XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp

# Investigação funcional do gene acetilornitina desacetilase na resistência à paromomicina em *Leishmania amazonensis*

**Guilherme Maion Biral [1], Adriano Cappellazzo Coelho [1]**
[1] Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

## Introdução

A leishmaniose é uma doença negligenciada com alta incidência no Brasil e que possui um número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento, além de possuírem vários efeitos colaterais (Uliana, Trinconi et al. 2018). A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico utilizado no tratamento de bactérias e protozoários intestinais e que demonstrou sucesso no tratamento da leishmaniose visceral no Sudeste Asiático (Davidson, den Boer et al. 2009) (Jha, Olliaro et al. 1998, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015). No Brasil, a paromomicina ainda não é aprovada para uso no tratamento desta parasitose, embora o fármaco apresente atividade *in vitro* contra espécies endêmicas no Brasil (Coser, Ferreira et al. 2020, Coser, Ferreira et al. 2021). Neste projeto de pesquisa, propõe-se investigar o papel da enzima **acetilornitina desacetilase (AOD)** na resistência à paromomicina em *Leishmania amazonensis*, espécie endêmica no Brasil e responsável pela leishmaniose cutânea. Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa, identificaram mutações no gene *AOD* em linhagens resistentes à paromomina de *L. amazonensis*. Este projeto propõe a validação funcional do gene *AOD* por meio da geração de linhagens transgênicas de *L. amazonensis* via superexpressão e deleção gênica por CRISPR-Cas9, seguido de ensaios de suscetibilidade *in vitro* à paromomicina.

## Metodologia

### Cultivo de promastigotas de L. amazonensis

Promastigotas da cepa M2269 de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), assim como da linhagem transgênica expressora da enzima Cas9 foram cultivados em meio 199 (Sigma-Aldrich) complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1mM, hemina 0,005%, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril, e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina mantidos em estufa a 25°C (Kapler, Coburn, and Beverley 1990).

### Extração de DNA genômico da linhagem M2269

Cerca de $1\times10^8$ promastigotas foram lavados com PBS estéril após centrifugação (3000 rpm por 10 min). A seguir, 1 mL de DNAzol foi adicionado, seguido de 1 mL de etanol 99%, com homogeneização por inversão, para lise celular e precipitação do DNA genômico. Este foi recuperado com uma alça de plástico, lavado duas vezes com etanol 70% e transferido para um microtubo para secagem. Finalmente, o DNA foi solubilizado com água Milli-Q, quantificado por absorbância e armazenado a 4°C.

### Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar a fase de leitura aberta do gene *AOD* para posterior clonagem em vetor de expressão, e dos cassetes de reparo e os sgRNAs utilizados para o nocaute gênico do gene *AOD*, utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9 (Beneke et al. 2017). Para a amplificação do gene *AOD*, utilizou-se como molde o DNA genômico extraído previamente. Os primers foram desenhados utilizando o software Primer3 (Untergasser et al. 2012) com adição dos sítios de restrição *PvuII* e *SbfI*, na porção 5' dos primers sense e anti-sense respectivamente. A amplificação dos cassetes de reparo para nocaute gênico foi feita a partir dos plasmídeos

pTPURO e pTBLAST, com primers obtidos através da plataforma LeishGEdit (Beneke et al. 2017). Já os sgRNA foram amplificados utilizando o primer G00 como molde, além dos iniciadores obtidos via LeishGEdit (http://www.leishgedit.net/Home.html). Para as reações de PCR foi utilizada a enzima Phusion High-Fidelity (New England Biolabs) conforme a descrição do fabricante. Os produtos das amplificações foram analisados em uma eletroforese em gel de agarose 1%.

