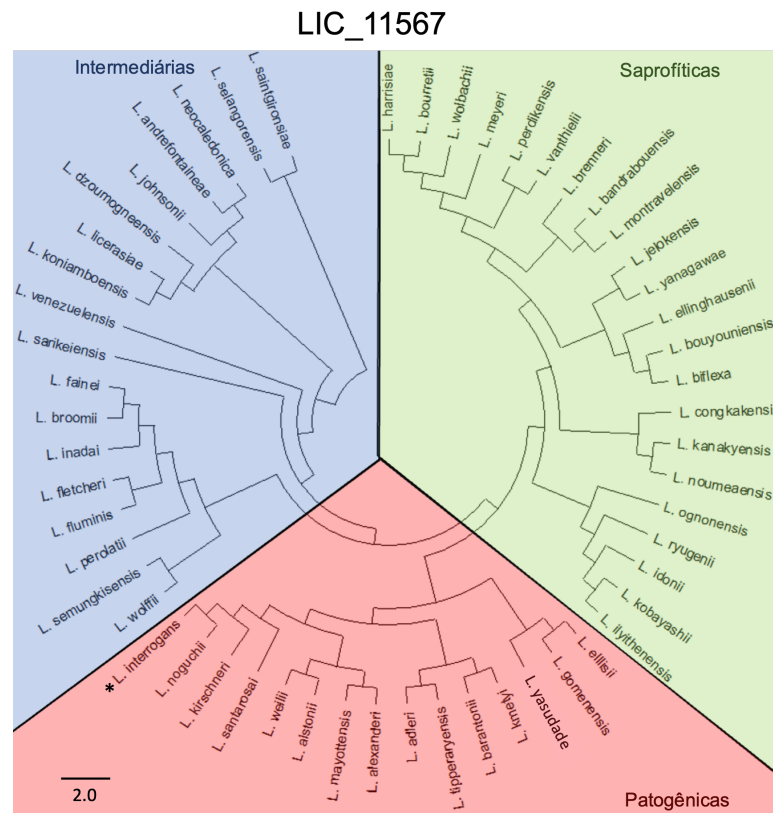


Figura 6 – Árvore filogenética com base na comparação de seqüências de aminoácidos traduzida do gene LIC_11567 de *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130 construída usando o método *maximum likelihood* (modelo LE; GASCUEL, 2008, (LG) G+I). As cores refletem os grupos de patogenicidade de *Leptospira* spp. segundo a classificação de VINCENT et al., 2019; CASANOVAS-MASSANA et al., 2019: verde – saprofíticas; azul – intermediárias; vermelho – patogênicas. A barra de escala representa o número de substituições de aminoácidos.

4.2. Clonagem de LIC_11567₁₇₋₁₂₄

O gene LIC_11567 foi amplificado por PCR e analisado em gel de agarose 1 %. O gene foi amplificado (sem a região que codifica o peptídeo sinal: resíduos 17-124) e digerido usando as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* para depois ser inserido no vetor de expressão pET-28a(+) (resultados não apresentados). Essa construção foi clonada pela aluna Vanice Harumi de Oliveira Kanashiro para seu projeto de iniciação científica “Estudo da pseudopilina majoritária formadora do pseudopilus encontrado no T2SS e possível antitoxina encontrados em *Leptospira interrogans*”.

Por outro lado, foi amplificada a construção de LIC_11567 usando as enzimas *NdeI* e *XhoI* (resíduos 17-124) (**Figura 7**) para ser inserida em pETDuet-1 no MCS 2.

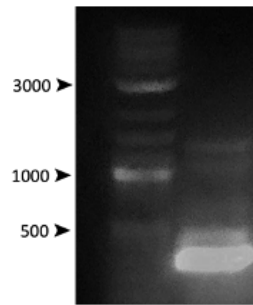


Figura 7 – Amplificação de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ de 365 pb por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni. * pb – pares de bases.

4.3. Testes de expressão de LIC_11567₁₇₋₁₂₄

A cepa de *E. coli* Lemo21 (DE3) foi a escolhida para testar a expressão de LIC_11567. Resultados preliminares obtidos pela aluna de iniciação científica, Vanice Harumi de Oliveira Kanashiro, mostraram uma boa expressão usando essa cepa. A análise de expressão da proteína recombinante LIC_11567₁₇₋₁₂₄ em Lemo21 (DE3), a partir do correspondente gene clonado em pET-28a(+), feita em SDS-PAGE permitiu a visualização de uma banda de ~ 16 kDa na fração induzida (**Figura 8**).

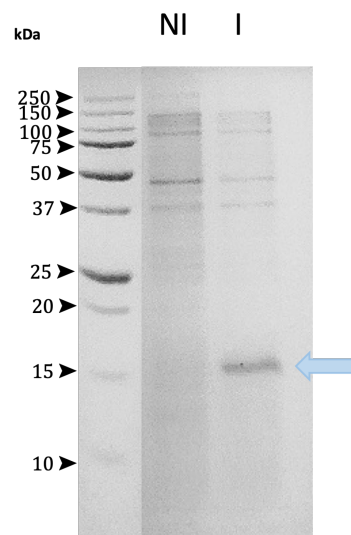


Figura 8 – Testes de expressão de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ em Lemo21 (DE3), em SDS-PAGE. * kDa – Kilodalton; NI – Não Induzido; I – Induzido.

4.4. Purificação de proteínas: LIC_11567₁₇₋₁₂₄

A construção de LIC_11567₁₇₋₁₂₄, começando no aminoácido número 17 (sem o peptídeo sinal de lipoproteína) foi purificada por cromatografia de afinidade sob as mesmas

condições descritas no ponto 3.7. **Purificação das proteínas: cromatografia de afinidade** observadas em gel de poliacrilamida 15 %. As amostras contendo a proteína de interesse foram confirmadas por Western Blot via reconhecimento da cauda de histidina.

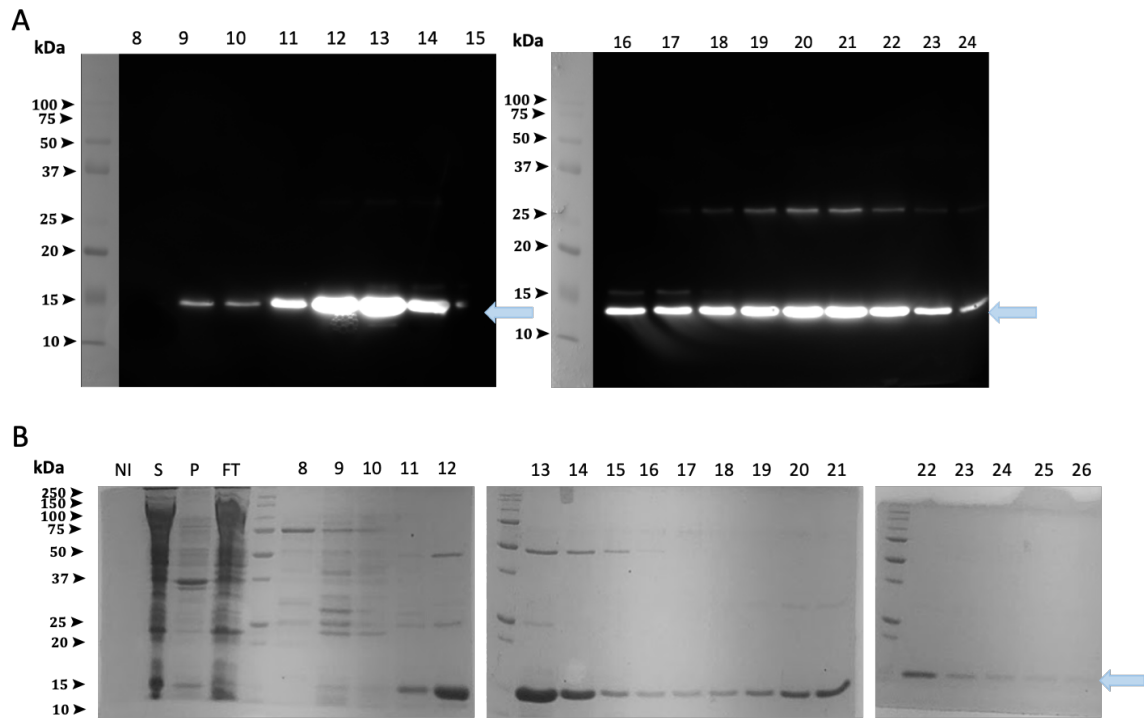


Figura 9 – Purificação de LIC_11567₁₇₋₁₂₄. (A) Detecção por Western Blot de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ purificada (~16 kDa). (B) Visualização por 15% SDS-PAGE de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ purificada (~16 kDa). * kDa – Kilodalton; NI – Não induzido; S – Sobrenadante (fração solúvel); P – Pellet (fração insolúvel); FT – Flow Throw; Números – frações de eluição.

A purificação da proteína recombinante LIC_11567₁₇₋₁₂₄ foi um sucesso. Dentre as 24 frações obtidas, 18 delas continham a proteína de interesse após eluição da proteína por cromatografia de afinidade, como podemos observar no gel de poliacrilamida e no imunoblot (**Figura 9A e 9B**). Podemos perceber nas frações 9-10 uma quantidade maior de proteínas contaminantes, provenientes de *E. coli* (**Figura 9A**). Por essa razão, essas frações foram descartadas e as outras frações (11-26) foram juntadas e aplicadas na coluna de exclusão por tamanho (dados não mostrados). No Western Blot, podemos ver bandas detectadas de peso diferente a 16 kDa (peso teórico de LIC_11567₁₇₋₁₂₄) (**Figura 9A**). Isto pode ser devido a uma inespecificidade dos anticorpos ou a formação de dímeros da proteína recombinante.

4.5. Determinação do título de anticorpos contra LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄

Foram realizadas 3 imunizações em coelho com intervalos de 15 dias como descritos nos materiais e métodos. O título de anticorpos foi determinado por ELISA e, como pode se observar na **Figura 10**, LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄ foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG. O soro imunizado apresenta um título de anticorpos estimado de 1:12.800, onde verificamos uma diferença significativa com os valores obtidos pelo pré-imune.

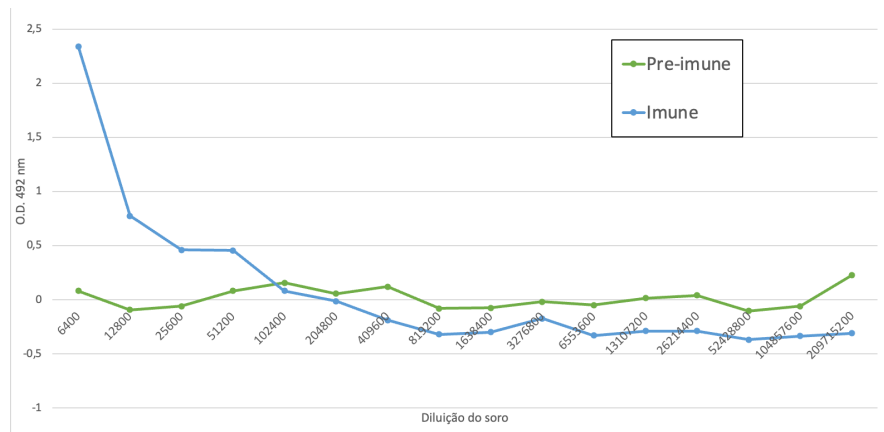


Figura 10 – Determinação do título de anticorpos para reconhecimento de LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄ produzidos em coelho. O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo.

4.6. Citotoxicidade de macrófagos THP-1

A técnica de exclusão por azul de tripan mensura a viabilidade celular pela integridade da membrana celular, sendo um dos métodos mais usados para estudar a citotoxicidade. O azul de tripan apenas cora células mortas com membranas plasmáticas rompidas, e não as células vivas que têm membranas plasmáticas intactas (CROWLEY et al., 2016). Esse método foi usado para avaliar o efeito tóxico de LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄ sobre macrófagos THP-1. As células THP-1 constituem uma linhagem celular de monócitos imortalizados, obtidos a partir de um caso de leucemia monocítica aguda infantil (BOSSHART; HEINZELMANN, 2016).

Os macrófagos derivados de células THP-1 foram incubados por diferentes tempos com diferentes concentrações de LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄ purificada. Nossos dados mostram que LIC₁₁₅₆₇₁₇₋₁₂₄ tem fortes efeitos citotóxicos em macrófagos atingindo 90 % de morte celular às 24 horas de incubação com 0,5 e 2 μ M de proteína (**Figura 11**). Para conhecer qual é a via que está ativando a morte celular, utilizamos KCl que inibe o inflamassoma NLRP3. Os

macrófagos, em presença de KCl e proteína, morrem menos (**Figura 11**, colunas tracejadas) do que os macrófagos na presença apenas da proteína. Estes resultados sugerem que a proteína ativa o inflamassoma NLRP3 desencadeando piroptose e consequentemente morte celular. Esses resultados sugerem que LIC_11567₁₇₋₁₂₄ ativa a resposta imune em células de macrófagos assim como descrito para a proteína Est12 de *Mycobacterium tuberculosis* (QU et al., 2020), que aparentemente possui homologia estrutural com LIC_11567 através de nossos dados por bioinformática. A observação dos macrófagos em presença de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ no microscópio óptico permitiu observar a morfologia característica de piroptose celular: ruptura da membrana plasmática e protrusões em forma de bolha (resultados não apresentados) (QU et al., 2020).

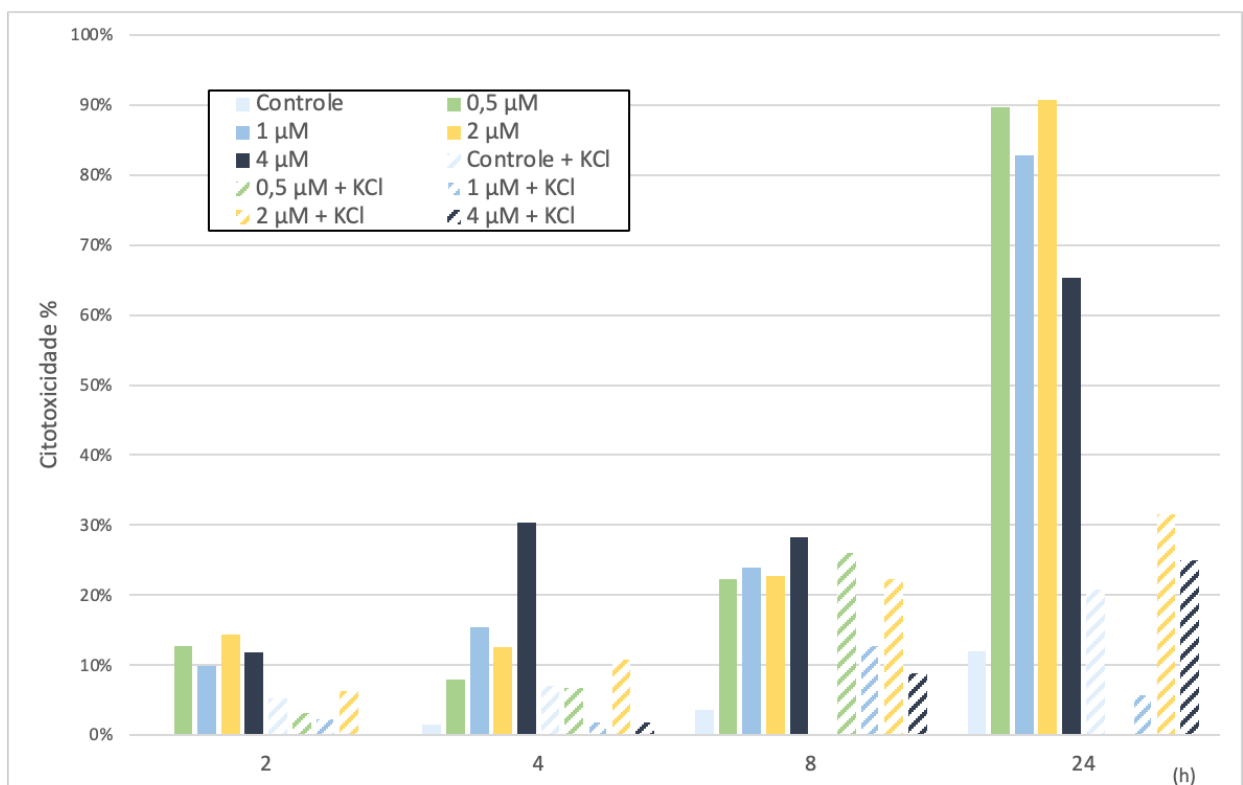


Figura 11 – Citotoxicidade de macrófagos THP-1 foi avaliada por meio da técnica de exclusão por azul de tripan. Os macrófagos foram tratados com 0,5, 1, 2 e 4 µM de LIC_11567 recombinante por 2, 4, 8 e 24 horas, em presença e ausência de KCl 70 mM.

A citotoxicidade de LIC_11567₁₇₋₁₂₄ também foi avaliada pelo método de liberação de LDH (Lactato desidrogenase). Os resultados obtidos por meio do kit de liberação de LDH não mostraram morte celular significativa de macrófagos THP-1 (resultados não apresentados). Isto pode ser devido a falta de estímulo “*priming*” dos macrófagos com LPS. O LPS estimula rapidamente a ativação do inflamassoma NLRP3 induzindo a ativação de NF-κB e a desubiquitinação de NLRP3 (QU et al., 2020). Galluzzi e colaboradores já evidenciaram a necessidade de usar uma combinação de técnicas complementares, mas não relacionadas, para

demonstrar a morte celular porque nenhum dos métodos é suficiente per se (GALLUZZI et al., 2009). À vista disso, usamos os métodos de liberação de LDH e incorporação de corantes de exclusão, azul de tripan, obtendo resultados diferentes. Portanto, repetições dos ensaios usando *priming* como LPS precisam ser feitos para que possamos saber se de fato LIC_11567₁₇₋₁₂₄ causa morte de macrófagos.

