PRICILA HAUK TEODORO

CARACTERIZAÇÕES BIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS LipL32 E HIyX DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SOROVAR COPENHAGENI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo 2009

CARACTERIZAÇÕES BIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS LipL32 E HIyX DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SOROVAR COPENHAGENI

PRICILA HAUK TEODORO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo 2009 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Teodoro, Pricila Hauk.

Caracterizações biológicas das proteínas LipL32 e HlyX de Leptospira interrogans sorovar Copenhageni / Priscila Hauk Teodoro. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Paulo Lee Ho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genoma funcional de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Versão do título para o inglês: Biology characterization of LipL32 and HlyX proteins of *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Descritores: 1. Microbiologia médica 2. Bactérias espiroquetas 3. Leptospira 4. Leptospirose 5. Proteínas recombinantes 6. Proteínas de matriz extracelular I. Ho, Paulo Lee II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pos-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB27/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):

Pricila Hauk Teodoro.

Título da Tese:

Caracterizações biológicas das proteínas LipL32 e HlyX de Leptospira interrogans sorovar Copenhageni.

Orientador(a):

Paulo Lee Ho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

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

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 256/06, sobre o projeto intitulado "Desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose", sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 14/03/2006.

São Paulo, 17 de março de 2006.

Dra. Denise V. Tambourgi Presidente da CEUAIB

De acordo:

zevedo Mercadante Dr. Otávio 7 Diretor do Instituto Butantan

Aos meus avós paternos Helmuth "*in memorium*" e Otília Hauk pelo amor, apoio e principalmente por SEMPRE apostarem em mim, incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto de pesquisa.

Ao Dr. Shaker Chuck Farah por me ajudar com os estudos estruturais de LipL32. Obrigada pelo tempo dispensado à mim e ao meu projeto de pesquisa.

Ao meu amor Mairan Macedo Teodoro, que tanto admiro, por entender minhas questões, dividir meus anseios, aturar meu imediatismo e por ser tão especial para mim!

Aos meus pais, Vitor e Leatrice Hauk pelo apoio constante durante esta dura caminhada e por entenderem a minha ausência.

Aos meus irmãos, avós e demais familiares por acreditarem no meu potencial.

Às pesquisadoras do Instituto Butantan, Dra. Angela Silva Barbosa e Dra. Patricía Antonia Estima Abreu pelas discussões, pelas dicas, pelos experimentos que me ajudaram a realizar e por serem tão generosas. Quero que saibam que são especiais para mim.

À Dr. Maria Leonor Sarno de Oliveira por me apoiar em momentos difíceis no Laboratório de Biotecnologia Molecular I e me ajudar a realizar e interpretar experimentos realizados com animais.

Ao Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo por me ajudar na clonagem do gene *hlyX* de *L*. *interrogans* sorovar Copenhageni.

Aos meus amigos, colegas e técnicos do laboratório de Biotecnologia Molecular I e dos demais laboratórios do Instituto Butantan, meu muitíssimo obrigada pela convivência, por me ensinar, discutir protocolos e pelo empréstimo de reagentes e equipamentos.

A todos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP que participaram e ajudaram nos ensaios de imunização e desafio em modelo de estudo animal

A todos os meus professores desde o ensino fundamental até a pós-graduação que levaram a missão de ensinar à sério. Nunca esquecerei dos professores que contribuiram e dos que ainda contribuirão para a minha formação.

À Cristiane Rodrigues Guzzo, por me ensinar e ajudar na resolução da estrutura de LipL32. Obrigada pela amizade e pelo zêlo!

À Sílvia Bazan por ser uma das únicas pessoas que consegue entender como me sinto, provavelmente por nos identificarmos muito, pela lealdade e verdadeira amizade.

À todos os funcionários do Instituto Butantan que foram gentis, prestativos e generosos comigo, pois acho que aprendemos muito uns com os outros, e isto é muito construtivo.

Aos meus colegas do laboratório do prof. Dr. Shaker Chuck Farah, do Instituto de Química da USP por terem me recebido com tanto carinho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e seus funcionários pelo serviço prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Á Fundação Butantan, pela infra-estrutura permitindo o desenvolvimento do projeto.

"No meio do caminho tinha uma pedra tinha uma pedra no meio do caminho tinha uma pedra no meio do caminho tinha uma pedra"

> (....) Carlos Drummond de Andrade (em "No meio do Caminho")

RESUMO

Hauk P. Caracterizações biológicas das proteínas LipL32 e HlyX de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Leptospirose é uma zoonose causada pela espiroqueta pertencente ao gênero Leptospira. LipL32 é um antígeno de superfície altamente conservado somente entre as espécies de leptospiras patogênicas e é expresso em altos níveis tanto in vitro com in vivo. HlyX é relatada como sendo uma proteína que possui um provável peptídeo sinal e cinco tetratricopeptídeos repetidos (TPR) em sua sequência de aminoácidos. Neste trabalho, mostrou-se que HlyX é expressa somente em cepas patogênicas, não sendo detectada a sua expressão na cepa saprofítica. HlyX foi reconhecida somente por soros de pacientes da fase convalescente da doença. Em constraste, LipL32 foi reconhecida por soros de pacientes colhidos tanto na fase aguda quanto na fase convalescente da infecção. Nossos resultados de immunoblot indicam que os domínios imunodominantes da proteína são os fragmentos C-terminal e intermediário. Uma resposta IgM foi detectada exclusivamente contra o fragmento C-terminal de LipL32 em ambas as fases da infecção. Com relação à capacidade de LipL32 e HlyX de interagir com componentes de matriz extracelular (CME), foi observada uma interação específica e dose-dependente de LipL32 e HlyX com colágeno tipo IV e fibronectina plasmática. O fragmento C-terminal de LipL32 é responsável por esta interação. Tanto a heparina quanto a gelatina foram capazes de inibir a ligação de LipL32 à fibronectina plasmática de forma dose-dependente, indicando que os domínios de ligação à heparina (30 kDa) e gelatina (45 kDa) da fibronectina estão envolvidos nesta interação. Por outro lado, apenas o domínio de ligação à heparina participa da interação da fibronectina com a proteína HlyX. A capacidade protetora das duas proteínas estudadas foi avaliada através de ensaios de imunização e desafio realizados em modelo animal (hamsters). A proteína HlyX induziu altos títulos de anticorpos IgG (1:128.000), mas somente a co-administração HlyX e LipL32 e a proteína LipL32 pura conferiram proteção, 100% e 80% respectivamente. HlyX não foi capaz de conferir proteção quando administrada apenas com o adjuvante Al(OH)₃. Em conclusão, os resultados indicam que o domínio C-terminal de LipL32 é reconhecido desde o início da infecção e este domínio é responsável por mediar a interação de LipL32 com CME. Os dados obtidos com HlyX demonstram um possível papel desta proteína na patogênese, pelo fato de ser expressa e conservada em cepas patogênicas, e também por interagir com CME. Porém, apesar de HlyX apresentar altos títulos de anticorpos IgG, não conferiu atividade protetora quando administrada individualmente.

Palavras-chave: Leptospirose. *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Antígenos. LipL32. HlyX. Adesinas. Componentes de matriz extracelular.

ABSTRACT

Hauk P. Biology characterization of LipL32 and HlyX proteins of *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni [Ph.D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Leptospirosis, a spirochaetal zoonotic disease caused by Leptospira, has been recognized as an important emerging infectious disease. LipL32 is a surface lipoprotein which is highly conserved among pathogenic Leptospira species and is also expressed at high levels either during cultivation and natural infection. Regarding HlyX, it has been annotated as a protein containing a signal peptide and five tetratricopeptide repeats (TPR). Immunoblot analyses concerning HlyX distribution on Leptospira spp. indicate that this protein is expressed exclusively by pathogenic species. Moreover, HlyX was only recognized by sera of patients in the second week of leptospirosis infection. In contrast, LipL32 was recognized by acute and convalescent sera from leptospirosis patients. Our immunoblot results indicate that both the C-terminal and the intermediate domains of LipL32 are recognized by sera of patients. An IgM response was detected exclusively against the LipL32 C-terminus in both the acute and convalescent phases of illness. Concerning the capacity of LipL32 and HlyX to interact with extracellular matrix (ECM) components, a dose-dependent specific binding of LipL32 and HlyX to collagen IV and plasma fibronectin was observed. The LipL32 binding capacity could be attributed to the C-terminal portion of this molecule. Both heparin and gelatin could inhibit LipL32 binding to fibronectin in a concentration-dependent manner, indicating that the 30-kDa heparin- and the 45-kDa gelatin-binding domains of fibronectin are involved in this interaction. However, HlyX binding to fibronectin could only be inhibited by heparin in a concentration-dependent manner. We also evaluated whether HlyX and LipL32 could induce protective immunity against the challenge with a homologous serovar in hamsters. Although high anti-HlyX (IgG) titers (1:128,000) have been achieved upon immunization, no protection was observed. However, a combined HlyX and LipL32 immunization could induce a protective response (100%). The protection observed for LipL32 immunization was 80%. Altogether, the results provide evidence that the LipL32 C-terminus is recognized early in the course of infection and is the domain responsible for mediating interaction with ECM proteins. HlyX protein may contribute to the pathogenesis of the disease by interacting with host proteins. However, HlyX is not a protective antigen when administered alone.

Keywords: Leptospirosis. *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Proteins. LipL32. HlyX. Adhesins. Extracellular matrix components.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxonomia das espiroquetas 19
Figura 2 – Comparação entre a arquitetura das membranas de bactérias Gram-negativas e de espiroquetas
Figura 3 – Esquema ilustrando a membrana externa, cilindro celular protoplasmático e o flagelo periplasmático das espiroquetas
Figura 4 – Leptospiras analisadas por microscopia eletrônica
Figura 5 – Modelo da exportação de lipoproteínas em espiroqueta
Figura 6 – Sequência de aminoácidos da LipL32
Figura 7 – Sequência de aminoácidos de HlyX
Figura 8 – Representação esquemática dos vetores de expressão em <i>E. coli</i>
Figura 9 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos de HlyX 44
Figura 10 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos de LipL32
Figura 11 – Amplificação dos genes <i>hly</i> X e <i>lip</i> L32
Figura 12 – Purificação de LipL32 6xHis
Figura 13 – Purificação do fragmento intermediário de LipL32
Figura 14 – Purificação do fragmento C-terminal de LipL32 64
Figura 15 – Purificação de HlyX renaturada
Figura 16 – Purificação do fragmento N-terminal de LipL32
Figura 17 – Purificação de LipL32, através de cromatografia catiônica (<i>SP-sepharose</i>) e cromatografia hidrofóbica (<i>Phenyl sepharose</i>)
Figura 18 – Purificação de LipL32 Se-M, através de cromatografia catiônica (SP-sepharose)
Figura 19 – Purificação de LipL32 através de cromatografia hidrofóbica (<i>Phenyl sepharose</i>)
Figura 20 – Confirmação da identidade das proteínas purificadas
Figura 21 – Especificidade dos anticorpos gerados contra os fragmentos de LipL32

Figura 22 – Pesquisa de anticorpos IgM e IgG gerados contra as proteínas HlyX e LipL32 utilizando soros de pacientes com leptospirose
Figura 23 – Fragmentos de LipL32 recombinante e a reatividade com soro de camundongos e com soro de pacientes com leptospirose
Figura 24 – Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes HlyX, LipL32 6xHis e LipL32
Figura 25 – Ligação de LipL32 6xHis e HlyX recombinantes a componentes de matriz extracelular e proteínas plasmáticas
Figura 26 – Ligação de LipL32 6xHis e de seus fragmentos C-terminal e intermediário em fibronectina plasmática (molécula inteira e seus fragmentos proteolíticos, F30 e F45) e ao colágeno tipo IV em função da concentração de proteínas
Figura 27 – Ligação de HlyX à fibronectina plasmática (molécula inteira e seu fragmento proteolítico, F30, mas não ao F45) e ao colágeno tipo IV em função da concentração
Figura 28 – Inibição da ligação de LipL32 aos fragmentos proteolíticos F30 e F45 e ao colágeno tipo IV pelo fragmento C-terminal de LipL32
Figura 29 – Inibição da ligação de LipL32 aos fragmentos proteolíticos de fibronectina plasmática F30 e F45 por heparina e gelatina, respectivamente
Figura 30 – Inibição da ligação de HlyX ao domínio de ligação da fibronectina plasmática a heparina.
Figura 31 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra a proteína HlyX, obtidos em um único experimento realizado
Figura 32 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra a proteína LipL32, obtidos em um único experimento realizado
Figura 33 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra o fragmento C-terminal de LigA, obtidos em um único experimento realizado
Figura 34 – Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de animais vacinados: salina, bacterina, C-terminal LigA, HlyX, LipL32 e HlyX co-adminstrada com LipL32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes hlyX, lipL32 6xHis, lipL32 eseus fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal.43
Tabela 2 – Massas moleculares e pontos isoelétricos (pIs) das proteínas recombinates
Tabela 3 – Títulos de MAT, início dos sintomas, sorovar infectante, e detecção de anticorpos nasamostras de soros de 12 pacientes com leptospirose
Tabela 4 – K_{ds} relativas à ligação de LipL32, do fragmento C-terminal de LipL32 e de HlyX à fibronectina plasmática e ao colágeno tipo IV
Tabela 5 – Avaliação do desafio animal quanto ao número de animais sobreviventes e a presença deleptospiras no fígado dos animais vacinados (portadores)

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- Amp ampicilina
- AP-1 Ativador de proteína-1 (fator de transcrição)
- BSA albumina bovina sérica

Clo/Cm^R – cloranfenicol/resistência a cloranfenicol

- CME Componentes de matriz extracelular
- DNA ácido desoxirribonucléico
- dNTPs deoxinucleotídeos trifosfato

DO - densidade óptica

- ECM Extracellular matrix components
- EDTA ácido etileno diamino tetracético

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

EMJH - Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

ExPASy – Expert Protein Analysis

F30 – fragmento proteolítico de fibronectina plasmática purificado que possui 30 kDa - domínio de ligação a heparina

F45 - fragmento proteolítico de fibronectina plasmática purificado que possui 45 kDa – domínio de ligação a gelatina

- iNOS Óxido nítrico sintetase induzível
- IPTG isopropiltiogalactosídeo
- $kDa 10^3 Dalton$
- kd constante de dissociação
- LPS lipopolissacarídeo
- MAT título de aglutinação microscópica

MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Informação em Biotecnologia)

- NF-кВ fator-кВ nuclear
- pb pares de base
- PBS Phosphate buffer saline (tampão fosfato-salina)
- PBS-T tampão fosfato contendo tween 20
- PCR Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
- pI ponto isoelétrico
- PMSF Phenylmethylsulfonyl fluoride
- OPD o-diidrocloreto fenilenodiamina
- RANTES Regulation on activation, normal T cell expressed and secreted
- RNA ácido ribonucléico
- SDS dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
- SMART Simple Modular Architecture Research Tool
- TAE tampão tris-acetato e EDTA
- TLR-2 Toll Like Receptor Type 2
- TNF- α fator de necrose tumoral α

1 INTRODUÇÃO	. 18
1.1 Espiroquetas	. 18
1.2 Gênero Leptospira	. 21
1.3 Leptospirose	. 23
1.3.1 Diagnóstico laboratorial	. 25
1.3.2 Desenvolvimento de vacinas	. 26
1.4 Genomas de Leptospira spp.	. 27
1.5 Lipoproteínas	. 29
1.6 Adesinas	. 31
1.7 As proteínas LipL32 e HlyX de <i>Leptospira</i>	. 32
1.7.1 <i>LipL32</i>	. 32
1.7.2 <i>HlyX</i>	. 34
2 OBJETIVO	. 36
2.1 Objetivos específicos	. 36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	. 37
3.1 Lista de soluções e meios de cultura	. 37
3.1.1 Soluções utilizadas	. 37
3.1.2 Meios de cultura utilizados	. 38
3.2 Vetores utilizados	. 39
3.3 Linhagens bacterianas	. 41
3.4 Soros de pacientes com leptospirose	. 41
3.5 Amplificação dos genes <i>hlyX</i> , <i>lipL32</i> e dos fragmentos, N-termir intermediário e C-terminal de LipL32	1al, . 42
3.6 Subclonagem dos produtos da PCR	. 46
3.6.1 Reação de adenilação	. 46
3.6.2 Reação de ligação	. 46
3.7 Transformação de bactérias competentes	. 47
3.8 Análise dos clones positivos através de extração com fenol-clorofórmio	. 47

SUMÁRIO

3.8.1 Purificação dos plasmídeos	47
3.9 Clonagem no vetor de expressão	48
3.10 Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	49
3.10.1 Expressão de LipL32 6xHis, LipL32 e do fragmento C-terminal de LipL32 E. coli BL21 (SI)	e m 49
3.10.2 Expressão de LipL32 com selênio-metionina (Se-M) em meio mínimo	(M9
ON)	50
3.10.3 Expressão de HlyX e dos fragmentos N-terminal e intermediário de LipL32 E.coli BL21(DE3) Star [plysS]	em 50
3.11 Purificação das proteínas recombinantes	51
3.11.1 Purificação da proteína HlyX após renaturação protéica	51
3.11.2 Purificação dos fragmentos de LipL32 e de LipL32 6xHis, através cromatografia de afinidade a metais bivalentes	de 52
Purificação do fragmento N-terminal de LipL32 em condições desnaturantes	52
Purificação dos fragmentos intermediário e C-terminal da proteína LipL3	62 e
LipL32 6xHis	52
3.11.3 Purificação de LipL32 e LipL32 Se-M	53
Cromatografia de troca iônica	53
Cromatografia hidrofóbica	54
3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (S PAGE)	DS- 54
3.13 Dicroísmo Circular	55
3.14 Ensaios de Western blot	55
3.14.1 Produção de anticorpos gerados contra as proteínas purificadas	55
3.14.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	56
3.14.3 Western blot	56
3.15 Ensaio de ligação das proteínas LipL32 6xHis e HlyX a componentes matriz extracelular	de 57
3.16 Ensaios de imunização e desafio animal	58
3.16.1 Ensaios de imunização ativa com as proteínas LipL32 e/ou HlyX e des homólogo em hamster	afio 58
3.16.2 Determinação dos títulos de anticorpos IgG gerados contra LipL32 e HlyX.	59
4 RESULTADOS	60

4.1 Amplificação dos genes <i>hlyX</i> , <i>lipL32</i> e dos fragmentos correspondentes ao N- terminal, intermediário e C-terminal de LipL32
4.2 Expressão das proteínas recombinantes
4.3. Purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade a metais bivalentes ou cromatografia de troca iônica e hidrofóbica 62
4.3.1 Purificação das proteínas expressas na forma solúvel, LipL32 6xHis e os
fragmento intermediário e C-terminal de LipL3262
4.3.2 Purificação das proteínas expressas em corpúsculos de inclusão, HlyX e o
fragmento N-terminal de LipL3264
4.3.3 Purificação de LipL32 e LipL32 Se-M através de cromatografia de troca
iônica e hidrofóbica
4.4 Análises de Western blot
4.4.1 Análise da conservação da expressão de LipL32 e HlyX em Leptospira sp. e caracterização dos fragmentos derivados de LipL32
4.4.2 Detecção de anticorpos IgM e IgG dirigidos contra LipL32 e HlyX em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose
Mapeamento do fragmento imunodominante de LipL3271
4.5 Análise da estrutura secundária de HlyX, LipL32 6xHis e LipL3274
4.6 As proteínas LipL32 e HlyX interagem com proteínas do hospedeiro
4.6.1 As proteínas LipL32 e HlyX interagem com colágeno tipo IV e fibronectina plasmática
4.6.2 <i>O</i> fragmento C-terminal compete com LipL32 pela ligação ao colágeno tipo IV e à fibronectina plasmática
4.6.3 Competição de LipL32, do fragmento C-terminal de LipL32 e de HlyX com os ligantes de F30 (heparina) ou F45 (gelatina)
4.7 Ensaio de proteção contra desafio homólogo
5 DISCUSSÃO
6 CONCLUSÕES
BIBLIOGRAFIA
ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espiroquetas

As espiroquetas pertencem a um grupo de bactérias que possuem motilidade e morfologia típicas, distinguindo-se assim das demais bactérias. Possuem forma helicoidal e são flexíveis. Dentro do grupo das espiroquetas existem variações nas dimensões das células, que vão desde 0,09 a 0,75 μ m de diâmetro e 3 a 500 μ m de comprimento (Johnson, *et al.*, 1977).

Estas bactérias pertencem à classe das *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales*, e estão divididas em três famílias. A primeira família, *Spirochaetaceae*, contém espécies do gênero *Borrelia*, *Brevinema*, *Cristipira*, *Spirochaeta*, *Spironema* e *Treponema*. A segunda família, *Brachyspiraceae*, contém o gênero *Brachyspira* (*Serpetulina*). A terceira família, *Leptospiraceae*, contém espécies dos gêneros *Leptonema* e *Leptospira*. Novas espécies de espiroquetas, que não puderam ser cultivadas *in vitro* até o momento, têm sido identificadas da cavidade oral humana, no intestino de cupins, e associadas a outros hospedeiros ou, ainda, de vida livre (Paster e Dewhirst, 2000). Na figura 1 está representado um esquema simplificado da taxonomia das espiroquetas.

Os habitats das espiroquetas são diversos, pois podem se estabelecer em ambientes como lama, águas de esgoto, trato digestivo de moluscos, e em túbulos renais de mamíferos (Charon, *et al.*, 2002). Algumas espiroquetas podem causar doenças (Johnson, *et al.*, 1977). Os gêneros *Treponema*, *Leptospira* e *Borrelia* contêm espécies patogênicas sendo o ser humano um dos possíveis hospedeiros (Paster e Dewhirst, 2000). *Treponema pallidum* é o agente causador da sífilis (Johnson, *et al.*, 1977) e algumas espécies de *Borrelia* podem causar a doença de Lyme, transmitida pelo carrapato (Hengee, *et al.*, 2003). Leptospiras podem causar a leptospirose, uma síndrome sistêmica consistindo de sintomas similares àqueles apresentados por outras doenças tropicais. Alguns casos também podem levar a meningite, danos hepáticos e falha renal representando a forma grave da doença (síndrome de Weil) (Palaniappan, *et al.*, 2007).



Figura 1 – Taxonomia das espiroquetas. A figura apresenta uma versão simplificada da taxonomia das espiroquetas focando nos gêneros importantes do ponto de vista clínico. Nos quadrados do organograma estão assinaladas em vermelho as doenças causadas pelas bactérias. Modificada de Schröder e colaboradores, 2008.

A organização e a composição da estrutura celular das espiroquetas são bastante semelhantes às das bactérias Gram-negativas, como por exemplo o padrão de organização das duas membranas. Por causa desta similaridade vários trabalhos postularam a presença de lipopolissacarídeos (LPS) em espiroquetas, que é um constituinte típico da parede das células das Gram-negativas, embora provas formais não existissem (Dahle, et al., 1996; Habicht, et al., 1986; Walker, et al., 1999). Entretanto, recentemente, através dos sequenciamentos dos genomas das espiroquetas, esta questão pôde ser esclarecida. Para Treponema e Borrelia, os genes de síntese de LPS estão ausentes, portanto a presença de LPS está excluída nestes gêneros (Frase, et al., 1997; Frase, et al., 1998; Norris e Weinstock, 2000; Seshadri, et al., 2004; Takayama, et al., 1987). Leptospira, em contraste, contém LPS com composição química única, quando comparado aos das demais Gram-negativas. Exibe na porção do lipídio A uma composição de ácidos graxos incomum e um único resíduo de fosfato metilado (Nahori, et al., 2005; Que-Gewirth, et al., 2004; Werts, et al., 2001). Estudos mostraram que os LPS de leptospiras ativam macrófagos através de CD14 e principalmente via receptores tipo Toll 2 (TLR-2) (Werts, et al., 2001). É importante ressaltar que embora Treponema e Borrelia não possuam LPS em sua composição celular, diferentemente da Leptospira, estas bactérias possuem outros glicolipídeos, como aqueles contendo diacilglicerol, encontrados em espécies de Treponema, e com funções similares ao ácido lipoteicóico (LTA) de bactérias

Gram-positivas. Em *Borrelia* também são encontrados glicolípideos, porém de menor massa molecular (Shröder, *et al.*, 2008). Na figura 2 podem ser visualizadas as diferenças entre a estrutura celular das bactérias Gram-negativas e das espiroquetas.



Figura 2 – Comparação entre a arquitetura das membranas de bactérias Gram-negativas e de espiroquetas. Bactérias Gram-negativas possuem duas membranas externas e uma pequena camada de peptideoglicano. A membrana externa é composta por LPS. As espiroquetas também exibem duas membranas, mas a membrana externa não está aderida à camada de peptideoglicano e o espaço periplasmático contem o flagelo. A membrana externa contém várias lipoproteínas e glicolipídeos. Os LPS* estão presentes em *Leptospira* e ausentes em *Borrelia* e *Treponema*. Modificada e extraída de Shröder e colaboradores, 2008.

Com relação à motilidade das espiroquetas, estas possuem flagelos periplasmáticos que são similares em muitos aspectos aos flagelos externos de bactérias com formato bastonete. Cada flagelo periplasmático está anexo subterminalmente em uma das pontas e se extende ao longo da célula em direção à outra ponta, conforme respresentado na figura 3. As espécies de espiroquetas possuem flagelos periplasmáticos que variam de acordo com o tamanho, número e com a sobreposição do flagelo periplasmático ao centro da célula (Charon, *et al.*, 2002).



Figura 3 – Esquema ilustrando a membrana externa, cilindro celular protoplasmático e o flagelo periplasmático das espiroquetas. Adaptada de Charon e colaboradores, 2002.

1.2 Gênero Leptospira

Leptospiras são espiroquetas aeróbicas obrigatórias com membrana citoplasmática e parede celular de peptideoglicano, envolvida por uma membrana externa contendo porinas que permitem a troca de soluto entre o espaço periplasmático e o ambiente (Murphy, *et al.*, 1980; Haake, 2000). As leptospiras normalmente possuem largura da ordem de 0,1 µm e de 6 a 20 µm de comprimento (Figura 4). Nos tecidos e dentro de fagócitos, estes organismos podem assumir uma aparência esférica ou granular. A forma delgada e helicoidal permite a sua passagem para dentro dos tecidos. Possuem dois flagelos periplasmáticos, cada um ligado subterminalmente em cada ponta, que se prolonga em direção ao centro da célula sem sobreposição (Goldestein, *et al.*, 1994; Schmid, *et al.*, 1989).

Leptospiras são incapazes de sintetizar ácidos graxos e na natureza somente se reproduzem dentro de seus hospedeiros, que incluem mamíferos, répteis e anfíbios (Murphy, *et al.*, 1980). Preferem ambientes quentes, com pH neutros ou levemente alcalinos e podem sobreviver em água fresca ou solo úmido por meses (Kuriakose, *et al.*, 1997; Simpson, *et al.*, 1998). Recentemente foi demonstrado por Ristow e colaboradores (2008) que tanto as espécies de leptospiras saprofíticas como as patogênicas são capazes de formar biofilmes. A maioria produz biofilmes *in vitro* em superfícies abióticas, como vidro e poliestireno. A formação de biofilmes pela espécie saprófita *L. biflexa* também foi observada em condições com baixa disponibilidade de nutrientes, em tubos de vidro com água mineral natural. A formação de biofilmes é consistente com a vida saprofítica em água e pode contribuir para a sobrevivência das cepas patogênicas em diferentes ambientes e também na colonização do hospedeiro (Ristow, *et al.*, 2008).



Figura 4 – Leptospiras aderidas ao epitélio da conjuntiva de equino, analisadas por microscopia eletrônica. Retirada de Bharti e colaboradores, 2003.

Tradicionalmente, as espécies de *Leptospira* têm sido divididas e classificadas dentro de mais de 250 sorovares de acordo com o teste de aglutinação microscópica (MAT). Utilizando-se o MAT, os sorovares são classificados dentro de sorogrupos determinados pelos antígenos que são compartilhados (sorogrupo-específicos) (Faine, *et al.*, 1999), podendo muitas vezes ocorrer reações cruzadas entre diferentes sorovares.