**Clonagem do gene *AOD* em vetor de expressão**

Para a clonagem, foi utilizado o plasmídeo pSPZEO, que se replica em *Escherichia coli* e *Leishmania* sp., contendo os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e zeomicina (Coelho et al. 2007). O gene amplificado e o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *PvuII* e *SbfI*, purificados e ligados na proporção 3:1 com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). A ligação foi incubada a 14°C por 16h, seguido da precipitação do DNA e ressuspensão em água Milli-Q. A transformação em *E. coli* foi feita por choque térmico, seguida de recuperação em LB e plaqueamento em meio LB sólido contendo ampicilina. A extração do plasmídeo recombinante foi realizada com o kit PureLink Quick Miniprep (Thermo Fisher Scientific).

**Nocaute do gene *AOD* em *L. amazonensis***

Os cassetes para transcrição dos sgRNAs in vivo e os cassetes de reparo foram transfectados em uma linhagem transgênica de *L. amazonensis* expressando as enzimas Cas9 e T7 RNA polimerase. Para cada transfecção, utilizou-se aproximadamente $1{,}2\times10^{7}$ promastigotas em fase logarítmica, os quais foram lavados com tampão Tb-BSF, e ressuspensos em 150 µL deste tampão contendo o DNA precipitado. Essa solução foi transferida para a cubeta de transfecção Gene Pulser com intervalo de 0,2 cm (Nucleofector II) e a eletroporação foi realizada no aparelho Nucleofector II (Amaxa) com um pulso (Beneke et al. 2017). Alternativamente, foi utilizado o protocolo high-voltage (25 µF e 1.500 V) (3.75 kV/cm) (Robinson and Beverley 2003) para as transfecções, utilizando o tampão Tb-BSF. O controle negativo foi preparado com uma suspensão de parasitos em Tb-BSF em ausência de DNA. Os parasitos eletroporados foram transferidos para uma garrafa de cultura contendo 5 mL de M199 e mantidos em estufa a 25°C. Depois de 24 horas, foram adicionados os antibióticos para seleção dos parasitos resistentes, contendo os genes de resistência à zeomicina (ZEO) e blasticidina (BLAST) (10 µg/mL de zeocina e blasticidina). Após 72 horas, os parasitos foram subcultivados e a seleção dos parasitos viáveis estava em andamento até a submissão do resumo.

## Resultados e Discussão

**Digestão e purificação do vetor pSPZEO**

O plasmídeo de expressão pSPZEO foi digerido com as enzimas *Pvu*II e *Sbf*I e o produto de ~4,5 kb foi purificado a partir do gel de agarose (**Figura 1a**).

**Amplificação do gene *AOD* e purificação do inserto**

A amplificação do gene *AOD* foi confirmada por PCR a partir de DNA genômico da cepa M2269 de *L. amazonensis* (**Figura 1b**). O gene foi amplificado com a enzima Phusion HF DNA polimerase. O produto de PCR foi purificado e quantificado.