4.7. Análise de bioinformática de LIC_11568

LIC_11568 possui um extremo N-terminal que contém um peptídeo sinal (possivelmente reconhecido pelo sistema *Sec*) seguido de uma região hidrofóbica e um sítio de clivagem predito pelos programas SignalP e Phobius.

Vale a pena mencionar que alguns programas de localização subcelular como PSORTb predisseram a membrana externa como destino da proteína LIC_11568. Proteínas, como a lisostafina de *S. aureus* e várias proteínas de ligação a fibronectina de *T. denticola*, contendo o mesmo domínio funcional que LIC_11568 também foram encontradas ancoradas à superfície da membrana externa (BABA; SCHNEEWIND, 1996; BAMFORD et al., 2010).

O domínio com ação tóxica seria o domínio da família das peptidases M23. Essas peptidases são consideradas metalopeptidases dependentes de zinco e possuem as sequências de aminoácidos HxH e HxxxD características (**Figura 12**) (ODINTSOV et al., 2004) e uma estrutura bem conservada em uma grande variedade de organismos. Uma das funções mais comumente descritas destas enzimas é a degradação da parede celular de bactérias Gram-positivas para a formação do septo no processo de divisão celular (VERMASSEN et al., 2019) ou para matar outras bactérias (competição bacteriana e nutrição) (TANG et al., 2020). Essa degradação pode acontecer clivando a ligação pentaglicina que une as cadeias de peptidoglicano, assim como as ligações glicosídicas entre N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, e a ligação existente entre o N-acetilmurâmico e L-alanina (KUMAR, 2008; THUMM; GOTZ, 1997). Uma das funções mais relevantes das proteínas que contém o domínio Peptidase M23, é atuar como fator de virulência. Esse é o caso das proteínas LasA de *Pseudomona aeruginosa* capazes de degradar componentes do tecido conectivo como elastina e estimular a liberação de proteoglicanas do ectodomínio da superfície, envolvidas com sinalização celular (SPENCER et al., 2010). Além disso, podem funcionar como D,D-endopeptidases virais envolvidas na entrada do bacteriófago na bactéria hospedeira (COHEN et al., 2009). Proteínas contendo o domínio Peptidase M23 são normalmente sintetizadas como

precursoras na forma inativa e são então ativadas extracelularmente pela ação de uma protease que resulta na clivagem da porção N-terminal da proteína (THUMM; GOTZ, 1997).

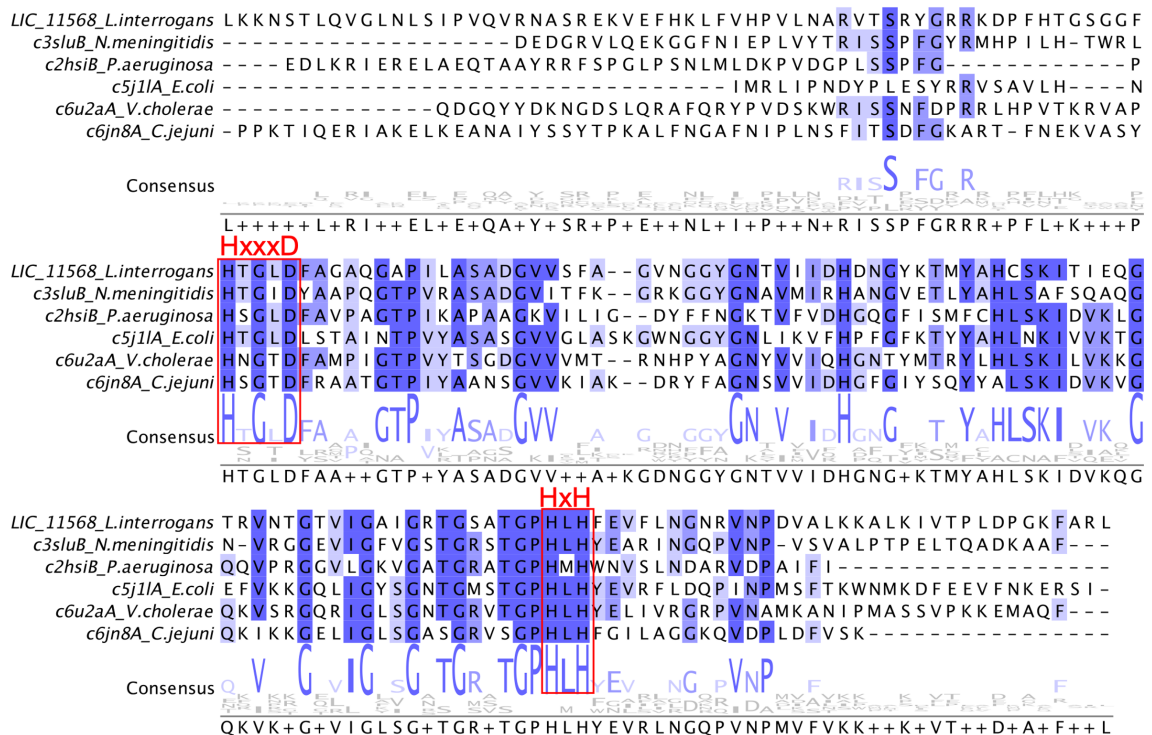


Figura 12 – Alinhamento das sequências das proteínas identificadas como semelhantes pelo servidor Phyre2, com a sequência do domínio Peptidase M23 de LIC_11568 (início no aminoácido 160), gerado pelo programa Clustal Omega e visualizado pela ferramenta Jalview. Caixas vermelhas indicam aminoácidos absolutamente conservados na família das Peptidases M23: HxxxD e HxH. Os diferentes tons de azul indicam a porcentagem de identidade entre os aminoácidos das sequências.

Os programas de predição de domínios InterPro e KEGG *Motif Search Tool* predisseram, além do domínio Peptidase M23, um domínio LysM. Os domínios LysM são capazes de se ligar ao peptidoglicano (WONG et al., 2015) ou a glicoproteínas da matriz extracelular (HIRSCHHAUSEN et al., 2012) o que permite que outros domínios, com atividade enzimática, consigam acessar melhor este substrato. Baseado nestas informações e na predição da estrutura secundária de LIC_11568 pelo programa Phyre2, distintas construções foram feitas a fim de desvendar o papel de cada domínio na função bioquímica da proteína (**Figura 13**). As sequências com maior confiança e identidade foram recuperadas da base de dados do Protein Data Bank (PDB), e alinhadas com a sequência de LIC_11568 correspondente ao domínio Peptidase M23, pelo programa Clustal Omega (LARKIN et al., 2007) (**Figura 12**).

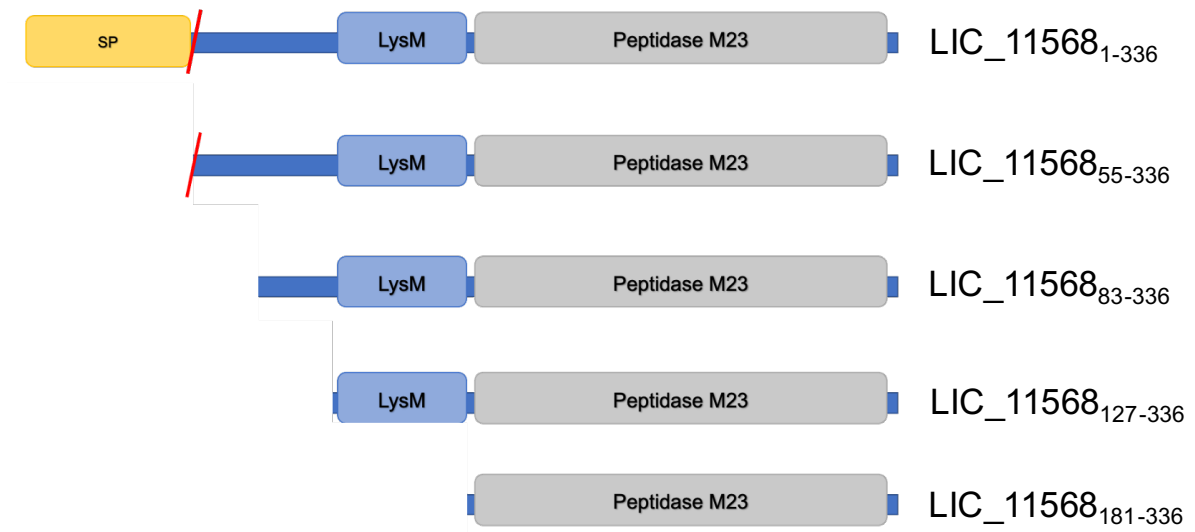


Figura 13 – Representação das construções contendo diferentes domínios da toxina putativa codificada por LIC_11568. A construção C é truncada em uma posição em que a predição de estrutura tridimensional feita pelo I-TASSER delimita a separação de dois domínios estruturais (dados não mostrados). O quadrado amarelo indica a presença do peptídeo sinal (SP) e a barra vermelha um possível sítio de clivagem. Os tamanhos dos domínios são proporcionais aos seus tamanhos em aminoácidos.

Foram escolhidos os modelos de estrutura terciária de LIC_11568 obtidos com maior confiança pelo servidor Phyre2 baseados em homologia com os domínios Peptidase M23 encontrados em proteínas de *N. meningitidis* e *V. cholerae*, apresentados na **Figura 14**. A figura indica a porcentagem de identidade das proteínas em relação ao domínio Peptidase M23 de *L. interrogans* e a sua cobertura relativa a esta sequência. Como visto com outras metaloproteases M23, os modelos de estrutura terciária de LIC_11568 estão organizados em torno de uma folha- β central, de quatro cadeias antiparalelas, flanqueadas por três fitas- β de um lado e quatro do outro no caso do modelo a partir de *N. meningitidis* (**Figura 14**).

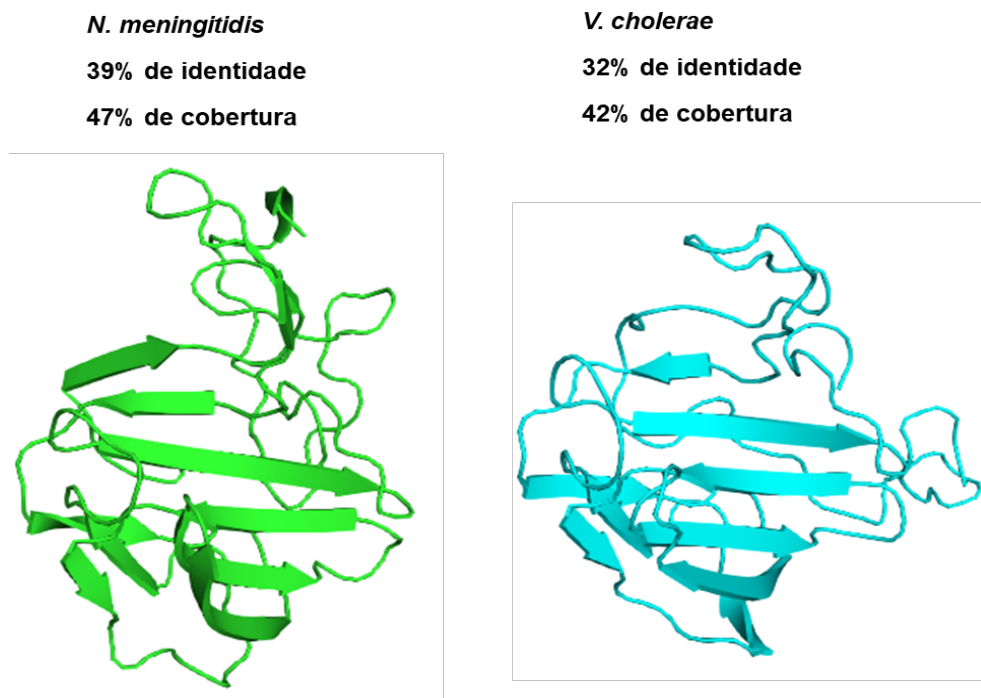


Figura 14 – Modelos de estrutura terciária de LIC_11568 baseados em similaridade de sequência com proteínas de *N. meningitidis* (PDBID: 3SLU) e *V. cholerae* (PDBID: 2GU1) gerados pelo servidor Phyre2. A figura mostra a identidade de aminoácidos entre o fragmento de LIC_11568 que se alinha a sequência primária correspondente a estrutura tridimensional do modelo. A cobertura indica a porcentagem de sequência de LIC_11568 capaz de ser alinhado com o modelo.

Hashimoto e colaboradores (HASHIMOTO et al., 2013) identificaram 6 proteínas com domínios Peptidase M23, enquanto nosso grupo identificou 14 proteínas no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (**Figura 15**). Podemos observar que, assim como no caso de LIC_11568, alguns genes possuem um peptídeo sinal e pelo menos um domínio LysM. Apenas LIC_11399 (descrita com uma proteína secretada e com atividade elastinolítica) tem um domínio diferente, F5 / F8, que é o fator de coagulação envolvido na adesão celular. Ele se liga às células epiteliais assim como o LysM, sugerindo seu envolvimento na virulência. Essas informações fazem-nos pensar na importância desse tipo de proteínas na adesão e colonização do hospedeiro assim como no metabolismo e sobrevivência da própria bactéria. Inclusive algumas espécies de bactérias codificam várias cópias de Peptidases M23. Por exemplo, *V. cholerae* codifica duas proteínas contendo domínios Peptidases M23 envolvidas na divisão celular: EnvC e NlpD, e três relacionadas com o alongamento celular: ShyA, ShyB e ShyC (DÖRR et al., 2013; FIRZUK; BOCHTLER, 2007).

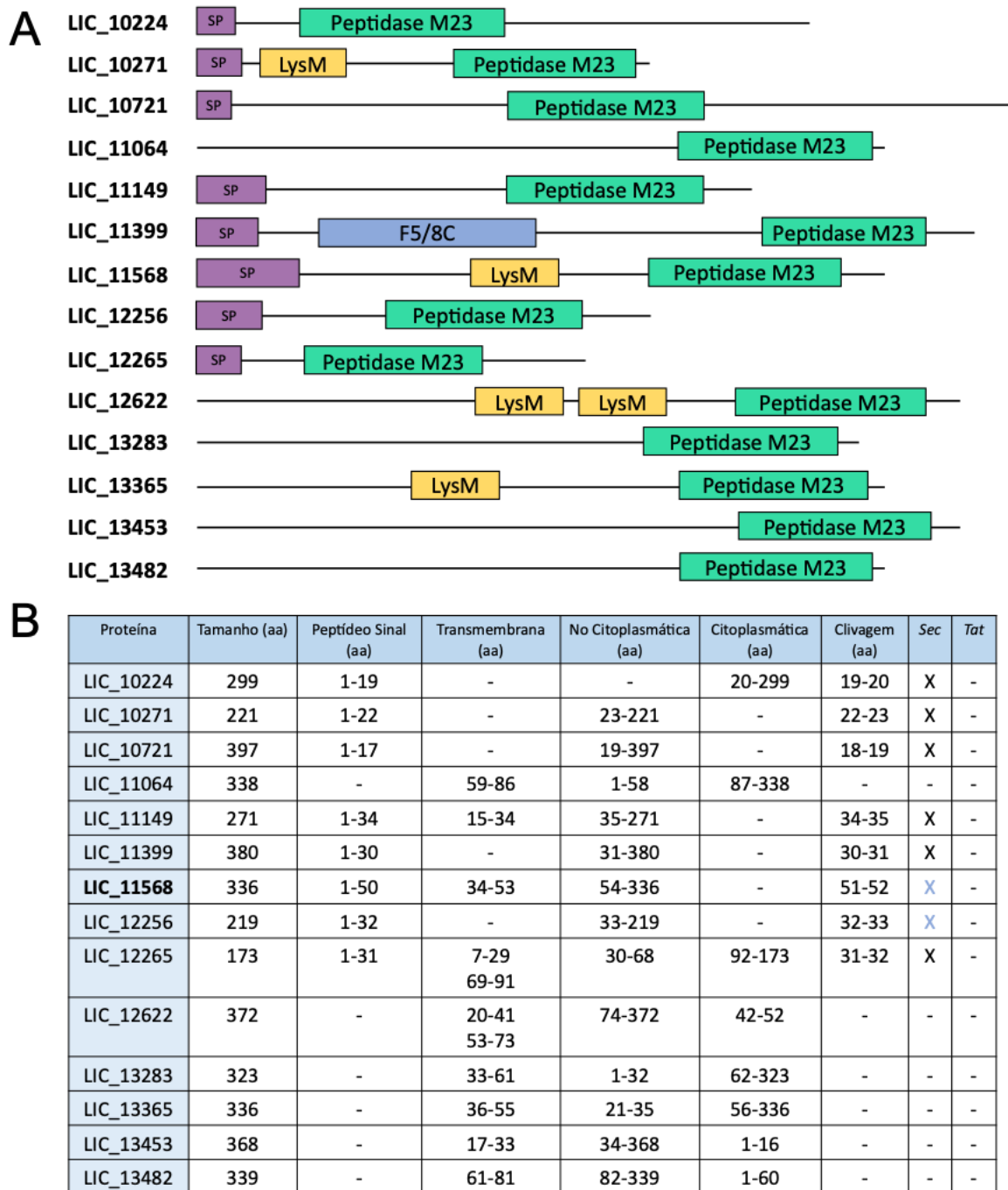


Figura 15 – Proteínas contendo domínios Peptidases M23 identificadas no genoma de *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130. (A) Representação de domínios das 14 metaloproteases identificadas no genoma de *Leptospira interrogans* Copenhageni que contém domínios Peptidase M23. Os domínios identificados são representados por quadrados. Quadrados roxos indicam a presença de peptídeo sinal (SP). Quadrados verde, amarelo e azul denotam domínios funcionais: Peptidase M23, LysM e F5 / 8C, respectivamente. (B) Informações e predições de bioinformática de peptídeo sinal, hélices transmembranar e localização subcelular das 14 metaloproteases identificadas. Na coluna Sec, os X coloridos em azul tem probabilidade abaixo de 30 %.