Estudos genéticos, baseados em hibridação por homologia de DNA, têm permitido melhorar a precisão no delineamento das espécies dentro do gênero *Leptospira* (Yasuda, *et al.*, 1987; Brenner, *et al.*, 1999). Desta forma, os sorovares são encontrados em mais de uma espécie, como definido pela homologia genética, ilustrando a variabilidade na expressão do genoma desta bactéria. Atualmente existem 17 espécies genômicas (genomo-espécies): *L. alexanderi*, *L.biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. meyeri* e *L. wolbachii*, e as genomoespécies 1, 2, 3, 4 e 5, ainda sem denominação (Bharti, *et al.*, 2003).

1.3 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de importância global, causada pela infecção por espécies de leptospiras patogênicas (Vinetz, *et al.*, 2001; Levett, 2001). As leptospiras infectam mamíferos, répteis e anfíbios, e estes animais servem como hospedeiros de manutenção para os mais de 250 sorovares do gênero *Leptospira*. Os ratos e outros roedores são a fonte de infecção mais importante para humanos. Um animal infectado pode permanecer assintomático e continuar expelindo leptospiras infectantes na urina por toda a sua vida (Murphy, *et al.*, 1980). A infecção de animais de importância econômica, como por exemplo bovinos e suínos, representa um grande impacto na produção de leite e carne.

Os seres humanos são usualmente infectados através do contato com solo ou água contaminados com urina, tecidos de animais infectados ou mordidas de rato (Lecour, *et al.*, 1989; Everard, *et al.*, 1995). Desta forma, veterinários, agricultores, pessoas encarregadas da limpeza de esgotos e saneamento, e outros trabalhadores que mantêm contato com animais, solo, água e limpeza de áreas, estão freqüentemente expostos a uma possível infecção por leptospiras. Outro fator que tem desencadeado aumento no risco de infecção por leptospiras são habitações aglomeradas, aumentando assim a população de animais domésticos e roedores (Plank e Dean, 2000).

A apresentação clínica da leptospirose, em seres humanos, é bifásica, com uma fase aguda ou septicêmica que dura cerca de uma semana, seguida por uma fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiras na urina. Muitas das complicações da leptospirose estão associadas à localização das leptospiras dentro dos tecidos durante a fase imune, ou seja, durante a segunda semana da doença (Levett, 2001). Aproximadamente 90% dos casos identificados são moderados. Porém, sem o tratamento, que é baseado no uso de antibióticos orais como doxiciclina ou eritromicina, a fase septicêmica geralmente evolui para a fase imune, sendo neste caso o medicamento de escolha penicilina intravenosa (World Health Organization, 2003). Durante a septicemia (leptospiremia), as bactérias podem ser encontradas no sangue, no fluído da medula cerebral, no humor aquoso, e na maioria dos tecidos (Van Crevel, *et al.*, 1994; MacClain, *et al.*, 1984). A febre pode desaparecer de 1 a 3 dias antes do início da fase imune que pode durar de 4 a 30 dias. Durante a fase imune, as leptospiras desaparecem do sangue, mas podem ser recuperadas do humor aquoso, rins e urina. A leptospiúria pode persisitir por meses (Van Crevel, *et al.*, 1994; MacClain, *et al.*, 1984).

Historicamente, a icterícia tem sido considerada o critério para a distinção entre as formas moderada e grave (síndrome de Weil), que é caracterizada por uma combinação da diminuição da atividade hepática e renal, hemorragia e colapso vascular (Murphy, *et al.*, 1980). No fígado, as leptospiras podem induzir a apoptose dos hepatócitos, o que poderia limitar a resposta inflamatória, permitindo a proliferação dos microrganismos neste órgão (Merien, *et al.*, 1998).

A maioria das mortes por leptospirose está diretamente relacionada ao comprometimento renal (Arean, *et al.*, 1962), e neste caso, além dos antibióticos se faz necessária uma terapia de suporte, que consiste principalmente na diálise, importante na insuficiência renal, desequilíbrio hidroeletrolítico e hemorragia (WHO, 2003). Pacientes com falha renal aguda possuem alta excreção de sódio e potássio, que aumentam e caem concomitantemente (Seguro, *et al.*, 1990). A patogênese renal pode envolver uma endotoxina de *Leptospira* conhecida como glicolipoproteína (GLP), que inibe a ATPase sódio/fosfato (Burth, *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, a hemorragia pulmonar também tem se apresentado como uma importante forma de manifestação clínica da leptospirose. Afetando cerca de 70% dos pacientes esta vem sendo considerada em alguns países como uma da principais causas de morte (Bharti, *et al.*, 2003; Levett, 2001; Seijo, *et al.*, 2002).

No Brasil, a média do número de casos de leptospirose relatados em humanos, referente aos anos de 1997 a 2008, é de aproximadamente 3.233 por ano (segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde em 20/01/2009). Porém, estes números números não refletem em nada a realidade desta doença no país. As diversas apresentações clínicas da leptospirose juntamente com o baixo índice de suspeita frequentemente resultam em um diagnóstico errado (Ko, *et al.*,1999). Em regiões tropicais, a leptospirose é mais comumente confundida com a dengue. Estas duas infecções são virtualmente indinstingíveis nos estágios iniciais (febre, dor de cabeça e mialgias estão presentes em ambas) e além disso possuem igual distribuição temporal devido às condições climáticas. Em 1996, a área urbana de Salvador, no Brasil, teve epidemias de dengue e leptospirose concomitantes e cerca de 42% dos pacientes foram inicialmente diagnosticados, erroneamente, com dengue (Ko, *et al.*, 1999).

1.3.1 Diagnóstico laboratorial

Ainda não existe nenhum teste diagnóstico para a leptospirose que seja sensível, específico, de baixo custo, rápido e amplamente disponível.

O teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico sorológico de leptospirose é o teste de aglutinação microscópica (MAT) (WHO, 2003), onde o soro do paciente reage com uma suspensão viva ou inativada de *Leptospira*. Após a incubação, a mistura soro-antígeno é examinada ao microscópio de campo escuro para a observação da aglutinação e para a determinação dos títulos de diluição. Porém, a interpretação deste teste é complicada pela alta proporção de reações cruzadas que ocorrem entre diferentes sorogrupos, especialmente em amostras colhidas na fase aguda da doença (Levett, 2001). Assim, este ensaio acaba tornando-se complexo, de difícil controle, padronização, leitura, interpretação, e a sua utilização na identificação de sorovares ainda é controversa (Levett, *et al.*, 2003).

Outro grande problema com este ensaio é a dificuldade para manter culturas de sorovares, pois existe a chance de contaminação entre os mesmos, sendo preciso um controle periódico, além de representar sério risco de contaminação local (WHO, 2003; Bajani, *et al.*, 2003). Pela complexidade do teste de microscopia de aglutinação, têm sido desenvolvidos testes rápidos para a observação de anticorpos na fase aguda da infecção como o uso de testes de ELISA para IgM. Técnicas aplicadas para a detecção de anticorpos contra leptospiras incluem: imunofluorescência, imunoensaio e imunoeletroforese (Levett, 2001). Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos, principalmente baseados em desenho de *primers*, uso de PCR e análise de restrição. Vários pares de *primers* para a detecção por PCR de *Leptospira* têm sido descritos, freqüentemente baseados nos genes 16S ou 23S rRNA e em elementos repetitivos (Heinemann, *et al.*, 2000; Levett, 2001). No entanto, estes testes diagnósticos ainda estão sendo padronizados e não são aceitos como métodos de referência (Bajani, *et al.*, 2003; Levett, 2001), pois apesar de serem altamente sensíveis e específicos, eles não têm sido sistematicamente comparados entre si e com o teste padrão (MAT) (Bajani, *et al.*, 2003).

1.3.2 Desenvolvimento de vacinas

Os estudos realizados até o momento indicam que a imunidade para *Leptospira* parece ser humoral e sorovar específica (Faine, *et al.*, 1999). Desta maneira, a imunização utilizando-se leptospiras inativadas ou atenuadas protege somente contra o sorovar homólogo ou antigenicamente similar. As vacinas devem consequentemente conter sorovares representativos daqueles presentes na população a ser imunizada (Faine, *et al.*, 1999). Este tipo de imunização tem sido usada há muitos anos com a finalidade de induzir imunidade em animais e humanos. As primeiras vacinas eram compostas de suspensões de leptospiras mortas cultivadas em meio contendo soro, e efeitos colaterais eram comuns. Vacinas modernas preparadas usando meio livre de proteína geralmente não possuem efeitos adversos (Faine, *et al.*, 1999). Existem estudos sobre o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose humana em países como Cuba, Rússia, China e França (Martínez-Sánchez, *et al.*, 1998; Ikoev, *et al.*, 1999; Yan, *et al.*, 2003; Rodriguez-Gonzales, *et al.*, 2004), com preparações semelhantes às bacterinas veterinárias. Vacinações realizadas na China, Vietnam e Japão com sorovares específicos endêmicos destas localidades após episódios de enchentes, aparentemente obtiveram sucesso (Faine, *et al.*, 1982; Faine, *et al.*, 1999).

Embora útil para animais, esta abordagem não é recomendável para seres humanos, constantemente expostos a numerosos sorovares através das diversas ocupações e viagens. Além do mais, a variação não acontece somente nas diferentes regiões, mas também ao longo do tempo (Lecour, *et al.*, 1989; Trevejo, *et al.*, 1998; Van Crevel, *et al.*, 1994; Park, *et al.*, 1989; Caldas, *et al.*, 1978; Sehgal, *et al.*, 1995), fazendo-se desejável uma vacina de amplo espectro (Plank e Dean, 2000). Ainda, a imunidade gerada pelas vacinas celulares não induz memória, havendo a necessidade de vacinações anuais ou bianuais e reações locais são comuns após as vacinações (Haake, *et al.*, 1999). Atualmente tem sido priorizado o desenvolvimento de vacinas com componentes bem definidos, com o objetivo de alcançar máxima proteção por tempo prolongado e com mínimos efeitos adversos (McBride, *et al.*, 2005).

Foram encontrados anticorpos em soros de pacientes com leptospirose que se ligam a diferentes proteínas de membrana externa e do espaço periplasmático, bem como a lipopolissacarídeos (LPS). A variação entre os LPS dos sorovares de *Leptospira*, representa um desafio para o desenvolvimento de uma vacina uniforme aplicável em seres humanos (Haake, *et al.*, 1999). Portanto, acredita-se que os esforços para a obtenção de uma vacina eficaz devam se concentrar em proteínas de membrana externa que sejam conservadas nos

sorovares patogênicos e que sejam imunodominantes. Pesquisas voltadas para este propósito estão sendo realizadas (Haake, *et al.*, 1999). Os genomas de 4 sorovares patogênicos e de 1 sorovar saprofítico, foram sequenciados (Ren , *et al.*, 2003; Nascimento, *et al.*, 2003; Bulach, *et al.*, 2006; Picardeau, *et al.*, 2008). As informações provenientes destes genomas representam uma importante contribuição para o estudo da biologia do microrganismo e abre perspectivas para estudos de genoma funcional. A vacinologia reversa (Rappuoli e Covacci, 2003) tem sido útil para a descoberta de potenciais candidatos vacinais contra a meningite e pneumonia, através da informação genômica de *Neisseria meningitides* (Pizza, *et al.*, 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (Wizemann, *et al.*, 2001). As informações genômicas obtidas com o sequenciamento dos genomas de *Leptospira* (Gamberini, *et al.*, 2005) também vêm auxiliando na busca de candidatos a vacina e ao diagnóstico da leptospirose.

1.4 Genomas de *Leptospira spp*.

A recente utilização de técnicas moleculares utilizadas no refinamento da taxonomia do gênero *Leptospira* tem revelado extensas diversidades genéticas dentro deste gênero, que possui mais de 12 espécies patogênicas e saprofíticas reconhecidas (Brenner, *et al.*, 1999; Levet, 2001). A análise dos genomas de *Leptospira* revelou diferenças entre as espécies patogênicas e saprofíticas, sugerindo prováveis funções biológicas de diversas proteínas, além de adicionar informações sobre a relação deste microrganismo com o ambiente.

Até então, foi realizado o sequenciamento do genoma de 5 sorovares pertencentes a 3 espécies de *Leptospira*, sendo 2 espécies patogênicas e 1 espécie saprofítica, *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Lai (Ren, *et al.*, 2003), *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Nascimento, *et al.*, 2003), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Bulach, *et al.*, 2006) e *L. biflexa* sorovar Patoc (Picardeau, *et al.*, 2008).

O genoma da *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Lai consiste de dois cromossomos, sendo o maior de 4,33 Mpb e o menor de 359 Kpb, com um total de 4.768 genes preditos (Ren, *et al.*, 2003). O sequenciamento do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni mostrou que esta cepa também possui dois cromossomos circulares: o cromossomo maior possui 4,27 Mpb e o cromossomo menor possui 350 Kpb, aproximadamente (Nascimento, *et al.*, 2004). A comparação realizada entre os dois sorovares de *L. interrogans* revelou que, apesar das similaridades genéticas gerais, existem significantes diferenças estruturais, incluindo uma inversão no cromossomo maior e grandes variações no número e distribuição de elementos de sequências de inserção (Nascimento, *et al.*, 2004).

Foram identificadas diferenças entre o sorovar Lai e Copenhageni em genes envolvidos na biossíntese da cadeia O de lipopolissacarídeos, oferecendo um importante começo para a elucidação da complexidade dos antígenos polissacarídicos presentes na superfície deste microorganismo. Estas diferenças podem estar associadas à adaptação destes sorovares em diferentes hospedeiros (Nascimento, *et al.*, 2004).

O genoma de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo é aproximadamente 700 Kpb menor quando comparado ao genoma de *L. interrogans* e possui uma menor densidade codificante resultante da presença de sequências de inserção, refletindo-se em uma redução do genoma (Bulach, *et al.*, 2006). A perda de função de gene não é aleatória, mas é centrada na diminuição da sinalização ambiental e no transporte e utilização de metabólitos. Estas características distinguem *L. borgpetersenii* de *L. interrogans*, sendo esta útima uma espécie que possui um menor decaimento genético e que sobrevive a extensivas passagens por ambientes aquáticos e no hospedeiro mamífero, diferentemente da primeira que parece estar se tornando dependente do hospedeiro (Bulach, *et al.*, 2006). O genoma de *L.biflexa*, que é a espécie saprofítica de vida livre presente em ambientes aquáticos, possui 3.590 genes codificadores de proteínas distribuídos através de três "*replicons*" circulares: o cromossomo maior possui 3,6 Mpb, o segundo *replicon* tem 278 kpb e também carrega genes essenciais e o terceiro *replicon* possui 74 Kpb (Picardeau, *et al.*, 2008).

As análises comparativas realizadas entre as sequências dos genomas apontaram evidências de que L. biflexa é um excelente modelo para o estudo de evolução de Leptospira, devido aos 2052 genes (61%) representarem um genoma ancestral que existiu antes da divergência das espécies patogênicas e saprofíticas. As comparações realizadas entre o genoma da L. biflexa e o genoma das duas espécies de Leptospira patogênica sequenciadas revelaram que aproximadamente um terço dos genes da L. biflexa estão ausentes em Leptospira patogênica (Picardeau, et al., 2008). Em constraste, os genomas das espécies de Leptospira patogênica analisadas sofreram frequentes rearranjos, muitas vezes envolvendo recombinação entre sequências de inserção. A identificação de genes comuns para as duas espécies patogênicas, L. interrogans e L. borgpetersenii, mas ausente em L. biflexa, é indicativa do papel destes genes na patogênese. Diferenças nas capacidades de percepção ambiental de L. biflexa, L. borgpetersenii e L. interrogans sugerem um modelo que postula que a perda das funções da transdução de sinal em L. borgpetersenii tem diminuído a sua sobrevivência fora do hospedeiro mamífero, enquanto L. interrogans tem conservado funções sensoriais ambientais que facilitam a transmissão da doença através da água (Picardeau, et al., 2008).

28

1.5 Lipoproteínas

Lipoproteínas de superfície estão envolvidas na interação entre patógeno e hospedeiro. Sinais ambientais podem regular a expressão das lipoproteínas e estas ainda podem ser reguladas no hospedeiro, sofrendo variação antigênica como uma estratégia para evadir ao sistema imune. Lipoproteínas também estão envolvidas na patogênese da doença através de sua habilidade em desencadear uma resposta inflamatória no hospedeiro (Haake, 2000).

O sequenciamento dos genomas das espiroquetas *Treponema pallidum* e *Borrelia burgdorferi* revelaram ortológos de genes codificantes de todos os componentes essenciais da maquinaria secretória (Fraser, *et al.*, 1997; Fraser, *et al.*, 1998). Segundo a revisão de Duong (1997), que compara os genes da maquinaria das espiroquetas e de *Escherichia coli*, as lipoproteínas emergentes do ribossomo ligam-se através do peptídeo sinal às partículas contendo Ffh, dirigindo-os ao complexo de pré-proteína translocase presente na membrana citoplasmática.

Como observado na figura 5, as prolipoproteínas são secretadas ao longo da membrana citoplasmática através do complexo de proteínas translocase, que consiste de um canal transmembrana SecYE contendo SecA no lado citoplasmático e SecDF no lado periplasmático da membrana citoplasmática. A secreção através do complexo translocase envolve um ciclo dependente de energia, no qual a SecA liga-se ao peptídeo sinal, impulsionando-o através do canal transmembrana (Wu, 1996).



Figura 5 – Modelo da exportação de lipoproteínas em espiroqueta. O modelo acima basea-se no que está estabelecido sobre exportação de lipoproteínas de bactéria e os ortólogos de proteínas secretórias em genomas de espiroquetas. O mecanismo pelo qual as lipoproteínas de espiroquetas são expostas não foi demonstrado experimentalmente. A, prolipoproteína (com peptídeo sinal) imediatamente após a secreção; B, sub-superfície da lipoproteína no folheto externo da membrana citoplasmática; C, sub-superfície da lipoproteína no folheto externo da membrana externa; D, lipoproteína exposta na superfície no folheto externo da membrana externa; Lsp, prolipoproteína peptidase sinal. Adaptada de Haake, 2000.

Depois disso, a SecA volta a ligar-se à próxima parte da proteína que está sendo secretada. Este ciclo continua até a proteína inteira ter sido completamente transportada através da membrana citoplasmática. É muito provável que lipoproteínas, bem como todas as outras proteínas com peptídeo sinal, sejam secretadas desta maneira (Wu, 1996). Após a secreção através da membrana citoplasmática, as proteínas são lipidadas e clivadas no resíduo de cisteína no sítio sinal de processamento de lipoproteína.

O processamento de lipoproteína é uma via de biossíntese de três passos que ocorre no lado periplasmático da membrana citoplasmática e envolve três enzimas separadas localizadas na membrana (Wu, 1996). Homólogos para todas as três enzimas requeridas para a biossíntese em *E. coli* têm sido encontrados tanto em *Treponema pallidum* como em *Borrelia burgdorferi*. Os detalhes do processamento foram originalmente testados em *E. coli* para a lipoproteína mureína e são presumivelmente similares em outras bactérias Gram-negativas e também em espiroquetas. A primeira das três enzimas na via de processamento de lipoproteína é a fosfotidilglicerol prolipoproteína diacilglicerol transferase (Lgt). Esta enzima transfere um grupo diacilglicerol (contendo dois ácidos graxos) do fosfotidilglicerol para o átomo de enxofre da cisteína. A segunda enzima na via é a prolipoproteína peptidase sinal (Lsp), que remove proteolíticamente o peptídeo sinal, fazendo da cisteína o novo aminoácido N-terminal. A terceira enzima é um fosfolipídeo: apolipoproteína transacilase (Lnt) que transfere um terceiro ácido graxo proveniente de um fosfolipídeo de membrana para o átomo de nitrogênio da cisteína. Após o processamento, as lipoproteínas terão três ácidos graxos ligados ao resíduo de cisteína (Haake, 2000).

Os estudos do sequenciamento dos genomas de espiroquetas têm revelado um grande número de genes codificantes para possíveis lipoproteínas (Frase, *et al.*, 1997; Fraser, *et al.*, 1998). A presença de um resíduo de Cys após um peptídeo sinal é uma evidência sugestiva de que uma proteína é lipidada. Em espiroquetas, a variabilidade de aminoácidos no sítio de clivagem da peptidase da lipoproteína sinal, incluindo a posição -3 em relação a cisteína, faz com que o reconhecimento dos sítios de clivagem da peptidase da lipoproteína sinal seja menos preciso do que nas demais bactérias (Haake, 2000). Para definir o *lipobox* das espiroquetas, Haake (2000) reuniu dados presentes na literatura para identificar lipoproteínas de espiroquetas, para as quais evidências experimentais de modificação de lipídios estavam disponíveis. Vinte e seis sequências foram obtidas das lipoproteínas produzidas pelas espécies de *Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia* e *Brachyspira*.

30

A sequência encontrada para o *lipobox* de espiroquetas foi: -Leu(Ala,Ser)₋₄-Leu(Val,Phe,Ile)₋₃-Ile(Val,Gly)₋₂-Ala(Ser,Gly)₋₁-Cys₊₁ (Haake, 2000). São exemplos de lipoproteínas de *Leptospira* (Setubal, *et al.*, 2006), LipL32 (Haake, *et al.*, 2000), LipL41 (Haake, *et al.*,1999), LipL21 (Cullen, *et al.*,2003), OmpL1 (Haake, *et al.*,1999), Loa22 (Ristow, *et al.*,2007), e Lsa24 (Barbosa, *et al.*,2006).

1.6 Adesinas

A capacidade das espiroquetas de aderir à superfície de células eucarióticas e a proteínas de matriz extracelular é essencial para a patogênese da leptospirose (Haake, 2000). O início da infecção requer a aderência das bactérias a células não fagocíticas ou a componentes de matriz extracelular, e muitos microorganismos entram nas células do hospedeiro após a ligação a estruturas específicas de superfície. As bactérias expressam moléculas de adesão associadas à superfície, geralmente chamadas de adesinas, que reconhecem receptores e células eucarióticas, proteínas ou carboidratos dos componentes de matriz extracelular (Preissner e Chhatwal, 2005). A matriz do tecido conjuntivo e as superfícies das células do hospedeiro servem como suporte para a infiltração de bactérias patogênicas durante a invasão e colonização, particularmente sob condições de injúria ou trauma. Moléculas de adesão encontradas na matriz extracelular ou na lâmina basal, como colágeno, fibronectina, laminina e outras proteínas de matriz, assim como proteínas do plasma (Haake, 2000) ou receptores de adesão e integrinas presentes nas células do hospedeiro, podem interagir diretamente com a bactéria através de suas adesinas de superfície e facilitar a entrada de patógenos para dentro dos tecidos (Preissner e Chhatwal, 2005). Em Leptospira foram encontradas adesinas que interagem com componentes de matriz extracelular, sendo elas Lsa24 (LenA ou LfhA) (Barbosa, et al., 2006), Lig (A e B) (Choy, et al., 2007), a família de proteínas parálogas Len (B, C, D, E e F) (Stevenson, et al., 2007) e LipL32 (Hoke, et al., 2008; Hauk, et al., 2008). A proteína Lsa24 foi descrita como sendo uma adesina capaz de se ligar a laminina, preferencialmente aos resíduos de açúcar desta molécula (Barbosa, et al., 2006). As proteínas LigA e LigB são proteínas expressas na superfície, em condições de alta osmolaridade, e possuem domínios imperfeitos de imunoglobulina. Estas proteínas mostraram ser capazes de aderir tanto a colágeno tipo IV como a fibronectina plasmática (Choy, et al., 2007). As proteínas Len (A, B, C, D, E e F) pertencem a uma família de proteínas de membrana externa, similares a endostatinas, que se ligam a laminina. As proteínas LenA e LenB também ligam-se ao fator H, um importante regulador da via alternativa do sistema sistema complemento. As Len (B, C, D e F) exibiram afinidade por fibronectina. (Stevenson, *et al.*, 2007).

1.7 As proteínas LipL32 e HlyX de Leptospira

1.7.1 LipL32

Muitas das proteínas da membrana externa das espiroquetas são lipoproteínas. A membrana externa de leptospira possui um perfil relativamente complexo de proteínas, sendo a mais abundante, a lipoproteína de superfície LipL32 (Cullen, *et al.*, 2005; Haake, *et al.*, 2000). Em uma comparação utilizando-se as seqüências de aminoácidos da LipL32 de seis espécies de *Leptospira*, encontrou-se 97,8% de similaridade e nenhuma outra seqüência com homologia significativa a LipL32 foi identificada no banco de dados do Genbank, definindo a alta especificidade para estas bactérias (Haake, *et al.*, 2000). Porém, recentemente foi encontrada uma proteína ortóloga de LipL32 no genoma de *Pseudoalteromonas tunicata*. Esta proteína apresenta similaridades funcionais e reatividade cruzada com LipL32 (Hoke, *et al.*, 2008).

A sequência de aminoácidos de LipL32 é compatível com as regras que caracterizam as lipoproteínas procarióticas (Hayashi e Wu, 1990; Pusgley, *et al.*, 1993). O peptídeo sinal de LipL32 possui uma região amino-terminal básica (incluindo lisinas nas posições 2 e 3), uma região hidrofóbica (posição de aminoácidos 4 a 19) seguido por um sítio de clivagem de peptidase sinal, I-T-A-C (Haake, *et al.*, 2000) (Figura 6).

1 4 19 MKKLSILAISVALFASITAC*GAFGGLPSLKSSFVLSEDTIPGTNETVKTLLPYGSV INYYGYVKPGQAPDGLVDGNKKAYYLYVWIPAVIAEMGVRMISPTGEIGEPGDGDLV SDAFKAATPEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDQIAKAAKAKPVQKLDDDDDGDDTY KEERHNKYNSLTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKLLVRGLYRISFTTYKPGEVKGSFV ASVGLLFPPGIPGVSPLIHSNPEELQKQAIAA 272

EESLKKAASDATK#

Figura 6 – Sequência de aminoácidos da LipL32. A posição de aminoácidos 1 a 20 representa a sequência sinal. Em vermelho estão indicados os aminoácidos básicos da sequência sinal, duas lisinas nas posições 2 e 3. Em azul está representada a região hidrofóbica, posições 4 a 19 aa. A sequência sublinhada refere-se ao sítio de reconhecimento para clivagem pela peptidase sinal. C* na posição 20 aa representa a cisteína lipidada (Haake, *et al.*, 2000).

A proteína LipL32 é altamente expressa nas espécies patogênicas de *Leptospira*, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas a sua expressão não foi detectada nas espécies saprofíticas (Haake, *et al.*, 2000; Guerreiro, *et al.*, 2001). Recentemente, o sequenciamento do genoma de *L. biflexa* mostrou a ausência do gene que codifica LipL32 nesta espécie saprofítica (Picardeau, *et al.*, 2008).

Estudos envolvendo células de túbulo proximal renal de camundongos mostraram que LipL32 induziu um aumento significativo na expressão de TLR2 (Toll Like Receptor type 2) nestas células e que estes receptores são requeridos para a resposta inflamatória precoce (Werts, et al., 2001; Yang, et al., 2006). Outros estudos realizados com estas mesmas células mostraram que quando tratadas com LipL32, elas apresentaram uma resposta inflamatória, verificada através da produção de transcritos de MCP-1 (proteína-1 quimioatraente de monócitos), RANTES (expresso e secretado por célula T normal, regulada por ativação), iNOS (óxido nítrico sintetase), TNF- α (fator de necrose tumoral α), aumento na ligação nuclear de NF-kB (fator-kB nuclear) e do fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora -1) (Yang, et al., 2002). Portanto, sugere-se que a proteína LipL32 seja o componente de membrana externa mais abundante que deflagra in vivo o quadro clínico de nefrite túbulointersticial (efeito citotóxico) após a infecção por Leptospira (Yang, et al., 2002).O papel da LipL32 na patogênese da leptospirose requer investigação detalhada, pois LipL32 também demonstrou induzir TNF-a em células monocíticas humanas (Yang, et al., 2002). Immunoblottings realizados para a pesquisa de anticorpos gerados contra proteínas de leptospiras em soros de pacientes com leptospirose indicaram a presenca de anticorpos IgG contra LipL32 durante a infecção. Nestes ensaios, extratos totais de isolados clínicos de L. interrogans foram utilizados e anticorpos IgM produzidos contra LipL32 não foram encontrados (Guerreiro, et al., 2001).