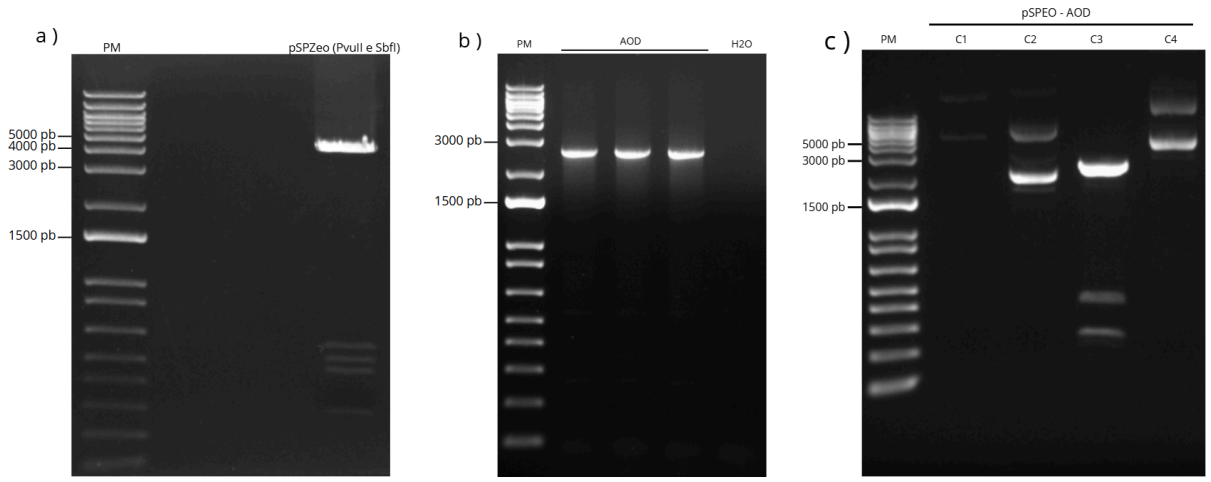


**Figura 1: a)** Digestão do vetor pSPZEO com as enzimas *Pvu*II e *Sbf*I para purificação do vetor linear a ser usado em processo de ligação com o inserto contendo o gene *AOD*. **b)** Confirmação da amplificação do gene alvo (AOD) para posterior purificação e fabricação do inserto através da amplificação usando a enzima Phusion HF. **c)** Digestão dos clones provenientes da ligação do gene *AOD* no vetor pSPZEO. Os clones obtidos foram digeridos com as enzimas *Pvu*II e *Sbf*I respectivamente.

## Ligação do gene *AOD* no vetor pSPZEO

A ligação do gene *AOD* no vetor pSPZEO foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase. Os resultados indicaram que nenhum dos clones analisados continha o inserto contendo o respectivo gene (Figura 1c). Devido a essas dificuldades, decidiu-se estabelecer um método alternativo de ligação independente da enzima T4 DNA ligase (**Ligase Independent Cloning [LIC]**) (Tosarini TR et al. 2018).

## Ensaios de suscetibilidade à paromomicina e aos antibióticos puromicina e blasticidina

Foram realizados ensaios com paromomicina, além dos antibióticos puromicina e blasticidina com a finalidade de padronizar os ensaios de suscetibilidade à paromomicina e para a seleção das linhagens nocaute que possuem os genes de resistência à puromicina e à blasticidina. Para realizar os testes foi utilizado o método de MTT em placas de 96 poços. Foram utilizados a cepa M2269 de *L. amazonensis* e a linhagem transgênica dessa cepa expressora da enzima Cas9. Tanto a cepa M2269 quanto a linhagem transgênica apresentaram suscetibilidade similar, ou seja, seriam adequadas para a seleção com os respectivos antibióticos **(Figura 2)**.

A $EC_{50}$ para paromomicina foi definida em 123,2 µM (M2269 WT) e 54,34 µM (M2269 Cas9) (**Figura 2a**). Para puromicina e blasticidina, os valores de $EC_{50}$ foram próximos, sendo 0,89 µM (M2269 WT) e 1,16 µM (M2269 Cas9) para os testes realizados com puromicina e 0,61 µM (M2269 WT) e 0,58 µM (M2269 Cas9) para os testes com blasticidina **(Figura 2b).**