Para entender melhor a função do domínio tóxico Peptidase M23 em LIC_11568 e em *Leptospira*, foi feita uma busca por proteínas contendo domínios peptidase M23 em *Leptospira biflexa* (espécie saprofítica do gênero mais estudada). A partir das sequências de aminoácidos

das proteínas de *L. interrogans* e *L. biflexa* que possuem esse domínio tóxico, foi feita uma árvore filogenética (**Figura 16A**). A partir desta, foi possível identificar que 12 dos 14 genes que codificam para proteínas contendo o domínio Peptidase M23 em *L. interrogans* possuem genes ortólogos na espécie saprofítica. Apenas 2 proteínas de *L. interrogans* não possuem ortólogos em *L. biflexa* (**Figura 16A**), e uma delas é a LIC_11399 que já foi descrita como um fator de virulência (HASHIMOTO et al., 2013).

Complementando as análises filogenéticas, foram feitas análises de padrão de conservação de aminoácidos (logos) a partir das sequências de proteínas que possuem o domínio Peptidase M23 em *L. interrogans* e *L. biflexa* para descobrir possíveis diferenças entre as espécies (**Figura 16B**). A partir do logo, podemos confirmar que não existem importantes variações entre as sequências da espécie patogênica e a saprofítica. É possível que as diferenças se encontrem ao longo do extremo N-terminal das proteínas que é muito divergente.

Vale a pena mencionar que as proteínas que contêm domínios Peptidase M23 são funcionalmente promiscuas sendo capazes de degradar diferentes tipos de ligações (como mencionado acima). Pode ser que as proteínas com domínios Peptidase M23 secretadas por leptospiros saprófitas estejam envolvidas com competição bacteriana e nutrição, e as Peptidases M23 secretadas por leptospiros patogênicos como *L. interrogans* estejam relacionadas com a virulência, degradando proteínas da matriz extracelular, já que possuem os fatores de adesão necessários para colonizar os tecidos/órgãos que contêm as moléculas alvo das peptidases.

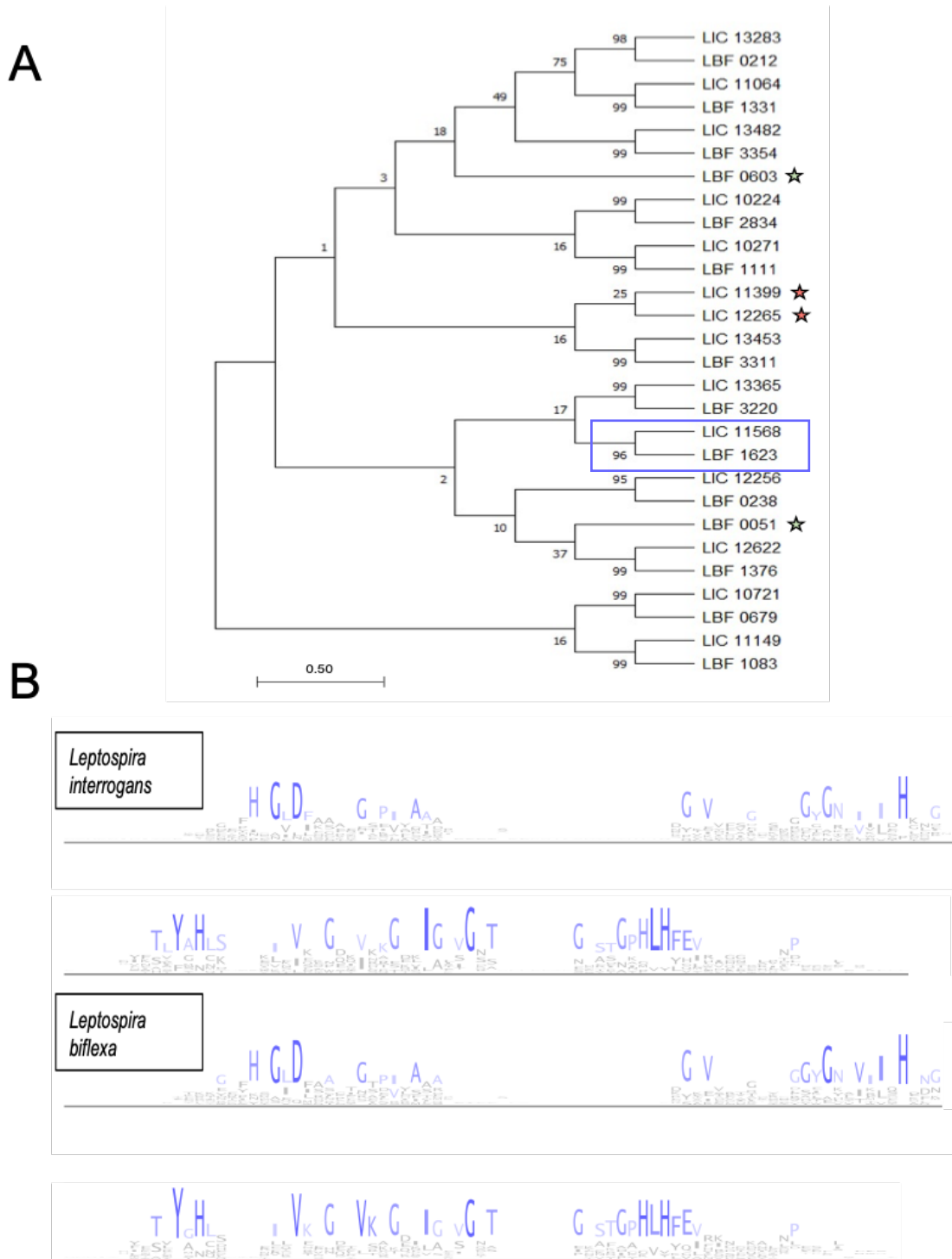


Figura 16 – Peptidases M23 identificadas em *L. interrogans* vs *L. biflexa*. (A) Árvore filogenética construída usando o método maximum likelihood (modelo WAG+G+F) com base na comparação de sequências de aminoácidos correspondentes aos domínios tóxicos de todas as proteínas que contêm domínio(s) peptidase M23 de *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*. Os números indicam porcentagens de bootstrap (a confiabilidade do cluster acontecer); a barra de escala representa o número de substituições de aminoácidos; as estrelas indicam as únicas proteínas de *Leptospira interrogans* (estrela vermelha) e *Leptospira biflexa* (estrela verde) que não possuem ortólogos na espécie saprofítica e vice-versa. (B) Logo derivado do alinhamento múltiplo das sequências das proteínas que contêm domínio(s) peptidase M23 de *Leptospira interrogans* (acima) e *Leptospira biflexa* (embaixo).

Quanto aos estudos filogenéticos podemos observar que LIC_11568 compartilha ancestrais comuns as espécies que formam o grupo patogênico, sugerindo uma possível relação com a patogenicidade de *Leptospira* (Figura 17) ou apenas uma correlação evolutiva pelo fato de ela estar presente em uma espécie patogênica.

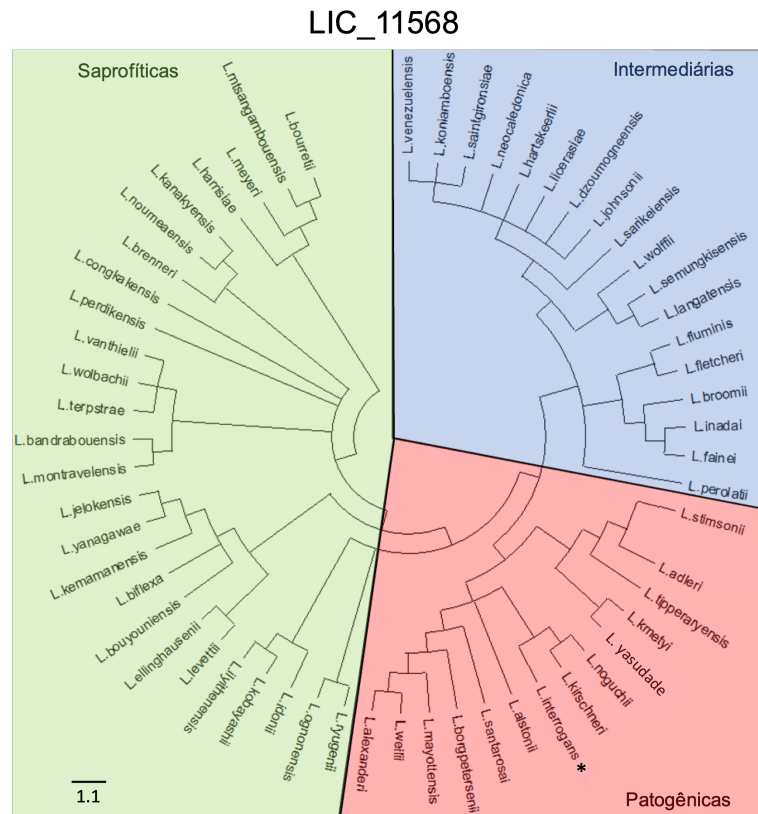


Figura 17 – Árvore filogenética com base na comparação de seqüências de aminoácidos traduzidas do fragmento do gene LIC_11568 de *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130 construída usando o método maximum likelihood (modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) G+I). As cores refletem os grupos de patogenicidade de *Leptospira* spp. segundo a classificação de VINCENT et al., 2019; CASANOVAS-MASSANA et al., 2019: verde – saprofíticas; azul – intermediárias; vermelho – patogênicas. A barra de escala representa o número de substituições de aminoácidos.

4.8. Clonagem de LIC_11568 no vetor pBRA

Os diferentes fragmentos de LIC_11568 (LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆) de tamanhos de 1011, 849, 765, 633 e 471 pares de bases, respectivamente, foram amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1 % como pode ser observado na Figura 18. Posteriormente, as diferentes construções foram clonadas no vetor pBRA contendo o peptídeo sinal de localização periplasmática PelB. Isto foi feito para garantir que a proteína fosse corretamente endereçada para o periplasma da célula de *E. coli* onde poderia exercer seus efeitos degradativos já que algumas análises

bioinformáticas preliminares mostraram que a LIC_11568 seria uma NlpD-like protein. NlpD junto com EnvC são exemplos de proteínas que contêm domínios Peptidases M23 com atividade de ativação de amidases em *E. coli* envolvidas na degradação do septo de peptidoglicano na última etapa da divisão celular (ERCOLI et al., 2015; UEHARA; DINH; BERNHARDT, 2009). Porém, após aprofundar nas análises, foi visto que estas proteínas não exibem atividade hidrolítica, pois carecem de importantes resíduos coordenadores Zn^{2+} (COHEN et al., 2009; MEISNER et al., 2012) e a LIC_11568 possui todos os resíduos conservados (HxxxD e HxH) (**Figura 12**) necessários para hidrólise. A construção LIC_11568₁₋₃₃₆, que contém o peptídeo sinal original, e LIC_11568₅₅₋₃₃₆, sem peptídeo sinal, foram inseridos no vetor pBRA sem pelB para verificar se a função de LIC_11568 seria dependente da translocação da proteína para o periplasma.

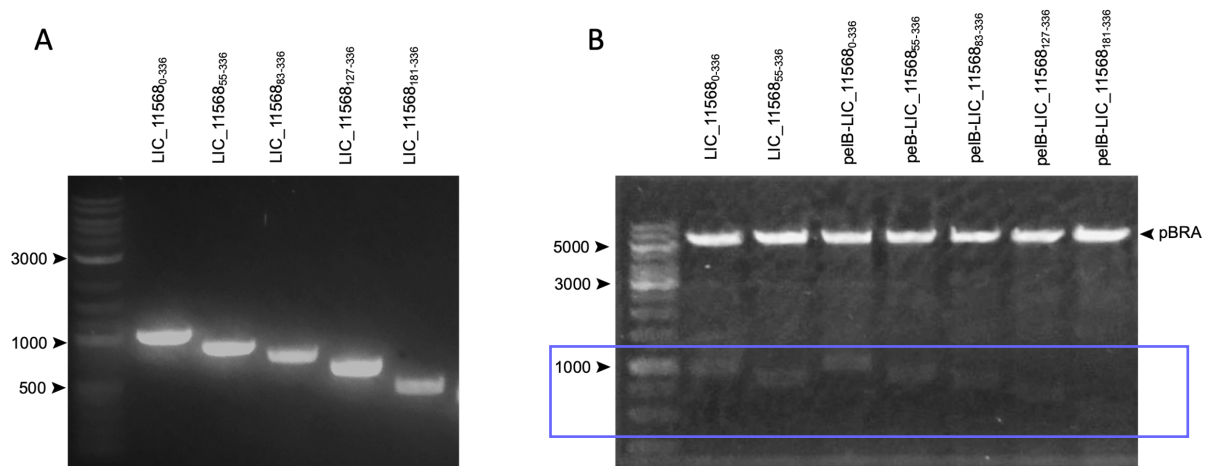


Figura 18 – Clonagem de LIC_11568 no vetor pBRA. (A) Amplificação por PCR das construções LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ e LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆ de LIC_11568 de 1011, 849, 765, 633, 471 pb respectivamente a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni. (B) Clonagem das construções LIC_11568₀₋₃₃₆ e LIC_11568₅₅₋₃₃₆ de LIC_11568 em pBRA contendo pelB e das construções LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆ de LIC_11568 em pBRA. O vetor foi digerido com *NcoI* e *SaI* liberando insertos de 1011, 849, 765, 633, 471 pb, respectivamente. A caixa azul mostra os fragmentos liberados após a digestão dos plasmídeos.

4.9. Toxicidade de LIC_11568 em *E. coli*

Foi analisada a toxicidade de LIC_11568 em células de *E. coli* DH5 α transformadas com o plasmídeo pBRA contendo as diferentes construções de LIC_11568. Essas células foram adicionadas em placas com o agente indutor da expressão (onde seria esperada uma diminuição no número de UFCs) e em placas com o agente repressor (onde não haveria mudanças). Vários meios foram testados obtendo-se resultados similares. Na **Figura 19** estão apresentados os resultados do ensaio de toxicidade em meio mínimo M9 onde pode ser observado que não houve redução significativa no número de UFCs de *E. coli* nas placas contendo o agente indutor da

expressão, arabinose. Apenas houve inibição do crescimento no controle positivo com a toxina STM14_0336 direcionada para o periplasma. Isto pode sugerir que LIC_11568, contendo o domínio tóxico Peptidase M23, não apresenta atividade contra o peptidoglicano de bactérias Gram-negativas e, portanto, não está envolvida com remodelação do peptidoglicano e a divisão celular. Além disso, foi comparada a morfologia celular nas placas reprimida e induzida ao longo do período de incubação (resultados não apresentados) e não foi vista nenhuma mudança morfológica importante.

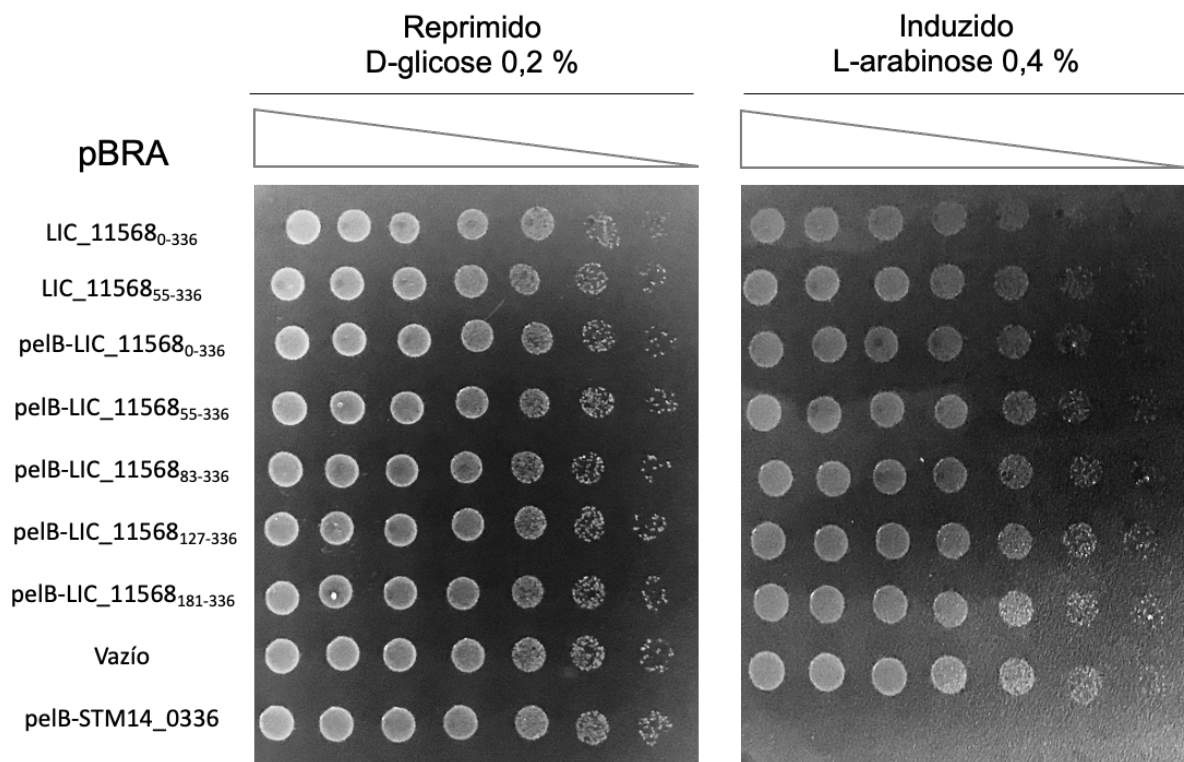


Figura 19 – Atividade tóxica de LIC_11568 em *E. coli* DH5 α . Diluição 4:1 em série de *E. coli* DH5 α contendo construções de LIC_11568 clonadas no vetor pBRA como indicado, adicionadas em placas de meio mínimo M9 reprimidas com D-glicose e induzidas com L-arabinose. A inibição do crescimento é observada, após a expressão, apenas no controle positivo (pelB-STM14_0336). * Vazío – apenas pBRA; STM14_0336 – controle positivo.