Recentemente, estudos usando *lip*L32 mutante de *Leptospira interrogans* (obtida por mutagênese realizada através de transposon) mostraram que a proteína codificada por este gene, embora presente somente em leptospiras patogênicas, parece não participar da infecção em modelo animal, seja na fase aguda ou na fase crônica da doença (Murray, *et al.*, 2008). Curiosamente, estudos realizados com outra proteína de membrana externa de *Leptospira* (Loa22), presente tanto em cepas patogênicas como naquelas de vida livre (Picardeau, *et al.*, 2008), mostraram que esta proteína é imprescindível para a virulência da bactéria (Ristow, *et al.*, 2007).

O alto grau de conservação de LipL32 entre as diferentes espécies de *Leptospira* patogênicas indica que a estratégia de sorodiagnóstico baseado neste antígeno pode ser efetiva em qualquer caso de infecção, independente do sorovar, e específica para o diagnóstico da leptospirose (Guerreiro, *et al.*, 2001). Ensaios baseados em ELISA, utilizando LipL32 recombinante, mostraram que este antígeno, sendo imunodominante, pode ser útil para o diagnóstico de leptospirose humana (Flannery, *et al.*, 2001; Haake, *et al.*, 2000). O uso da proteína recombinante para a detecção diagnóstica da doença canina através de ELISA mostrou uma atividade específica de anticorpos presentes nos soros dos cães infectados contra este antígeno. Este ensaio demonstrou ser sensível, específico e exato, quando comparado ao método diagnóstico padrão, o teste de aglutinação microscópica (MAT) (Dey, *et al.*, 2004).

Componentes de proteínas da membrana externa de *Leptospira* representam potenciais candidatos vacinais (Haake, *et al.*, 2000) e, sendo LipL32 a proteína de superfície mais abundante e ainda presente somente em leptospiras patogênicas, foi considerada uma promissora candidata a antígeno vacinal (Cullen, *et al.*, 2005; Branger, *et al.*, 2005). A atividade protetora de LipL32 foi avaliada através de imunizações nas quais diferentes formas de apresentação do antígeno foram utilizadas: adenovírus (Branger, *et al.*, 2001); vacina de DNA e LipL32 recombinante associada a hidróxido de alumínio (Branger, *et al.*, 2005) e *Mycobacterium bovis* (BCG) (Seixas, *et al.*, 2007). Estas imunizações induziram proteção parcial contra *Leptospira interrogans* em modelo de desafio animal (Branger, *et al.*, 2001; Branger, *et al.*, 2005).

1.7.2 HlyX

A proteína HlyX codificada pelo gene LIC10325 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi anotada como uma hemolisina pela homologia com o gene correspondente de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo sorotipo hardjobovis, segundo informações do Genbank. O gene LIC10325 possui ainda um ortólogo (LA0378) em *L. interrogans* sorovar Lai que possui domínios tetratricopeptídeos.

Estudos realizados por Zhang e colaboradores (2005) com *E. coli* expressando HlyX (LA0378) bem como ensaios realizados pela nossa equipe com a proteína recombinante purificada (Hauk, *et al.*, 2005) mostraram uma atividade hemolítica em placas de ágar sangue de ovelha. Porém, estudos posteriores feitos em nosso laboratório com a proteína purificada não confirmaram esta atividade (Hauk, *et al.*, 2008). Hoje, sabe-se que a atividade hemolítica

observada pode ser atribuída à presença de contaminação com Triton X-114, utilizado para remover o LPS da proteína HlyX (Hauk, *et al.*, 2008).

Os domínios tetratricopeptídeos são sequências degeneradas de 34 aminoácidos repetidos. Estão envolvidos no controle do ciclo celular, repressão da transcrição, inibição de proteínas quinases, na interação proteína-proteína, entre outras funções (Lamb, *et al.*, 1995). A proteína HlyX possui um peptídeo sinal (posições dos resíduos, 1 a 25 aa) (Figura 7) indicando possivelmente que é secretada ou que seja dirigida para domínios transmembrana, sendo assim, potencialmente exposta ao reconhecimento do sistema imune do hospedeiro. Logo, a proteína HlyX representa um potencial antígeno vacinal para leptospirose, justificando desta forma o interesse por mais estudos relacionados a expressão e caracterização desta proteína.

Informações obtidas a partir do sequenciamento do genoma de *L. biflexa* indicaram a presença do gene que codifica a proteína HlyX na cepa saprofítica (Picardeau, *et al.*, 2008).



Figura 7 – Sequência de aminoácidos de HlyX. A posição de aminoácidos 1 a 25, representa a sequência sinal, predita pelo programa computacional SMART. As sequências em vermelho, azul, alaranjado, roxo e cinza estão representando os cinco tetratricopeptídeos presentes na proteína.
2 OBJETIVO

Caracterizar o papel biológico das proteínas LipL32 e HlyX de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

2.1 Objetivos específicos

- Obter as proteínas LipL32 e HlyX recombinantes purificadas através da de histidina fusionada no N-terminal das proteínas recombinantes;

- Obter LipL32 sem cauda de histidina para estudos de estrutura tridimensional (cristalografia);

- Caracterizar a atividade biológica de adesina de LipL32 e HlyX;

- Mapear domínios da proteína LipL32 para realizar estudos de imunodominância e atividade biológica;

- Avaliar LipL32 e/ou HlyX como possíveis candidados vacinais contra a leptospirose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lista de soluções e meios de cultura

3.1.1 Soluções utilizadas

1) Solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 10x: Tris base 400 mM, Ácido acético 190 mM e EDTA 10 mM, pH 7,6.

2) Ficoll Dye 10x: Azul de bromofenol 0,2% (m/V), xileno cianol 0,42% (m/V) e glicerol 50% (V/V).

3) Solução tampão de amostra para SDS-PAGE 10x: Tris-HCl 1 M, pH 6,8, SDS 10% (m/V), azul de bromofenol 0,5% (m/V), glicerol 50% (V/V) e β -mercaptoetanol 1,43 M.

4) Solução tampão de lavagem dos corpúsculos de inclusão (1 M uréia): Tris-HCl 50 mM, pH
8,0, NaCl 500 mM, uréia 1 M e β-mercaptoetanol 10 mM.

5) Solução tampão de solubilização dos corpúsculos de inclusão (8 M uréia): Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, uréia 8 M e β-mercaptoetanol 10 mM.

6) Solução tampão de ligação à coluna I (solução de equilíbrio): Tris-HCl 150 mM, pH 8,0.

7) Solução tampão de ligação à coluna II (solução de equilíbrio): 20 mM trietanolamina, pH7,8.

8) Solução tampão de diálise: Tris-HCl 150 mM, pH 8,0.

9) Solução tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5% (m/V), glicina 9,4% (m/V) e SDS 0,5% (m/V).

10) Solução corante de SDS-PAGE: *Comassie Blue Brillant* 0,25% (m/V), etanol 40% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

11) Solução descorante de SDS-PAGE: Etanol 30% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

12) Solução secante de SDS-PAGE: Etanol 50% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

13) PBS (Solução tampão fosfato): NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄
14 mM, pH 7,4.

14) PBS-T: PBS e Tween® 20 0,05% (V/V).

15) Solução tampão carbonato-bicarbonato: Na₂CO₃ 50 mM e NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6.

16) Solução tampão citrato-fosfato: Citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO4) 300 mM.

17) Solução tampão de transferência de Western blot 5x: Tris-glicina 5x e SDS 10% (m/V).

3.1.2 Meios de cultura utilizados

1) Meio líquido 2YT: Triptona 1,6% (m/V), extrato de levedura 1% (m/V) e NaCl 0,5% (m/V).

2) Meio sólido 2YT-ágar: meio 2YT e bactoágar 1,5% (m/V).

3) Meios sólido ou líquido 2YT-amp: meio 2YT-ágar ou 2YT e 100 µg/mL de ampicilina.

4) Meio sólido ou líquido 2YT-amp/clo: meio 2YT-ágar ou 2YT e 100 μg/mL de ampicilina e
 30 μg/mL de cloranfenicol

5) Meio líquido 2YT/ON: Triptona 1,6% (m/V) e extrato de levedura 1% (m/V).

6) Meio sólido 2YT/ON-ágar: meio 2YT/ON e bactoágar 1,5% (m/V).

7) Meio sólido ou líquido 2YT/ON-amp: meio 2YT/ON-ágar ou 2YT/ON e 100 µg/mL de ampicilina.

8) Meio líquido M9/ON: Na₂HPO₄ 0,3 M, KH₂PO4 0,17M, MgSO₄ 1 M, glicose 20%, CaCl₂
1 M e NH₄Cl 0,5M.

9) Meio líquido EMJH (Difco®-USA): Di-sódio fosfato 0,1% (m/V), fosfato de sódio monobásico 0,03% (m/V), NaCl 0,1% (m/V), cloreto de amônio 0,025% (m/V) e tiamina 0,0005% (m/V).

10) Meio líquido EMJH enriquecido: EMJH base 0,23 % (m/V), peptona 0,03% (m/V), extrato de carne 0,02% (m/V), soro de coelho estéril 10%, L-asparagina 0,015% (m/V), CaCl₂ 0,001% (m/V), MgCl₂ 0,001% (m/V), piruvato de sódio 0,001% (m/V).

3.2 Vetores utilizados

Os vetores utilizados para as subclonagens de produtos de PCR foram: pCR^R4Blunt– TOPO (Invitrogen[®]), pENTR TOPO (Invitrogen[®]) e pGEM-T *easy* (*Promega[®]*). Os vetores de expressão em *E. coli* utilizados neste trabalho foram pDEST17 (Invitrogen[®]) e pAE (Ramos, *et al.*,2004) (Figura 8).

Anteriormente a este trabalho, *lip*L32 já havia sido clonada por Gamberini e colaboradores (2005), utilizando-se o sistema Gateway (Invitrogem). O vetor pENTR TOPO contendo *lip*L32 foi transferido por recombinação para o vetor de expressão pDEST17 (Invitrogen[®]), pela ação da LR clonase. O vetor pDEST17 contém o promotor do fago T7 (T7), sítio de ligação de ribossomo (RBS), códon ATG de iniciação e sequência codificante para seis histidinas (6xHis), que são fusionadas na porção N-terminal da proteína recombinante, facilitando a purificação desta através de cromatografia de afinidade a metais bivalentes. Dois sítios de recombinação, *att*R1 e *att*R2, flanqueiam o gene de resistência a cloranfenicol. Estas sequências são trocadas pelas sequências, *att*L1 e *att*L2, presentes no "clone de entrada" pela reação com a enzima LR clonase. As sequências de DNA clonadas no pDEST17 podem ser expressas pela ação da T7 RNA polimerase em *E. coli*.

O vetor de expressão pAE, desenvolvido por Ramos e colaboradores (2004) possui a origem de replicação do vetor pUC18, sendo também constituído pelo promotor do fago T7, um sítio de ligação de ribossomo (RBS), sequência codificadora para seis histidinas, sítio múltiplo de clonagem (MCS) e terminador de transcrição (T7 term). Este vetor possui sequência codificadora para β -lactamase, conferindo resistência à ampicilina. A presença da cauda de histidina neste vetor também é utilizada como estratégia de purificação através de cromatografia de afinidade a metais bivalentes.



Figura 8 – Representação esquemática dos vetores de expressão em *E. coli*, pAE (A) e pDESTTM17 (B). Ambos os vetores adicionam uma sequência contendo seis resíduos de histidinas no N-terminal da proteína recombinante. O vetor pAE adiciona a sequência: MHHHHHHLE e o vetor pDESTTM17 adiciona a sequência: MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSAAAPF no N-terminal da proteína heteróloga.

3.3 Linhagens bacterianas

As cepas de *Leptospira*⁽¹⁾ (*L. interrogans* sorovares Canicola, Pyrogenes, Pomona, Autumnalis, Hardjo, Brastilava, Copenhageni e Icterohaemorragiae, *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. kirchneri*) foram cultivadas por 7 dias a 28 °C sob condições aeróbicas em meio líquido EMJH enriquecido. A linhagem virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni (ATCC BAA-1198) também foi cultivada nas condições citadas acima, porém para que a virulência desta linhagem fosse mantida foram necessárias passagens periódicas por hamsters.

A linhagem *Escherichia coli* DH5 α^{TM} (Invitrogen[®]) foi utilizada para as subclonagens dos produtos de PCR e para as clonagens dos genes de interesse no vetor de expressão. *E. coli* DH5 α foi cultivada em meio 2YT-amp a 37 °C por 16 h.

Para a etapa de expressão das proteínas recombinantes foram utilizadas as cepas de *E. coli* BL21 SI (Gibco/BRL[®]) ou *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] (Novagen[®]). *E. coli* BL21 SI foi cultivada em meio 2YTON-amp a 30 °C por 16 h; já a *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] foi cultivada em meio 2YT-amp/clo a 37 °C por 16 h.

A cepa *E. coli* BL21(SI) contém o gene da T7 RNA polimerase sob o controle da ação do promotor *pro*U de *E. coli* responsivo a osmolaridade, induzível por NaCl (Bhandari e Gowrishankar, 1997). *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] possui o promotor induzível por IPTG e um plasmídeo (pLysS) que confere resistência a cloranfenicol e produz T7 lisozima que se liga a T7 RNA polimerase, reduzindo os níveis basais de expressão do gene de interesse, sendo desta forma apropriado para a expressão de proteínas tóxicas. Esta cepa possui o lisógeno do λ DE3 que carrega uma cópia cromossomal do gene T7 RNA polimerase que está sob o controle do promotor *lacUV*5.

3.4 Soros de pacientes com leptospirose

Os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose foram obtidos da coleção de soros do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. Duas amostras de soro correspondendo à fase aguda e à fase convalescente da infecção foram colhidas de 12 pacientes. Todos os pacientes foram hospitalizados com sintomas de leptospirose. Os dados referentes aos soros

⁽¹⁾As cepas de *Leptospira* foram gentilmente fornecidas pelo Dr Sílvio Arruda Vasconcellos, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

dos pacientes, títulos de MAT, início dos sintomas e sorovar infectante estão disponíveis na tabela 3.

3.5 Amplificação dos genes *hly*X, *lip*L32 e dos fragmentos, N-terminal, intermediário e C-terminal de LipL32

Os genes *hly*X e *lip*L32⁽²⁾ foram amplificados por PCR utilizando-se como molde o DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (linhagem Fiocruz L1-130). Para as amplificações foram utilizados 50 µl de reação contendo 20 mM de cada oligonucleotídeo, 200 mM de cada dNTP e cerca de 60 η g de DNA genônico, 1 µl de Platinum *Pfx* DNA polimerase 400 U/µl, tampão da *Pfx* DNA polimerase 1X (fornecido pelo fabricante pronto para uso) e 50 mM MgSO₄.

A reação de amplificação de *hly*X foi realizada com temperatura de desnaturação de 94 °C durante 7 min e 30 ciclos de: 94 °C por 30 s; 47 °C por 30 s; 68 °C de 2 min, finalizando com 68 °C durante 5 min. Para as reações de amplificação de *lip*L32 e seus fragmentos foi utilizada a mesma condição, ou seja, temperatura de desnaturação de 95 °C durante 3 min e 35 ciclos de: 95 °C por 30 s; 50 °C por 30 s; 68 °C de 1 min, finalizando com 68 °C durante 2 min.

Os fragmentos do gene *lip*L32 também foram amplificados por PCR, porém o DNA molde utilizado foi a construção *lip*L32/pGEM-T *easy*, obtida na subclonagem. Para a amplificação dos fragmentos do gene *lip*L32 que correspondem aos fragmentos protéicos de interesse, N-terminal, intermediário e C-terminal, foram utilizadas as mesmas condições de amplificação utilizadas para *lip*L32. Todos os oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação estão presentes na tabela 1.

Nas figuras 9 e 10 estão representadas as sequências nucleotídicas e de aminoácidos, nas quais estão demonstradas as regiões dos genes *hlyX*, *lipL32* e os fragmentos de *lipL32* (N-terminal, intermediário e C-terminal), respectivamente, que foram amplificadas e posteriormente clonados.

⁽²⁾ *lip*L32 está sendo novamente clonada para que possa ser expressa sem a fusão de seis histidinas no N-terminal. A ausência da cauda de histidina é importante em estudos de estrutura terciária.

seus fragmentos N-terminal, intermediario e C-terminal.					
Primers	Sequência				
HlyX _F	5'-TA <u>CTCGAG</u> GTGTATCAAACTACGATTCAAGAC-3' <i>Xho</i> I				
HlyX _R	5'-AA <u>GAATTC</u> TCAATCCAATTTTTCGGTTTCC-3' <i>Eco</i> RI				
LipL32 6xHis _F *	5'-CACCGGTGCTTTCGGTGGTCTG-3'				
LipL32 6xHis _R *	5' - ATTACTTAGTCGCGTCAGAAGC-3'				
LipL32 _F	5'- <u>CTCGAGCATATG</u> GGTGCTTTCGGTGGTCTG-3' XhoI NdeI				
LipL32 _R	5'-AA <u>GCTTAC</u> TTAGTCGCGTCAGAAGC-3' <i>Hind</i> II				
N-terminal _F	5'- <u>CTCGAGCATATG</u> GGTGCTTTCGGTGGTCTG-3' <u>XhoI NdeI</u>				
N-terminal _R	5'- <u>AAGCTT</u> TTAAGCGATTACGGCAGGAAT-3' <i>Hind</i> III				
Intermediário _F	5'- <u>CTCGAG</u> ATGGAAATGGGAGTTCGTATG-3' <i>Xho</i> I				
Intermediário _R	5'- <u>AAGCTT</u> TTAGATTCTAGTAAGAGAGTTGT-3' <i>Hind</i> III				
C-terminal _F	5'- <u>CTCGAG</u> ATGAAGATCCCTAATCCTCCA-3' <i>Xho</i> I				
C-terminal _R	5'- <u>AAGCTT</u> ACTTAGTCGCGTCAGAAGC-3' <i>Hind</i> II				

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes *hlyX*, *lipL32* 6xHis, *lipL32* e seus fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal.

_

*Oligonucleotídeos desenhados por Gamberini, *et al.*, 2005, com a inserção de 4 bases (CACC) "foward" com o objetivo de permitir a clonagem direcional no sistema *Gateway* (Invitrogen[®]). O produto de PCR gerado contendo as 4 bases (CACC) na região 5' é reconhecido por uma sequência "overhang" (GTGG) presente no vetor pENTR TOPO (vetor de subclonagem), sob a ação da topoisomerse, que anela as bases complementares adicionadas e estabiliza o produto de PCR na orientação correta.

	HlyX _F : 5'-TACTCGAGGTGTATCAAACTACGATTCAAGAC-3'										
	Xhol										
	1 21 25										
5 ′	M N R S I I L I T G F L F I C A G L L T A V Y Q T T I Q ATGAACCGTT CTATCATATT AATTACAGGA TTTTATTTA TCTGCGCCGG CCTTTTAACC GCAGTGTATC AAACTACGAT TCAAC TACTTGGCAA GATAGTATAA TTAATGTCCT AAAAATAAAT AGACGCGGCC GGAAAATTGG CGTCACATAG TTTGATGCTA AGTTC	D E ACGAA TGCTT	D S GATTCC CTAAGG	K 3 AAAC TTTG	3′						
5 '	Y R K N V L E K I K E G E E Y L K Q T N S K A A E K A V D I GAAAGAACGT TCTGGAAAAA ATTAAAGAAG GCGAGGAATA CTTAAAACAA ACCAATTCAA AAGCTGCAGA AAAGGCTGTG GATATA CTTTCTTGCA AGACCTTTTT TAATTTCTTC CGCTCCTTAT GAATTTTGTT TGGTTAAGTT TTCGACGTCT TTTCCGACAC CTATA	F .TTCT (.TAAGA	S E CTGAACT GACTTG	L S I TTC AAAG	3′						
5 ′	Y A R E I P E E H S F R V K Y D M G R A L E R N Q D S L L A CGCCAGAGAG ATTCCAGAAG AACATTCTTT CCGTGTTAAG TACGATATGG GAAGAGCACT TGAAAGAAAC CAAGATAGTC TTTTA GCGGTCTCTC TAAGGTCTTC TTGTAAGAAA GGCACAATTC ATGCTATACC CTTCTCGTGA ACTTTCTTTG GTTCTATCAG AAAAA	L .GCGCT 'CGCGA	G I GGGGAT CCCCTA	Y S TTAT AATA	3′						
5 '	Y R E L N Q K E G L S R D E R S K V A Y S M G N L L L Q L AGAGAATTAA ATCAAAAAGA AGGCCTTTCC AGAGACGAAC GCTCAAAAGT TGCGTATTCC ATGGGAAATC TTCTTTTACA ACTCA TCTCTTAATT TAGTTTTTCT TCCGGAAAGG TCTCTGCTTG CGAGTTTTCA ACGCATAAGG TACCCTTTAG AAGAAAATGT TGAGT	N R ATCGA TAGCT	D E GACGAA CTGCTT	E GAAG CTTC	3′						
5 '	Y G K G H L E E V L R I S A D S K L R S N A L S A I A D Y Y GAAAAGGTCA TTTAGAAGAG GTTCTTAGAA TTTCAGCGGA TTCTAAACTT CGTTCAAACG CGTTATCTGC AATTGCTGAC TATTA CTTTTCCAGT AAATCTTCTC CAAGAATCTT AAAGTCGCCT AAGATTTGAA GCAAGTTTGC GCAATAGACG TTAACGACTG ATAAT	M .TATGA ATACT	K K AAAAGG TTTTCC	G N S GAAA CTTT	3′						
5 '	Y D L S R K N Y V L A L Q E D P E N V K A R V R W G K S TTATGATCTT TCTCGCAAAA ATTACGTCCT CGCCCTCCAG GAAGATCCTG AAAATGTAAA AGCCAGAGTT CGTTGGGGAA AATCT AATACTAGAA AGAGCGTTTT TAATGCAGGA GCGGGAGGTC CTTCTAGGAC TTTTACATTT TCGGTCTCAA GCAACCCCTT TTAGA	L R TTACG AATGC	R M CAGAAT GTCTTA	G GGGT CCCA	3′						
5′	Y K D W S A Y D V Y D D Y A Q A G F Y F D P E K E K V S S AAGGATTGGT CCGCCTACGA TGTTTATGAC GATTACGCTC AAGCTGGATT CTACTTTGAT CCAGAAAAAG AAAAAGTAAG TTCCC TTCCTAACCA GGCGGATGCT ACAAATACTG CTAATGCGAG TTCGACCTAA GATGAAACTA GGTCTTTTC TTTTTCATTC AAGGC	E F AGTTT TCAAA	R S AGAAGT TCTTCA	G 3 GGTA CCAT	3′						
5′	Y I L E K A R Q L Y V R K Q Y Y G A I D T F K K A L D M G V TCTTAGAGAA AGCAAGACAA CTCTACGTTC GTAAACAGTA CTATGGCGCT ATCGATACTT TTAAAAAAGC CCTTGATATG GGCGT AGAATCTCTT TCGTTCTGTT GAGATGCAAG CATTTGTCAT GATACCGCGA TAGCTATGAA AATTTTTTCG GGAACTATAC CCGCA	S CAGCT .GTCGA	S K CGAAAG GCTTTC	A E CGGA GCCT	3′						
5′	Y E Q A L F Y I A E S Y E A I G K S D S A L Q Y L N R V L AGAACAAGCT TTGTTTTATA TTGCAGAAAG TTACGAAGCG ATTGGTAAAT CCGATTCCGC TCTTCAATAC CTAAATCGAG TTTTA TCTTGTTCGA AACAAAATAT AACGTCTTTC AATGCTTCGC TAACCATTTA GGCTAAGGCG AGAAGTTATG GATTTAGCTC AAAAT	G N .GGAAA CCTTT	Q D TCAAGA AGTTCT	G 3 TGGC ACCG	,						
5′	Y S L D Q T A L F R K G T I Y F K S G K Y E K A A A L F Q TCTTTAGATC AAACGGCTCT TTTTCGCAAA GGTACAATCT ATTTTAAAAG TGGTAAATAT GAAAAGGCTG CAGCCTTATT TCAAG AGAAATCTAG TTTGCCGAGA AAAAGCGTTT CCATGTTAGA TAAAATTTTC ACCATTTATA CTTTTCCGAC GTCGGAATAA AGTTC	E A AAGCC TTCGG	T D ACGGAT TGCCTA	к 3 АААТ ТТТА	,						
5 '	Y P D S P V G R K A S A W K K E S L D Q V E D N L H Y K Q ATCCGGATTC TCCCGTTGGT AGAAAGGCAA GCGCTTGGAA AAAAGAATCC TTGGATCAAG TGGAAGATAA TCTTCATTAC AAGCA TAGGCCTAAG AGGGCAACCA TCTTTCCGTT CGCGAACCTT TTTTCTTAGG AACCTAGTTC ACCTTCTATT AGAAGTAATG TTCGT	E .GGAAG CCTTC	D K ATAAAG TATTTC	E K AAAA TTTT	3′						
5 '	Y S K E D L E T E K L <mark>D</mark> # 3' AAGTAAAGAG GATCTAGAAA CCGAAAAATT GGATTGA TTCATTTCTC CTAGAT CTTT GGCTTTTTAA CCTAACT										
	HlyX _R : 3'- CTTTGGCTTTTTAACCTAACT<u>CTTAAG</u>AA -5' <i>Eco</i> RI										

Figura 9 – Sequência de nucleotídeos (1137 pb) e aminoácidos de HlyX (378 aa), e os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene. A sequência sinal predita pelo programa computacional SMART está sublinhada. A amplificação de *hlyX* foi realizada a partir da posição 22 aa, excluindo-se grande parte da provável sequência sinal.