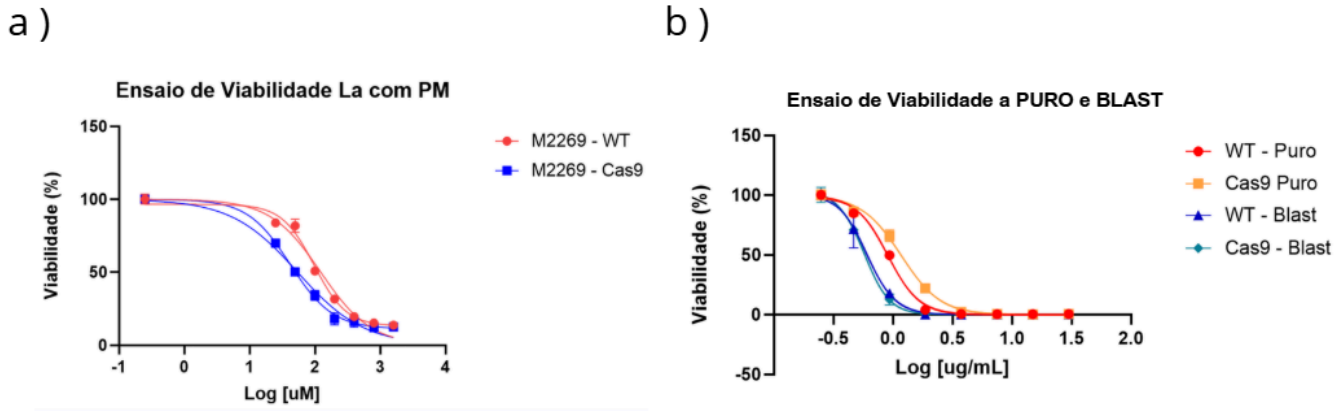

**Figura 2: a)** Curva de suscetibilidade à paromomicina (PM) de promastigotas da cepa M2269 e linhagem Cas9. **d)** Curva de susceptibilidade das promastigotas das linhagens M2269 WT e Cas9 à Puromicina (PURO) e Blasticidina (BLAST).

**Geração de uma linhagem nocaute para o gene *AOD* de *L. amazonensis***

Foram realizados experimentos para o nocaute do gene *AOD* na cepa expressora da Cas9 através de duas metodologias transfecção, utilizando os eletroporadores da Lonza (Nucleofector II) e da BioRad (GenePulser Xcell). Como controle, foram gerados os cassetes de reparo e para a transcrição *in vivo* dos sgRNA dirigidos ao *locus* da subunidade menor ribossomal (SSU) (Fig. 3). O uso de distintas quantidades de DNA (50–100 µg) aumentou a eficiência das transfecções no nucleofector, visto que, ao aumentar a concentração de DNA nas reações, houve insucesso na obtenção de parasitos viáveis. As culturas transfectadas foram submetidas à seleção com os antibióticos (puromocina e blasticidina) ambos a 10 µg/mL, e os clones resistentes foram isolados em meio sólido de M199 contendo ágar 1%.

As transfecções utilizando o método de CRISPR-Cas9 foram bem-sucedidas com menor concentração de DNA, e a recuperação de clones em meio sólido confirmou a viabilidade dos protocolos empregados. A padronização desses métodos permitirá a futura obtenção de linhagens nocaute para o gene *AOD*.