4.10. Clonagem de LIC_11568

O gene LIC_11568 e suas diferentes construções foram amplificadas por PCR e analisadas em gel de agarose 1 %. Foram amplificadas cinco diferentes construções (LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆) de LIC_11568 de tamanhos de 1011, 849, 765, 633 e 471 pares de bases, respectivamente (**Figura 20A**). Posteriormente os insertos foram inseridos no vetor de expressão pETDuet-1. A presença do inserto no plasmídeo foi confirmada por digestão com as mesmas enzimas de restrição

usadas para a clonagem, *Bam*HI e *Sal*I (**Figura 20B**). A dupla digestão gerou um vetor vazio do tamanho esperado (5.420 pb) e insertos também do tamanho esperado, confirmando a clonagem.

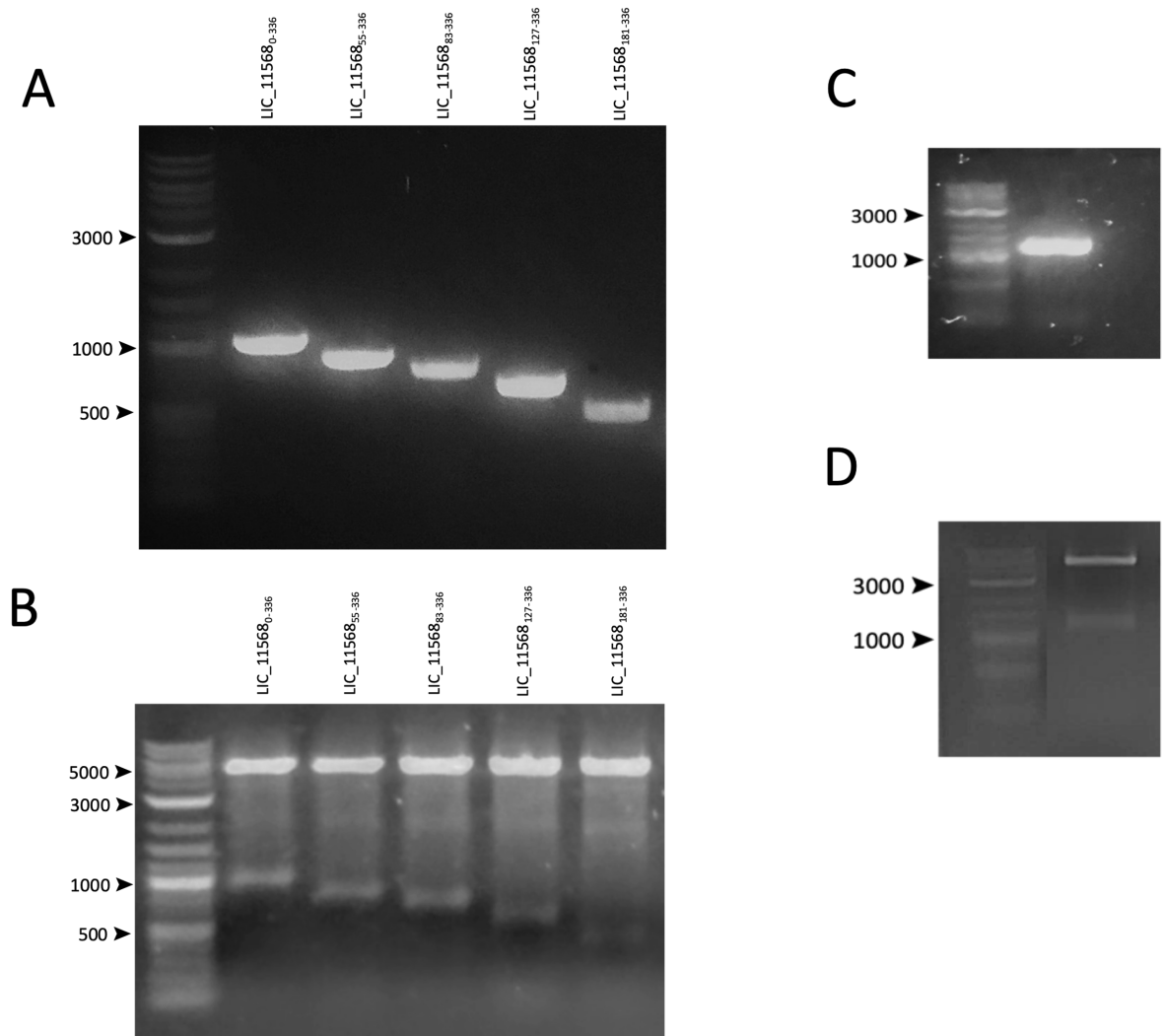


Figura 20 – Clonagem de LIC_11568 em vetor de expressão. (A) Amplificação por PCR das construções LIC_11568₀₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ e LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆ de 1011, 849, 765, 633, 471 pb respectivamente a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni. (B) Clonagem das construções LIC_11568₀₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ e LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆ em pETDuet-1. O vetor foi digerido com *Bam*HI e *Sal*I liberando insertos de 1011, 849, 765, 633, 471 pb. (C) Amplificação por PCR da construção LIC_11567-LIC_11568₁₇₋₄₆₀ de 1367 pb a partir do DNA genômico de *L. interrogans* Copenhageni. (D) Clonagem da construção LIC_11567-LIC_11568₁₇₋₄₆₀ em pET-28a(+). O vetor foi digerido por *Nde*I e *Sal*I liberando um inserto de 1367 pb. * pb – pares de bases.

A construção dos genes LIC_11567 e LIC_11568 (LIC_11567-LIC_11568₁₇₋₄₆₀) também foi amplificada por PCR gerando um fragmento de 1329 pb (**Figura 20C**). O produto da PCR foi inserido em pET-28a(+) e comprovado por dupla digestão com *Nde*I e *Sal*I (**Figura 20D**), gerando-se assim uma banda visível no gel de agarose 1 %, correspondente ao vetor vazio

(5.369 pb) e outra correspondente ao inserto. A ideia dessa construção é verificar se clonando o cluster que contém os dois genes favoreceria a expressão de ambas as proteínas de forma a aumentar a expressão e a solubilidade de LIC_11568, pois resultados preliminares do grupo tinham mostrado certa dificuldade para conseguir expressar LIC_11568.

Seguindo um raciocínio similar ao do parágrafo anterior. Os diferentes fragmentos de LIC_11568 foram clonados no sítio múltiplo de clonagem 1 (MCS 1) do pETDuet-1 no qual foi inserido anteriormente LIC_11567₁₇₋₁₂₄ no MCS 2 (descrito no tópico acima 4.2. Clonagem de LIC_11567₁₇₋₁₂₄). Assim, foram obtidos cinco clones contendo cada uma das construções de LIC_11568 junto com LIC_11567₁₇₋₁₂₄ (diferentes dos cinco clones de cada uma das construções de LIC_11568 sozinhos).

4.11. Testes de expressão de LIC_11568

A primeira etapa da expressão das proteínas recombinantes foi uma triagem com diferentes cepas de *E. coli* transformadas com os plasmídeos contendo os genes de interesse. A expressão das construções LIC_11568₁₋₃₃₆, LIC_11568₅₅₋₃₃₆, LIC_11568₈₃₋₃₃₆, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, LIC_11568₁₈₁₋₃₃₆ clonadas em pETDuet-1 foi testada em BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) e BL21-Codon Plus (DE3)-RIL. Não foi detectada expressão de LIC_11568 em RIL nem nos géis de poli-acrilamida nem nos ensaios de Western Blot para detecção da cauda de polihistidina (resultados não apresentados). Também não foi observada expressão no SDS-PAGE das linhagens de expressão BL21 (DE3) e BL21 Star (DE3) (**Figura 21A e 21B**), porém, no Western Blot de BL21 (DE3) foram identificadas bandas correspondentes aos pesos das construções LIC_11568₅₅₋₃₃₆ e LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, (~33 kDa e ~25 kDa respectivamente) (**Figura 21C**).

Por outro lado, também foi testada a co-expressão de LIC_11567 e LIC_11568 (construção LIC_11567-LIC_11568₁₇₋₄₆₀) em BL21 (DE3) e BL21 Star (DE3) a partir de uma sequência só de ambas as proteínas, pois uma das nossas hipóteses iniciais era que formavam um par toxina e antitoxina e, portanto, poderiam interagir. A “antitoxina” putativa LIC_11567 poderia se ligar à toxina LIC_11568 deixando-a mais estável e ajudando à expressão, aparecendo assim no SDS-PAGE. Ainda assim, LIC_11568 não foi observada no gel de poli-acrilamida (**Figura 21A e 21B**). A expressão da proteína LIC_11567 (~16 kDa) foi detectada, produto da construção LIC_11567-LIC_11568₁₇₋₄₆₀, tanto no SDS-PAGE quanto no

Western Blot das frações induzidas de BL21 (DE3) (**Figura 21A e 21C**) e não na cepa BL21 Star (DE3) (**Figura 21B**).

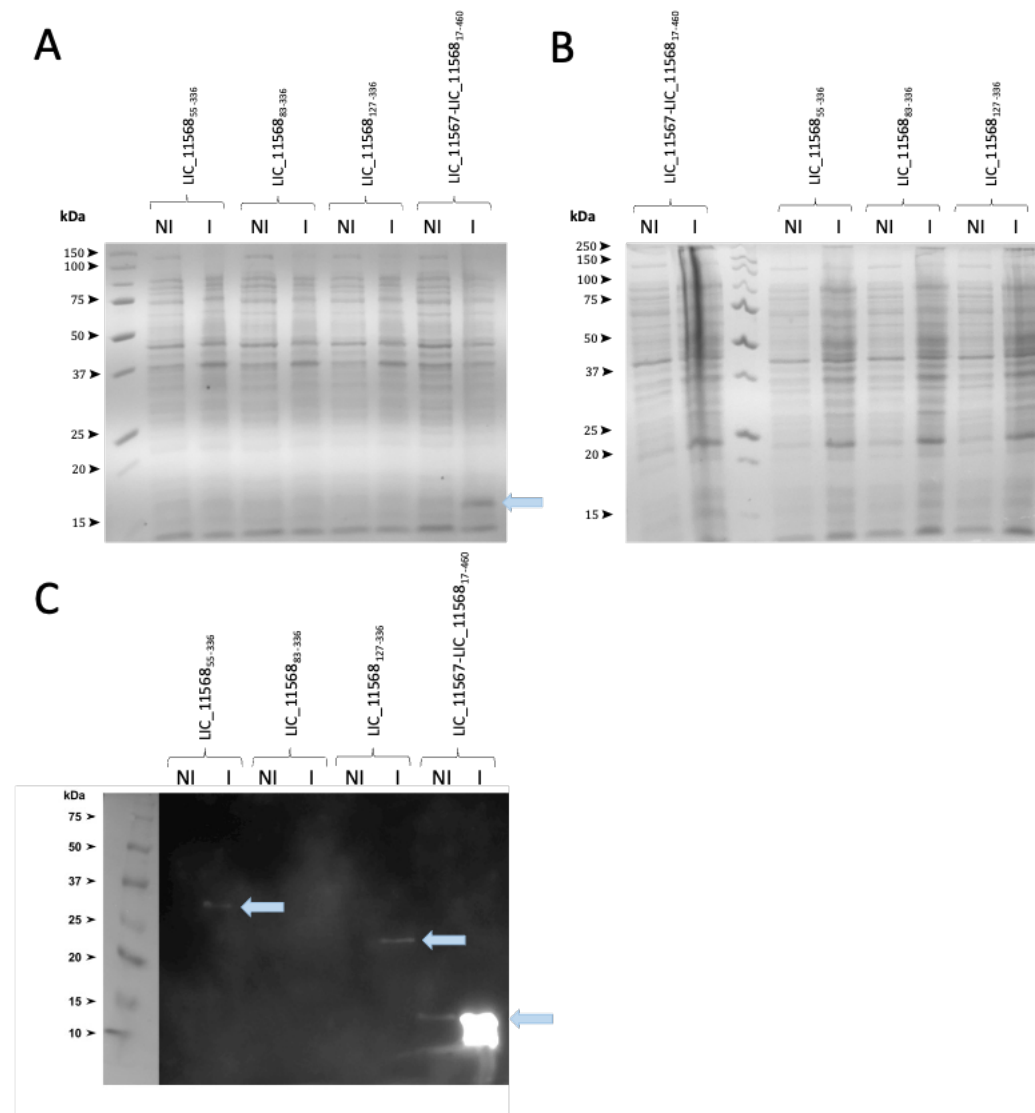


Figura 21 – Testes de expressão de LIC₁₁₅₆₈. (A)(B) Análise da expressão das construções LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶, LIC₁₁₅₆₈⁸³⁻³³⁶, LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶ e da construção conjunta LIC_{11567-LIC}₁₁₅₆₈¹⁷⁻⁴⁶⁰ em BL21 (DE3) e BL21 (DE3) Star respectivamente, em SDS-PAGE. (C) Análise da expressão das construções LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶, LIC₁₁₅₆₈⁸³⁻³³⁶, LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶ e da construção conjunta LIC_{11567-LIC}₁₁₅₆₈¹⁷⁻⁴⁶⁰ em BL21 (DE3), por Western Blot. * kDa – Kilodalton; NI – Não Induzido; I – Induzido.

A co-expressão das duas proteínas a partir do vetor pETDuet-1 também foi avaliada. O vetor codifica dois locais de clonagem múltipla, cada um deles precedido por um promotor T7, operador lac e locais de ligação ao ribossomo, o que garante que os ribossomos de *E. coli* detectem ambos os genes transcritos e aconteça a expressão. A co-expressão das duas proteínas recombinantes não permitiu uma melhor expressão de LIC₁₁₅₆₈ (resultados não apresentados).

4.12. Purificação das proteínas: LIC_11568₅₅₋₃₃₆ e LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆

Após os testes de expressão, decidimos seguir em frente com as purificações com as construções LIC_11568₅₅₋₃₃₆ (sem o peptídeo sinal) e LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ (apenas os domínios funcionais LysM e Peptidase M23). As duas proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade sob as mesmas condições descritas acima e observadas em gel de poliacrilamida 15 % e Western Blot para detecção da cauda de histidina.

A construção LIC_11568₅₅₋₃₃₆ foi purificada e eluída em 24 frações de 5 mL cada. As frações escolhidas para trabalhar foram as 20-23 onde podem ser observadas tanto em Western Blot (**Figura 22A**) quanto em 15% SDS-PAGE (**Figura 22B**) bandas com ~ 33 kDa correspondentes à LIC_11568₅₅₋₃₃₆. A proteína de interesse também foi detectada por Western Blot nas frações 9-12 (**Figura 22A**), mas não foram aproveitadas porque o grau de impureza era inferior, como pode-se observar na **Figura 22B**. Um controle positivo com a proteína induzida foi usado.

Da mesma forma, a construção com apenas os domínios funcionais, LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆, foi purificada e analisada. A observação dela em SDS-PAGE não ficou clara. Apareceram bandas do peso esperado, ~ 25 kDa, nas frações 8-9 e 11-13 foram observadas (**Figura 23B**). Porém, as frações 8-9 continham muitos contaminantes e as 12-13 não foram detectadas por Western Blot (**Figura 23A**). Diante disso, as frações 14-19 foram as escolhidas para as próximas etapas. Um controle não induzido, uma alíquota do sobrenadante (fração solúvel) e uma outra do pellet (fração insolúvel) das células induzidas com IPTG, e um controle do descarte (*Flow Through*) após carregar a coluna foram usados para análise por Western Blot. Tanto as frações escolhidas de LIC_11568₅₅₋₃₃₆ quanto as de LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ foram concentradas em tubos Amicon Ultra-15 e dialisadas em tampão PBS pH 8,5.

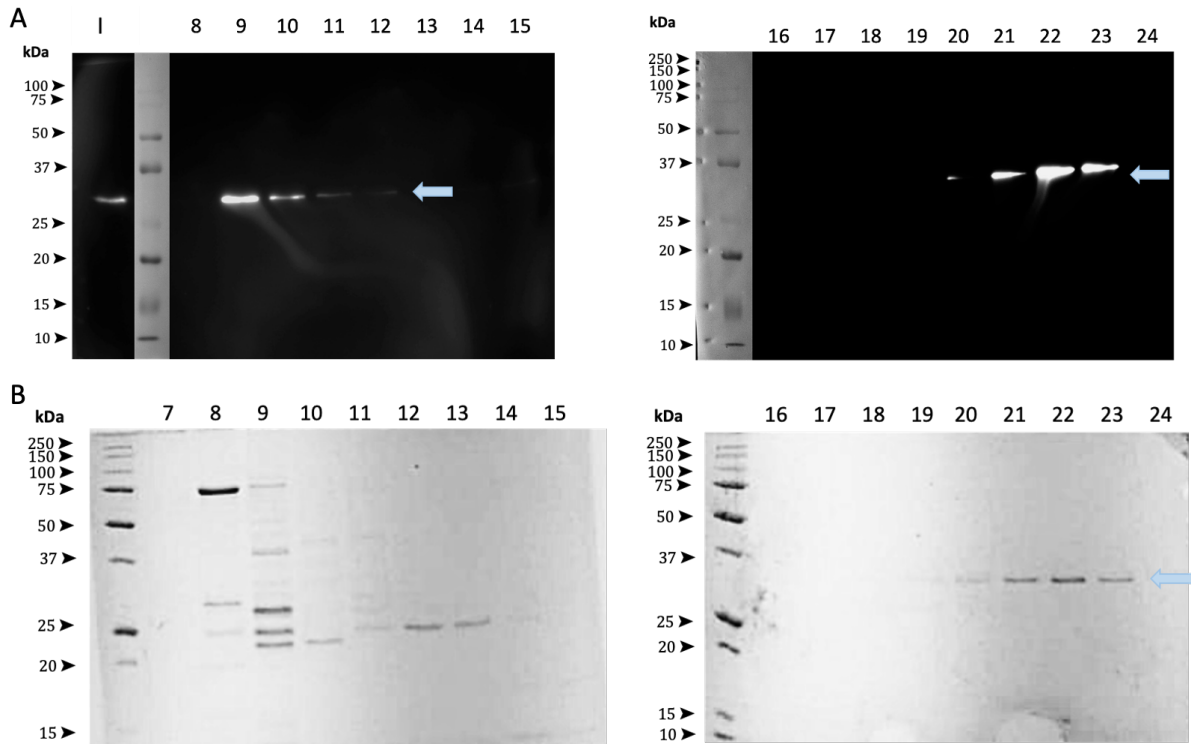


Figura 22 – Purificação de LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶. (A) Detecção por Western Blot de LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶ purificada (~33 kDa). (B) Visualização por SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de afinidade contendo a proteína LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶ (~33 kDa). * kDa – Kilodalton; I – Induzido; Números – frações de eluição da coluna de afinidade. A seta azul mostra a banda da proteína LIC₁₁₅₆₈⁵⁵⁻³³⁶.