N-terminal_F: 5'- CTCGAGCATATGGGTGCTTTCGGTGGTCTG-3' *Xho*I NdeI 21 1 5′ M K F S С FGGLP SLK SSFV3' Α А Α G Α TTTCGATTTT **GGC**TATCTCC GTTGCACTCT TTGCAAGCAT TACCGCTTGT GGTGCTTTCG GTGGTCTGCC AAGCCTAAAA AGCTCTTTTG ATGAAAAAAC TACTITITTE AAAGCTAAAA CCGATAGAGG CAACGTGAGA AACGTTCGTA ATGGCGAACA CCACGAAAGC CACCAGACGG TTCGGATTTT TCGAGAAAAC DTI 5' L S E PGT NETV KTL LPY GSVI NYY GYV KPGO 31 TTCTGAGCGA GGACACAATC CCAGGGACAA ACGAAACCGT AAAAACGTTA CTTCCCTACG GATCTGTGAT CAACTATTAC GGATACGTAA AGCCAGGACA AAGACTCGCT CCTGTGTTAG GGTCCCTGTT TGCTTTGGCA TTTTTGCAAT GAAGGGATGC CTAGACACTA GTTGATAATG CCTATGCATT TCGGTCCTGT intermediário_F: 5'- CTCGAGATGGAAATGGGAGTTCGTATG-3' **XhoI** 93 5′ APD G L V D G N K K A Y Y L Y VWIP A V A E M GVRM TSP3 Т AGCCCCCGGAC GGTTTAGTCG ATGGAAACAA AAAAGCATAC TATCTCTATG TTTGGATTCC TGCCGTAATC GCTGAAATGG GAGTTCGTAT GATTTCCCCA TCGCGGGCCTG CCAAATCAGC TACCTTTGTT TTTTCGTATG ATAGAGATAC AAACC**TAAGG ACGGCATTAG CGA**CTTTACC CTCAAGCATA CTAAAGGGGT N-terminal_R: 3'- TAAGGACGGCATTAGCGAATTTTCGAA-5' *Hind*III 51 TGE TGEPGDG D L V S D A F КАА TPE EKSM РНW FDT 3 ACAGGCGAAA TCGGTGAGGC AGGCGACGGA GACTTAGTAA GCGACGCTTT CAAAGCGGCT ACCCCAGAAG AAAAATCAAT GCCACATTGG TTTGATACTT TGTCCGCTTT AGCCACTCGG TCCGCTGCCT CTGAATCATT CGCTGCGAAA GTTTCGCCGA TGGGGTCTTC TTTTTAGTTA CGGTGTAACC AAACTATGAA 5'WIRVERMSAIMPDQIAKAAKPVQKLDDD D D G D 3 GGATCCGTGT AGAAAGAATG TCGGCGATTA TGCCTGACCA AATCGCCAAA GCTGCGAAAG CAAAACCAGT TCAAAAATTG GACGATGATG ATGATGGTGA CCTAGGCACA TCTTTCTTAC AGCCGCTAAT ACGGACTGGT TTAGCGGTTT CGACGCTTTC GTTTTGGTCA AGTTTTTAAC CTGCTACTAC TACTACCACT C-terminal_F: 5'- CTCGAGATGAAGATCCCTAATCCTCCA-3' *Xho*I 185 R H N K LTR I <mark>K</mark> I P N P P K S F 5'D T Y KEE Y N S DDLK NTD 3' CGATACTTAT AAAGAAGAGA GACACAACAA GTACAACTCT CTTACTAGAA TCAAGATCCC TAATCCTCCA AAATCTTTTG ACGATCTGAA AAACATCGAC GCTATGAATA TTTCTTCTCT CTGTGTTGTT CA**TGTTGAGA GAATGATCTT AG**TTCTAGGG ATTAGGAGGT TTTAGAAAAAC TGCTAGACTT TTTGTAGCTG intermediário_R: 3'- тдттдададаатдатстт адаттттсдаа- 5' *Hind*III L L V R G L Y R I S F Т Т Ү K P G E V K GSFV A S V G L L 31 5' Т к к ACTAAAAAAC TTTTAGTAAG AGGTCTTTAC AGAATTTCTT TCACTACCTA CAAACCAGGT GAAGTGAAAG GATCTTTCGT TGCATCTGTT GGTCTGCTTT TGATTTTTTG AAAATCATTC TCCAGAAATG TCTTAAAGAA AGTGATGGAT GTTTGGTCCA CTTCACTTTC CTAGAAAGCA ACGTAGACAA CCAGACGAAA A A E E S L K K A A 3 5'F P P G I P G V S P LIHS NPE ELO KOAI TCCCACCAGG TATTCCAGGT GTGAGCCCGC TGATCCACTC AAATCCTGAA GAATTGCAAA AACAAGCTAT CGCTGCTGAA GAGTCTTTGA AAAAAGCTGC AGGGTGGTCC ATAAGGTCCA CACTCGGGCG ACTAGGTGAG TTTAGGACTT CTTAACGTTT TTGTTCGATA GCGACGACTT CTCAGAAACT TTTTTCGACG 272 51 SDA т <mark>к</mark> # 3' TTCTGACGCG ACTAAGTAA AAGACTGCGC TGATTCATT C-terminal_R: 3'- AAGACTGCGCTGATTCATTCGAA-5' HindIII

Figura 10 – Sequência de nucleotídeos (819 pb) e aminoácidos (272 aa) de LipL32, e os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações de LipL32 e seus fragmentos. Na figura pode ser visualizado o esquema de amplificação de *lipL32* e seus fragmentos, N-terminal, intermediário e C-terminal. Para *lipL32* a amplificação foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos a partir da posição 21 aa, excluindo-se a região do *"lipobox"*, que termina na cisteína. Para o mapeamento de LipL32, foram desenhados três pares de oligonucleotídeos. Foram amplificados segmentos de DNA correspondentes a região N-terminal, aminoácidos 21 a 92 aa, para a região do fragmento intermediário de 93 a 184 aa e para a região C-terminal de 185 a 272 aa.

3.6 Subclonagem dos produtos da PCR

Para a subclonagem, os produtos da PCR foram ligados nos vetores disponíveis no laboratório. O produto da amplificação de *hly*X foi ligado ao vetor pCR^R4Blunt–TOPO e os demais produtos, *lipL32* e seus fragmentos, foram ligados no vetor pGEM-T *easy*. Para a reação de ligação dos insertos aos vetores de subclonagem, os produtos de PCR foram submetidos a uma migração eletroforética em um gel de agarose 1%, tampão TAE 1X e brometo de etídio 0,5 g/L (Sambrook, *et al.*, 1989). Após a migração, as bandas referentes aos fragmentos amplificados foram purificadas do gel utilizando-se o kit "GFXTM Gel Band Purification" (GE HealthCare[®]). Após a purificação das bandas, somente *hlyX* pôde ser submetido à reação de ligação no vetor pCR^R4Blunt–TOPO. Os demais insertos precisaram ser submetidos a uma reação de adenilação, pois o vetor pGEM-T *easy*, no qual foram ligados, é fornecido pelo fabricante na forma linear, com um resíduo de timidina nas extremidades 3'. Diferentemente da *Taq* polimerase que faz a adenilação na extremidade 3', a Platinum Pfx DNA polimerase, não apresenta esta atividade, requerendo esta reação adicional.

3.6.1 Reação de adenilação

Para cada reação de 50 μ l foram utilizados cerca de 50 η g de *lip*L32 e seus fragmentos correspondentes ao N-terminal, intermediário e C-terminal, tampão da *Taq* polimerase 1X, MgCl₂ 50 mM, dATP 20 mM, 2 unidades (U) de *Taq* polimerase e 0,5 μ l de H₂O. As reações de adenilação foram realizadas a 72 °C por 30 min, utilizando-se um termociclador.

3.6.2 Reação de ligação

Cerca de 50 η g de *hly*X , *lip*L32 e seus fragmentos foram incubados a 16 °C por 16 horas com 25 η g do pCR^R4Blunt–TOPO para *hly*X e 25 η g do vetor pGEM-T para os insertos adenilados, 1 μ L de T₄ DNA ligase 400 U/ μ L (Invitrogen[®]) na presença da solução tampão fornecida pelo fabricante da enzima num volume total de 20 μ L.

3.7 Transformação de bactérias competentes

As bactérias *E. coli* quimiocompetentes (competência por Ca²⁺) foram preparadas de acordo com o protocolo previamente descrito (Sambrook, *et al.*, 1989). Foram adicionados a 50 μ l de bactérias competentes *E. coli* DH5 α , 20 μ l do produto da reação de ligação. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e em seguida submetida a choque térmico de 42 °C por 2 minutos. Após 5 minutos no gelo, adicionaram-se 300 μ l de meio 2YT e deixou-se incubando a 37 °C por 50 minutos. O volume total dessa mistura foi dividida e plaqueada em meio sólido (2YT-ágar) contendo 100 μ g/ml de ampicilina. As placas contendo as bactérias com plasmídeo foram incubadas por 16 horas a 37 °C.

3.8 Análise dos clones positivos através de extração com fenol-clorofórmio

Os clones resistentes a ampicilina foram selecionados e inoculados em 3 ml de meio 2YT contendo ampicilina. Retirou-se uma alíquota de 200 μ l de cultura, crescida por 16 horas. Centrifugou-se por 4 minutos a 13.400 X g e descartou-se o meio de cultura. Adicionou-se ao precipitado bacteriano 40 μ l de Ficoll Dye 2x, 15 μ l de uma solução 1:1 de fenol:clorofórmio (V/V). A mistura foi agitada por 1 minuto e centrifugada por 1 minuto a 13.400 X g. Foram aplicados em um gel de agarose 1% (m/V) 10 μ l do sobrenadante dessa mistura, contendo DNA genômico e plasmidial e RNA.

A banda do plasmídeo do controle negativo (plasmídeo sem inserto) deve ter maior mobilidade que os plasmídeos dos clones positivos, devido à diferença de massa molecular entre eles. Portanto, os clones que migraram menos em relação ao controle negativo, foram escolhidos para serem purificados (Beuken, *et al.*, 1998). Após a purificação dos plasmídeos estes foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia (Sanger, *et al.*, 1977), usando o sequenciador de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems do Brasil) ou submetidos a análise de restrição com endonucleases.

3.8.1 Purificação dos plasmídeos

Para a purificação dos plasmídeos a partir dos clones positivos foram utilizados os mesmos cultivos, usados para a pesquisa de clones positivos. A fração de cultura restante contendo os clones positivos escolhidos foi aliquotada e o precipitado bacteriano foi obtido

por centrifugação com posterior descarte do meio. As etapas subseqüentes foram realizadas usando o kit "Promega's Wizard Plus Miniprep" conforme instruções do fabricante.

3.9 Clonagem no vetor de expressão

Para a clonagem dos insertos no vetor pAE, foi necessário submeter os plasmídeos positivos e o vetor pAE vazio à digestão com enzimas de restrição que "flanqueiam" os insertos de interesse. Para *hlyX* foi realizada a digestão do clone positivo obtido da subclonagem e do vetor pAE vazio com as enzimas de restrição *XhoI* e *Eco*RI, inseridas pelo *primer foward* e *primer reverse*, respectivamente. Os fragmentos do gene *lipL32*, N-terminal, intermediário e C-terminal foram todos desenhados com oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição *XhoI* no *primer foward* e *Hind*III no *primer reverse*, portanto o produto destas subclonagens foram digeridos com estas enzimas, assim como o pAE vazio.

Com relação a *lipL32*, o *primer foward* foi desenhado com dois sítios de restrição para permitir que a proteína pudesse ser clonada com e sem a sequências codificadora das seis histidinas presentes no vetor pAE. Portanto, o *primer foward*, possui os sítios *XhoI* e *NdeI*, em virtude do vetor pAE possuir no sítio mútiplo de clonagem (MCS) a sequência nucleotídica CATATG (*NdeI*). Desta forma, *lipL32/pGEM-T easy* e o vetor pAE vazio foram digeridos com as enzimas *XhoI* e *Hind*III, esta última adicionada pelo *primer reverse* ao produto de PCR. Os produtos das digestões com as endonucleases foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose 1%, para cortar a banda relativa ao fragmento linearizado com o tamanho esperado. Foram realizados novamente os passos 3.6.2 (ligação dos insertos agora no vetor de expressão) e 3.7. A confirmação das clonagens no pAE foi feita através da comparação da mobilidade, por eletroforese em gel de agarose, dos plasmídeos e do vetor pAE vazio (Beuken, *et al.*, 1998), como descrito no item 3.8.

Os DNAs de alguns clones de cada construção foram purificados e seqüenciados com oligonucleotídeos adequados para verificar se a clonagem ocorreu do modo esperado. Após a confirmação dos clones positivos com as diferentes construções estas foram transformadas em cepas de *E. coli* utilizadas para expressão de proteínas. A construção *lip*L32/pAE precisou ainda ser submetida a uma nova digestão com a enzima *Nde*I para a remoção das seis histidinas presentes na construção.

3.10 Expressão das proteínas recombinantes em E. coli

3.10.1 Expressão de LipL32 6xHis, LipL32 e do fragmento C-terminal de LipL32 em E. coli BL21 (SI)

Bactérias competentes *E. coli* BL21(SI) foram transformadas com as construções *lip*L32/pDEST17, *lip*L32/pAE ou C-terminal_*lip*L32/pAE, semelhantemente ao realizado com a linhagem bacteriana DH5 α , exceto pelo fato de que tanto em meio sólido (2YTONágar-amp) quanto em meio líquido (2YTON-amp), a linhagem bacteriana (SI) cresceu a 30° C em meio sem NaCl, pois este é o indutor do promotor desta cepa de expressão. Foi escolhida uma das inúmeras colônias resistentes à ampicilina e esta foi inoculada em 50 ml de meio líquido 2YTON (meio 2YT sem NaCl) contendo 100 µg/ml de ampicilina (2YTON-amp), incubada a 30 °C por 16 horas sob agitação. Os 50 ml de cultura crescida durante 16 h (préinóculo) foram adicionados em 1 litro de meio 2YTON e crescidos a 30 °C sob agitação.

Quando a OD₆₀₀ atingiu 0,6 (aproximadamente 3 horas de crescimento), aliquotou-se 1 1 ml de cada cultura (para análise do ponto não induzido por SDS-PAGE) e em seguida foi adicionado 300 mM NaCl na cultura de células. Procedeu-se então a uma incubação de 3 horas a 30 °C sob agitação. Foi aliquotado 1 ml de cada cultura para o ponto induzido ser analisado por eletroforese. As amostras de 1 ml que foram aliquotadas para a verificação da expressão foram centrifugadas para a remoção do meio de cultura e ressuspendidas em 100 µl de água e 25 µl de tampão SDS 5X. As amostras foram agitadas vigorosamente e os extratos gerados foram aquecidos a 96 °C por 30 minutos para a degradação do DNA genômico bacteriano. Os lisados foram analisados por SDS-PAGE 15% para as construções *lipL32/pDEST17 e lipL32/pAE*. Para a construção C-terminal_*lipL32/pAE*, os lisados foram analisados por SDS-PAGE 18%. As culturas de 1 litro de células foram centrifugadas por 10 minutos a 3786 X g e os precipitados bacterianos obtidos foram ressuspendidos em 100 ml de tampão 150 mM Tris-HCl, pH 8.0, agitados vigorosamente até a homogeneização, e logo em seguida congelados a –20 °C para facilitar o rompimento das células bacterianas. Após o descongelamento das misturas, estas foram lisadas por pressão no French Pressure[®].

Os lisados foram centrifugados, para separar a fração solúvel e insolúvel de proteínas. Em todas as expressões das construções realizadas somente a fração solúvel foi coletada, os corpúsculos de inclusão foram descartados.

3.10.2 Expressão de LipL32 com selênio-metionina (Se-M) em meio mínimo (M9 ON)

Para a expressão de LipL32 contendo metioninas marcadas com selênio, bactérias competentes *E. coli* BL21(SI) contendo o plasmídeo *lip*L32/pAE foram crescidas em 5 ml de meio 2YT ON contendo 100 μ g/ml por 16h a 30 °C (pré-inóculo). Após 16h de cultivo, o pré-inóculo foi centrifugado a 8.400 X g por 5 min. O precipitado bacteriano foi ressuspendido em 1 ml de meio M9 (meio mínino) ON (sem NaCl) e então adicionaram-se 500 μ l da supensão bacteriana para cada 1 litro de meio de cultura M9 sem sal, contendo 100 μ g/ml, que foi cultivado a 30 °C sob agitação. Quando a OD₆₀₀ atingiu 0,8 (aproximadamente 17 horas de crescimento), adiciononaram-se às culturas 100 mg/ml de lisina (Sigma), 100 mg/ml de fenilalanina (Sigma), 100 mg/ml de treonina (Sigma), 50 mg/ml de valina (Sigma) e 60 mg/ml de selênio-metionina (Sigma). Após 15 min da adição dos aminoácidos, foi adicionado 300 mM de NaCl na cultura de células. Procedeuse então a uma incubação de 3 horas a 30 °C sob agitação. Os passos subsequentes foram realizados de forma semelhante ao realizado no item 3.10.1.

3.10.3 Expressão de HlyX e dos fragmentos N-terminal e intermediário de LipL32 em E.coli BL21(DE3) Star [plysS]

Bactérias competentes *E.coli* BL21(DE3) Star [plysS] foram transformadas com as construções *hlyX/pAE*, N-terminal_*lipL32/pAE* ou intermediário_*lipL32/pAE*.

A transformação nas células competentes foi realizada de forma semelhante a da linhagem bacteriana DH5 α , apenas com a exceção da forma pela qual as colônias foram selecionadas, pois a seleção neste caso deve ser baseada na resistência à ampicilina e ao cloranfenicol. A colônia escolhida foi inoculada em 50 ml de meio líquido 2YT contendo 100 µg/ml de ampicilina e 30 µg/ml cloranfenicol, incubada a 37 °C por 16 horas sob agitação. A cultura crescida por 16h (pré inóculo) foi adicionada para 1 litro de cultura 2YT e crescida a 37 °C sob agitação. Os passos subsequentes da expressão e tratamento final da cultura e precipitado bacteriano foram realizados de forma semelhante à realizada no item 3.10.1, com a única exceção de que o indutor adicionado quando a OD₆₀₀ atingiu 0,6 foi 1,2 mM de IPTG.

O tratamento do precipitado bacteriano foi posteriormente tratado para a separação do sobrenadante, lavagem dos corpúsculos de inclusão com as soluções 1 M e 8 M uréia (lavagem e solubilização das proteínas insolúveis, respectivamente). As proteínas HlyX e o

fragmento N-terminal de LipL32 foram expressas em sua maior parcela em forma de corpúsculos de inclusão (proteínas insolúveis). Já o fragmento intermediário de LipL32 foi encontrado na fração solúvel.

3.11 Purificação das proteínas recombinantes

3.11.1 Purificação da proteína HlyX após renaturação protéica

Os corpúsculos de inclusão, obtidos através do tratamento do precipitado bacteriano, foram lavados primeiramente com 20 ml de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol e 1 M uréia (solução 1 M uréia). Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados por 16 horas em 20 ml de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol, 8 M uréia (solução 8 M). Para a renaturação protéica foi utilizada uma solução de 4 litros contendo 50 mM de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 500 mM NaCl e 5 mM imidazol (solução de renaturação proteíca), onde foram gotejados os 20 ml da solução 8 M uréia, contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados. Após o gotejamento da solução, os 4 litros de solução de renaturação ficaram durante 16h a 18 °C.

Para a purificação de HlyX foi utilizada a cromatografia de afinidade a metais bivalentes, pelo fato da proteína possuir uma cauda de seis histidinas adicionadas pelo vetor de expressão pAE, na sua porção N-terminal. A coluna (1 cm de diâmetro) contendo 5 ml da resina *chelating sepharose* (GE HealthCare[®]) foi preparada com uma solução 300 mM NiSO₄, lavada com 10 ml de H₂O para a remoção do excesso da solução de níquel e posteriormente equilibrada com o tampão de equilíbrio (solução de renaturação protéica). A solução foi então adsorvida pela coluna, com o auxílio da bomba peristáltica, com fluxo de 3,5 ml/min. Com o propósito de remover HlyX da coluna cromatográfica, esta foi lavada com incrementos na concentração de imidazol. Foram realizadas lavagens com soluções contendo 5, 20, 40 e 60 mM imidazol em 150 mM Tris-HCl, pH 8,0. Após as lavagens a proteína foi eluída da coluna com 25 ml de uma solução contendo 1 M imidazol em 150 mM Tris-HCl, pH 8.0. A presença de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE 15%.

As lavagens e frações eluídas nas quais encontrou-se proteína foram dialisadas em 2 litros de solução de 150 mM Tris-HCl, pH 8,0. As soluções de diálise foram renovadas a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos, para que todo o imidazol fosse removido, e a solução de diálise equilibrada com a amostra.

3.11.2 Purificação dos fragmentos de LipL32 e de LipL32 6xHis, através de cromatografia de afinidade a metais bivalentes

Purificação do fragmento N-terminal de LipL32 em condições desnaturantes

O tratamento do sedimento bacteriano da expressão do fragmento N-terminal de LipL32 foi realizado de forma similar ao item 3.11.1. Os 20 mL da solução 8 M uréia contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados foram adsorvidos pela coluna cromatográfica de dimensões e resina iguais ao item 3.11.1, previamente carregada com uma solução 300 mM NiSO₄, e equilibrada com a solução de equilíbrio na qual o sedimentado bacteriano foi solubilizado, que neste caso foi a solução 8 M uréia. Todo o volume da solução contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados foi passado pela resina da coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 1,0 ml/min. Com o propósito de remover proteínas contaminantes de *E. coli* da coluna, esta foi lavada com incrementos na concentração de imidazol. Foram realizadas lavagens com 10 volumes de soluções contendo 5, 20, 40 e 60 mM imidazol, 8 M uréia e 150 mM Tris-HCl pH 8,0. Após as lavagens foram utilizados 25 ml de uma solução contendo 1 M imidazol, 8 M uréia e 150 Tris-HCl pH 8,0 para a eluição do fragmento N-terminal. A presença de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE 18%. As lavagens e frações eluídas nas quais encontrou-se proteína foram agrupadas e armazenadas a 4 °C.

Purificação dos fragmentos intermediário e C-terminal da proteína LipL32 e LipL32 6xHis

Os sobrenadantes obtidos através do tratamento dos sedimentados bacterianos das expressões dos fragmentos intermediário e C-terminal de LipL32 e de LipL32 6xHis foram adsorvidos pela mesma coluna cromatográfica do item anterior, previamente carregada com uma solução 300 mM NiSO₄, e equilibrada com as soluções de equilíbrio na qual os sedimentados bacterianos foram homogeneizados, 150 mM Tris-HCl pH 8,0. Todo o volume das soluções de sobrenadante (100ml) foi passado pela resina da coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 1,0 ml/min. Com o mesmo objetivo de remover proteínas contaminantes de *E. coli* da coluna realizados na purificação da proteína HlyX e do fragmento N-terminal de LipL32, em cada purificação a coluna foi lavada com incrementos na concentração de imidazol. Foram realizadas lavagens com 10 volumes das soluções contendo

5, 20, 40 e 60 mM imidazol em 150 mM Tris-HCl pH 8,0. Após as lavagens as proteína foram eluídas da coluna com 25 ml de uma solução contendo 1 M imidazol na mesma solução das lavagens. A presença das proteínas recombinantes foi observada por SDS-PAGE 18% para os fragmentos de LipL32 e SDS-PAGE 15% para LipL32 6xHis, devido à diferença das massas moleculares dos fragmentos e da proteína inteira. As lavagens e frações eluídas nas quais foram encontradas as proteínas foram dialisadas em 2 litros de solução de diálise (150 mM Tris-HCl pH 8,0). As soluções de diálise foram renovadas a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos, para que todo o imidazol fosse removido, e a solução de diálise equilibrada com a amostra. Após a diálise as proteínas purificadas foram armazenadas a -20 °C.

3.11.3 Purificação de LipL32 e LipL32 Se-M

Para purificar as proteínas LipL32 e LipL32 Se-M, ambas sem a cauda de histidina, foram utilizadas as mesmas técnicas cromatográficas descritas abaixo.

Cromatografia de troca iônica

O sobrenadante do lisado bacteriano obtido na expressão foi adsorvido pela coluna (1 cm de diâmetro) cromatográfica de troca iônica preeenchida com 5 ml da resina aniônica Q-Sepharose (GE HealthCare[®]), previamente equilibrada com uma solução 20mM trietanolamina, pH 7,8 (solução de equilíbrio) na qual o precipitado bacteriano foi homogeneizado. Todo o volume da solução de sobrenadante (100 ml) foi passado pela coluna cromatográfica com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 1,0 ml/min. Após a passagem pela troca aniônica, a fração não adsorvida foi submetida a uma cromatografia catiônica SP-Sepharose (GE HealthCare[®]), utilizando-se uma coluna de iguais dimensões e volume de resina e equilibrada com a mesma solução mencionada acima. Todo o volume da solução da fração não adsorvida pela cromatografia aniônica (100ml) foi passado pela resina da coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 1,0 ml/min. Para remover LipL32 da coluna, esta foi submetida a um gradiente crescente e descontínuo de NaCl. Foram realizadas lavagens com soluções contendo 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 M NaCl em solução 20 mM trietanolamina, pH 7,8. A presença de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE 15% e as alíquotas nas quais foram encontradas menos contaminantes foram separadas para outra etapa cromatográfica.

Cromatografia hidrofóbica

A cromatografia hidrofóbica foi utilizada para que os demais contaminantes remanescentes da purificação catiônica fossem eliminados da preparação. As amostras mais purificadas foram reunidas e NaCl foi adicionado já que a cromatografia hidrofóbica baseia-se no efeito "salting-out". As amostras passaram a ter uma concentração de 3 M NaCl para que LipL32 fosse adsorvida pela resina *Phenyl-Sepharose* (GE HealthCare[®]). A coluna cromatográfica de 1 cm de diâmetro, contendo 5 ml da resima Phenyl sepharose, foi previamente equilibrada com uma solução 3 M NaCl, 20 mM trietanolamina, pH 7,8. Todo o volume da amostra foi passado pela resina da coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 1,0 ml/min. A remoção de LipL32 da coluna, foi realizada utilizando-se um gradiente decrescente e descontínuo de NaCl. Foram realizadas coletas com soluções contendo 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,7, 0,5, 0,3, 0,1 M NaCl em solução 20 mM trietanolamina, pH 7,8. Foram também realizadas coletas com 20 mM trietanolamina, pH 7,8 e H₂O. A presença de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE 15%. As amostras eluídas nas quais encontrou-se a proteína purificada foram dialisadas em 2 litros de solução de diálise (20 mM trietanolamina, pH 7,8). As soluções de diálise foram renovadas a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos, para que todo o NaCl fosse removido, e a solução de diálise equilibrada com a amostra. Após a diálise as amostras foram armazenadas a 4 °C.

3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas de acordo com protocolos previamente descritos (Laemmli, 1970; Sambrook, *et al.*, 1989). Os géis de poliacrilamida utilizados possuíam 5% de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 15% ou 18% no gel de resolução para LipL32 e HlyX ou fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal de LipL32, respectivamente, preparados a partir de uma solução de acrilamida 29% (m/V) e bis-acrilamida 1% (m/V). As eletroforeses foram realizadas a 25 mA por gel em tampão trisglicina 1X. Os géis de resolução foram corados com solução corante, por 16 h a temperatura ambiente, descorados com solução descorante, incubados com solução secante, e envolvidos em papel celofane para secagem.

3.13 Dicroísmo Circular

A caracterização da estrutura secundária das proteínas HlyX, LipL32 6xHis e LipL32 foi realizada através de dicroísmo circular, utilizado-se o espectropolarímetro modelo J-810 (Jasco *Inc.*) conectado ao sistema *Peltier Jasco PFD-425S* para o controle de temperatura. Foram mensurados comprimentos de onda de 190 a 260 nm, utilizando-se célula de quartzo com 1 mm de caminho óptico, por nove vezes consecutivas, a temperatura de 20° C, em intervalo de 0,5 em 0,5 nm, e velocidade de 50 nm/min.³

Para o ensaio a proteína HlyX encontrava-se na concentração de 10 μM em 10 mM tampão fosfato, pH 7,4 e as proteínas LipL32 6xHis e LipL32 em uma concentração 10 μM em 10 mM TrisHCl, pH 8,0. A concentração de proteínas foi estimada através de leitura óptica de 280 nm, considerando-se os coeficientes de extinção molar de LipL32 6xHis (34990 M⁻¹cm⁻¹), LipL32 (27681 M⁻¹cm⁻¹) e HlyX (46510 M⁻¹cm⁻¹), baseados na seqüência de aminoácidos da proteína recombinante esperada ou também através de comparação densitométrica com uma curva de BSA (*Bovine Serum Albumin*) em SDS-PAGE.

3.14 Ensaios de Western blot

Para os ensaios de *immunoblotting* foi necessária a geração de anticorpos contra as proteínas purificadas, a produção de extratos de diferentes cepas de *Leptospira* e a obtenção de soros de pacientes⁽⁴⁾ com leptospirose confirmada.

3.14.1 Produção de anticorpos gerados contra as proteínas purificadas

Seis grupos de camundongos, cada grupo contendo 10 animais, Balb/C fêmeas de 5 a 8 semanas foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de HlyX, LipL32 6xHis, fragmento N-terminal, intermediário e C-terminal ou LipL32 e incorporadas em Al(OH)₃. As imunizações foram realizadas em um período de 4 semanas, com reforço de doses toda a semana. Os camundongos foram sangrados pelo plexo retrorbital, uma vez a cada semana e o sangue foi incubado por 30 min a 37 °C. Logo em seguida, o sangue foi acondicionado por 30

⁽³⁾ O espectropolarímetro, pertencente ao Laboratório de Biofísica Molecular, Departamento de Química, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof. Dr. Richard John Ward foi gentilmente emprestado para que fossem realizadas as análises de estrutura secundária.