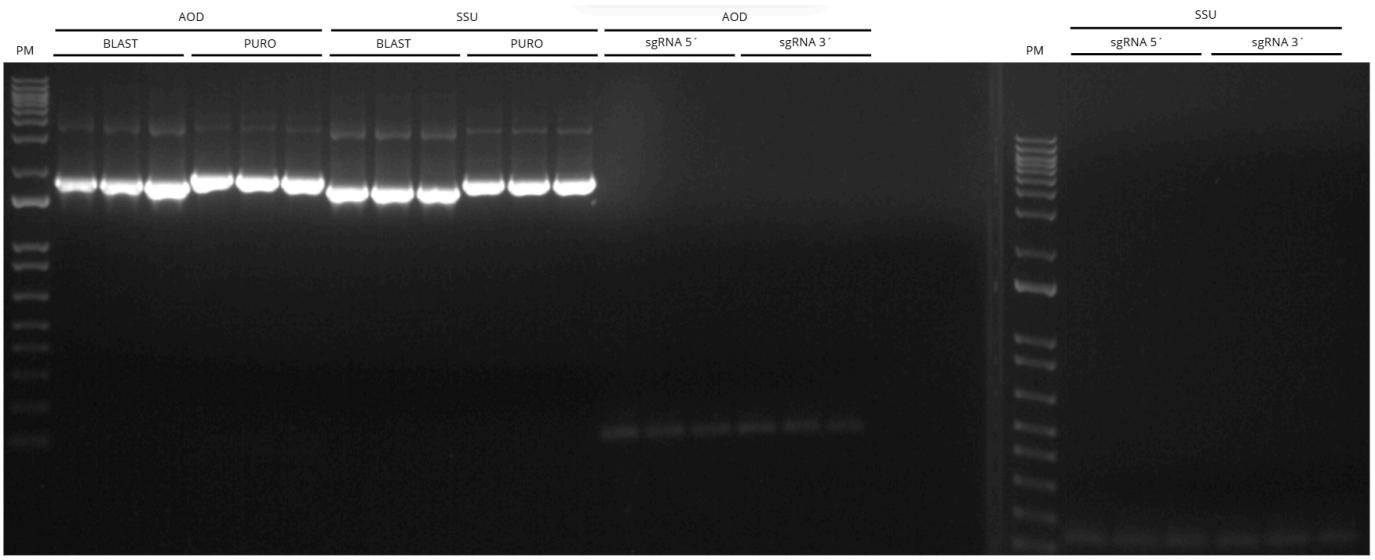


**Figura 3:** Amplificação dos cassetes de reparo e para a transcrição *in vivo* dos sgRNAs para o gene *AOD* e o *locus* SSU para transfecção e produção das linhagens nocaute.

## Conclusões

Apesar das dificuldades técnicas nas etapas de clonagem tradicional, o projeto caminhou significativamente no processo de geração das linhagens nocaute e na clonagem do gene *AOD* pelo método LIC. A padronização de ensaios de suscetibilidade à PM e os protocolos de nocaute gênico por CRISPR-Cas9 estabelece uma base sólida para as próximas etapas. O desenvolvimento de linhagens mutantes será essencial para a validação funcional do gene *AOD* e para elucidar mecanismos de resistência.

## Referências

- Coser, E. M., B. A. Ferreira, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2021). "Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of Leishmania species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil." Acta Trop 215: 105806.

- Uliana, S. R. B., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." Parasitology 145(4): 464-480.

- Jha, T. K., P. Olliaro, C. P. Thakur, T. P. Kanyok, B. L. Singhania, I. J. Singh, N. K. Singh, S. Akhoury and S. Jha (1998). "Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India." Bmj 316(7139): 1200-1205.

- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha and S. K. Bhattacharya (2007). "Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India." N Engl J Med 356(25): 2571-2581.

- Jamil, K. M., R. Haque, R. Rahman, M. A. Faiz, A. T. Bhuiyan, A. Kumar, S. M. Hassan, H. Kelly, P. Dhalaria, S. Kochhar, P. Desjeux, M. A. Bhuiyan, M. M. Khan and R. S. Ghosh (2015). "Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis 9(10): e0004118.

- Davidson, R. N., M. den Boer and K. Ritmeijer (2009). "Paromomycin." Trans R Soc Trop Med Hyg 103(7): 653-660.

- Kapler, G. M., C. M. Coburn and S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol 10(3): 1084-1094.

- Beneke, T., R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter and E. Gluenz (2017). "A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids." R Soc Open Sci 4(5): 170095.

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012 Aug;40(15):e115. doi: 10.1093/nar/gks596. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.

- Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette, and P. C. Cotrim. 2007. 'Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes', Antimicrob Agents Chemother, 51: 3030-2.

- Tosarini TR, Ramos PZ, Profeta GS, Baroni RM, Massirer KB, Couñago RM, Mondego JMC. Cloning, expression and purification of kinase domains of cacao PR-1 receptor-like kinases. Protein Expr Purif. 2018 Jun;146:78-84. doi: 10.1016/j.pep.2018.01.004. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29360581.