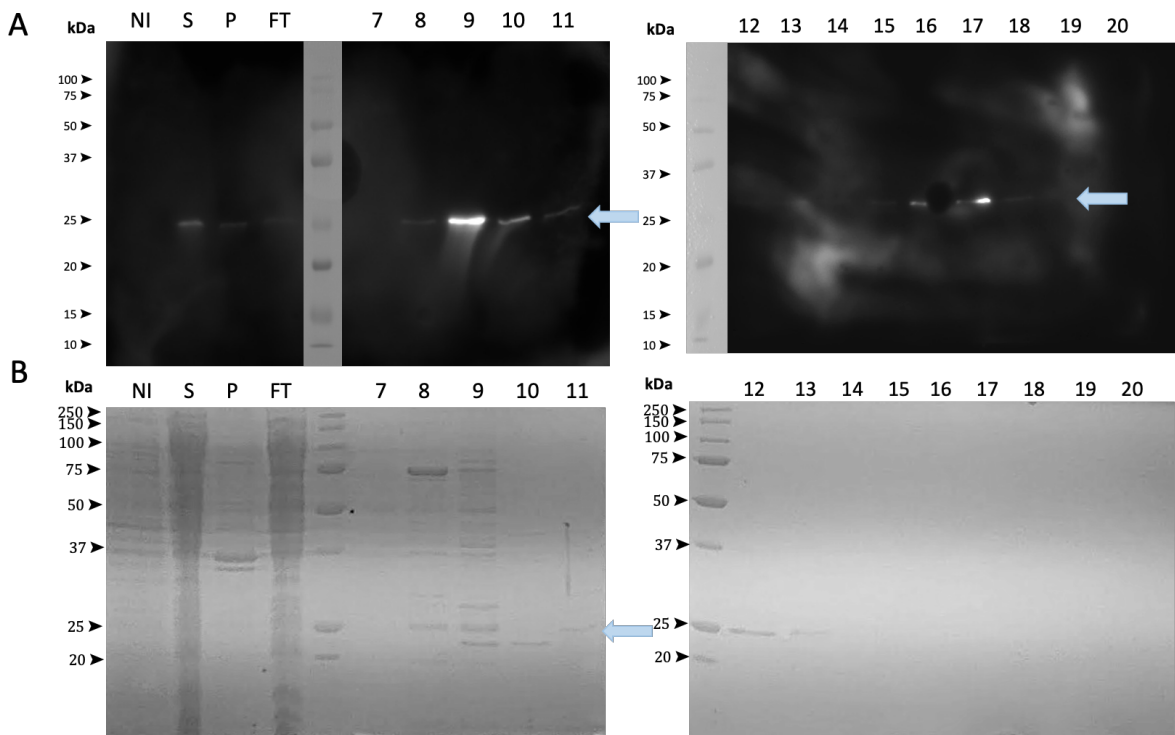


Figura 23 – Purificação de LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶. (A) Detecção por Western Blot de LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶ purificada (~25 kDa). (B) Visualização por SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de afinidade contendo a proteína LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶ (~25 kDa). * kDa – Kilodalton; NI – Não induzido; S – Sobrenadante (fração solúvel); P – Pellet (fração insolúvel); FT – Flow Throw; Números – frações de eluição. A seta azul mostra a banda da proteína LIC₁₁₅₆₈¹²⁷⁻³³⁶.

4.13. Degradação de proteínas de matriz extracelular e plasma sanguíneo

As moléculas secretadas em todos os tecidos e órgãos que constituem o microambiente celular formam a matriz extracelular “ECM” (do inglês: *extracellular matrix*), composta por uma matriz complexa de água, glicoproteínas, colágenos, glicosaminoglicanos e proteoglicanas (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011). ECM fornece a estrutura, a forma e força de muitos tecidos, como a membrana basal, osso e cartilagem (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011) assim como permite processos bioquímicos e biomecânicos cruciais para a diferenciação e homeostase do tecido (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; TO; MIDWOOD, 2011). Por outro lado, a ligação e degradação de estruturas do hospedeiro como a matriz extracelular pode permitir a colonização do hospedeiro por *Leptospira* (MURRAY, 2015).

Lumican pertence à família de pequenas proteoglicanas ricas em leucinas “SLRP” (do inglês: *small leucine-rich proteoglycan*) (NAITO, 2005) que constituem uma fração importante de proteínas da matriz extracelular não colágenas (NIKITOVIC et al., 2008). Lumican pode ser encontrado na pele, rins, pulmões e artérias, e está envolvido com a manutenção da homeostase de diferentes tecidos e com a proliferação, migração e diferenciação celular (NIKITOVIC et al., 2008). A glicoproteína lumican tem um peso molecular aproximado de 55 kDa (KLEJEWSKI et al., 2017).

Fibronectina e vitronectina são glicoproteínas que se ligam as integrinas e estão presentes tanto no plasma quanto na matriz extracelular. A fibronectina humana é o principal componente da matriz extracelular (MOSHER, 1984) e o mais estudado porque se liga a muitos receptores de adesão celular, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (ZOLLINGER; SMITH, 2017). Fibronectina é secretada pelas células como um dímero solúvel e é subsequentemente montado em fibrilas multiméricas insolúveis na superfície celular. É composta por duas subunidades de aproximadamente 250 kDa conectadas por um par de ligações dissulfeto nos extremo C-terminais (ZOLLINGER; SMITH, 2017). Existem duas formas principais de fibronectina: a plasmática e a celular. A fibronectina plasmática é sintetizada pelos hepatócitos, e em menor grau por macrófagos, linfócitos, plaquetas e células endoteliais, e secretada no plasma sanguíneo, onde circula a 300-400 µg/mL em uma forma solúvel, compacta e inativa, e pode participar de processos como a coagulação sanguínea e na cicatrização de feridas (TO; MIDWOOD, 2011). Inclusive a fibronectina plasmática é mais importante na fase inicial da cicatrização de feridas, onde se liga às plaquetas e à fibrina,

formando o coágulo de fibrina (LENSELINK, 2015). A fibronectina celular é uma proteína insolúvel de forma multimérica, sintetizada por muitos tipos de células, incluindo fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, células sinoviais e miócitos (TO; MIDWOOD, 2011).

A vitronectina é uma glicoproteína multifuncional com função de adesão que está altamente presente no soro, matriz extracelular e osso (BERA et al., 2020). A vitronectina está ancorada à matriz extracelular e promove a adesão, disseminação e migração celular por interação com integrinas específicas. Essa interação da vitronectina com as integrinas também está envolvida com a diferenciação e proliferação celular. Também participa da resposta imune inata por meio de sua interação com o complemento e no processo de coagulação por meio de sua ligação à heparina (SCHVARTZ; SEGER; SHALTIEL, 1999). A vitronectina é encontrada predominantemente no plasma em duas formas monoméricas: uma única cadeia de 75 kDa e uma outra clivada de 65 kDa (BARNES; SILNUTZER, 1983; SCHVARTZ; SEGER; SHALTIEL, 1999). Em condições fisiológicas, a vitronectina pode ser desnovelada e expor diferentes domínios que levam à formação de multímeros de vitronectina por ligações dissulfeto. A forma multimérica está presente na adesão plaquetária e na matriz extracelular ligando-se a colágeno (SCHVARTZ; SEGER; SHALTIEL, 1999).

Quanto ao fibrinogênio, podemos defini-lo como uma glicoproteína solúvel circulante de 340 kDa, sintetizada no fígado pelos hepatócitos. Desempenha um papel importante na coagulação sanguínea. Após uma lesão acontecer, a trombina cliva fibrinogênio gerando fibrina que é o principal componente do coágulo sanguíneo (HERRICK et al., 1999). A prevenção da coagulação do sangue pode contribuir para a hemorragia em infecção por leptospiros patogênicas (MURRAY, 2015). O fibrinogênio é composto por duas moléculas simétricas, cada uma com três cadeias não idênticas denominadas $A\alpha$, $B\beta$, e γ , ligadas entre elas por ligações dissulfeto (HERRICK et al., 1999; MOSESSON, 2005). As cadeias têm pesos moleculares de 70, 56 e 48 kDa respectivamente (HERRICK et al., 1999).

Em todas as moléculas mencionadas acima, Lumicam (**Figure 24A**), Fibronectina (**Figure 24B**), Vitronectina (**Figure 24C**) e Fibrinogênio (**Figure 24D**), houve degradação de maneira dose-dependente quando foram incubadas com LIC_11568₅₅₋₃₃₆ e LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆ por 4 horas. A atividade peptidase foi testada em todos os substratos com ambas as construções de LIC_11568, obtendo resultados equivalentes. Aqui apenas foram apresentados os resultados das incubações com a construção LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆. A partir de 100 nM de proteína, pode-se

observar a degradação, de forma progressiva, dos substratos sendo que com 500 nM a banda correspondente aos substratos desaparece completamente em lumican e vitronectina (**Figura 24A e 24C**) e parcialmente em fibronectina e fibrinogênio (**Figura 24B e 24D**). Para avaliar a especificidade de LIC_11568, foram utilizados dois inibidores de metalopeptidases: EDTA e 1,10-fenantrolina (ODINTSOV et al., 2004). Em presença de EDTA, observou-se inibição total da clivagem dos substratos fibronectina e vitronectina (**Figura 24B e 24C**) e uma inibição menos eficaz em lumican e fibrinogênio (**Figura 24A e 24D**). Contudo, a fenantrolina não conseguiu impedir a degradação dos substratos (**Figura 24B, 24C e 24D**). Esses resultados sugerem que LIC_11568 pode ser uma das proteínas secretadas por bactérias do gênero *Leptospira* que degradam moléculas da matriz extracelular e do plasma humano, sendo, portanto, um potencial fator de virulência.

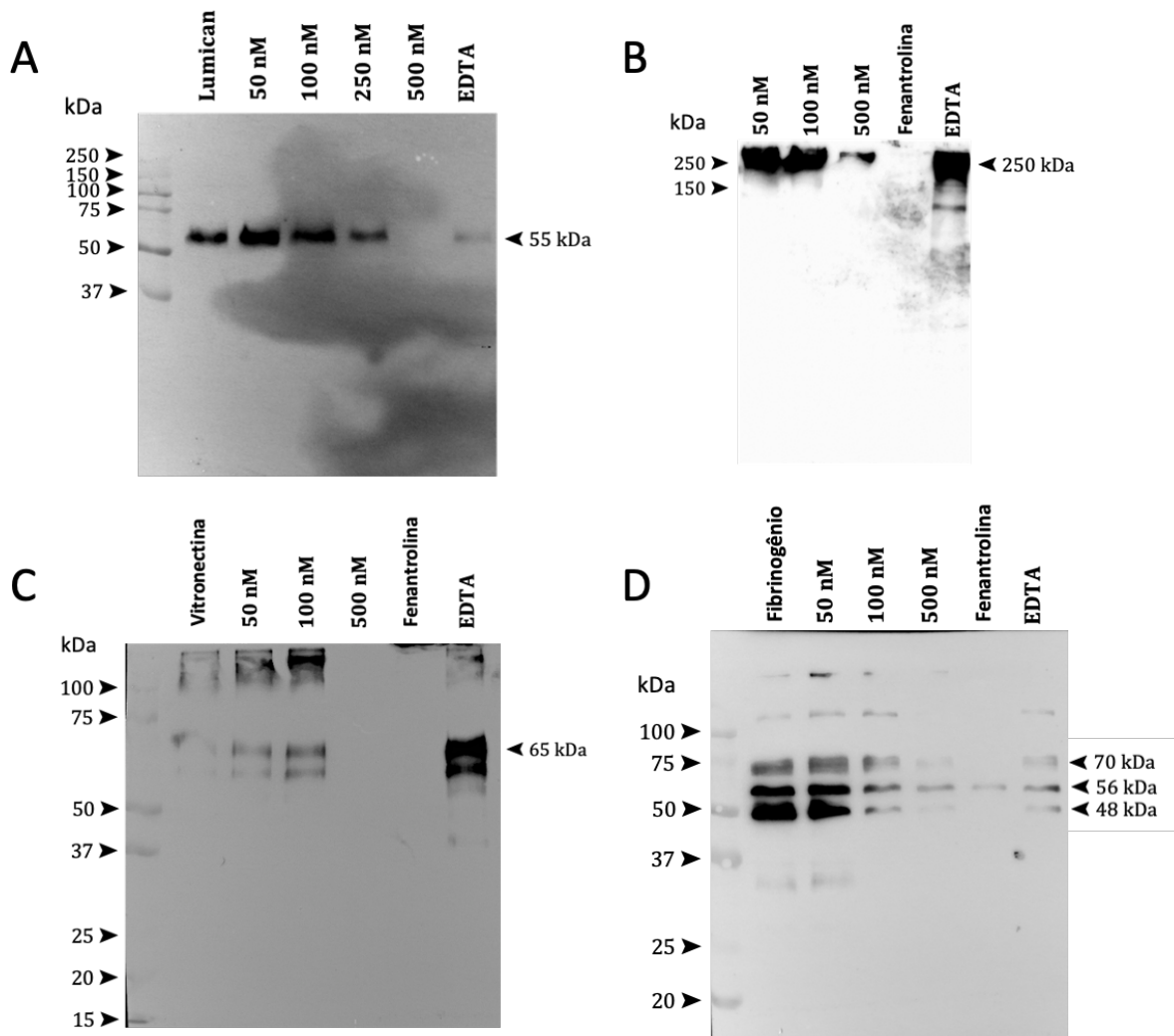


Figura 24 – Degradação de moléculas do hospedeiro por LIC_11568₁₂₇₋₃₃₆. Lumican (A), Fibronectina (B), Vitronectina (C) e Fibrinogênio (D) foram incubados com 50, 100, 250 e 500 nM de LIC_11568 por 4 horas. Os produtos de degradação foram analisados com anticorpos específicos por Western Blot. Os substratos incubados apenas com PBS serviram como controle negativo. Os substratos também foram incubados com 500 nM de LIC_11568 e 10 mM de EDTA ou 5 mM de 1,10-fenantrolina.

4.14. Mutagênese de LIC_11568₅₅₋₃₃₆

Uma extensa revisão bibliográfica foi feita para escolher os resíduos a serem mutados. Para isso foi comparada a sequência de aminoácidos de LIC_11568 com as sequências das proteínas com domínio Peptidase M23 mais estudadas e que já foram alvos de mutações sítio-dirigidas bem sucedidas (GRABOWSKA et al., 2015; ODINTSOV et al., 2004; SPENCER et al., 2010). Assim, foi possível identificar os aminoácidos essenciais para a atividade de LIC_11568. ODINTSOV e colaboradores fez mutação sítio dirigida em três resíduos envolvidos na ligação ao Zn^{2+} do domínio Peptidase M23 de *Staphylococcus aureus* que são a histidina e o ácido aspártico de HxxxD e a segunda histidina de HxH (em amarelo na **Figura 25**). As três construções puderam ser expressas, e duas delas, a histidina e o ácido aspártico de HxxxD, produziram proteínas mutantes solúveis e inativas. Porém, a construção da segunda histidina de HxH foi insolúvel.