⁽⁴⁾ Os soros de pacientes com leptospirose fazem parte da coleção de soros sob responsabilidade da Dra Eliete Caló Romero, do Instituto Adolfo Lutz

min a 4 °C para a retenção do coágulo. Em seguida, o coágulo foi removido, procedeu-se à centrifugação, o soro foi coletado do sobrenadante e armazenado a -20 °C.

3.14.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram utilizadas placas de microtítulo (Maxisorp-NUNC[®]) cujos poços foram revestidos com 1µg/mL de cada proteína purificada em 0,05 M de tampão carbonatobicarbonato, pH 9,6 a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com 0,05% Tween 20/ Tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS-T). Foram adicionados 100 µl de tampão de bloqueio (10% leite desnatado Molico[®] em PBS-T), e a placa foi incubada a 37 °C durante 1h. Após a remoção do tampão de bloqueio com três lavagens de PBS-T, diluições dos soros contendo anticorpos gerados em camundongos contra as proteínas purificadas, em 1% de albumina de soro bovino (BSA) e tampão PBS-T foram adicionados à placa contendo a proteína correspondente ao soro. As placas foram incubadas a 37 °C por 1h. Após as lavagens, diluições apropriadas de anti-IgG de camundongo gerada em cabra conjugada a peroxidase (Sigma) foram adicionadas às placas e incubadas durante 1h a 37 °C. As placas foram reveladas pela adição de 100 µl de uma solução contendo 8 mg de OPD em 20 ml de tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0 na presença de 10 µl of H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de 4 M H₂SO₄, e absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 492 nm.

3.14.3 Western blot

As proteínas recombinantes e extratos de *Leptospira* (descritos no item 3.4) foram fracionados em SDS-PAGE 15% e 18 % e eletrotransferidos a 350 mA para membranas de nitrocelulose em solução tampão de transferência, através de sistema de transferência úmida Biorad (Biorad Biosystems). As membranas foram incubadas com 10% (m/V) de leite desnatado Molico[®] em PBS-T, e após três lavagens de 10 min com PBS-T, elas foram incubadas com diluições adequadas de anticorpos policlonais anti-HlyX, anti-LipL32 6xHis, anti-N-terminal, anti-intermediário, anti-C-terminal e anti-LipL32, produzidos em camundongos, em leite desnatado Molico[®]-PBS-T 5% por 1h 30 min.

Seguindo uma repetição de lavagens com PBS-T como descrito acima, as membranas foram incubadas com diluições apropriadas de anti-IgG de camundongo gerada em cabra

conjugada a peroxidase (Sigma) em 5% leite desnatado Molico[®]-PBS-T por 1h, lavadas e reveladas com reagente ECL (GE Healthcare). Alternativamente, 2 μ g de HlyX, LipL32 6xHis e seus fragmentos foram fracionadas em 15% e 18% SDS-PAGE, transferidos e incubados com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose (fase aguda e fase covalescente). Para estes blots foram utilizados anticorpos anti-IgM (cadeia μ -específico) e anti-IgG (cadeia δ -específico) de humanos gerados em cabra conjugados a peroxidase (Sigma).

3.15 Ensaio de ligação das proteínas LipL32 6xHis e HlyX a componentes de matriz extracelular

Os ensaios de ligação foram realizados segundo um protocolo já descrito (Cameron, 2003), com algumas modificações. Placas de ELISA com superfícies altamente aderentes (*Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface*) foram revestidas com 1 µg de laminina, colágeno Tipo I, colágeno Tipo IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática, e fetuína (controle negativo, proteína glicosilada) diluídos em 100 µl de PBS. As placas foram mantidas a 37 °C por 2h. Os poços foram lavados três vezes com PBS-0,05% Tween 20 (PBST). O bloqueio foi feito com 200 µl de BSA 1% por 1h a 37 °C, seguido de uma incubação a 4 °C por toda a noite.

Um micrograma de proteína recombinante diluída em PBS foi adicionado a cada poço. Após um período de incubação de 1h30min a 37 °C, os poços foram lavados seis vezes com PBST. As proteínas aderidas foram detectadas pela adição de anti-soros correspondentes produzidos em camundongos em diluições 1:10.000 seguida de uma incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5.000). Após três lavagens com PBST, foi adicionado OPD (0,04%) diluído em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) e 0,01% de H₂O₂. Após 15 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 8 M. A absorbância a 492 nm foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

Para as análises estatísticas, a ligação de HlyX e LipL32 aos componentes de matriz extracelular foi comparada às suas ligações com fetuína (controle negativo) através do teste t de Student. Nos experimentos de dose-dependência, LipL32 6xHis e os fragmentos intermediário e C-terminal foram adicionados em concentrações variando-se de 0 a 4µM em

100 μl de PBS em poços revestidos com fibronectina plasmática, seus fragmentos ligantes de heparina (F30) e gelatina (F45) e colágeno tipo IV.

Para os experimentos de dose-dependência de ligação de HlyX a fibronectina plasmática, F30 e colágeno tipo IV, as concentrações variam de 0 a 2 μ M. Ensaios de competição envolvendo F30, F45 e colágeno tipo IV foram realizados variando-se a concentração dos fragmentos C-terminal e intermediário de 0 a 7 μ M na presença de 1,5 μ M de LipL32 6xHis. Para avaliar se moléculas de heparina (Liquemine, Roche[®]) e de gelatina (Sigma) poderiam competir pelos domínios de ligação da fibronectina plasmática, F30 e F45, respectivamente, com LipL32 6xHis e o fragmento C-terminal, incubou-se 2 μ M de proteína recombinante na presença de heparina (0 a 500 UI) ou gelatina (0 a 50 μ g). A competição entre HlyX e heparina pela ligação ao domínio F30 também foi realizada com uma concentração fixa de 2 μ M de HlyX na presença de concentrações crescentes de heparina (0 a 500 UI). A detecção das proteínas aderidas foi realizada como descrito anteriormente, no ensaio de ligação das proteínas recombinantes aos componentes de matriz extracelular.

3.16 Ensaios de imunização e desafio animal

3.16.1 Ensaios de imunização ativa com as proteínas LipL32 e/ou HlyX e desafio homólogo em hamster

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) recém-desmamados fêmeas pesando entre 80 a 120 g foram divididos em 5 grupos de 10 animais. Os grupos foram imunizados duas vezes em intervalos de 2 semanas com injeções subcutâneas de 50 μ g de LipL32 recombinante, 50 μ g de HlyX recombinante, uma combinação de HlyX e LipL32 (50 μ g de cada), 50 μ g do fragmento C-terminal de LigA (resíduos de aa 817-1224 aa), bacterina (108 células/dose) ou salina, usando nas preparações hidróxido de alumínio como adjuvante (para cada 1 μ g de proteína recombinante, 10 μ g Al⁺³). A preparação da bacterina foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Silva e colaboradores (2007). Para a obtenção de soro, o sangue foi coletado do plexo retrorbital dos animais nos dias 0 (pré-imune) e 30.

Os animais vacinados foram desafiados intraperitonealmente com aproximadamente 10^5 leptospiras (*L. interrogans* sorovar Copenhageni, linhagem ATCC BAA-1198). O número de leptospiras injetadas nos hamsters vacinados para o desafio animal foi estimado a partir do cálculo da LD₅₀ (aproximadamente 170 leptospiras). Para o cáculo foram preparados inóculos

contendo diluições do macerado do fígado dos hamsters infectados necropsiados cultivados em meio EMJH enriquecido em uma temperatura de 28 °C. Após cultivo de 2 semanas, os inóculos contendo as diferentes diluições foram injetados em grupos de animais sadios para verificação da diluição mínima capaz de levar ao óbito 50% dos animais infectados (DL_{50}). O cálculo da LD_{50} foi baseado no método de Reed-Muench (Reed e Muench, 1938).

Após o desafio a sobrevivência foi monitorada e animais que sobreviveram até o dia 58 foram sacrificados e tiveram seus fígados coletados para análise quanto à presença de leptospiras, através do cultivo do macerado do fígado cultivado em meio EMJH enriquecido a 28 °C.

3.16.2 Determinação dos títulos de anticorpos IgG gerados contra LipL32 e HlyX

Foram utilizadas placas de microdiluição (Maxisorp-NUNC) que foram incubadas a 4 °C com 1µg/poço de LipL32, HlyX e fragamento C-terminal de LigA purificadas em 0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. As placas foram lavadas três vezes com 0,05% Tween 20/Tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS-T). Adicionou-se 100 µl de tampão de bloqueio (10% leite desidratado sem gordura em PBS-T), e as placas foram incubadas a 37 °C durante 1h. Após a remoção do tampão de bloqueio com três lavagens de PBS-T, diluições de soros coletados dos animais imunizados como descrito no item anterior, em 1% BSA e tampão PBS-T, foram adicionadas às placas que foram incubadas a 37 °C por 1h. Após as lavagens, diluições apropriadas de anticorpo monoclonal anti-IgG de Hamster gerado em cabra conjugada a peroxidase (Sigma) ou anticorpo policlonal anti-IgG de Hamster gerado em coelho (Sigma) foram adicionadas nas placas e incubadas durante 1h a 37 °C.

Nas placas onde adicionou-se anticorpo policional anti-IgG de Hamster gerado em coelho, foi realizada uma etapa adicional de incubação com diluição apropriada de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) durante 1h a 37 °C. As placas foram reveladas pela adição de 100 μ l de uma solução contendo 8 mg de OPD em 20 ml de tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0 na presença de 10 μ l of H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ l de 4 M H₂SO₄, e a absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 492 nm. A análise estatística da produção de anticorpos nos animais foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

4 **RESULTADOS**

4.1 Amplificação dos genes *hlyX*, *lipL32* e dos fragmentos correspondentes ao N-terminal, intermediário e C-terminal de LipL32

Os genes *hly*X e *lip*L32 foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, linhagem L1-130 da Fiocruz-Bahia (Ko, *et al.*, 1999; Nascimento, *et al.*, 2003). Nas figuras 11A e 11B podem ser verificados os produtos das PCRs de aproximadamente 1,1 Kpb para *hly*X e 759 pb para *lip*L32, respectivamente. Os fragmentos de *lip*L32 correspondentes ao N-terminal, intermediário e C-terminal da proteína foram amplificados por PCR a partir do vetor de subclonagem pGEM-T *easy* contendo *lip*L32. Na figura 11B podem ser observados os produtos das amplificações dos fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal que correspondem a 222 pb, 288 pb e 276 pb, respectivamente. *E. coli* DH5 α quimicompetentes foram transformadas com as construções obtidas nas subclonagens (*hlyX/pCR*^R4Blunt–TOPO e *lip*L32 ou fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal/pGEM-T), e as bactérias recombinantes, resistentes à ampicilina, foram selecionadas para a extração plasmidial. Os genes *hlyX*, *lip*L32 e fragmentos de *lip*L32 foram sequenciados e tiveram a sequência confirmada. Todas as construções obtidas nas subclonagens foram devidamente digeridas e os genes de interesse liberados e ligados no vetor de expressão em *E. coli*, pAE.



Figura 11 – Amplificação dos genes *hly*X (A) de 1,1 kb e *lip*L32 (B) de 759 pb. Em B, pode-se verificar as amplificações dos fragmentos de *lip*L32, correspondente ao N-terminal (N) de 222 pb, intermediário (I) de 288 pb e C-terminal (C) de 276 pb.

4.2 Expressão das proteínas recombinantes

As expressões das proteínas recombinantes de interesse foram testadas nas cepas *E*. *coli* BL21 (SI) cultivada em meio 2YT ON-amp a 30 °C ou *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] cultivada em meio 2YT-amp/clo a 37 °C. Os resultados obtidos utilizando-se as duas cepas de expressão mostraram que a proteína HlyX mostrou ser expressa somente na cepa *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] em maiores níveis na forma insolúvel. A cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS] tranformada com a construção *hlyX_pAE* não foi capaz de formar unidades formadoras de colônias (UFCs).

As proteínas LipL32 6xHis, LipL32 e LipL32 Se-M foram expressas em ambas as cepas testadas predominantemente na forma solúvel (sobrenadante) e em quantidades semelhantes entre si. Com relação a análise das expressões dos fragmentos de LipL32, N-terminal, intermediário e C-terminal foi possível verificar que o tanto o fragmento N-terminal como o intermediário foram expressos em maiores quantidades na cepa *E. coli* BL21 (DE3) star [plysS], diferentemente do fragmento C-terminal que obteve melhores níveis de expressão com a cepa *E. coli* BL21 (SI) (dados comparativos não mostrados). Quanto a forma de expressão, solúvel ou insolúvel, ambos os fragmentos intermediário e C-terminal foram expressos na forma solúvel, diferentemente do fragmento N-terminal que obteve sua maior expressão em forma de corpúsculos de inclusão.

As expressões das proteínas recombinantes podem ser visualizadas nos géis SDS-PAGE juntamente com as respectivas purificações, no item 4.3.

As massas moleculares e os pontos isoelétricos (pIs) teóricos das proteínas recombinantes expressas foram calculados, através da sequência de aminoácidos de cada proteína, em programa disponível no site: http://www.expasy.ch. Os valores obtidos estão na tabela 2.

Proteínas	Massas moleculares (kDa)	Pontos Isoelétricos	N° de aminoácidos	Sequências correspondentes
HlyX	42,3	6,31	366	22-378 aa
LipL32 6xHis	30,7	6,84	280	21-272 aa
LipL32	27,6	5,81	252	21-272 aa
N-terminal	8,78	6,96	80	21-92 aa
Intermediário	11,69	5,45	102	93-184 aa
C-terminal	10,7	9,29	97	185-272 aa

Tabela 2 – Massas moleculares e pontos isoelétricos (pIs) das proteínas recombinates

4.3 Purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade a metais bivalentes ou cromatografia de troca iônica e hidrofóbica

4.3.1 Purificação das proteínas expressas na forma solúvel, LipL32 6xHis e os fragmento intermediário e C-terminal de LipL32

As purificações das proteínas LipL32 6xHis e dos fragmentos intermediário e Cterminal foram realizadas dos sobrenadantes de culturas induzidas, através de cromatografia de afinidade. Nos géis de SDS-PAGE 15% e 18% respectivamente, foram observadas bandas com massas moleculares de aproximadamente 30,7 kDa (Figura 12), 11,7 kDa (Figura 13) e 10,7 kDa (Figura 14) correspondentes às proteínas LipL32 6xHis e os fragmentos intermediário e C-terminal purificados, respectivamente.

LipL32 6xHis foi encontrada tanto na lavagem 60 mM imidazol (Figura 12A) como nas frações de 1 M imidazol (Figura 12B), porém nas frações eluídas onde a proteína estava mais concentrada, foi verificada a presença de contaminantes de *E. coli*. Sendo assim, somente a lavagem 60 mM imidazol e as frações eluídas, 1 a 4 com 1 M imidazol, contendo LipL32 em melhores condições de pureza, foram reunidas para uso posterior.

O fragmento intermediário de LipL32 foi eluído na lavagem 40 mM imidazol (Figura 13A) e nas eluições 1 M imidazol (Figura 13B). Somente a lavagem 40 mM imidazol foi utilizada, devido a presença de muitos contaminantes em praticamente todas as eluições realizadas com 1 M imidazol.

A eluição do fragmento C-terminal de LipL32 ocorreu na lavagem 60 mM imidazol e nas eluições com 1 M imidazol onde houve intensa contaminação de proteínas de *E. coli* e as maiores quantidades de eluição deste fragmento (Figura 14). Desta forma, somente a lavagem 60 mM imidazol e as frações 1 a 6 na concentração 1 M imidazol foram selecionadas para serem reunidas e processadas.

Todas as purificações de LipL32 6xHis e dos fragmentos intermediário e C-terminal foram armazenadas a -20 °C.



Figura 12 – SDS-PAGE 15% da purificação de LipL32 6xHis a partir da fração solúvel de extratos de *E. coli* recombinante induzida. (A) M se refere ao padrão de massa molecular, poço 1 se refere ao extrato de *E. coli* BL21 (SI) induzida, 2 ao sobrenadante, 3 ao corpúsculo de inclusão solubilizado em solução 8 M uréia, 4 a lavagem do corpúsculo de inclusão em solução 1 M uréia, 5 é a fração não adsorvida à coluna de Ni²⁺ sepharose, 6 a 9 às lavagens com 5, 20, 40 e 60 mM imidazol, respectivamente. (B) M é o padrão de massa molecular, 1 a 9 referem-se às frações ímpares 1-17 eluídas da coluna de Ni²⁺ sepharose. A banda correspondente a LipL32 6xHis (30,7 kDa) está indicada pela seta.



Figura 13 – SDS-PAGE 18% da purificação do fragmento intermediário de LipL32 a partir da fração solúvel de extratos de *E. coli* induzida. (A) refere-se ao marcador de massa molecular, 1 ao extrato de *E. coli* recombinante não induzida, 2 ao extrato de *E. coli* recombinante induzida, 3 à lavagem dos corpúsculos de inclusão com solução 1 M uréia, 4 aos corpúsculos de inclusão solubilizados em solução 8 M uréia, 5 ao sobrenadante, 6 a fração não adsorvida na coluna, 7-9 referem-se às lavagem 60 mM imidazol, 2-9 referem-se às frações ímpares 1-15 eluídas da coluna Ni²⁺ *sepharose* com 1 M imidazol. A banda referente ao fragmento intermediário (11,7 kDa) está indicada pela seta.



Figura 14 – SDS-PAGE 18% da purificação do fragmento C-terminal de LipL32 a partir da fração solúvel de extratos de *E. coli* recombinante induzida. (A) M indica o marcador de massa molecular, poço 1 refere-se ao extrato de *E. coli* recombinante não induzida, 2 ao extrato de *E. coli* induzida, 3 à lavagem do corpúsculo de inclusão com solução 1 M uréia, 4 à solubilização dos corpúsculos de inclusão com solução 8 M uréia, 5 à fração solúvel, 6 à fração não adsorvida, 7-9 referem-se às lavagens com 5, 20 e 40 mM, respectivamente.
(B) M refere-se ao marcador de massa molecular, 1 à lavagem 60 mM imidazol, 2-9 indicam às frações ímpares 1 a 15 eluídas da coluna Ni²⁺ sepharose, com 1 M imidazol. A banda correspondente ao fragmento C-terminal de LipL32 (10,7 kDa) está indicada pela seta.

4.3.2 Purificação das proteínas expressas em corpúsculos de inclusão, HlyX e o fragmento *N*-terminal de LipL32

A proteína HlyX e o fragmento N-terminal de LipL32 foram purificados a partir da expressão destas proteínas na fração insolúvel solubilizadas em solução 8 M uréia.

Previamente ao processo de purificação da proteína HlyX esta foi renaturada conforme o item 3.11.1. Na figura 15, pode-se verificar que a maior fração de HlyX (42,3 kDa) foi eluída nas lavagens 40 e 60 mM imidazol. Houve também eluição de HlyX nas frações eluídas com 1 M imidazol, mas em pouca quantidade e impura. Após a diálise das lavagens contendo HlyX foi necessária a adição de 1 mM PMSF, para impedir a ação de proteases.



Figura 15 – SDS-PAGE 15% da purificação de HlyX renaturada, a partir do corpúsculo de inclusão obtidos de extratos de *E. coli* recombinante induzida. (A) M indica o marcador de massa molecular, poço 1 refere-se ao extrato de *E. coli* recombinante não induzido, 2 ao extrato de *E. coli* recombinante induzido, 3 ao corpúsculo de inclusão solubilizado em solução 8 M uréia, 4 a lavagem do corpúsculo de inclusão em 1 M uréia, 5 à fração solúvel, 6-9 referem-se as lavagens com 5, 20, 40 e 60 mM imidazol, respectivamente. (B) M indica o padrão de massa molecular, 1-9 referem-se às frações 1 a 17 eluídas da coluna de Ni²⁺ *sepharose*, com 1 M imidazol. A banda correspondente à HlyX (42,3 kDa) está indicada pela seta.

Quanto a purificação do fragmento N-terminal esta foi realizada em condições desnaturantes a partir da solubilização do corpúsculo de inclusão na solução 8 M uréia. Na figura 16, pode-se observar que parte do fragmento N-terminal de LipL32 (8,9 kDa) foi eluído nas lavagens 40 e 60 mM imidazol. A proteína também foi eluída nas frações de 1 M imidazol (Figura 16B), porém nestas eluições as proteínas encontravam-se com contaminantes de *E. coli*. Sendo assim, somente as frações (lavagens 40 e 60 mM imidazol) que possuíam o fragmento N-terminal purificado foram agrupadas e armazenadas a 4 °C.



Figura 16 – SDS-PAGE 18% da purificação do fragmento N-terminal de LipL32 em condições denaturantes, a partir dos corpúsculos de inclusão, solubilizados em solução 8 M uréia, obtidos de extratos de *E. coli* recombinante induzida. (A) M refere-se ao marcador de massa molecular, 1 ao extrato de *E. coli* recombinante não induzido, 2 ao extrato de *E. coli* recombinante induzido, 3 à lavagem dos corpúsculos de inclusão com 1 M uréia, 4 aos corpúsculos de inclusão solubilizados em solução 8 M uréia, 5 à fração não adsorvida à coluna, 6-9 às lavagens com 5, 20, 40 e 60 mM imidazol. (B) M refere-se ao marcador de massa molecular, 1-9 indica às frações ímpares 1 a 17 eluídas da coluna Ni²⁺ sepharose. O fragmento N-terminal (8,9 kDa) está indicado pela seta.

4.3.3 Purificação de LipL32 e LipL32 Se-M através de cromatografia de troca iônica e hidrofóbica

Para a purificação das proteínas LipL32 e LipL32 Se-M a partir da fração solúvel, foram utilizadas cromatografias de troca iônica (*Q-sepharose* e *SP-sepharose*) e hidrofóbica (*Phenyl sepharose*), pela ausência da cauda de histidina nestas proteínas que tem como objetivo estudos de estrutura tridimensional.

A resina aniônica (*Q-sepharose*) foi utilizada apenas para a clarificação da amostra e eliminação de proteínas contaminates de *E. coli* que persistiam nos demais passos de purificação. Com relação a proteína LipL32 foi possível observar no gel de SDS 15% (Figura 17) uma banda purificada que corresponde a aproximadamente a massa molecular teórica (27,6 kDa) de LipL32 recombinante. Na figura 17A é possível verificar que apesar da baixa força iônica (20 mM trietanolamina, pH 7,8) da solução que contém a proteína recombinante, a eficiência da ligação de LipL32 à resina catiônica (*SP-sepharose*) foi baixa, pois LipL32 foi eluída já na primeira lavagem com 0,1 M NaCl em 20 mM trietanolamina, pH 7,8 e grande parte da proteína recombinante pode ser encontrada na fração não adsorvida à coluna cromatográfica.

A partir da proteína purificada presente na lavagem 0,1 M NaCl em 20 mM trietanolamina, pH 7,8, obtida através da cromatografia catiônica, foi realizado o segundo passo de purificação de LipL32, que utilizou a cromatografia hidrofóbica (*Phenyl sepharose*).

Para ser submetida à passagem pela coluna hidrofóbica foi necessário um acréscimo na concentração de NaCl na amostra, que passou de 0,1 M para 3 M NaCl. Na figura 17B é possível verificar que a proteína liga-se fortemente à resina *Phenyl sepharose* nestas condições. A proteína LipL32 começou a ser eluída da coluna hidrofóbica após uma drástica diminuição de NaCl na coluna, 0,1 M NaCl em 20 mM trietanolamina, pH 7,8. Nas lavagens onde não havia a presença de NaCl (20mM trietanolamina, pH 7,8 e água) a proteína ainda continuou a ser eluída pela diminuição das interações hidrofóbicas de LipL32 com a resina *Phenyl sepharose*.



Figura 17 – SDS-PAGE 15% da purificação de LipL32 a partir da fração solúvel de extratos de *E. coli* recombinante induzida. (A) refere-se a purificação realizada através da cromatografia catiônica (*SP-sepharose*); M refere-se ao marcador de massa molecular, 1 ao extrato de *E. coli* recombinante não induzido, 2 ao extrato de *E. coli* recombinante induzido, 3 à fração não adsorvida a resina *Q-sepharose* (amostra de entrada), 4 à fração não adsorvida (*SP-sepharose*), 5-8 às lavagens 0,1, 0,3, 0,5 e 0,7 NaCl, respectivamente e 9 à lavagem 1 M NaCl. (B) refere-se à purificação de LipL32, através da cromatografia hidrofóbica (*Phenyl sepharose*) a partir da lavagem 0,1 M NaCl. M indica o marcador de massa molecular, 1-7 refere-se às lavagens 2,5 M, 2,0 M, 1,5 M, 1,0 M, 0,5 M, 0,3 M, 0,1 M NaCl, respectivamente, 8 e 9 às eluições com 20 mM trietanolamina, pH 7,8 e àgua, respectivamente. A banda correspondente à LipL32 (27,5 kDa) está indicada pela seta.

LipL32 Se-M foi purificada de forma similar a LipL32, porém na figura 18A é possível visualizar um padrão de bandas contaminantes mais intenso na lavagem 0,1 M NaCl em 20 mM trietanolamina, pH 7,8, quando comparado com a purificação de LipL32 expressa em meio 2YT ON com a resina *SP-sepharose*. Na figura 18A pode-se observar que existem proteínas contaminantes na preparação com mais afinidade pela resina *SP-sepharose* do que a proteína recombinante, LipL32 Se-M. Apesar da intensa quantidade de bandas contaminantes presentes na eluição da proteína encontrados no primeiro passo de purificação (cromatografia catiônica) (Figura 18A), a purificação realizada na cromatografia hidrofóbica resultou em um grau de purificação satisfatório (Figura 19). Na figura 19A pode-se observar que LipL32,

contendo metioninas marcadas com selênio, permanece interagindo fortemente com a coluna hidrofóbica, pois praticamente toda a proteína liga-se à coluna.



Figura 18 – SDS-PAGE 15% da purificação de LipL32, através de cromatografia catiônica (*SP-sepharose*) a partir da fração solúvel de *E. coli* recombinante induzida em meio mínimo (M9 ON), com adição de selênio metionina. M indica o marcador de massa molecular, poço 1 refere-se ao extrato de *E. coli* recombinante não induzida, 2 ao extrato de *E. coli* recombinante induzida, 3 à lavagem do corpúsculo de inclusão com solução 1 M uréia, 4 à solubilização do corpúsculo de inclusão com solução 8 M uréia, 5 à fração solúvel, 6 à fração não adsorvida na resina *Q-sepharose* (amostra de entrada para a purificação), 7 à fração não adsorvida na *SP-sepharose*, 8 e 9 às lavagens com 0,1 M e 0,3 M, respectivamente. (B) M indica o marcador de massa molecular e 1-4 correspondem às lavagens 0,5, 0,7, 1,0 e 2,0 M NaCl em 20mM trietanolamina, pH 7,8.



Figura 19 – SDS-PAGE 15% da purificação de LipL32 através de cromatografia hidrofóbica (*Phenyl sepharose*), a partir da lavagem 0,1 M NaCl obtida na cromatografia catiônica (*SP-sepharose*). (A) M indica a massa molecular, 1 refere-se à eluição com água, 2 à amostra de entrada (0,1 M NaCl) e 3 indica à fração não adsorvida. (B) M refere-se à massa molecular, 1-7 correspondem às lavagens 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,5, 0,3, 0,1 M NaCl em 20 mM trietanolamina, pH 7,8, 8 à lavagem 20 mM trietanolamina, pH 7,8 e 9 ao poço sem amostra.

4.4 Análises de Western blot

4.4.1 Análise da conservação da expressão de LipL32 e HlyX em Leptospira sp. e caracterização dos fragmentos derivados de LipL32

Para a análise da conservação das proteínas LipL32 e HlyX em *Leptospira sp.* foram utilizados os anticorpos gerados contra todas as proteínas purificadas, conforme item 3.14.1.