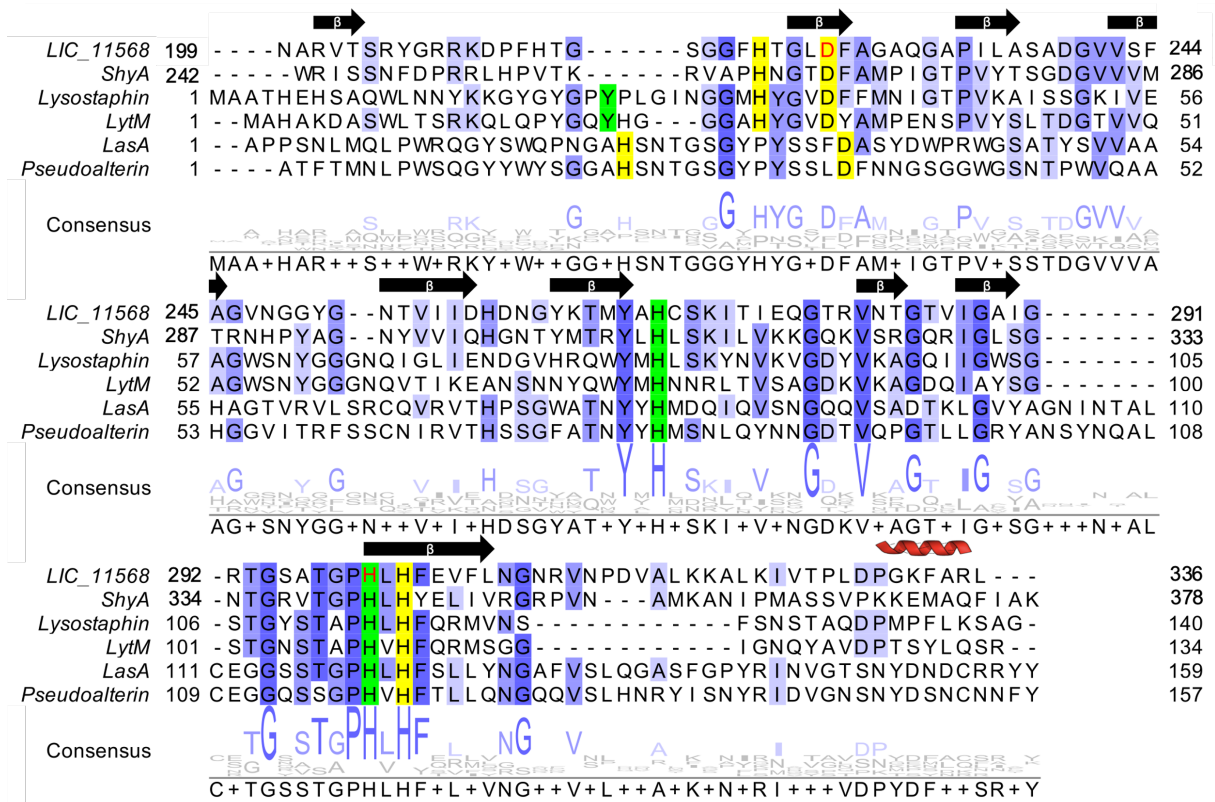


Figura 25 – Alinhamento das sequências das metaloproteases M23 mais estudadas com a sequência do domínio peptidase M23 de LIC_11568 (início no aminoácido 199), gerado pelo programa Clustal Omega e visualizado pela ferramenta Jalview. Os diferentes tons de azul indicam a porcentagem de identidade entre os aminoácidos das sequências; em amarelo estão representados os aminoácidos que atuam como ligandos de Zn^{2+} ; em verde estão representados os aminoácidos que contribuem com a ligação ao substrato. As letras em vermelho indicam os aminoácidos escolhidos para as mutações sítio-dirigidas. E estrutura secundária predita para LIC_11568 pelos servidores JPred4 e Phyre2 está representada por setas pretas (fita- β) e hélices vermelhas (α -hélice).

Por outro lado, a primeira histidina do motivo **HxH** (em verde na **Figura 25**) não liga ao Zn^{2+} em LytM, mas sua conservação em todas as proteínas dessa família sugere um papel funcional. Essa hipótese foi comprovada substituindo a histidina por uma alanina e testando sua atividade, resultando em uma proteína sem atividade de degradação da molécula de pentaglicina (ODINTSOV et al., 2004).

Com base nessas informações, foram construídos os mutantes dos motivos **HxxxD** e **HxH**: D225A e H300A respectivamente, a partir de LIC_11568₅₅₋₃₃₆. Os clones dos mutantes, gerados por mutagênese sítio-dirigida fazendo uso da técnica overlap extension PCR. A expressão e purificação dos mutantes (D225A e H300A de LIC_11568₅₅₋₃₃₆) em larga escala está sendo realizada atualmente para posteriormente testar sua atividade e comprovar que as atividades enzimáticas observadas são de LIC_11568 e não de uma contaminação de *E. coli* provinda do processo de purificação.

4.15. Secretoma de *Leptospira interrogans*

Para demonstrar a possível secreção de LIC_11567 e LIC_11568, foram identificadas por espectrometria de massas as proteínas do secretado de *Leptospira interrogans*. Os dados foram analisados em dois softwares: Maxquant (TYANOVA et al., 2015) e Proteome Discoverer (ORSBURN, 2021). Os dois softwares são capazes de identificar e quantificar proteínas com base na intensidade de sinal dos íons. As diferenças intrínsecas dos dois softwares baseadas nos métodos de quantificação e identificação podem refletir na diferença no número de proteínas. As proteínas identificadas pelos softwares Proteome Discoverer e MaxQuant estão representadas nos diagramas de Venn das **Figura 26A** e **Figura 26B**, respectivamente. Na **Figura 26A** podemos ver que 12 proteínas identificadas na banda do tamanho aproximado esperado para a proteína LIC_11567 também são detectadas na banda do tamanho aproximado esperado para LIC_11568. Usando MaxQuant (**Figura 26B**) apenas foi detectada uma proteína em comum. A detecção de proteínas de tamanhos diferentes pode estar relacionada com os processos de proteólise ou modificações pós-traducionais, em geral, que ocorrem.

Na **Tabela 6** do APÊNDICE se apresentam todas as proteínas identificadas no secretado de *L. interrogans* por espectrometria de massas. Nesta podemos observar que as proteínas LIC_11567 e LIC_11568 não foram identificadas nessas condições. Isso pode ser devido a uma baixa abundância das proteínas de interesse, impedindo a identificação, pois estão em uma

mistura complexa. Por exemplo, algumas proteínas de massa molecular similar à proteína de interesse LIC_11568 (~31 kDa) foram identificadas: LipL32 de 29 kDa e LipL41 de 39 kDa, podendo estar atrapalhando a identificação de LIC_11568.

Por outro lado, foram identificadas várias proteínas citoplasmáticas dentre as proteínas secretadas (**Tabela 6**, APÊNDICE). Isto pode ser devido à lise das bactérias ou secreção não-convencional de proteínas. Também foram identificadas seis proteínas com peptídeos sinais reconhecidos pelo sistema *Sec* e uma proteína com peptídeo sinal reconhecido pelo sistema *Tat*, dessa forma, tornando-se alvos do T2SS.

Além disso, dentre as proteínas identificadas, estão as lipoproteínas LipL21, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45 e LipL71. A proteína LipL32 destaca por ser abundante em espécies patogênicas de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000) e sua secreção já foi comprovada experimentalmente em sobrenadante de *L. interrogans* sorovar *Autumnalis* (BRANGER et al., 2005). Porém trabalhos recentes sugerem uma localização subsuperficial da LipL32 (PINNE; HAAKE, 2013).

Na **Figura 26C** estão representadas as funções moleculares preditas pelo Gene Ontology (GO) Project. Segundo essas predições a maioria das funções estão relacionadas com o metabolismo da célula pois têm muitas proteínas citoplasmática. Apenas 7 % das proteínas identificadas foram preditas como hidrolases das quais 2 delas destacam por serem lipoproteínas reconhecidas por *Sec*: a peptidase M43 Q72LV9 e a Serina protease Q72NM1. A hidrolase Q72Q11 é também reconhecida pelo sistema *Sec*.

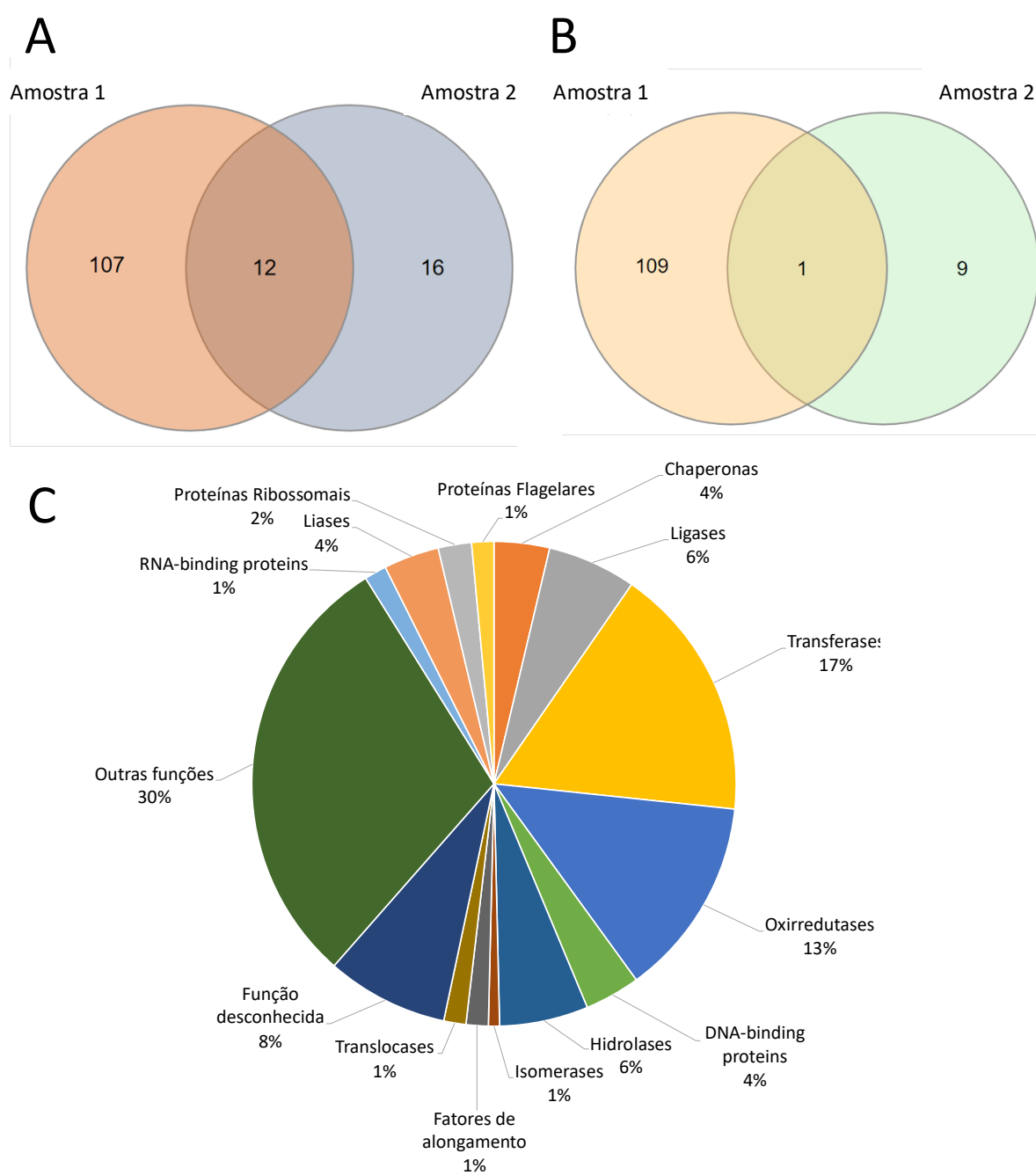


Figura 26 – Identificação de proteínas por espectrometria de massas. (A) Diagrama de Venn das proteínas identificadas pelo software Proteome Discoverer. **(B)** Diagrama de Venn das proteínas identificadas pelo software MaxQuant. **(C)** Representação das funções moleculares previstas pelo Gene Ontology (GO) Project. *Amostra 1 – proteínas identificadas na banda do tamanho aproximado esperado para a proteína LIC_11568; Amostra 2 – proteínas identificadas na banda do tamanho aproximado esperado para a proteína LIC_11567;

5. CONCLUSÕES

Nosso trabalho tem como objetivo o estudo funcional de duas proteínas, LIC_11567 e LIC_11568, localizadas no cluster que codifica proteínas da montagem do sistema de secreção tipo II de *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni (estirpe Fiocruz L1-130). Estas duas proteínas são bem conservadas em diferentes espécies de *Leptospira*, mas suas funções ainda não foram caracterizadas. Devido ao contexto gênico de LIC_11567 e LIC_11568, acreditamos que elas são potenciais efetores do T2SS e possam ser importantes para a sobrevivência da bactéria e/ou estarem envolvidas na patogênese da bactéria.

Em relação aos estudos funcionais de LIC_11567, os ensaios de ativação de piroptose em macrófagos na presença da proteína foram promissores, mas ainda precisam ser repetidos e confirmados. Para isso, experimentos de citotoxicidade de células de macrófagos THP-1 serão repetidos fazendo priming com LPS, para avaliar a morte celular usando o kit de LDH e azul de tripan. Os anticorpos produzidos contra LIC_11567 servirão para tentar localizar ela tanto na bactéria quanto no macrófago. A ausência de domínios funcionais com sítios catalíticos, faz com que a tirosina 120 de LIC_11567 possa estar envolvida com ativação do inflamassoma NLRP3. Desta forma esse resíduo é alvo de futuras mutações, para verificar se ela também participa na interação com a proteína RACK1.

Com base nas análises bioinformáticas e funcionais de LIC_11567, emergem os seguintes cenários (representados na **Figura 27**): a lipoproteína LIC_11567 deve ser reconhecida pelo sistema *Sec* e ser translocada para o periplasma onde é lipídada. Em seguida é liberada da membrana interna pelo transportador ABC LolCDE e transportada para a membrana externa por LolA (OKUDA; TOKUDA, 2011; WILSON; BERNSTEIN, 2016). A inserção na membrana externa deve ser auxiliada por LolA ou por alguma outra proteína transmembrana, já que LolB não foi identificado no genoma de *Leptospira* (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Uma vez na membrana externa, LIC_11567 pode permanecer na face interna da membrana externa ou ser transportada para a face externa via mecanismos espontâneos, flippase ou T2SS (WILSON; BERNSTEIN, 2016). Já no espaço extracelular LIC_11567 seria capaz de ativar o inflamassoma dos macrófagos levando à morte celular por piroptose, nossos dados preliminares sugerem esse mecanismo de ação. Nós acreditamos que LIC_11567 fica exposta na superfície da membrana externa de *Leptospira* onde seria capaz de exercer sua atividade, já que foi identificada por anticorpos presentes no soro de pacientes com

leptospirose grave (HARTWIG et al., 2011). Embora LIC_11567 não tenha sido detectada nas nossas análises de espectrometria de massas do secretado de *L. interrogans*, ela já foi identificada na fração de detergente de Triton X-114 por THODUVAYIL et al., 2020.

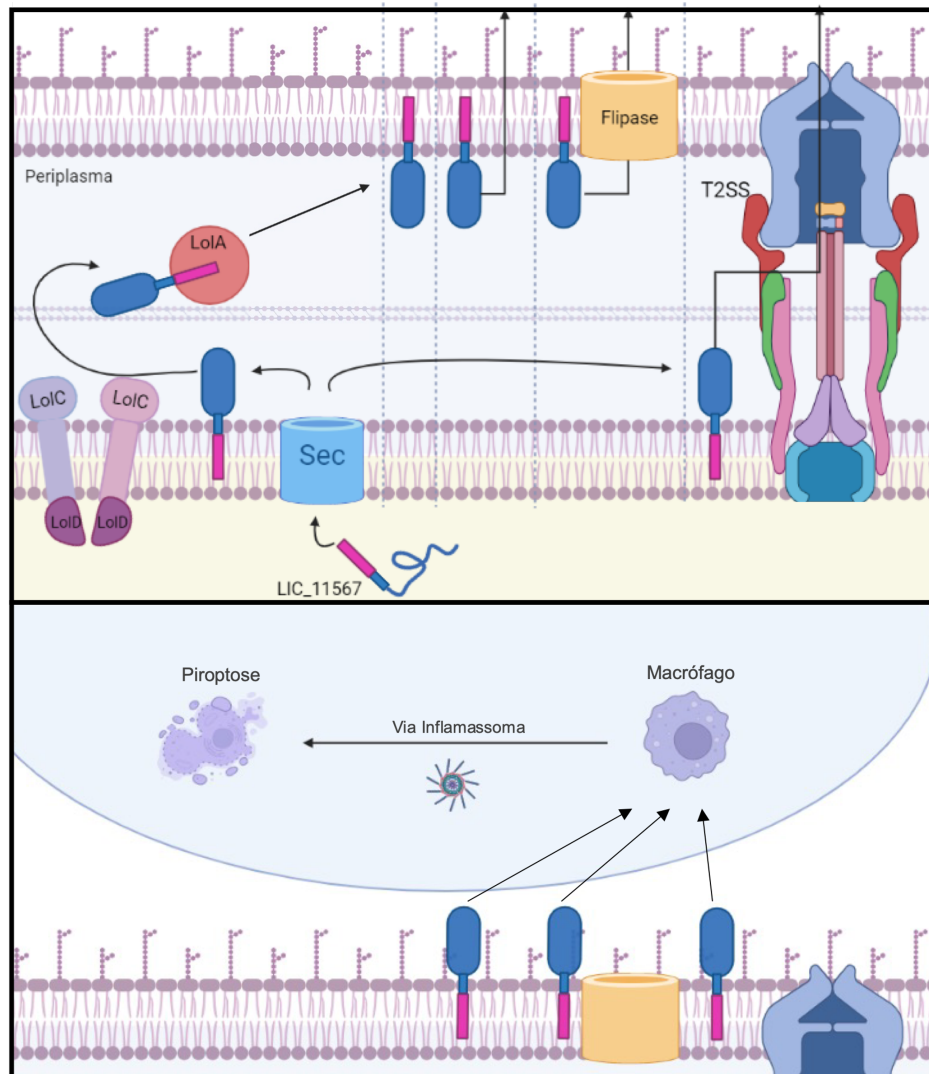


Figura 27 – Possíveis cenários de processamento, localização subcelular e função de LIC_11567. Figura feita no servidor BioRender.com.

Por outro lado, os resultados dos ensaios de degradação de moléculas de matriz extracelular e plasma sanguíneo pela enzima LIC_11568 são muito promissores. À vista disso, novos experimentos estão sendo feitos com outros substratos como laminina e decorina em colaboração com o grupo da Professora Angela Silva Barbosa no Instituto Butantã. Da mesma maneira, experimentos de imunofluorescência estão sendo executados para observar a degradação de componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, produzidos por células renais em cultura. De forma paralela, está sendo testado o efeito de LIC_11568 em modelo de zebrafish.