Com relação a conservação da expressão de LipL32 e HlyX em *Leptopsira sp.* foram visualizadas bandas correspondentes aos tamanhos esperados para estas proteínas em todos os extratos de sorovares patogênicos de *L. interrogans* testados (sorovares Canicola, Grippotyphosa, Pyrogenes, Pomona, Autumnalis, Hardjo, Bratislava, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae) mas não no sorovar saprofítico, não patogênico *L. biflexa* sorovar Patoc (Figura 20). No caso de LipL32, foram utilizados anticorpos gerados contra LipL32 6xHis e LipL32.

Anticorpos foram gerados contra os fragmentos de LipL32, N-terminal, intermediário e C-terminal (Figura 21B) e mostraram ser específicos contra cada um dos fragmentos respecivamente (Figura 21). Estes anticorpos também reconheceram a proteína LipL32 nos extratos de *Leptospira* de diferentes sorovares patogênicos mas não na espécie saprofítica, *L. biflexa* (Figura 21B).



Figura 20 – Confirmação da identidade das proteínas purificadas através dos extratos celulares de diferentes sorovares de *Leptospira interrogans* analisados com anticorpos gerados contra as proteínas recombinantes, HlyX, LipL32 6xHis e LipL32. 1, Icterohaemorrhagiae; 2, Copenhageni; 3, Bratislava; 4, Hardjo; 5, Autumnalis 6, Pomona; 7, Pyrogenes; 8, *L. kirchneri* sorovar Grippotyphosa; 9, *L. biflexa* sorovar Patoc; 10, Canicola;11A, HlyX; 11B, LipL32 6xHis; 11C, LipL32.



Figura 21 – Especificidade dos anticorpos gerados contra os fragmentos de LipL32. Soros de camundongos Balb/C fêmeas imunizados com os fragmentos de LipL32 reconheceram o fragmento correspondente (N, N-terminal; I, intermediário; C, C-terminal), bem como LipL32 (L, LipL32) (A), e LipL32 nativa dos extratos totais of *L. interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae (poço 1), Copenhageni (poço 2), Bratislava (poço 3), Hardjo (poço 4), Autumnalis (poço 5), Pomona (poço 6), Pyrogenes (poço 7), and Canicola (poço 8) and *L. kirchneri* sorovar Grippotyphosa (poço 10). Os soros também reconheceram a proteína recombinante (poço 11) mas não reagiram com o extrato total de *L. biflexa* sorovar Patoc (poço 9) (B).

4.4.2 Detecção de anticorpos IgM e IgG dirigidos contra LipL32 e HlyX em soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

As análises de *Western blot*, demonstraram a presença de anticorpos IgM e IgG dirigidos contra LipL32 respectivamente, na fase aguda e na fase convalesente da doença. Na figura 22 pode-se verificar o reconhecimento de LipL32 por soros de pacientes com leptospirose confirmada, utilizando-se anti-IgM e anti-IgG.

Com relação aos resultados obtidos com a proteína HlyX foram observados somente anticorpos IgG dirigidos contra a proteína HlyX somente nos soros de pacientes coletados na segunda semana da doença (fase convalescente), com títulos de aglutinação microscópica de 25.600; 6.400, 3.200 e 1.600 (Figura 22). Não foram detectados anticorpos IgM dirigidos contra HlyX nos soros testados.



Figura 22 – Pesquisa de anticorpos IgM e IgG gerados contra as proteínas HlyX e LipL32. HlyX, H; LipL32 6xHis, L e Sm14, S (proteína ligante de ácidos-graxos de *Schistosoma mansoni*, usada como controle negativo), utilizando soros de pacientes com leptospirose (Paciente A e B). Os títulos de aglutinação microscópica dos soros de pacientes da fase aguda da doença não são detectáveis. Para a fase convalescente os títulos foram 1.600 para o paciente A e 25.600 para o paciente B.

Mapeamento do fragmento imunodominante de LipL32

A partir dos resultados obtidos no item 4.4.2 foram realizadas análises utilizando-se a mesma técnica de detecção de anticorpos, *Western blot*, para o mapeamento da porção imunodominante da proteína LipL32. Para definir o fragmento imunodominante de LipL32, primeiramente utilizou-se o anticorpo gerado em camundongos contra LipL32 6xHis, conforme descrito no item 3.14.1, e o anticorpo anti-IgG de camundongo para a detecção. Os anticorpos gerados em camundongos contra a proteína inteira mostraram que o fragmento intermediário e C-terminal de LipL32 são os fragmentos com maior imunoreatividade (Figura 23A). A seguir, foram realizados ensaios utilizando-se soros de pacientes com leptospirose confirmada através de diagnóstico laboratorial (MAT positivo). Foram utilizados 12 pares de soros de pacientes, fases aguda (MAT negativo) e convalescente da infecção (MAT positivo), com diferentes títulos (Tabela 3). Em todos os casos foi detectada uma resposta IgM exclusivamente contra o fragmento C-terminal, tanto na fase aguda como na fase covalescente (Tabela 3, Figura 23B).

Com relação à resposta IgG na fase aguda, o fragmento C-terminal foi reconhecido pelos anticorpos presentes no soros de 5 pacientes, e o fragmento intermediário reagiu com anticorpos IgG presentes em uma amostra de soro (Tabela 3). Durante a fase convalescente, anticorpos IgG de quase todas as amostras de soro reconheceram o fragmento intermediário, e anticorpos presentes em 5 das 12 amostras reconheceram o fragmento C-terminal (Tabela 3,


Figura 23B). Em nenhuma das amostras de soro de paciente foi possível detectar anticorpos IgM e IgG contra o fragmento N-terminal de LipL32.

Figura 23 – Fragmentos de LipL32 recombinante e a reatividade com soro de camundongos (A) e com soro de pacientes com leptospirose (B). Análises de imunoblotting com os fragmentos de LipL32, N-terminal (N), intermediário (I), C-terminal (C), e LipL32 6xHis (L), utilizando-se 2 µg de cada proteína recombinante. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com soro de camundongos imunizados com LipL32 6xHis recombinante (A) ou com soros obtidos de 4 pacientes com leptospirose 1 a 4 (Tabela 3) durante a fase aguda e convalescente da doença (B). Os blots foram realizados com anti-IgG de camundongo gerado em cabra conjugado a peroxidase (A) ou anti-IgM humano gerado em cabra conjugado a peroxidase (B). Os títulos de MAT estão indicados para cada paciente.

	Soros com reatividade IgM							A	Soros com reatividade IgG							G	Inverso	erso Dias anís a inísia a			
Paciente	Fase aguda conv		Fase onvalescente				F	Fase aguda				Fase convalescente			títulos MAT	sintomas	Reatividade sorovar Leptospira				
	L	Ν	Ι	С	L	N	1	Ι	С	L	Ν	Ι	С	L	N	Ι	С		MAT(-)	MAT(+)	
1	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	+	_	6.400	Não conhecido	Não conhecido	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni
2	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	+	+	_	+	_	25.600	6	23	Autumnalis
3	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	+	_	3.200	2	9	Cynopteri
4	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	+	+	_	+	+	3.200	4	30	Icterohaemorrhagiae
5	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	+	+	25.600	1	17	Cynopteri
6	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	+	_	1.600	11	17	Vários sorovares/inconclusivo
7	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	—	+	_	+	_	3.200	13	21	Icterohaemorrhagiae
8	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	+	+	_	_	_	3.200	5	11	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni
9	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	+	+	_	+	+	1.600	6	14	Copenhageni
10	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	+	+	+	_	+	+	1.600	4	9	Copenhageni
11	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	_	_	6.400	4	17	Autumnalis
12	+	_	_	+	+	_	-	_	+	+	_	_	_	+	_	+	+	6.400	6	31	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni

Tabela 3 – Títulos de MAT, início dos sintomas, sorovar infectante, e detecção de anticorpos nas amostras de soros de 12 pacientes com leptospirose^a.

^{*a*} L, LipL32 6xHis; N, N- terminal; I, intermediário; C, C-terminal

4.5 Análise da estrutura secundária de HlyX, LipL32 6xHis e LipL32

As proteínas recombinantes HlyX, LipL32 6xHis e LipL32 apresentam as seguintes estruturas secundárias, segundo predições realizadas pelo programa Expasy: HlyX possui 56% de estrutura α - hélice, 2% de folha β -pregueada e 42% de estrutura randômica, enquanto LipL32 6xHis possui 63% de estrutura randômica, 13% de folha β-pregueada e 23% de αhélice e LipL32 possui 60% de estrutura randômica, 15% de folha β-pregueada e 25% de αhélice. As análises de dicroísmo circular confirmam a predominância da estrutura α -hélice em HlyX e a presença das estruturas α - hélice, folha β -pregueada e randômica para LipL32 6xHis e LipL32. No caso de LipL32 6xHis a predição do programa ExPASy estimou uma porcentagem maior de dobramentos randômicos (3%) quando comparada com LipL32. Este aumento na porcentagem dos dobramentos randômicos são provenientes da sequência fusionada pelo vetor pDEST17 (Invitrogen). Dentre os 27 aminoácidos inseridos pelo vetor pDEST17 na região N-terminal de LipL32 6xHis, 22 aminoácidos estavam preditos para formação de estrutura randômica. Os resultados obtidos por dicroísmo circular com as proteínas LipL32 6xHis e LipL32 corroboram com a predição do programa ExPASy. A proteína LipL32 6xHis mostrou mais dobramentos aleatórios do que LipL32. Além disso, indica que o processo de renaturação da proteína HlyX foi bem sucedido.



Figura 24 – Espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes HlyX e LipL32 6xHis. Em (A) estão dispostas as curvas típicas de estrutura secundária de proteínas. A curva representada pelo espectro (B) representa a média das medidas da amostra de HlyX renaturada e (C) as médias das medidas obtidas com LipL32 6xHis e LipL32, ambas solúveis. As leituras foram obtidas através do espectropolarímetro, modelo J-810 (*Jasco Inc.*).

4.6 As proteínas LipL32 e HlyX interagem com proteínas do hospedeiro

4.6.1 As proteínas LipL32 e HlyX interagem com colágeno tipo IV e fibronectina plasmática

Sendo LipL32 a proteína de superfície mais expressa durante a infecção, e HlyX uma proteína que possui domínios tetraticopeptídeos de interação proteína-proteína. Foram realizados experimentos para verificar se estas proteínas poderiam interagir com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como laminina-1, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina celular e fibronectina plasmática.

As proteínas de matriz extracelular foram imobilizadas em placas de microtítulo, e as adesões de LipL32 6xHis e HlyX foram analisadas através de um método baseado em ELISA, descrito no item 3.15. Como mostrado na figura 25, tanto LipL32 6xHis como HlyX exibiram um significante nível de ligação a colágeno tipo IV (P < 0.0001) e a fibronectina plasmática (P < 0.0001). A proteína HlyX também exibiu ligação para colágeno tipo I (P < 0.0001) e para laminina-1 (P < 0.0001), mas optou-se por estudar as interações desta proteína com colágeno tipo IV e fibronectina plasmática, pois estas interações apresentaram-se mais intensas. A ligação de LipL32 às demais macromoléculas testadas não diferiu significativamente de sua ligação com fetuína, proteína utilizada como controle negativo (Figura 25). Também não foi detectada adesão da proteína codificada por LIC11030⁽⁵⁾, utilizada como controle negativo, aos componentes de matriz extracelular (Figura 25).

Uma ligação dose-dependente à fibronectina plasmática e ao colágeno tipo IV foi observada quando se utilizaram concentrações cresentes de LipL32 (0 a 4 μ M) e HlyX (0 a 2 μ M), mantendo-se fixas as quantidades de fibronectina plasmática e colágeno tipo IV (1 μ g) (Figuras 26A e 26D e 27A e 27D).

⁽⁵⁾A proteína codificada por LIC11030 foi gentilmente cedida pela Dr. Angela Silva Brarbosa. Esta proteína é predita como sendo uma proteína de membrana externa e foi purificada em condições semelhantes às da proteína LipL32.



Figura 25 – Ligação de LipL32 6xHis e HlyX recombinantes a componentes de matriz extracelular e proteínas plasmáticas.Os poços foram revestidos com 1 µg de laminina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina celular, fibronectina plasmática, e fetuína, utilizada como proteína controle negativo. A adesão das proteínas recombinantes foi avaliada por um método baseado em ELISA. Um micrograma de cada proteína recombinante foi adicionada por poço. As densidades ópticas foram determinadas a 492 nm. Os dados representam a média \pm o desvio padrão de 3 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Para as análises estatísticas, a adesão das proteínas recombinantes à foram comparadas com a ligação das proteínas recombinantes à fetuína através do *t* teste (*, *P* < 0.0001).

Foram realizados também experimentos para verificar se LipL32 6xHis e HlyX mostrariam adesões específicas aos fragmentos proteolíticos de fibronectina plamática F30 (30 kDa - domínio de ligação a heparina) e F45 (45 kDa – domínio de ligação a gelatina). Os resultados indicam que LipL32 6xHis interage com ambos os domínios da fibronectina testados de forma dose-dependente (Figura 26B, 26C) e HlyX interage somente com o domínio de ligação a heparina (F30) (Figura 27B), também de maneira dose-dependente. A ligação de HlyX ao domínio de ligação a gelatina (F45) não foi observada (Figura 27C).

Para se mapear a região de LipL32 responsável pela atividade de ligação ao componentes de matriz extracelular, foram realizados ensaios com os fragmentos C-terminal e intermediário. Como o fragmento N-terminal de LipL32 está em condições denaturantes (solução 8 M uréia), este não foi incluído nos ensaios. Como mostrado na figura 26, o perfil de ligação do fragmento C-terminal à fibronectina plasmática e ao colágeno tipo IV assemelha-se ao perfil de ligação exibido por LipL32 6xHis a estas macromoléculas, indicando que a interação de LipL32 6xHis com a matriz é mediada pela sua porção C-terminal. O fragmento intermediário não foi capaz de aderir à fibronectina e ao colágeno tipo IV, mesmo em altas concentrações (Figura 26).



Figura 26 – Ligação de LipL32 6xHis e de seus fragmentos C-terminal e intermediário em fibronectina plasmática (molécula inteira e seus fragmentos proteolíticos, F30 e F45) e ao colágeno tipo IV em função da concentração de proteínas. A, ligação à fibronectina plasmática; B, ligação ao F30; C, ligação ao F45; D, ligação ao colágeno tipo IV. As concentrações de proteínas recombinantes variaram de 0 a 4 μM. Cada ponto representa a média dos valores de absorbância a 492 nm ± o erro padrão de três experimentos independentes.



Figura 27 – Ligação de HlyX à fibronectina plasmática (molécula inteira e seu fragmento proteolítico, F30, mas não ao F45) e ao colágeno tipo IV em função da concentração. A, ligação à fibronectina plasmática; B, ligação ao F30; C, ligação ao F45; D, ligação ao colágeno tipo IV. As concentrações da proteína recombinante variaram de 0 a 2μM. Cada ponto representa a média dos valores de absorbância a 492 nm ± o erro padrão de três experimentos independentes.

Os K_{ds} aparentes para a ligação de LipL32 e HlyX a fibronectina plasmática e colágeno tipo IV estão apresentados na tabela 4. O valor da K_d obtidos para a ligação de LipL32 à fibronectina plasmática foi de 99 nM e para a ligação de LipL32 aos domínios F30 e F45 os valores de K_{ds} alcançaram os valores de 107 e 138 nM, respectivamente. Valores similares foram encontrados para o fragmento C-terminal. Já os K_{ds} obtidos para colágeno tipo IV em relação a LipL32 e seu fragmento C-terminal alcançaram valores de 167 e 156 nM, respectivamente. A proteína HlyX apresentou baixos valores de *Kds* aparentes quando comparada a LipL32 (Tabela 4). A ligação de HlyX a fibronectina plasmática e seu domínio F30 alcançou valores de 25 e 51 nM, respectivamente. O valor da K_d obtido para a ligação com colágeno tipo IV, mostrou uma alta afinidade, 14 nM. A análise das K_{ds} encontrados para a ligação das proteínas LipL32 e HlyX, para as moléculas estudadas, permite afirmar que a afinidade da proteína HlyX é maior quando comparada à de LipL32 (Tabela 4).

Proteínas	$K_d(\mathbf{nM})$								
ligantes	Fibronectina Plasmática	F30	F45	Colágeno tipo IV					
LipL32	99 (±11)	107 (±5)	138 (±11)	167 (±12)					
C-terminal	96 (±5)	109 (±4)	101 (±7)	156 (±6)					
HlyX	25 (±1)	33 (±1)	ND*	14 (±1)					

Tabela 4 – K_{ds} relativas à ligação de LipL32, do fragmento C-terminal de LipL32 e de HlyX à fibronectina plasmática e ao colágeno tipo IV. O valor entre parênteses representa o erro padrão experimental.

ND* Não determinado.

4.6.2 *O* fragmento C-terminal compete com LipL32 pela ligação ao colágeno tipo IV e à fibronectina plasmática

De acordo com os resultados descritos acima, o fragmento C-terminal de LipL32 ligase a ambos os domínios de fibronectina, F30 e F45, e ao colágeno tipo IV de forma dosedependente. Com a intenção de identificar a região envolvida nesta interação, ensaios de competição foram realizados usando-se concentrações crescentes dos fragmentos C-terminal ou intermediário (0 to 7 μ M) na presença de uma concentração fixa de LipL32 (1,5 μ M).

A ligação aos componentes de matriz extracelular foi realizada essencialmente como descrito acima. Anticorpos anti-intermediário de LipL32 foram utilizados quando quantidades crescentes de fragmento C-terminal foram usados no ensaio de competição e anticorpos anti-C-terminal foram utilizados quando quantidades crescentes de fragmento intermediário foram usados com o mesmo propósito. Essa estratégia permitiu detectar a ligação de LipL32 a componentes de matriz em ambos os casos. Uma inibição dose-dependente da ligação de LipL32 a colágeno tipo IV, F30 e F45 foi alcançada quando quantidades crescentes do fragmento C-terminal foram usadas, indicando que este domínio compete pela ligação de LipL32 a estes componentes de matriz extracelular. Além disso, a inibição da ligação não ocorreu aumentando-se as quantidades do fragmento intermediário (Figura 28).



Figura 28 – Inibição da ligação de LipL32 aos fragmentos proteolíticos F30 e F45 e ao colágeno tipo IV pelo fragmento C-terminal de LipL32. Os poços foram revestidos com F30 (A), F45 (B), ou colágeno tipo IV (C), e concentrações crescentes dos fragmentos C-terminal ou intermediário (0 to 7 μM) foram adicionadas na presença de uma concentração fixa de LipL32 (1,5 μM). As densidades ópticas foram determinadas a 492 nm. Os dados representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes, cada experimento foi realizado em triplicata.

4.6.3 Competição de LipL32, do fragmento C-terminal de LipL32 e de HlyX com os ligantes de F30 (heparina) ou F45 (gelatina)

Como já mencionado, F30 e F45 são fragmentos proteolíticos de fibronectina que contêm domínios que se ligam a heparina e gelatina, respectivamente. Com os domínios de fibronectina imobilizados, utilizou-se 2 μ M de LipL32 ou do fragmento C-terminal na presença de quantidades crescentes de heparina (0 a 500 UI) ou gelatina (0 a 50 μ g). Para os ensaios envolvendo a proteína HlyX, também foram utilizados 2 μ M de proteína na presença de quantidades crescentes de heparina (0 a 500 UI). Tanto a heparina quanto a gelatina foram capazes de inibir a ligação de LipL32 e do fragmento C-terminal aos domínios F30 e F45 de maneira dose-dependente (Figura 29).

O padrão de inibição obtido com gelatina foi bastante similar quando se utilizou LipL32 intacta ou o fragmento C-terminal, e uma inibição quase completa foi observada com baixas concentrações de gelatina (Fig. 29B). Entretanto, a heparina não foi capaz de inibir completamente a interação de LipL32 a F30, embora a ligação do fragmento C-terminal a este domínio tenha sido abolido com sucesso. É possível que a interação de LipL32 com fibronectina envolva outras regiões da molécula (Figura 29A).

De fato, como demonstrado na figura 26B a ligação de LipL32 em F30 foi significativamente maior do que a exibida pelo fragmento C-terminal. Em conclusão, LipL32 interage com fibronectina principalmente através de sua porção C-terminal, e a ligação coincide susbstancialmente ou se co-localiza com os sítios de ligação a heparina e gelatina.

Os resultados obtidos com a proteína HlyX, mostraram que a ligação da proteína ao domínio de heparina é específico, pois a heparina em concentrações crescentes, conseguiu inibir a ligação de HlyX ao domínio F30 (Figura 30).



Figura 29 – Inibição da ligação de LipL32 aos fragmentos proteolíticos de fibronectina plasmática F30 e F45 por heparina e gelatina, respectivamente. A ligação de LipL32 e seu fragment C-terminal (2 μM) a F30 (A) e F45 (B) foi realizada na presença de quantidades crescentes de heparina (0 a 500 UI) ou gelatina (0 to 50 μg). As densidades ópticas foram determinadas a 492 nm. Os dados representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes.



Figura 30 – Inibição da ligação de HlyX ao domínio de ligação da fibronectina plasmática a heparina. A ligação de HlyX (2 μM) a F30 (A) foi realizada na presença de quantidades crescentes de heparina (0 a 500 UI). As densidades ópticas foram determinadas a 492 nm. Os dados representam a média ± o erro padrão de três experimentos independentes.

4.7 Ensaio de proteção contra desafio homólogo

Nos ensaios de imunização e desafio em modelo animal utilizados para leptospirose, a proteína HlyX foi injetada subcutâneamente em hamsters para verificar se o antígeno possuía habilidade de conferir proteção em hamsters infectados com a cepa virulenta, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. As análises dos ensaios de níveis de IgG por ELISA de um único experimento realizado independentemente, mostram que as proteínas HlyX, LipL32 e o fragmento C-terminal de LigA (resíduos de aa 817-1224 aa) geraram títulos de anticorpos, respectivamente em torno de 1:128.000 (Figura 31), 1:16.000 (Figura 32) e 1:64.000 (Figura 33). A dispersão dos títulos de IgG obtidos com os soros individuais dos animais de cada grupo vacinado e a mediana de títulos de IgG de cada grupo vacinado estão mostrados nas figuras 31, 32 e 33.



Figura 31 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra a proteína HlyX, obtidos em um único experimento realizado. Neste gráfico os títulos de IgG anti-HlyX observados nos animais individualmente estão representados pelos triângulos e a mediana destes valores estão indicadas pelos traços em negrito.



Figura 32 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra a proteína LipL32, obtidos em um único experimento realizado. Neste gráfico os títulos de IgG anti-LipL32 observados nos animais individualmente estão representados pelos triângulos e a mediana destes valores estão indicadas pelos traços em negrito.



Figura 33 – Títulos de anticorpos IgG gerados contra o fragmento C-terminal de LigA, obtidos em um único experimento realizado. Neste gráfico os títulos de IgG anti-C-terminal de LigA observados nos animais individualmente estão representados pelos triângulos e a mediana destes valores estão indicadas pelos traços em negrito.

Os títulos de IgG anti-HlyX induzidos nos animais imunizados com a proteína HlyX foram estatisticamente diferentes dos títulos encontrados com os soros pré-imunes de todos os grupos de animais estudados e dos soros dos animais inoculados com a bacterina, fragmento C-terminal de LigA ou com LipL32 (p<0.001). Não houve diferença de anticorpos entre os títulos encontrados nos animais inoculados com HlyX e HlyX em co-administração com LipL32 (p>0.9681). Os títulos de anticorpos encontrados no grupo bacterina e nos soros pré-imunes de todos os grupos vacinados foram menores que 1:1000 e muito inferiores aos encontrados para HlyX. Os animais imunizados com LipL32 e com o fragmento C-terminal de LigA não apresentaram títulos de IgG detectáveis contra a proteína HlyX.

Para LipL32 os títulos de IgG induzidos nos animais imunizados com esta proteína foram estatisticamente diferentes dos títulos encontrados nos soros pré-imunes de todos os grupos de animais estudados e dos soros dos animais inoculados com a bacterina, C-terminal de LigA ou com HlyX (p<0.05). Não houve diferença de anticorpos entre o grupo vacinado com LipL32 e HlyX em co-administração com LipL32 (p>0.05). Nos soros pré-imunes de todos os grupos vacinados os títulos de anticorpos encontrados foram menores que 1:100. Os animais imunizados com o fragmento C-terminal de LigA apresentaram títulos detectáveis de IgG contra a proteína LipL32, mostrando uma reatividade cruzada do C-terminal de LigA com LipL32. Porém, apesar desta reatividade cruzada os títulos observados nos animais imunizados com LipL32 e HlyX em co-administração com LipL32 foram estatisticamente diferentes dos títulos observados nos animais imunizados com o fragmento C-terminal de LigA (p<0.05).

Os títulos de IgG anti-C-terminal de LigA nos animais imunizados com este fragmento da proteína LigA foram estatisticamente diferentes dos títulos encontrados nos animais imunizados com a proteína HlyX (p<0.001). Os títulos de anticorpos encontrados no grupo bacterina e nos soros pré-imunes de todos os grupos vacinados foram menores que 1:1000 e muito inferiores aos encontrados no grupo imunizado com a porção C-terminal de LigA. Interessantemente, os animais imunizados com LipL32 e HlyX em co-administração com LipL32 apresentaram títulos detectáveis de absorbância contra o fragmento C-terminal de LigA, mostrando o mesmo perfil de reatividade cruzada do fragmento C-terminal de LigA com LipL32. Porém, apesar desta reatividade cruzada os títulos de anticorpos nos animais imunizados com LipL32 foram estatisticamente diferentes dos títulos obtidos pela imunização dos animais com o fragmento C-terminal de LigA (p<0.05).

Quanto a proteção conferida pelas proteínas recombinantes utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante, as proteínas HlyX e LipL32 administradas isoladamente demonstraram diferentes resultados. A imunização subcutânea com HlyX não foi capaz de conferir proteção em animais desafiados com leptospiras virulentas (20% de proteção). Por outro lado, a imunização com LipL32 conferiu 80% de proteção (Figura 34). Já o grupo vacinado com HlyX em co-administração com LipL32 demonstrou a mesma capacidade protetora do controle positivo de vacina recombinante, o fragmento C-terminal de LigA e da bacterina, ou seja, 100% dos animais vacinados sobreviveram ao desafio homólogo com leptospiras virulentas (Figura 34). Os animais vacinados e desafiados que sobreviveram até o dia 58 foram sacrificados e tiveram seus fígados coletados para análise quanto a presença de leptospiras *in vitro*. Na tabela 5 pode-se verificar que todos os animais vacinados com as proteínas recombinantes sobreviventes possuíam leptospiras em seus fígados. Já todos os animais vacinados com a bacterina e desafiados sobreviveram (Figura 34). Os figados macerados e cultivados mostraram ser negativos quanto a presença de leptospiras (Tabela 5).



Figura 34 – Análise da porcentagem de sobrevivência dos grupos de animais vacinados: salina, bacterina, C-terminal LigA, HlyX, LipL32 e HlyX co-adminstrada com LipL32, realizada em um período de 28 dias, após desafio com 10⁵ Leptospira interrogans sorovar Copenhageni virulentas.

Grupos vacinados	Porcentagem de sobrevivência	Vivos/Total	Valor de P em relação ao grupo salina*	Portadores/Total de sobreviventes	
Salina	10%	1/10		1/1	
C-terminal de	100%	10/10	< 0.001	10/10	
LigA	100 %	10/10	< 0,001	10/10	
Bacterina	100%	10/10	< 0,001	0/10	
LipL32	80%	8/10	<0.01	8/8	
LipL32 + HlyX	100%	10/10	<0,001	10/10	
HlyX	20%	2/10	>0,05	2/2	

Tabela 5 – A	Avaliação do desafio animal quanto ao número de animais sobrev	iventes e a presença de
16	leptospiras no fígado dos animais vacinados (portadores).	

* Teste Exato de Fisher

5 DISCUSSÃO

As vacinas existentes contra a leptospirose até o momento são preparadas a partir de suspensões de leptospiras atenuadas ou inativadas, o que pode levar a reações adversas. Além disso, são sorovar específicas, não oferecendo ampla cobertura e longo período de proteção.

Visando contribuir de forma efetiva para o combate à disseminação da leptospirose, escolhemos através do sequenciamento do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Nascimento, *et al.*, 2004) e de estudos apresentados na literatura de referência, proteínas com potencial diagnóstico e vacinal. Foram objetos deste estudo as proteínas LipL32 e HlyX.

A proteína LipL32 foi identificada anteriormente ao sequenciamento dos genomas de *Leptospira* (Ren, *et al.*, 2003; Nascimento, *et al.*, 2004; Bulach, *et al.*, 2006) por Haake e colaboradores (2000). LipL32 é uma lipoproteína de superfície (Cullen, *et al.*, 2005), altamente expressa *in vitro* e *in vivo* e encontrada somente em espécies patogênicas de *Leptospira* (Haake, *et al.*, 2000). O sequenciamento do genoma da espécie de vida livre, *L. biflexa* sorovar Patoc mostrou a ausência de gene ortólogo para LipL32 (Picardeau, *et al.*, 2008), demonstrando desta forma que leptospiras patogênicas necessitam por algum motivo desta proteína. Por todos estes atributos, LipL32 se tornou um importante alvo para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinais (Flannery, *et al.*, 2001; Guerreiro, *et al.*, 2001; Branger, *et al.*, 2005 e Seixas, *et al.*, 2007).

Quanto ao gene que codifica a proteína HlyX identificado durante a anotação do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, este codifica uma provável hemolisina. Porém, nossos dados (Hauk, *et al.*, 2008) mostraram que a proteína não possui atividade hemolítica conforme relatado por Zhang e colaboradores (2005). HlyX também possui homologia com o gene identificado em *L. interrogans* sorovar Hardjo, que contém 5 domínios tetratricopeptídeos. Segundo a literatura, os domínios tetraticopeptídeos estão envolvidos em interações proteína-proteína (Lamb, *et al.*, 1995). Desta forma, HlyX poderia ser uma possível adesina (fator de colonização) e, consequentemente, um potencial antígeno vacinal, pois a imunização com esta proteína poderia inibir a colonização do hospedeiro.

No presente estudo, todas as proteínas foram clonadas sem seus respectivos peptídeos sinais. Para os estudos com LipL32 foram utilizadas duas diferentes construções, uma sem e outra com a presença de uma cauda de histidina, respectivamente para estudos estruturais e funcionais. Com o intuito de mapear domínios imunodominantes e funcionais de LipL32, mais três construções obtidas através da clonagem de segmentos de LipL32 foram

realizadas (N-terminal, intermediário e C-terminal). A amplicação do gene que codifica LipL32 foi realizada com o objetivo de se obter uma proteína compreendendo os aminoácidos dos resíduos 21 a 272. Desta forma, excluiu-se a região hidrofóbica da sequência sinal contendo o consenso *lipobox* definida por comparação entre sequências conhecidas de lipoproteínas (Haake, 2000). O fragmento N-terminal de LipL32 também foi expresso a partir dos resíduo 21 aa, sem a região hidrofóbica.

Para a realização de estudos com HlyX, grande parte da região de aminoácidos referida como provável sequência sinal (posição 1 a 25 aa) também foi excluída. A proteína resultante contém os aminoácidos compreendidos entre os resíduos 22 a 378.

A remoção da sequência sinal das proteínas LipL32 e HlyX foi realizada para evitar um possível mal direcionamento e/ou processamento das proteínas em *E. coli*, que poderia acarretar um prejuízo no metabolismo desta bactéria e ausência de expressão destas proteínas.

A expressão das proteínas recombinantes foram realizadas com a cepa de expressão, *E. coli* BL21 (SI) ou *E. coli* BL21(DE3) Star [plysS]. Na análise comparativa entre as cepas de expressão foram utilizados critérios como: capacidade de expressar a proteína recombinante, níveis de expressão, escape, solubilidade da proteína recombinante e ainda o agente indutor, no caso destas duas linhagens, NaCl ou IPTG. A maioria da proteínas recombinantes foram expressas na forma solúvel, excetuando-se HlyX e o fragmento Nterminal de LipL32 que foram expressos em maiores quantidades na forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão. Com relação a ausência da solubilidade do fragmento N-terminal de LipL32 esta pode ser explicada através de dados obtidos recentemente por Hoke e colaboradores (2008), que clonaram porções contendo diferentes extensões da LipL32. Os fragmentos expressos (posições 20-106 aa, 20-155 aa e 20-200 aa) por Hoke e colaboradores (2008) são todos solúveis e se sobrepõem parcialmente àqueles por nós estudados, fragmento intermediário (93-184 aa) e C-terminal (185-272 aa). É possível que os aminoácidos responsáveis pela solubilidade de LipL32 se localizem após a sequência N-terminal (posição 21-92 aa), presentes na sequência do fragmento intermediário e C-terminal de LipL32).

A expressão de LipL32 em meio mínimo (M9) sem sal (agente indutor na *E. coli* BL21 SI), realizada para a expressão de LipL32 Se-M devido à restrição de aminoácidos no meio de cultivo foi mais demorada. Somente 17 h após a inoculação obteve-se a densidade óptica ideal para a adição dos aminoácido e do agente indutor. A expressão de LipL32 contendo selênio-metionina (Se-M) baseia-se no bloqueio da biossíntese de metioninas pela

inibição das aspartoquinases em presença de alta concentração de isoleucina, lisina e treonina (Berne, *et al.*, 1999) e foi realizada para a obtenção de cristais que serviram à resolução da estrutura tridimensional da proteína (ver colaboração adiante com o prof. Dr. Shaker Chuck Farah do Departamento de Bioquímica do IQ/USP).

Com exceção da purificação de LipL32 sem a fusão das seis histidinas na porção Nterminal da molécula, que dificultou o processo de purificação desta proteína, as demais proteínas recombinantes foram purificadas eficientemente. Para a purificação da LipL32 para fins cristalográficos foram escolhidas três técnicas cromatográficas: aniônica, catiônica e hidrofóbica. É importante relatar que foi possível observar nas purificações de LipL32, uma massa molecular (baseada na mobilidade eletroforética) diferente da calculada teoricamente. Esta anomalia na mobilidade eletroforética de LipL32, já havia sido observada por Haake e colaboradores (2000). LipL32 possui uma discrepância de aproximadamente 4 kDa entre a massa molecular observada (32 kDa) e sua massa molecular calculada (27,6 kDa) (Haake, et al.,2000). Uma provável explicação para esta anomalia seria a alta porcentagem de resíduos ácidos (34 de 253 aa; 13,4%) que poderia reduzir a ligação SDS. A proteína de Leptospira LipL41 e a lipoproteína TpN34 de T. Pallidum são dois exemplos de lipoproteínas com altas porcentagens de resíduos ácidos apresentando essas discrepâncias (Shang, et al., 1996; Swancutt, et al., 1989). A explicação baseada na redução da ligação SDS pela alta porcentagem de resíduos ácidos pode ser confirmada através dos resultados obtidos com a purificação dos fragmentos de LipL32, N-terminal, intermediário e C-terminal. O fragmento intermediário foi o único que apresentou anormalidade na mobilidade eletroforética em gel SDS-PAGE. Os demais fragmentos mostraram mobilidade eletroforética compatível com suas massas moleculares teóricas. O fragmento intermediário se comportou da mesma forma que a LipL32 total, mostrando uma discrepância de aproximadamente 4 kDa entre a mobilidade eletroforética observada e sua massa molecular calculada. Ambos os fragmentos N-terminal e C-terminal possuem baixas porcentagens de resíduos ácidos quando comparados ao fragmento intermediário, que possui em sua sequência 7 aspartatos seguidos.

Experimentos de *Western blot* foram realizados utilizando-se anticorpos gerados contra todas as proteínas purificadas *versus* as próprias proteínas e também contra extratos de *Leptospira*. No caso da LipL32, a informação sobre a expressão desta proteína somente por cepas patogênicas, não sendo encontrada na espécie de vida livre (Haake, *et al.*, 2000) já era amplamente conhecida. Porém após o recente sequenciamento do genoma da *L. biflexa* sabe-

se que o gene *lip*L32 está ausente nos dois cromossomos e no plasmídeo desta cepa (Picardeau, *et al.*, 2008). Esta informação aumenta ainda mais o interesse pelo estudo desta proteína, pois ela provavelmente deve ter algum papel na patogenicidade, mantendo-se altamente conservada entre as cepas patogênicas (Guerreiro, *et al.*, 2001). Além disso, trata-se de uma proteína de superfície (Cullen, *et al.*, 2005), ou seja, deve interagir com moléculas do hospedeiro e, ainda, é a proteína mais expressa durante a infecção (Haake, *et al.*, 2000).

Quanto à proteína HlyX, os anticorpos gerados contra a molécula purificada permitiram verificar que ela é expressa somente nas espécies patogênicas. Porém, o fato da expressão de HlyX não ter sido detectada não significa que o gene que codifica esta proteína, esteja ausente do genoma de espécies saprofíticas. De fato, Picardeau e colaboradores, (2008) mostraram que *hlyX* está presente no genoma da *L. biflexa* (cepa saprofítica). Com estas informações, surgem questionamentos com relação à condição e mecanismos de modulação de expressão desta proteína pelas espécies patogênicas e a possibilidade de uma expressão em baixos níveis na cepa saprofítica, não detectadas nas condições experimentais adotadas para este estudo através da técnica de *Western blot*.

Além da confirmação da identidade das proteínas purificadas, foram realizados ensaios de dicroísmo circular para verificar o enovelamento destas para possíveis ensaios funcionais. A proteína LipL32 6xHis apresentou mais enovelamentos de estrutura secundária randômica quando comparada à LipL32 purificada para crescimento de cristais, que apresentou dobramentos α -hélice e folha β -pregueada mais definidos. A pertubação na estrutura secundária de LipL32 6xHis demonstrada pela intensa presença de dobramentos randômicos deve-se provavelmente à sequência de 3,2 kDa fusionada no N-terminal da proteína resultante de uma sequência do vetor de expressão pDEST17 (Invitrogen), contendo as seis histidinas para purificação através de cromatografia de afinidade. Já a proteína HlyX purificada a partir da renaturação de corpúsculos de inclusão apresentou predominância de típicos dobramentos α -hélice. O sucesso obtido no processo de renaturação desta proteína deve-se ao fato de α -hélices serem mais estáveis que dobramentos folha β -pregueada.

Para a pesquisa de anticorpos anti-LipL32 e anti-HlyX em soros de pacientes com leptospirose foram utilizados primeiramente anticorpos anti-IgG, pois Flannery e colaboradores (2001) e Guerreiro e colaboradores (2001), detectaram apenas anticorpos IgG dirigidos contra LipL32. Nesses estudos, não foram detectados anticorpos IgM gerados contra

LipL32 através de ensaios de ELISA (Flannery, *et al.*, 2001) e nem através de *immunobloting* (Guerreiro, *et al.*, 2001) utilizando-se soros de pacientes, na fase aguda e convalescente da doença.

No que se diz respeito à HlyX foram detectados anticorpos IgG dirigidos contra esta proteína, indicando que ela é apresentada ao sistema imune durante a infecção. Entretanto, não houve reatividade contra esta proteína com soros de pacientes coletados durante a primeira semana (fase aguda) de infecção. Em contraste, LipL32, a lipoproteína de Leptospira mais expressa durante a infecção em mamíferos (Haake, et al., 2000), foi reconhecida por soros de pacientes com leptospirose na fase aguda (primeira semana de infecção) e na fase convalescente (segunda semana de infecção) da doença. Uma resposta mais intensa e específica para IgM em comparação à IgG foi observada, o que contraria a resposta relatada por Flannery e colaboradores (2001) e Guerreiro e colaboradores (2001). Extratos totais de Leptospira foram utilizados nesses casos, o que poderia explicar as diferenças observadas. Com este resultado obtido com LipL32, pretendeu-se caracterizar o domínio imunodominante da proteína. Os resultados mostraram que a reatividade contra o fragmento C-terminal é detectada logo no início do curso da infecção, e que a reatividade contra o fragmento intermediário parece ser mais tardia. O fragmento N-terminal não parece ser imunogênico, provavelmente pela sua localização próxima à membrana, acarretando um provável impedimento estérico de anticorpos nesta região. Nossos dados indicam que LipL32 pode ser usada como um antígeno diagnóstico tanto na fase aguda quanto na fase convalescente da leptospirose. Em adição a isto, nossos resultados identificaram o domínio C-terminal de LipL32 como um alvo imunológico primário, mostrando de forma inédita uma resposta IgM humoral em todos os pacientes testados.

Outro aspecto examinado nesta tese foi a capacidade das proteínas LipL32 e HlyX de interagir com componentes de matriz extracelular (CME). Os mecanismos pelos quais leptospiras patogênicas invadem e colonizam o hospedeiro ainda são pouco entendidos. Durante a invasão, leptospiras interagem com a matriz extracelular ou proteínas plasmáticas (Barbosa, *et al.*, 2006; Choy, *et al.*, 2007; Lin, *et al.*, 2007; Meri, *et al.*, 2005; Merien, *et al.*, 2000; Stevenson, *et al.*, 2007).

Em condições normais, CME não são expostos para bactérias. Patógenos podem ter acesso aos CME após trauma tecidual seguido de injúria mecânica ou química ou ainda como consequência de uma infecção bacteriana, através da atividade de toxinas e enzimas líticas (Fink, *et al.*, 2002). Não seria surpreendente se LipL32, considerada a proteina mais expressa durante a infecção, pudesse estabelecer interações com moléculas do hospedeiro, como CME. Para HlyX considerou-se o fato desta proteína possuir domínios tetratricopeptídeos relacionados com interação proteína-proteína, como uma potencial característica para estabelecer interações com CME.

Os resultados obtidos comprovaram nossas suspeitas, pois foi possível verificar uma ligação específica dose-dependente de LipL32 e HlyX a colágeno tipo IV e fibronectina plamática. Ensaios de competição entre o fragmento C-terminal e intermediário de LipL32, mostraram que o fragmento intermediário não participa da ligação à fibronectina plasmática e colágeno tipo IV. Em contrapartida a competição do fragmento C-terminal com LipL32 não deixou dúvidas quanto ao fato de que mediação da ligação às moléculas testadas ocorre predominantemente via fragmento C-terminal. No caso da LipL32 a capacidade de ligação à fibronectina plasmática e colágeno tipo IV é mediada pelo domínio C-terminal da proteína. Concomitantemente à publicação de nossos dados (Hauk, *et al.*, 2008), Hoke e colaboradores (2008) apresentaram dados atribuindo ao domínio C-terminal de LipL32 o papel de se ligar a componentes de matriz extracelular, concordantes, portanto, com nossos resultados. Foram realizados também ensaios para verificar se LipL32 era capaz de inibir a adesão de leptospiras aos componentes de matriz extracelular. Os resultados mostraram que LipL32 não apresentou efeito inibitório (dados não mostrados), e isto pode ser explicado pela provável existência de múltiplas adesinas em *Leptosira*.

Muitos patógenos ligam-se a domínios específicos de fibronectina, principalmente ao domínio de interação com heparina (Choy, *et al.*, 2007; Fink, *et al.*, 2002). A proteína LipL32 interagiu com os domínios de ligação a heparina (Fragmento de 30 kDa – F30) e gelatina (Fragmento de 45 kDa – F45). Os resultados obtidos com a proteína HlyX demonstraram que esta proteína interage com fibronectina plasmática (provavelmente via domínio F30), bem como com colágeno tipo IV. Para confirmar a ligação das proteínas via estes domínios de fibronectina foram realizados ensaios para verificar a especificidade destas ligações. Nós demonstramos que heparina e gelatina podem inibir a ligação de LipL32 à fibronectina de forma dose-dependente, indicando que os domínios de ligação a heparina (30 kDa) e gelatina (45 kDa) presentes na fibronectina plasmática estão envolvidos nesta interação. Como HlyX mostrou interagir somente com o domínio de ligação à heparina, os experimentos foram realizados de modo a verificar se heparina poderia inibir a ligação de HlyX à fibronectina de forma dose-dependente. Os resultados mostraram que para HlyX somente o domínio de

ligação a heparina participa desta ligação. Os valores de *Kds* aparentes encontrados para HlyX foram bem inferiores aos encontrados para LipL32, principalmente no caso da ligação ao colágeno tipo IV. A presença de 5 tetratricopeptídeos (TRPs) na sequência de HlyX pode, eventualmente, mediar a interação desta proteína com as macromoléculas testadas, já que TPRs estão associados a interações proteína-proteína (Lamb, *et al.*, 1995).

Os valores de *Kd*s para a ligação de LipL32 em fibronectina e colágeno tipo IV indicam que esta proteína interage com CME com avidez de ligação comparáveis com às das adesinas conhecidas de *Leptospira* como as Ligs (A e B) (Choy, *et al.*, 2007; Lin, *et al.*, 2007). Entretando, o mesmo não pode ser afirmado para HlyX, pois esta proteína possui avidez de ligação a colágeno tipo IV e fibronectina superior às adesinas de *Leptospira* mencionadas. Como já mencionado, LipL32 não foi capaz de inibir a adesão de leptospiras à proteínas de matriz extracelular. Ensaios realizados *in vitro* indicaram que o soro anti-LipL32 falhou no bloqueio da adesão de leptospiras em CME (Hoke, *et al.*, 2008). A ausência de um efeito inibitório observado em ambos os casos poderia ser explicado em parte pela existência de proteínas adicionais de *L. interrogans* que contribuem para a aderência das leptospiras em CME. Os experimentos de inibição da ligação de leptospiras em CME realizados com LipL32 ainda serão realizados com a proteína HlyX.

O significado biológico da ligação de LipL32 e HlyX à componentes de matriz extracelular ainda não está claro. Existem multiplas isoformas de fibronectina. Fibronectina plasmática, a isoforma que interage com LipL32 e HlyX, é solúvel e circula no sangue e em demais fluídos corporais, participando da formação de coágulos de sangue, cicatrização e na fagocitose. Recentemente, Cinco e colaboradores (2002) demonstraram que leptospiras são capazes de reconhecer e se ligar a integrinas CR3 (MAC-1) expressas em neutrófilos e em células CHO transfectadas com mac-1 (Cinco, *et al.*, 2002). Esta interação parece ocorrer através do domínio I da integrina CR3, que é responsável pelo reconhecimento de iC3b (fragmento do complemento, que se liga às superfícies dos patógenos durante a resposta imune), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular da superfamília das imunoglobulinas, expressa no endotélio), fibrinógeno e fibronectina.

De acordo com estes resultados, a adesão das células aumenta quando leptospiras ou as células são pré-tratadas com fibronectina, sugerindo que esta molécula possa facilitar e melhorar a interação entre microrganismos e o domínio I da integrina CR3 (Cinco, *et al.*, 2002). Além das proteínas LipL32 e HlyX, poucas proteínas de *Leptospira* tem sido mostradas por ligar-se a fibronectina plasmática como por exemplo, uma proteína de 36 kDa

não caracterizada ligante de fibronectina (Merien, *et al.*, 2000), as proteínas LigA e LigB (Choy, *et al.*, 2007; Lin, *et al.*, 2007), e proteínas de membrana externa tipo endostatina de *Leptospira* (Len) (Stevenson, *et al.*, 2007). Diversas proteínas presentes em outros microrganismos patogênicos se ligam à fibronectina (Joh, *et al.*, 1999). Glicoproteínas adesivas, assim como fibronectina ou laminina, tem sido definidas como domínios de ligação de células e bactérias, enquanto colágeno fornece múltiplos sítios de interação para células e patógenos ao longo da estrutura de tripla hélice, mostrando-se desta forma como uma importante molécula participa de forma dinâmica nestes tipos de interações (Preissner e Chhatwal, 2005). Além do mais, colágenos frequentemente formam agregados supramoleculares que variam na estrutura e na composição, dependendo da associação com outras moléculas da CME como fibronectina, vitronectina, fator de von Willebrand, laminina, nidogenio e proteoglicanos. Em muitos casos, as interações com bactérias não é determinada exclusivamente pelo componente colágeno (Preissner e Chhatwal, 2005).

LipL32 e HlyX exibiram uma ligação significante a colágeno tipo IV, que é o maior componente de membranas. Sobre a injúria tecidual, particularmente nos sítios de cicatrização ou degradação de CME, esta molécula vem a ser exposta e a interação com proteínas da superfície de bactérias pode ocorrer. A presença de multiplos sítios de ligação a CME em uma única proteína pode ser de grande importância (Cameron, *et al.*, 2004). As proteínas de *Leptospira* LigA, LigB e Len mostraram a habilidade de se ligar em vários CMEs (Choy, *et al.*, 2007; Stevenson, *et al.*, 2007), assim como a proteína autotransportadora, Hap de *Haemophilus influenzae* (Fink, *et al.*, 2002). Leptospiras circulantes ligadas a fibronectina plasmática poderiam atingir diferentes alvos teciduais. De fato, foi demonstrado que a fibronectina plasmática melhora a aderência de *Streptococcus sanguis* em gelatina (Lowrance, *et al.*, 1988). É possível que fibronectina ligada a LipL32 ou HlyX também ajude nesta interação com colágeno tipo IV presente nos componentes de matriz do endotélio.

Portanto, os resultados relacionados a interação de LipL32 e HlyX à fibronectina plasmática e colágeno IV obtidos nesta tese, nos permite sugerir que as proteínas de *Leptospira* abordadas neste estudo participam da patogênese da leptospirose, apesar de não estar muito claro por qual mecanismo estas proteínas se associam à colágeno tipo IV e fibronectina plasmática para atuar no hospedeiro.

A maioria dos estudos realizados com proteínas de *Leptospira* têm como principal objetivo a descoberta de antígenos para diagnóstico ou vacinas. Baseados nos estudos de

vacinologia reversa (Rappuoli e Covacci, 2003), genomas de diferentes sorovares e espécies de Leptospira foram sequenciados e vários genes identificados. Os esforços se concentram na busca por um antígeno que confira proteção contra todas as espécies e sorovares de Leptospira. Entre os antígenos testados que conferiram proteção parcial contra Leptospira interrogans em modelo de desafio animal encontram-se OmpL1 co-adminstrada com LipL41 (Haake, et al., 1999), o fragmento C-terminal da proteína LigA (Palaniappan, et al., 2006; Silva, et al., 2007), a proteína LipL32 em diferentes formas de apresentação: adenovírus (Branger, et al., 2001), vacina de DNA e LipL32 recombinante associada a hidróxido de alumínio (Branger, et al., 2005) e Mycobacterium bovis (BCG) (Seixas, et al., 2007). Ainda não existe um entendimento detalhado do mecanismo de imunidade do hospedeiro para *Leptospira*. É observado que a aquisição da imunidade que protege contra a re-infecção por Leptospira ocorre naturalmente e assume-se que esta imunidade seja humoral (Bharti, et al., 2003). Esta imunidade protetora pode ser atribuída pelo anticorpos gerados contra lipopolissacarídeos específicos de cada sorovar. Lipopolissacarídeos de Leptospira estimulam o sistema de resposta inata via um mecanismo dependente de TLR2, um mecanismo potencial adicional tanto de imunidade protetora como de imunopatogênese (Werts, et al., 2001).

O papel da imunidade celular em leptospirose está sendo explorado. Estudos realizados com gado imunizado com uma vacina composta por *L. borgpetersenii* mortas mostrou *in vitro* uma resposta de proliferação de células T CD4+ e células T $\gamma\delta$ e ainda a produção de interferon γ após estimulação realizada com uma preparação contendo *Leptospira* (Naimam, *et al.*, 2001).

Nos nossos estudos de atividade vacinal (protetora), a proteína HlyX foi o principal objeto de pesquisa, pelo fato de ainda não ter sido estudada com este propósito. Portanto era importante explorar esta possível atividade, já que HlyX é reconhecida pelo sistema imune e ainda possui a habilidade de interagir com proteínas do hospedeiro. Portanto, para estes fins foram realizados estudos com HlyX, LipL32 e HlyX em co-administração com LipL32 em modelo de desafio animal (hamsters), utilizando-se hidróxido de alumínio como adjuvante.

O fragmento C-terminal de LigA foi incorporado ao experimento como um controle positivo de proteína recombinante que apresenta atividade protetora (Palaniappan, *et al.*, 2006; Silva, *et al.*, 2007). Entretanto, deve-se destacar que o fragmento de LigA (posição resíduos de aa 817-1224 aa) utilizado nos nossos ensaios de imunização não corresponde exatamente à sequência de aminoácidos dos fragmentos utilizados nos estudos de imunização e desafio animal realizados por Palaniappan e colaboradores (2006) e Silva e colaboradores

(2007). Além do fragmento C-terminal de LigA, também utilizou-se uma bacterina preparada a partir de células da mesma cepa virulenta utilizada no desafio animal, como controle positivo.

Na avaliação da capacidade das proteínas recombinantes HlyX, LipL32 e fragmento C-terminal de LigA de induzir a produção de anticorpos IgG dirigidos contra as mesmas, através da imunização pela via subcutânea pode-se constatar que HlyX mostrou-se altamente imunogênica pelo alto título de anticorpos IgG apresentados (1:128.000), assim como o fragmento C-terminal de LigA (1:64.000). A proteína LipL32 mostrou também ser capaz de induzir a produção de anticorpos IgG, mas em quantidades menores (1:16.000) quando comparada com as duas outras proteínas recombinantes estudadas.

A alta imunogenicidade de HlyX, representada através dos altos títulos de anticorpos gerados pode se atribuida pela baixíssima similaridade que esta proteína tem com as proteínas do hospedeiro. Interessantemente, o fragmento C-terminal de LigA mostrou reatividade cruzada contra os soros de animais imunizados com LipL32. O contrário também foi observado, a proteína LipL32 mostrou a mesma reatividade cruzada contra os soros de animais imunizados C-terminal de LigA.

Com relação a estes resultados, poucas suposições podem ser levantadas já que seriam necessários mais experimentos para comprovar se este tipo de resposta é persistente com os dados observados. É possível que no processo de purificação tenha havido algum tipo de contaminação proveniente de E. coli e que esta houvesse se mantido em ambas as purificações de LipL32 e do fragmento C-terminal de LigA. Apesar do fato das expressões terem sido realizadas em diferentes cepas de expressão, e do fato das proteínas terem sido expressas em diferentes formas: LipL32 na forma solúvel e purificada a partir do sobrenadante do lisado bacteriano e o fragmento C-terminal de LigA expresso na forma insolúvel e purificado após renaturação, existe a possibilidade de alguma(s) proteína(s) presente em ambas as cepas de E. coli ter sido co-purificada com as proteínas recombinantes, e em baixas concentrações, a ponto de não ser visualizada em gel corado com Comassie blue. A possibilidade de LipL32 e o fragmento C-terminal de LigA possuírem algum tipo de similaridade na sequência de aminoácidos está descartada. Intrigantemente, não foram detectados títulos de anticorpos IgG dirigidos contra LipL32 nos soros de animais imunizados com bacterina. Sendo LipL32 a proteína de superfície mais expressa durante a infecção (Cullen, et al., 2005; Haake, et al., 2000), era esperada a detecção de títulos de anticorpos gerados contra esta proteína nos animais imunizados com esta preparação. Apesar dos altos títulos de anticorpos gerados pela proteína HlyX esta obteve praticamente o mesmo desempenho do controle negativo (salina) ou seja, não apresentou capacidadade protetora em modelo de desafio animal, no esquema de imunização utilizado. Os anticorpos IgG gerados contra HlyX utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante não foram capazes de neutralizar o patógeno de forma eficiente. É portanto, possível que HlyX isoladamente não seja um bom candidato vacinal.

Apenas as preparações de LipL32, HlyX em co-administração com LipL32 e os controles positivos, fragmento C-terminal de LigA e bacterina conferiram proteção. No caso da proteção conferida pela co-administração de LipL32 e HlyX, pode-se atribuir a proteção principalmente à proteína LipL32 e não à proteína HlyX, pois LipL32 conferiu 80% de proteção quando administrada individualmente. Entretanto esta proteção, não foi esterelizante já que todos os fígados dos animais sobreviventes apresentavam leptospiras. Uma proteção parcial (50%) conferida por LipL32 recombinante utilizando hidróxido de alúminio e saponina como adjuvantes também foi observada por Branger e colaboradores (2005).