Futuramente, ensaios de degradação poderão ser feitos com componentes do sistema complemento visto que as proteases secretadas por *Leptospira* também são capazes de clivar esse tipo de moléculas (DA SILVA et al., 2018). Devido a presença do domínio LysM, estudos de ligação à matriz extracelular também poderão ser avaliados, assim como a produção de soro policlonal contra LIC_11568 para ensaios de imunolocalização.

Na **Figura 28** se observam os possíveis cenários de processamento, localização subcelular e função de LIC_11568 com base nos resultados obtidos nesse trabalho. A proteína desenvolvida, contendo um peptídeo sinal no seu extremo N-terminal, deve ser reconhecida pelo sistema *Sec* e translocada para o periplasma, onde o peptídeo sinal é clivado e a proteína adquire sua conformação funcional. Já no periplasma, a proteína deve ser reconhecida pelo T2SS e ser secretada para o espaço extracelular onde, no caso de ser secretada durante a infecção por *Leptospira*, é capaz de degradar proteínas da matriz extracelular (lumican, fibronectina e vitronectina) e do plasma sanguíneo (fibrinogênio) permitindo a colonização do hospedeiro. Em contrapartida, nem a análise do secretado de *L. interrogans* por espectrometria de massas deste trabalho nem outros estudos de proteômica identificaram a LIC_11568. Isso pode sugerir que ela não é secretada e que exerce sua função dentro do periplasma modificando o peptidoglicano. Porém, nossos resultados mostraram que, na presença de LIC_11568, o peptidoglicano de *E. coli* não sofre alterações ou não são suficientes para produzir lise celular ou mudanças morfológicas. Por outro lado, assim como em *L. interrogans*, *A. hydrophila* não contém o gene que codifica a pilotina envolvida na montagem da secretina GspD na membrana externa, em compensação ela possui um complexo de ligação ao peptidoglicano (com um domínio similar ao domínio peptidase M23) que auxilia na oligomerização de GspD, mas a necessidade deste complexo pode ser driblada pela super expressão de GspD (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012; LI et al., 2011; LI; HOWARD, 2010). Inclusive, o domínio de ligação ao peptidoglicano de *A. hydrophila* está presente em várias proteínas com estrutura já resolvida, sete delas são proteínas eucarióticas com atividade metaloproteinase de matriz extracelular (LI et al., 2011). Isto pode sugerir uma relação de LIC_11568 com a montagem do T2SS, porém é sabido que a secretina de *L. interrogans* é uma liposecretina e provavelmente seja automontada, como mencionado na introdução. Além disso, uma outra função descrita para as metaloproteases M23 é a degradação de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas em forma de interação predador-presa ou competição bacteriana (TANG et al., 2020). Ensaios para avaliar essa hipótese devem ser feitos. Essa diversidade de funções de um mesmo domínio poderia permitir a sobrevivência de *Leptospira* na natureza, lisando bactérias Gram-positivas

para a sua nutrição, e nas pessoas, permitindo a colonização do corpo e, em consequência, causando leptospirose.

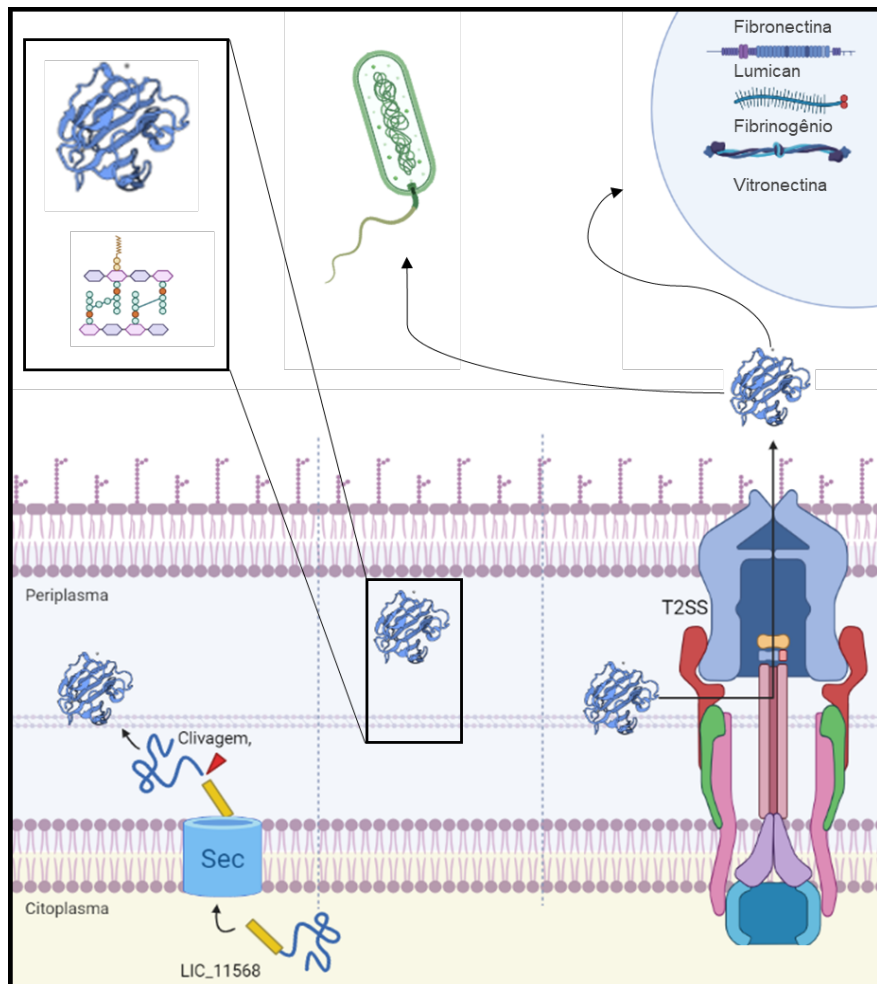


Figura 28 – Possíveis cenários de processamento, localização subcelular e função de LIC_11568. Figura feita no servidor BioRender.com.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 27 jan. 2010.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, 18 abr. 2019.
- BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 18, set. 1996.
- BALDI, D. L. et al. The type II secretion system and its ubiquitous lipoprotein substrate, SsIE, are required for biofilm formation and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2042–2052, 2012.

- BAMFORD, C. V. et al. Characterization of a novel family of fibronectin-binding proteins with M23 peptidase domains from *Treponema denticola*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 369–383, dez. 2010.
- BARDWELL, V. J.; TREISMAN, R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. **Genes & Development**, v. 8, n. 14, p. 1664–1677, 15 jul. 1994.
- BARNES, D. W.; SILNUTZER, J. Isolation of human serum spreading factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12548–12552, 1983.
- BAYER-SANTOS, E. et al. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 9, p. e1007651, 12 set. 2019.
- BERA, A. et al. Functional role of vitronectin in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, 1 nov. 2020.
- BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. **THP-1 cells as a model for human monocytes** *Annals of Translational Medicine* AME Publishing Company, , 1 nov. 2016.
- BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* Sensus Lato Challenge by DNA Immunization with the Gene Encoding Hemolysin-Associated Protein 1. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4062–4069, jul. 2005.
- CAGLIERO, J.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; MATSUI, M. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 0, n. JUN, p. 204, 20 jun. 2018.
- CAIMI, K.; RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, p. 104241, 1 jul. 2020.
- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, 2009.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. *Leptospira dzianensis* and *Leptospira putramalaysiae* are later heterotypic synonyms of *Leptospira yasudae* and *Leptospira stimsonii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 3, 6 jun. 2019.
- CHAN, V. L.; SHERMAN, P. M.; BOURKE, B. Bacterial genomes and infectious diseases. **Bacterial Genomes and Infectious Diseases**, p. 1–270, 2006.
- CHEN, X. et al. The pre-activated immune response induced by LPS protects host from leptospirosis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242742, 1 nov. 2020.
- COHEN, D. N. et al. Shared Catalysis in Virus Entry and Bacterial Cell Wall Depolymerization. **Journal of Molecular Biology**, v. 387, n. 3, p. 607–618, 3 abr. 2009.
- COSTA, T. R. D. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology** 2015 13:6, v. 13, n. 6, p. 343–359, 15 maio 2015.
- CROWLEY, L. C. et al. Dead Cert: Measuring Cell Death. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, 1 dez. 2016.
- DA SILVA, L. B. et al. *Leptospira interrogans* secreted proteases degrade extracellular matrix and plasma proteins from the host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. MAR, 27 mar. 2018a.
- DA SILVA, L. B. et al. *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 27 mar. 2018b.
- DEPLUVEREZ, S.; DEVOS, S.; DEVREESE, B. The Role of Bacterial Secretion Systems in the Virulence of Gram-Negative Airway Pathogens Associated with Cystic Fibrosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 30 ago. 2016.
- DENISE, R.; ABBY, S. S.; ROCHA, E. P. C. The Evolution of Protein Secretion Systems by Co-option and Tinkering of Cellular Machineries. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 372–386, 1 maio 2020.
- DÖRR, T. et al. Substrate specificity of an elongation-specific peptidoglycan endopeptidase and its implications for cell wall architecture and growth of *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 949–962, 29 set. 2013.
- DUAN, Y. et al. RACK1 Mediates NLRP3 Inflammasome Activation by Promoting NLRP3 Active Conformation and Inflammasome Assembly. **Cell Reports**, v. 33, n. 7, p. 108405, 17 nov. 2020.
- EFTEKHAR, M. G. Prediction of protein subcellular localization using deep learning and data augmentation. **bioRxiv**, p. 2020.05.19.068122, 15 jun. 2020.

- FIRCZUK, M.; BOCHTLER, M. Folds and activities of peptidoglycan amidases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 6, p. 676–691, nov. 2007.
- FRAGA, T. R. et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, 15 dez. 2010.
- GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 8, p. 1093–1107, 17 ago. 2009.
- GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.
- GORASIA, D. G.; VEITH, P. D.; REYNOLDS, E. C. The Type IX Secretion System: Advances in Structure, Function and Organisation. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1173, 1 ago. 2020.
- GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 29 jan. 2016.
- GRABOWSKA, M. et al. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue. **Scientific Reports**, v. 5, 6 out. 2015.
- GUGLIELMINI, J. et al. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007374, 1 abr. 2019.
- HAAKE, D. A. et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, abr. 2000.
- HAAKE, David A. Hamster model of leptospirosis. **Current protocols in microbiology**, v. 2, n. 1, p. 12E. 2.1–12E. 2.13, 2006.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, p. no-no, 15 jul. 2010a.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–814, 1 ago. 2010b.
- HALL, B. G. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1229–1235, 1 maio 2013.
- HARTWIG, D. D. et al. Characterization of the Immunogenic and Antigenic Potential of Putative Lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1337–1341, 11 abr. 2011.
- HASHIMOTO, V. L. et al. Evaluation of the elastinolytic activity and protective effect of Leptallo I, a protein composed by metalloprotease and FA5/8C domains, from *Leptospira interrogans* Copenhageni. **Microbial Pathogenesis**, v. 61–62, ago. 2013.
- HERRICK, S. et al. Fibrinogen. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 7, jul. 1999.
- HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 15, p. 7351–7367, 1988.
- HIRSCHHAUSEN, N. et al. Characterization of the Modular Design of the Autolysin/Adhesin Aaa from *Staphylococcus Aureus*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e40353, 29 jun. 2012.
- HOLM, L. Using Dali for Protein Structure Comparison. **Methods in Molecular Biology**, v. 2112, p. 29–42, 2020.
- JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Science**, v. 12, n. 8, ago. 2003.
- KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 5, p. 1027–1036, 14 maio 2004.
- KÄLLBERG, M. et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols** 2012 7:8, v. 7, n. 8, p. 1511–1522, 19 jul. 2012.
- KANEHISA, M. The KEGG databases at GenomeNet. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, 1 jan. 2002.
- KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols** 2015 10:6, v. 10, n. 6, p. 845–858, 7 maio 2015.

- KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. **Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor** *Journal of Endocrinology*, maio 2011.
- KLEJEWSKI, A. et al. The significance of lumican expression in ovarian cancer drug-resistant cell lines. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, 26 set. 2017.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology** **2009 7:10**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.
- KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature Reviews Microbiology** **2012 10:5**, v. 10, n. 5, p. 336–351, 2 abr. 2012.
- KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 19 jan. 2001.
- KUMAR, J. K. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. **Applied Microbiology and Biotechnology** **2008 80:4**, v. 80, n. 4, p. 555–561, 8 jul. 2008.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 1 jun. 2018.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, 1 nov. 2007.
- LAUBER, F. et al. Type 9 secretion system structures reveal a new protein transport mechanism. **Nature**, v. 564, n. 7734, p. 77–82, 7 dez. 2018.
- LE, S. Q.; GASCUEL, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 1 jul. 2008.
- LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 313–316, 1 jun. 2015.
- LI, G. et al. Assembly of the Type II Secretion System: Identification of ExeA Residues Critical for Peptidoglycan Binding and Secretin Multimerization. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 1, p. 197–204, jan. 2011.
- LI, G.; HOWARD, S. P. ExeA binds to peptidoglycan and forms a multimer for assembly of the type II secretion apparatus in *Aeromonas hydrophila*. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 772–781, 25 mar. 2010.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, 28 jan. 2015.
- MATSUNAGA, J. et al. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3777–3786, 1 dez. 2006.
- MEISNER, J. et al. Structure of the basal components of a bacterial transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5446–5451, 3 abr. 2012.
- MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D412–D419, 8 jan. 2021.
- MONIZ, G. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009.
- MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, ago. 2005.
- MOSHER, D. F. Physiology of Fibronectin. **Annual Review of Medicine**, v. 35, n. 1, fev. 1984.
- MURRAY, G. L. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In: [s.l.: s.n.].
- NAITO, Z. The Role of Small Leucine-rich Proteoglycan (SLRP) Family in Pathological Lesions and Cancer Cell Growth. **Journal of Nippon Medical School**, v. 72, n. 3, 2005.
- NAKAYAMA, H.; KUROKAWA, K.; LEE, B. L. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. **FEBS Journal**, v. 279, n. 23, p. 4247–4268, dez. 2012.
- NIKITOVIC, D. et al. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. **IUBMB Life**, v. 60, n. 12, dez. 2008.
- NIVASKUMAR, M.; FRANCETIC, O. Type II secretion system: A magic beanstalk or a protein escalator. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, ago. 2014.
- ODINTSOV, S. G. et al. Latent LytM at 1.3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 3, p. 775–785, 16 jan. 2004.
- OKUDA, S.; TOKUDA, H. Lipoprotein Sorting in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 239–259, 13 out. 2011.

- ORSBURN, B. C. Proteome Discoverer—A Community Enhanced Data Processing Suite for Protein Informatics. **Proteomes**, v. 9, n. 1, p. 15, 23 mar. 2021.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology** 2017 15:5, v. 15, n. 5, p. 297–307, 6 mar. 2017.
- QU, Z. et al. **Mycobacterial EST12 activates a RACK1-NLRP3-gasdermin D pyroptosis-IL-1 β immune pathway** *Sci. Adv.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/>>.
- RONDELET, A.; CONDEMINE, G. Type II secretion: the substrates that won't go away. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 556–561, 1 jul. 2013.
- SCHVARTZ, I.; SEGER, D.; SHALTIEL, S. Vitronectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 5, maio 1999.
- SIKORA, A. E. et al. Proteomic Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretome Reveals New Proteins, Including Three Related Serine Proteases *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p. 16555–16566, 13 maio 2011.
- SIKORA, A. E. Proteins Secreted via the Type II Secretion System: Smart Strategies of *Vibrio cholerae* to Maintain Fitness in Different Ecological Niches. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003126, fev. 2013.
- SPENCER, J. et al. Crystal Structure of the LasA Virulence Factor from *Pseudomonas aeruginosa*: Substrate Specificity and Mechanism of M23 Metallopeptidases. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 4, p. 908–923, 5 mar. 2010.
- TANG, B.-L. et al. A predator-prey interaction between a marine *Pseudoalteromonas* sp. and Gram-positive bacteria. **Nature Communications** 2020 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–14, 15 jan. 2020.
- TAYLOR, A. J.; PARIS, D. H.; NEWTON, P. N. A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003866, 25 jun. 2015.
- THODUVAYIL, S. et al. Triton X-114 Fractionated Subcellular Proteome of *Leptospira interrogans* Shows Selective Enrichment of Pathogenic and Outer Membrane Proteins in the Detergent Fraction. **PROTEOMICS**, v. 20, n. 19–20, 17 out. 2020.
- THUMM, G.; GOTZ, F. **Studies on prollyostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus** *Molecular Microbiology*. [s.l: s.n.].
- TILAHUN, Z. et al. Global epidemiological overview of leptospirosis. **Int J Microbiol Res**, v. 4, n. 1, p. 9-5, 2013.
- TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. **Plasma and cellular fibronectin: Distinct and independent functions during tissue repair** *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 16 set. 2011.
- TYANOVA, S. et al. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. **PROTEOMICS**, v. 15, n. 8, p. 1453–1456, 5 abr. 2015.
- URBAN, A.; NEUKIRCHEN, S.; JAEGER, K.-E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one- step overlap extension PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 11, p. 2227–2228, 1 jun. 1997.
- VERMASSEN, A. et al. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. FEB, p. 331, 2019.
- VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 1 maio 2019.
- WILSON, M. M.; BERNSTEIN, H. D. Surface-Exposed Lipoproteins: An Emerging Secretion Phenomenon in Gram-Negative Bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 198–208, 1 mar. 2016.
- WONG, J. E. M. M. et al. An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 592–605, 1 mar. 2015.
- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics** 2008 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–8, 23 jan. 2008.
- ZOLLINGER, A. J.; SMITH, M. L. **Fibronectin, the extracellular glue** *Matrix Biology* Elsevier B.V., , 1 jul. 2017.
- ZÜCKERT, W. R. Protein Secretion in Spirochetes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, 31 maio 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE - Tabelas

Tabela 2 – Vetores de expressão e suas resistências a antibióticos

Vetor de expressão	Antibiótico	Concentração
pET-28a(+)	Canamicina	50 µg/mL
pETDuet-1	Ampicilina	100 µg/mL

Tabela 3 – Primers desenhados para clonagem

Nome	Sequência	Enzima de restrição
LIC_11568F_0_NcoI	ATACCATGGAGATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAAATC	<i>NcoI</i>
LIC_11568F_55_NcoI	ATACCATGGAGAATTACGACGCAGAAATTTTCAGAATATAC	<i>NcoI</i>
LIC_11568F_83_NcoI	ATACCATGGAGTTTTCTCAATCTCCTGAAAATTGGCAG	<i>NcoI</i>
LIC_11568F_127_NcoI	ATACCATGGAGGGAATCATATATAAAAATTATGTAGTCAAACCCAAG	<i>NcoI</i>
LIC_11568F_181_NcoI	ATACCATGGAGAACGCGAGCCGAGAAAAAGTAG	<i>NcoI</i>
LIC_11568F_0_BamHI	ATAGGATCCATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAAATC	<i>BamHI</i>
LIC_11568F_55_BamHI	ATAGGATCCAATTACGACGCAGAAATTTTCAGAATATACC	<i>BamHI</i>
LIC_11568F_83_BamHI	ATAGGATCCTTTTTCTCAATCTCCTGAAAATTGGCAG	<i>BamHI</i>
LIC_11568F_127_BamHI	ATAGGATCCGGAATCATATATAAAAATTATGTAGTCAAACCCAAG	<i>BamHI</i>
LIC_11568F_181_BamHI	ATAGGATCCAACGCGAGCCGAGAAAAAGT	<i>BamHI</i>
LIC11568_Rev_SalI	ATAGTCGACTCACAATCTAGCAAATTTACCAGGGTCTAAAG	<i>SalI</i>
LIC_11567_For_NdeI	TTTTCATATGGGTAACAGATTGATTCGTAAGACGC	<i>NdeI</i>
LIC_11567_Rev_XhoI	ATACTCGAGTTATTTTTCTTTTTGTATTCCACAAGTTCATTGG	<i>XhoI</i>
LIC_11568_55_D225A_FOR	GGCTCCATACCGTTTGGCTTTTGCTGGGGCTCAAGGC	-
LIC_11568_55_D225A_REV	GCCTTGAGCCCAGCAAAAAGCCAAACCGGTATGGAAGCC	-
LIC_11568_55_H300A_FOR	TCGGCTACGGGACCTGCTCTTCATTTTGAAGTC	-
LIC_11568_55_H300A_REV	GACTTCAAAATGAAGAGCAGGTCCCGTAGCCGA	-

Tabela 4 – Cepas de *E. coli* usadas nos testes de expressão com as respectivas resistências e concentrações de antibióticos

Linhagem de expressão	Antibiótico	Concentração
BL21 (DE3)	-	-
BL21 Star™ (DE3)	Cloranfenicol	30 µg/mL
BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	Cloranfenicol	30 µg/mL
Lemo21 (DE3)	Cloranfenicol	30 µg/mL

Tabela 5 – Anticorpos primários e secundários, e suas respectivas diluições, usados nos ensaios de degradação de proteínas de matriz extracelular e plasma sanguíneo.

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Anti-Lumican (R&D Systems, #AF2057)	1:5000	Anti-Cabra conjugado com peroxidase (Sigma)	1:10000
Anti-Fibrinogênio (Sigma)	1:1000	Anti-Coelho conjugado com peroxidase (Sigma)	1:5000
Anti-Fibronectina (Sigma, #F3648)	1:5000	Anti-Coelho conjugado com peroxidase (Sigma)	1:10000
Anti-Vitronectina (Sigma, #3186)	1:5000	Anti-Coelho conjugado com peroxidase (Sigma)	1:5000
Anti-Laminina (Sigma, #L9393)	1:500	Anti-Coelho conjugado com peroxidase (Sigma)	1:5000

Tabela 6 – Proteínas identificadas no secretado de *Leptospira interrogans* por espectrometria de massas.

Nesta tabela aparecem os nomes (*Accession n°*) dos genes que codificam as proteínas identificadas nas duas amostras de secretado de *L. interrogans* e sua descrição segundo Uniprot. Também estão indicadas suas abreviações (*Gene Symbol*) e seus *gene IDs* assim como seus possíveis peptídeos sinais (segundo SignalP) e localização subcelular (segundo Psortb). *NO_SP– Sem Peptídeo Sinal; LIPO_SEC– Peptídeo Sinal de Lipoproteína reconhecido por *Sec*; TAT– Peptídeo Sinal reconhecido por *Tat*; Cyt– Citoplasma; Unkn– Localização desconhecida; CytMem– Membrana Citoplasmática; Perip– Periplasma; Extrac– Extracelular.

Accession n°	Description	Gene Symbol	Gene ID	SignalP	Psortb
P61438	Chaperonin GroEL	groEL	LIC_11335	NO_SP	Cyt
P61442	Chaperone protein DnaK	dnaK	LIC_10524	NO_SP	Cyt
P61524	Argininosuccinate synthase	argG	LIC_13324	NO_SP	Cyt
P61656	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	kdsA	LIC_11541	NO_SP	Cyt
P61975	Malate dehydrogenase	mdh	LIC_11781	NO_SP	Unkn
P62038	Probable transcriptional regulatory protein	-	LIC_12886	NO_SP	Cyt
Q72LQ9	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	ilvE	LIC_13496	NO_SP	Cyt
Q72LT0	Ferredoxin--NADP reductase	-	LIC_13470	NO_SP	CytMem
Q72LV9	Peptidase_M43 domain-containing protein	-	LIC_13434	LIPO_SEC	Unkn
Q72LZ4	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	mtnP	LIC_13399	NO_SP	Cyt
Q72M00	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	ilvC	LIC_13393	NO_SP	Cyt
Q72M01	Polysaccharide deacetylase	-	LIC_13392	SP_SEC	Unkn
Q72M38	L-amino acid oxidase	lao	LIC_13353	TAT	Unkn
Q72M72	Fatty acid synthase subunit beta	fas1	LIC_13318	NO_SP	Unkn
Q72M89	3-ketoacyl-CoA thiolase	-	LIC_13301	NO_SP	Unkn
Q72M90	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	fadB	LIC_13300	NO_SP	Cyt
Q72ME4	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	icdA	LIC_13244	NO_SP	Cyt
Q72ML7	Tas	tas	LIC_13176	NO_SP	Cyt
Q72MT7	Glucose-6-phosphate isomerase	pgi	LIC_13105	NO_SP	Cyt
Q72MX9	LipL36	lipL36	LIC_13060	LIPO_SEC	Unkn
Q72N71	LipL41	lipL41	LIC_12966	LIPO_SEC	Unkn
Q72NB1	Citrate synthase	-	LIC_12925	NO_SP	Cyt

Q72NF9	Elongation factor Tu	tuf	LIC_12875	NO_SP	Cyt
Q72NI8	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	rpoA	LIC_12846	NO_SP	Cyt
Q72NJ3	LL-diaminopimelate aminotransferase	dapL	LIC_12841	NO_SP	Cyt
Q72NJ5	Aspartate carbamoyltransferase	pyrB	LIC_12839	NO_SP	Cyt
Q72NK5	Citrate synthase	gltA	LIC_12829	NO_SP	Cyt
Q72NM1	Serine protease MucD	mucD	LIC_12812	LIPO_SEC	Perip
Q72NT3	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	nuoF	LIC_12746	NO_SP	Cyt
Q72NT5	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	nuoD	LIC_12744	NO_SP	Cyt
Q72NY4	Glutamate synthase (NADPH) alpha chain	-	LIC_12694	NO_SP	Cyt
Q72P58	Diaminopimelate decarboxylase	lysA	LIC_12618	NO_SP	Cyt
Q72PA2	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	sucC	LIC_12573	NO_SP	Cyt
Q72PA7	Adenylosuccinate synthetase	purA	LIC_12565	NO_SP	Cyt
Q72PJ3	Lactamase_B domain-containing protein	-	LIC_12478	NO_SP	Cyt
Q72PJ6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	lpdA	LIC_12475	NO_SP	Cyt
Q72PK5	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	carA	LIC_12466	NO_SP	Cyt
Q72PL1	Uncharacterized protein	-	LIC_12460	NO_SP	Cyt
Q72PRO	Putative glutamine synthetase protein	glnA	LIC_12407	NO_SP	Cyt
Q72PW0	50S ribosomal subunit assembly factor BipA	bipA	LIC_12357	NO_SP	CytMem
Q72PX7	Ricin B-type lectin domain-containing protein	-	LIC_12340	NO_SP	Unkn
Q72PY2	Serine hydroxymethyltransferase	glyA	LIC_12335	NO_SP	Cyt
Q72Q11	Carboxy-terminal processing protease	-	LIC_12303	SP_SEC	CytMem
Q72Q50	Uncharacterized protein	-	LIC_12263	SP_SEC	Cyt
Q72Q79	Fructose-bisphosphate aldolase	-	LIC_12233	NO_SP	Unkn
Q72QB0	UDP-glucose 4-epimerase	-	LIC_12202	NO_SP	Cyt
Q72QB3	UDP-glucose 4-epimerase	-	LIC_12199	NO_SP	Cyt
Q72QB5	Aminotransferase	-	LIC_12197	NO_SP	Cyt
Q72QC4	Uncharacterized protein	-	LIC_12188	NO_SP	Cyt
Q72QC5	Perosamine synthetase	per	LIC_12187	NO_SP	Cyt
Q72QC6	Methionyl-tRNA(Fmet) n-formyltransferase	-	LIC_12186	NO_SP	Cyt
Q72QE4	Aspartate aminotransferase	-	LIC_12168	NO_SP	Cyt
Q72QE6	Alcohol dehydrogenase	-	LIC_12166	NO_SP	Cyt
Q72QE7	Putative molybdenum cofactor biosynthesis protein	moaA	LIC_12165	NO_SP	Cyt
Q72QH2	Galactowaldenase	-	LIC_12141	NO_SP	Cyt
Q72QM3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gapA	LIC_12090	NO_SP	Cyt
Q72QN1	Cysteine synthase	cysK	LIC_12082	NO_SP	Cyt
Q72QU2	Chaperone protein ClpB	clpB	LIC_12017	NO_SP	Cyt
Q72QZ4	ARM repeat superfamily protein	-	LIC_11958	SP_SEC	Cyt
Q72R31	Uncharacterized protein	-	LIC_11920	NO_SP	Cyt
Q72R63	Putative lipoprotein	-	LIC_11885	LIPO_SEC	Unkn
Q72R96	O-acetylhomoserine (Thiol) lyase	-	LIC_11852	NO_SP	Cyt
Q72RE4	Anti-sigma factor antagonist	-	LIC_11801	NO_SP	Unkn
Q72RE5	Lactamase_B domain-containing protein	-	LIC_11800	NO_SP	Cyt
Q72RF5	Aminotransferase	aspC	LIC_11790	NO_SP	Cyt
Q72RH7	3-isopropylmalate dehydrogenase	leuB	LIC_11768	NO_SP	Cyt

Q72RJ9	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	argC	LIC_11746	NO_SP	Cyt
Q72RN8	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	fbp	LIC_11707	NO_SP	Cyt
Q72RW4	DNA helicase	uvrD	LIC_11624	NO_SP	Cyt
Q72S55	Flagellin	-	LIC_11531	NO_SP	Perip
Q72S58	Histidine kinase sensor protein	-	LIC_11528	NO_SP	CytMem
Q72S69	Acetyl-CoA carboxylase alpha subunit	accA2	LIC_11517	NO_SP	Cyt
Q72SC1	Uncharacterized protein	-	LIC_11463	LIPO_SEC	Extrac
Q72SC3	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	gatA	LIC_11461	NO_SP	Cyt
Q72SG7	Trigger factor	tig	LIC_11416	NO_SP	Cyt
Q72SH4	Uncharacterized protein	-	LIC_11408	NO_SP	Cyt
Q72SI2	N-acetylneuraminate synthase	-	LIC_11400	NO_SP	Cyt
Q72SM0	MaoC	maoC	LIC_11359	NO_SP	Cyt
Q72SM5	S-adenosylmethionine synthase	metK	LIC_11354	NO_SP	Cyt
Q72SM7	LipL32	lipL32	LIC_11352	LIPO_SEC	Unkn
Q72SV2	Uncharacterized protein	-	LIC_11270	LIPO_SEC	Unkn
Q72SV5	Periplasmic sulfate-binding protein	sbp	LIC_11267	SP_SEC	Perip
Q72T14	Putative lipoprotein	-	LIC_11207	LIPO_SEC	Unkn
Q72T23	Adenylate/guanylate cyclase	-	LIC_11198	NO_SP	Cyt
Q72T27	Putative citrate lyase	-	LIC_11194	NO_SP	Cyt
Q72TG8	Uncharacterized protein	-	LIC_11053	NO_SP	Cyt
Q72TH5	SH3b domain-containing protein	-	LIC_11046	NO_SP	Cyt
Q72TL5	LipL71	lipL71	LIC_11003	LIPO_SEC	OutM
Q72TQ9	Alcohol dehydrogenase	-	LIC_10958	NO_SP	Cyt
Q72TT9	Putative lipoprotein	-	LIC_10927	NO_SP	Extrac
Q72U22	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	dapA	LIC_10842	NO_SP	Cyt
Q72U74	Flagellar filament sheath protein	flaA-1	LIC_10788	NO_SP	Cyt
Q72U92	Processing metalloprotease	-	LIC_10769	NO_SP	Cyt
Q72UD9	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein	-	LIC_10718	NO_SP	Cyt
Q72UE4	Putative lipoprotein	-	LIC_10713	LIPO_SEC	OutM
Q72UH8	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	purC	LIC_10679	NO_SP	Cyt
Q72UM3	Cysteine desulfurase	-	LIC_10634	NO_SP	Cyt
Q72UQ0	Aminotransferase	-	LIC_10607	NO_SP	Cyt
Q72VA5	Acetyl-CoA acetyltransferase	phbA	LIC_10396	NO_SP	Cyt
Q72VC9	Putative lipoprotein	-	LIC_10371	LIPO_SEC	Unkn
Q72VD3	Putative lipoprotein	-	LIC_10365	LIPO_SEC	Unkn
Q72VD8	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	etfA	LIC_10360	NO_SP	Unkn
Q72VM5	Elongation factor G	fusA	LIC_10272	NO_SP	Cyt
Q72VP3	Alcohol dehydrogenase	-	LIC_10253	NO_SP	Cyt
Q72VS1	RNA polymerase ECF-type sigma factor	-	LIC_10225	NO_SP	Cyt
Q72VY3	Fumarate hydratase class II	fumC	LIC_10162	NO_SP	Cyt
Q72W14	Lactamase_B domain-containing protein	-	LIC_10127	NO_SP	Cyt
Q72W91	Proton-translocating transhydrogenase, subunit alpha part 1	pntA	LIC_10046	NO_SP	CytMem
Q72W92	UDP-glucuronate decarboxylase	-	LIC_10045	NO_SP	Cyt

Q72WD5	Beta sliding clamp	dnaN	LIC_10002	NO_SP	Cyt
Q72WD6	Chromosomal replication initiator protein DnaA	dnaA	LIC_10001	NO_SP	Cyt
Q75FC8	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	asd	LIC_20266	NO_SP	Cyt
Q75FE5	Aconitate hydratase A	acnA	LIC_20249	NO_SP	Cyt
Q75FI5	Cysteine desulfurase	csdB	LIC_20204	NO_SP	Cyt
Q75FT1	HDOD domain-containing protein	-	LIC_20100	NO_SP	Cyt
Q75FU8	Adenosylhomocysteinase	ahcY	LIC_20083	NO_SP	Cyt
Q75FY7	HtpG	htpG	LIC_20044	NO_SP	Cyt
Q75G05	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	hemB	LIC_20010	NO_SP	Cyt
Q72RU5	LipL45	-	LIC_11643	LIPO_SEC	Cyt
Q72M65	Nucleoside diphosphate kinase	ndk	LIC_13326	NO_SP	Extrac
Q72ML0	Methyl-accepting chemotaxis-like	-	LIC_13183	NO_SP	Cyt
Q72N72	Putative lipoprotein	-	LIC_12965	NO_SP	Unkn
Q72N82	Nitrogen regulatory IIA protein	ptsN	LIC_12955	NO_SP	Cyt
Q72NI7	30S ribosomal protein S4	rpsD	LIC_12847	NO_SP	Cyt
Q72RX1	Transcriptional regulator (ArsR family)	-	LIC_11617	NO_SP	Unkn
Q72S27	50S ribosomal protein L19	rplS	LIC_11559	NO_SP	Cyt
Q72SG0	Glycine rich RNA-binding protein	-	LIC_11423	NO_SP	Unkn
Q72SH2	Acetolactate synthase	ilvH	LIC_11410	NO_SP	Cyt
Q72SY4	ATP synthase subunit c	atpE	LIC_11238	NO_SP	Unkn
Q72UA0	50S ribosomal protein L13	rplM	LIC_10761	NO_SP	Cyt
Q72V90	Uncharacterized protein	-	LIC_10411	SP_SEC	Unkn
Q72VR1	Uncharacterized protein	-	LIC_10235	NO_SP	Unkn
Q72VV5	Peptidoglycan associated cytoplasmic membrane protein	-	LIC_10191	LIPO_SEC	Unkn
Q72W53	Uncharacterized protein	-	LIC_10087	NO_SP	Unkn
Q72WC6	LipL21	lipL21	LIC_10011	LIPO_SEC	Perip