O fragmento C-terminal de LigA conferiu 100% de proteção, embora não tenha sido esterilizante, conforme os resultados descritos na literatura (Palaniappan, *et al.*, 2006; Silva, *et al.*, 2007) já que os animais continuavam sendo portadores de leptospiras. Entretanto, a comparação dos nossos resultados obtidos com animais imunizados com o fragmento C-terminal de LigA não podem ser comparados aos dados descritos na literatura, pois o fragmento de LigA de Palaniappan e colaboradores (2006) e de Silva e colaboradores (2007) diferem em número de aminoácidos do fragmento utilizado pelo nosso grupo na imunização dos animais.

A bacterina mostrou ser a preparação vacinal mais eficaz, pois além da proteção total apresentou atividade esterelizante, já que nenhum dos animais sobreviventes era portador de leptospiras. Apesar de eficaz, a bacterina é sorovar específica, portanto não oferece cobertura em relação aos sorovares (mais de 200 sorovares) que não estão presentes na preparação vacinal. Além do mais, a proteção conferida por este tipo de preparação não é duradora, sendo necessária a vacinação frequente para a manutenção da imunidade humoral (Levett, 2001). Para imunizações em humanos, este tipo de medida profilática torna-se um problema ainda maior, pois existem muitas reações adversas neste tipo de preparação, provocadas pelos lisados celulares e pelo próprio meio de cultura. Portanto esta estratégia de vacinação com bacterina deve ser descartada e os esforços em busca de uma vacina contra a leptospirose continuada.

Apesar dos resultados obtidos no modelo de desafio animal serem um indicativo da atividade vacinal de LipL32, serão necessários mais ensaios de desafio para a comprovação dos resultados.

Os resultados obtidos com as proteínas LipL32 e HlyX nos levam a concluir que estas proteínas podem ter realmente um papel relacionado com a patogênese da leptospirose. Com relação a HlyX, serão necessários mais estudos visando avaliar a função desta proteína que, além de ser expressa em cepas patogênicas, e ser reconhecida pelo sistema imune, possui a capacidade de interagir com proteínas do hospedeiro, e é altamente imunogênica.

A proteína LipL32 vem sendo mais estudada pelo fato de estar presente somente em cepas patogênicas de *Leptospira* e por ser altamente expressa tanto em cultura como no hospedeiro. Muitos trabalhos especulam o potencial diagnóstico e vacinal de LipL32, bem como seu papel na patogênese. Estudos mostraram que LipL32 é reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, apresentando-se desta forma como um potencial antígeno vacinal e diagnóstico e, ainda, foi demonstrado que ela interage com proteínas do hospedeiro. Por todos estes motivos, esta proteína desperta a curiosidade de toda a comunidade científica que trabalha na área.

Curiosamente, um estudo genético realizado por Murray e colaboradores (2008) mostrou que hamsters inoculados com leptospiras mutantes para LipL32 apresentaram manifestações clínicas (doença grave) exibidas pelo grupo controle (hamsters inoculados com leptospiras selvagens). Porém este resultado ainda não deve ser considerado definitivo para afirmar que LipL32 não possui relevância na patogênese. Aliás, este resultado parece ser tão antagônico quanto àqueles obtidos com a proteína LoA22 (OmpA) por Ristow e colaboradores (2007). O gene que codifica para esta proteína é encontrado tanto no genoma de leptospiras patogênicas como no de leptospiras de vida livre (Picardeau, *et al.*, 2008). LoA22 parece ser uma proteína crucial para a virulência da *Leptospira* (Ristow, *et al.*, 2007). Entretanto, se LoA22 é tão importante para a virulência da *Leptospira*, qual seria o motivo de *L. biflexa*, a cepa saprofítica, trazer em seu genoma o gene que codifica essa proteína e não possuir o gene que codifica a LipL32? Qual seria o papel biológico de uma proteína expressa em altos níveis por uma bactéria patogênica, sem que aquela tenha um papel fundamental para a sobrevivência desta bactéria?

Estudos relacionados à resolução da estrutura tridimensional de LipL32 podem ajudar a desvendar o verdadeiro papel desta proteína na patogênese da *Leptospira*. Embora não apresentada nesta tese, a estrutura tridimensional de LipL32 foi resolvida em colaboração com o Prof. Dr. Shaker Chuck Farah do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. A estrutura de LipL32 (ver Anexo) número de depósito no PDB, *Protein Data Bank :* 3FRL) possui uma topologia *jell-roll* (rocambole) e mostrou que esta possui similaridades topológicas com duas outras proteínas que se ligam a cálcio, como calpaína-7 e colagenase. Estudos de dicroísmo circular e fluorescência realizados com LipL32 na presença e na ausência de cálcio, comprovaram os indícios da ligação a cálcio obtidos através da comparação realizada entre as topologias das proteínas presentes nos bancos de dados. Um artigo científico abordando os dados obtidos com a resolução da estrutura tridimensional de LipL32 e a ligação a cálcio foi recentemente submetido para a publicação (Anexo).

Sabe-se que o hospedeiro possui altas concentrações de cálcio e que microrganismos requerem este íon para muitas das suas funções biológicas como transdução de sinal, controle da divisão e ciclo celular, competência, patogênese, motilidade e quimiotaxia, interações patógeno-hospedeiro, estabilidade e manutenção da integridade da membrana externa lipopolissacarídica e da parede celular, atividade e estabilização de várias enzimas e proteínas, muitas delas localizadas extracelularmente e controladas por ligação a Ca^{2+} (Lin, *et al.*, 2008).

Os estudos realizado por Johnson e Gary (1963) e Shenberg (1967) demostraram a importância dos íons cálcio para a sobrevivência e o crescimento de *Leptospira sp.* Recentemente, LigB, uma importante proteína da família de proteínas de *Leptospira* que possuem domínios tipo imunoglobulina bacteriano (BIg) também encontrado na LigA, mostrou se ligar a íons cálcio (Lin, *et al.*, 2008). Assim como LipL32, LigA e LigB interagem com componentes de matriz extracelular, fibronectina, fibrinogenio, laminina e colágeno (Choy, *et al.*, 2007; Lin, *et al.*, 2007; Lin e Chang, 2008).

Conjuntamente todos os resultados obtidos demonstram uma alta complexidade de interações entre LipL32 e diversos ligantes como proteínas da matriz extracelular e íons cálcio. Desta forma, futuros estudos de mutação sítio dirigida e co-cristalização de LipL32 com possíveis receptores podem ajudar a desvendar o papel de LipL32 na patogênese.

6 CONCLUSÕES

1- A proteína HlyX, bem como LipL32 6xHis e seus fragmentos, N-terminal, intermediários e C-terminal podem ser expressos utilizando *E. coli*, como sistema de expressão heterólogo.

2- A proteína HlyX, expressa em sua maior parte em forma de corpúsculos de inclusão, pode ser renaturada por diluição, sendo este resultado confirmado por dicroísmo circular.

3- HlyX, LipL32 6xHis e seus fragmentos foram purificadas eficientemente, utilizando-se cromatografia de afinidade a Ni²⁺.

4- LipL32 obteve grau de pureza suficiente para ensaios de cristalização, através das cromatografias aniônica, catiônica e hidrofóbica.

5- HlyX mostrou ser uma proteína expressa somente em cepas de *Leptospira* patogênicas, embora a possibidade desta proteína ser expressa em baixos níveis na cepa saprofítica e não ser detectada devido as condições experimentais empregadas, não estar descartada.

6- LipL32 é uma proteína expressa somente em cepas de *Leptospira* patogênicas como ampalmente dilvulgado na literatura.

7- Foram encontrados em soros de pacientes com leptospirose confirmada, anticorpos IgG dirigidos contra HlyX somente na fase crônica da infecção por leptospiras, não havendo a produção de anticorpos IgM contra esta proteína em nenhuma dos soros dos pacientes com leptospirose que foram testados.

8- LipL32 mostrou induzir anticorpos IgM e IgG durante a infecção por leptospiras em pacientes com leptospirose confirmada.

9- O fragmento C-terminal (resíduos 185-272 aa) de LipL32 mostrou ser o domínio imunodominante, embora o fragmento intermediário (resíduos 93-184 aa) também seja reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro em uma fase mais tardia da infecção,

diferentemente do fragmento N-terminal (resíduos 21-92 aa) que não mostrou nenhuma reatividade em qualquer fase da infecção.

10- Ambas as proteínas HlyX e LipL32 ligam-se a fibronectina plasmática e colágeno tipo IV, sendo a avidez da ligação de HlyX nestas proteínas maior do que a encontrada para LipL32.

11- A ligação de LipL32 e HlyX a fibronectina plasmática ocorrem ambas no domínio de ligação a heparina (30 kDa). No caso de LipL32, a ligação a fibronectina plasmática também ocorre devido a interação ao domínio de ligação a gelatina (45 kDa).

12- No caso de LipL32 a ligação desta às proteínas, fibronectina plasmática e colágeno tipo IV são mediadas pelo fragmento C-terminal (resíduos 185-272 aa), sendo que os outros dois domínios não participam destas interações.

13- A proteína HlyX não demonstrou atividade protetora segundo o ensaio de imunização e desafio animal utilizados neste estudo, mas em contrapartida apresentou-se altamente imunogênica pelos títulos de anticorpos IgG gerados em hamsters.

14- LipL32 e a co-administração HlyX com LipL32 mostraram atividade protetora, sendo LipL32 a proteína protetora na co-administração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^{*}

Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's Disease). American Journal of Pathology. 1962;40:393–415.

Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins, BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. Evaluation of four comercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41:803-09

Barbosa AS, Abreu PAE, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos AS, Nascimento, ALTO. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. Infection and Immunity. 2006;74:6356–64.

Beuken E, Vink C, Bruggeman CA. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. Biotechniques. 1998;24(5):748-50.

Berne PF, Doublié S, Carter CWJ. Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach. 2nd ed. Oxford University Press;1999.

Bhandari P, Gowrishankar J. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. Journal of Bacteriology. 1997;179:4403–06.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman R H, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. On behalf of the Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infection Diseases. 2003;3:757–71.

Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, Andre-Fontaine G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. Infection and Immunity. 2005;73:4062–69.

Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre´-Fontaine G, Eloit M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination, Infection and Immunity. 2001;69:6831–38.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS, Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999;49:839–58.

^{*} De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America. 2006;103:14560-65.

Burth P, Younes-Ibrahim M, Gonecalez FH, Costa ER, Faria MV, Purification and characterization of a Na+, K+ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. Infection and Immunity. 1997;65:1557–60.

Caldas EM, Costa E, Sampaio MB, Leptospirosis in Salvador (Brazil). Clinical and laboratory aspects. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1978;20:164–76.

Cameron CE, Brown EL, Kuroiwa JM, Schnapp LM, Brouwer NL, *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins. Journal of Bacteriology. 2004;186:7019–22.

Cameron CE, Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. Infection and Immunity. 2003;71:2525-33.

Charon WN, Goldestein FS, Genetics of Motility and Chemotaxis of a Fascinating Group of Bacteria: The Spirochetes. Annual Review of Genetics. 2002;36:47-73.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA, Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infection and Immunity. 2007;75:2441–50.

Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G, *Leptospira interrogans* binds to CR3 receptor on mammalian cells. Microbial Pathogenesis. 2002;33:299–305.

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake, DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira spp*. Infection and Immunity. 2005;73:4853–63.

Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infection and Immunity. 2003,71:2414-21.

Dahle UR, Tronstad L, Olsen I, 3-Hydroxy fatty acids in a lipopolysaccharide-like material from *Treponema denticola* strain FM. Endodontics & dental traumatology. 1996;12:202–05.

Dey S, Mohan CM, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2004;103:99–106.

Duong F, Eichler J, Price A, Leonard MR, Winckner W. Biogenisis of the gram-negative bacterial envelope. Cell. 1997;91:567-73.

Everard CO, Edwards CN, Everard JD, Carrington DG. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. European Journal of Epidemiology. 1995;11:311-20.

Faine S. Guidelines for the Control of Leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 1982.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999.

Fink DL, Green BA, Geme III JW St. The *Haemophilus influenza* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. Infection and Immunity. 2002;70:4902–07.

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39:3303–10.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White 0, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature. 1997;390:580-6.

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White 0, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Venter JC. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science. 1998;281:375-88.

Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EAL, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LCC, Ho PL, Nascimento ALTO. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. FEMS Microbiology Letters. 2005; 244:305–13.

Goldstein SF, Charon NW, Motility of the spirochete *Leptospira*. Cell. Motility and Cytoskeleton. 1988;9:101–10.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infection and Immunity. 2001;69:4958–68.

Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 e LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infection and Immunity. 1999;67:6572-82.

Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology. 2000;146:1491-504.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infection and Immunity. 2000;68:2276-85.

Habicht GS, Beck G, Benach JL, Coleman JL, Borrelia burgdorferi lipopolysaccharide and its role in the pathogenesis of Lyme disease. Zentralblatt fuer Bakterlologie, Mikrobiologie und hygiene (reihe A). 1986;263:137–41.

Hauk P, Macedo Felipe, Romero EC, Vasconcellos AS, de Morais ZM, Barbosa AS, Ho P L. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary
Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. Infection and Immunity. 2008;76:2642–50.

Hauk P, Negrotto S, Romero CE, Vasconcellos SA, Genovez EC, Ward RJ, Schattner M, Gómez RM, Ho PL. Expression and characterization of hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;333:1341-47.

Hauk P, Negrotto S, Romero CE, Vasconcellos SA, Genovez EC, Ward RJ, Schattner M, Gómez RM, Ho PL. Expression and characterization of hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. 2008;372:948. Corrigendum in: Hauk P, Negrotto S, Romero CE, Vasconcellos SA, Genovez EC, Ward RJ, Schattner M, Gómez RM, Ho PL. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;333:1341–47.

Hayashi S, Wu HC. Lipoproteins in bacteria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1990;22:451-71.

Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZMM, Vasconcellos AS, Richtzenhain LJ. Detection and differentiation of *Leptospira spp*. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Veterinary Microbiology. 2000;73:261-7.

Hengge UR, Tannapfel A, Tyring SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. The Lancet Infectious Diseases. 2003,3:489–500.

Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular-matrix-interacting protein of *Leptospira* and *Pseudoalteromonas tunicata*. Infection and Immunity. 2008;76:2063–9.

Ikoev VN, Gorbunov MA, Vachaev BF, Iagovkin EA, Kondratenko VF, Anan'ina IuV, Ansimova TI, Kostina NI, Iur'eva IL, Nikitin MG. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii. 1999;4:39-43.

Joh D, Wann ER. Kreikemeyer B, Speziale P, Höök, M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. Matrix Biology. 1999;18:211–23.

Johnson CR. The Spirochetes. Annual Reviews Microbiology. 1977;31:89-106.

Johnson RC, Gary ND. Nutrition of Leptospira Pomona. Calcium, Magnesium, and Potassium Requirements. Journal of Bacteriology. 1963; 85: 983-5.

Ko AI, Galvão Reis M, Ribeirodourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet. 1999;354:820-5.

Kuriakose M, Eapen CK, Paul R. Leptospirosis in Kolenchery, Kerala, India: epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar. European Journal of Epidemiology. 1997;13:691–7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.

Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? Trends in Biochemical Sciences. 1995;20:257-9.

Lecour H, Miranda M, Magro C, Rocha A, Gonçalves V. Human leptospirosis- a review of 50 cases. Infection. 1989;17:8-12.

Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 2001;14:296-326.

Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clinical Infectious Diseases. 2003;36:447-52.

Lin YP, Chang YF. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007;362:443–48.

Lin YP, Chang YF. The C-terminal variable domain of LigB from Leptospira mediates binding to fibronectin. Journal of Veterinary Science. 2008;9:133-44.

Lin YP, Raman R, Sharma Y, Chang YF. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. Journal of Biology Chemistry. 2008;283:25140-9.

Lowrance JH, Hasty DL, Simpson WA. Adherence of *Streptococcus sanguis* to conformationally specific determinants in fibronectin. Infection and Immunity. 1988;56:2279–85.

Martínez-Sánchez R, Obregón Fuentes AM, Pérez S, A. Baly Gil A, Díaz González M, Baró Suárez M, Menéndez Capote R, Ruiz Pérez A, Sierra Gónzalez G, López Chávez AU. The reactogenicity and immunogenicity of the first Cuban vaccine against human leptospirosis. Revista Cubana de Medicina Tropical. 1998;50(2):159-66.

McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2005;18:376-86.

McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. Annals of Internal Medicine. 1984;100:696–8.

Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. Microbial Pathogenesis. 2005;39:139–47.

Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiology Letters. 2000;185:17–22.

Merien F, Truccolo J, Rougier Y, Baranton G, Perolat P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiology Letters. 1998;169:95–102.

Miller NG, Wilson RB. Electron microscopy of the liver of the hamster during acute and chronic leptospirosis. American Journal of Veterinary Research. 1966;27:1071–81.

Murphy PA. Leptospirosis. Clinical conferences at the Johns Hopkins Hospital, J. Hopkins. Medical Journal. 1980;147:65-9.

Murray GL, Srikram A, Hoke DE, Wunder EA Jr, Henry R, Lo M, Zhang K, Sermswan RW, Ko AI, Adler B. The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans. Infection and Immunity. In press 2008.

Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR, Saint Girons I, Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. The Journal of Immunology. 2005;175:6022–31.

Naimam BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed Leptospira borgpetersenii vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma-delta T lymphocytes. Infection and Immunity. 2001;69:7550-8.

Nascimento ALTO, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Harstkeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CFM, Leite LCC, Carrer H, Coutinho LL, Degrave WM, Dellagostin AO, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MIT, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MHS, Harakava R, Jerônimo SMB, Junqueira-de-Azevedo ILM, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EGM, Lemos MVF, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJG, Ferro JA, Camargo LEA, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. Journal of Bacteriology. 2003;186:2164-72.

Nascimento ALTO, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LEA, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EAL. Genoma features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2004;37:459-78.

Norris SJ, Weinstock GM. The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? Current Opinion in Infectious Diseases. 2000;13:29–36.

Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2007;20:284–92.

Palaniappan RUM, McDonough SP, Divers TJ, Chen C-S, Pan M-J, Matsumoto M, Chang Y-F. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. Infection and Immunity. 2006; 74: 1745-50.

Park SK, Lee SH, Rhee YK, Kang SK, Kim KJ, Kim MC, Kim KW, Chang WH. Leptospirosis in Chonbuk providence of Korea in 1987: a study of 93 patients. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1989;41:345-51.

Paster JB, Dewhirst EF. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2000;2(4):341-4.

Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T,

Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Me´digue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS ONE. 2008;3:e1607.

Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science. 2000;287:1816-20.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes and Infection. 2000;2:1265-76.

Preissner KT, Chhatwal GS. Extracellular matrix and host cell surfaces: potential sites of pathogen interaction. In: Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. Cellular Microbiology. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 87-103.

Pusgley AP. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1993; 57: 50-108.

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Girons IS, Werts C, Raetz CR. A methylated phosphate group and four amidelinked acyl chains in Leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. Journal of Biological Chemistry. 2004;279:25420–9.

Ramos CRR, Abreu PAE, Nascimento ALTO, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal Histagged fusion peptide. Brazilian Journal of Medical Biological Research. 2004;37:1103–9.

Rappuoli R, Covacci A. Reverse vaccinology and Genomics. Science. 2003;302:602.

Reed LJ, Muench H. "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene. 1938;27:493-7.

Ren S-X, Fu Gang, Jiangk X-G, Zeng R., Miao Y-G, Xu H, Zhang Y-X, Xiong H, Lu G, Lu L-F, Jiang H-Q, Jia J, Tu Y-F, Jiang J-X, Gu W-Y, Zhang Y-Q, Cai Z, Sheng H-H, Yin H-F, Zhang Y, Zhu G-F, Wank M, Huangk H-L, Qian Z, Wang S-Y, Ma W, Yao Z-J, Shen Y, Qiang B-Q, Xia Q-C, Guo X-K, Danchinq A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen Y-M, Shik M-H, Chen Z, Xuk J-G, Zhao G-P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2003;422:888-93.

Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Girons IS, Ko AI, Picardeau M. PLoS pathogen. 2007;e97,3:894-903.

Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost M-C, Lilenbaum W, Picardeau M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires Microbiology. 2008;154:1309–17.

Rodriguez-Gonzalez I, Fillonneau C, Blanchet B, Suard I, Catilina P, Andre-Fontaine G. Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents. Medical Malpractice Infection. 2004;34(5):196-200.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory manual. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America. 1977;74:5463-7.

Shenberg E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. Journal of Bacteriology. 1967;93:1598-606.

Schmid GP. Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases. Reviews of Infectious Diseases. 1989;11:1460–9.

Schröder NWJ, Eckert J, Stübs G, Schumann RR. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. Immunobiology. 2008;213:329-40.

Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Messina OGO, de Bassadoni CD, R Schtirbu, Olenchuk A, de Mazzonelli GD, Parma A. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emergin Infectious Diseases Journal. 2002;8:1004–5.

Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. Nephron. 1990;55:146–51.

Sehgal SC, Murhekar MV, Sugunan AP. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman. Indian Journal of Medical Research. 1995;102:9–12.

Seixas FK, da Silva EF, Hartwig DD, Cerqueira GM, Amaral M, Fagundes MQ, Dossa RG, Dellagostin AO. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. Vaccine. 2007;26:88–95.

Seshadri R, Myers GS, Tettelin H, Eisen JA, Heidelberg JF, Dodson RJ, Davidsen TM, DeBoy R.T, Fouts DE, Haft DH, Selengut J, Ren Q, Brinkac LM, Madupu R, Kolonay J, Durkin, SA, Daugherty SC, Shetty J, Shvartsbeyn A, Gebregeorgis E, Geer K, Tsegaye G, Malek J, Ayodeji B, Shatsman S, McLeod MP, Smajs D, Howell JK, Pal S, Amin A, Vashisth P, McNeill TZ, Xiang Q, Sodergren E, Baca E, Weinstock GM, Norris SJ, Fraser CM, Paulsen IT. Comparison of the genome of the oral pathogen Treponema denticola with other spirochete genomes. Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America. 2004;101:5646–51.

Setubal JC, Reis M, Matsunaga J, Haake D.A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. Microbiology. 2006;152:113-21.

Shang ES, Summers TA, Haake D.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene enconding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infection and Immunity. 1996; 64: 2322-30.

Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA, Haake DA, Reis MG, Ko AI. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine. 2007;25(33):6277-86.

Simpson FG, Green KA, Haug GJ, Brookes DL. Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in Far North Queensland. The Medical Journal of Australia. 1998;169:151–3.

Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS ONE. 2007;2:e1188.

Swancutt MA, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV. Molecular characterization of the pathogen-specific, 34-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum*. Infection and Immunity. 1989;57:3314-23.

Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. Infection and Immunity. 1987;55:2311–13.

Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquain-Gonzaalez C, Amador JJ, De Los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Braag SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage Nicaragua, 1995. The Journal of Infectious Diseases. 1998;178:1457-63.

Van Crevel R, Speelman P, Gravekamp C, Terpstra WJ. Leptospirosis in travelers. Clinical Infectious Diseases. 1994;19:132-14.

Vinetz JM. Leptospirosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2001;14:527–38.

Walker SG, Xu X, Altman E, Davis KJ, Ebersole JL, Holt SC. Isolation and chemical analysis of a lipopolysaccharide from the outer membrane of the oral anaerobic spirochete Treponema pectinovorum. Oral Microbiology Immunology. 1999;14:304–8.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nature Immunology. 2001;2:346–52.

Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W, Barren P, Lathigra R, Hanson M, Langermann S, Johnson S, Koenig S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infection and Immunity. 2001;69:1593-8.

WHO, World Health Organization Human leptospirosis: guindance for diagnosis, surveillance and control, 2003. International Leptospirosis Society, 2003.

Wu HC. Biosynthesis of lipoproteins. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1996. p. 1005-1014.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. Journal of American Society of Nephrology. 2002;8:2037–45.

Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Zhang A, Zhou W, Gao Z, Ye X, Xiao Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. Journal of Chinese Medical Association. 2003;66(4):224-30.

Yang C-W, Hung C-C, Wu M-S, Tian Y-C, Chang C-T, Pan M-J, Vandewalle A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. Kidney international. 2006;69:815-822.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF., Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 1987;37:407-15.

Zhang YX, Geng Y, BI B, HE JY, Wu CF, Guo XK, Zhao GP. Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohae-morragiae serovar Lai. Acta Pharmacologia Sinica. 2005;4:453-61.

ANEXOS

ANEXO A - Trabalhos publicados em revistas científicas

Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos AS, Genovez M E, Ward, R J, Schattner M, Gómez R M, Ho PL. Expression and characterization of hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;333:1341-7.

Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos AS, Genovez M E, Ward, R J, Schattner M, Gómez R M, Ho PL. Expression and characterization of hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. 2008;372:948. Corrigendum in: Hauk P, Negrotto S, Romero CE, Vasconcellos SA, Genovez EC, Ward RJ, Schattner M, Gómez RM, Ho PL. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;333:1341–7.

Hauk P, Macedo F, Romero CE, Vasconcellos SA, de Morais ZM, Barbosa AS, Ho PL. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. Infection and Immunity. 2008;76:2642–50.

ANEXO B - Trabalhos submetidos para publicação em revistas científicas

Hauk P, Guzzo CR, Ho PL, Farah CS. Crystallization and preliminary X-ray analysis of LipL32 from *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Hauk P, Guzzo RC, Roman- Ramos H, Ho PL, Farah CS. Structure and calcium binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira sp.*



Available online at www.sciencedirect.com



Biochemical and Biophysical Research Communications 333 (2005) 1341-1347

www.elsevier.com/locate/ybbrc

Expression and characterization of HlyX hemolysin from Leptospira interrogans serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32

Pricila Hauk ^{a,b}, Soledad Negrotto^c, Eliete Caló Romero^d, Sílvio Arruda Vasconcellos^e, Margareth Élide Genovez^f, Richard John Ward^g, Mirta Schattner^c, Ricardo Martín Goméz^{h,*}, Paulo Lee Ho^{a,b,i,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

^b Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, Brazil

^c Department of Thrombosis and Haemostasis, Hematological Research Institute, National Academy of Medicine,

National Research Council (CONICET), Buenos Aires, Argentina

^d Departamento de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brazil

^f Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

^g Departamento de Quínica, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, Brazil

^h Biochemistry and Molecular Biology Institute, Department of Biological Sciences, Faculty of Exact Sciences, National University of La Plata, CONICET, La Plata, Argentina

ⁱ Instituto de Biociências e Instituto de Química da USP, São Paulo, Brazil

Received 3 June 2005 Available online 20 June 2005

Abstract

The HlyX, a putative hemolysin identified from the *Leptospira* genomes, was cloned, expressed in *Escherichia coli*, purified, and its hemolytic activity was confirmed. Mouse polyclonal antiserum against the recombinant HlyX recognized HlyX-related antigens in a panel of *Leptospira* species extracts and it was also able to abolish the hemolytic activity of HlyX. A mixture of HlyX and LipL32, a known hemolysin from *Leptospira*, induced hemolysis in a synergistic way that was fully inhibited by antiserum against either protein. Moreover, sera from patients with leptospirosis also recognized the recombinant HlyX, showing that it is presented to the host immune system during *Leptospira* infection.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: HlyX; Hemolysin; LipL32; Leptospira interrogans serovar Copenhageni; Leptospirosis

Leptospirosis is a widespread antropozoonosis caused by pathogenic spirochetes belonging to the genus *Leptospira* which in recent years has emerged as an important global and veterinary health problem. The genus *Leptospira* presents more than 200 pathogenic ser-

E-mail addresses: rmg@biol.unlp.edu.ar (R.M. Goméz), hoplee@ (P.L. HO) butantan.gov.br (P.L. Ho).

ovars, which are classified by their agglutination after cross-adsorption with homologous antigen, related to the variations in the carbohydrate side chains of the lipopolysaccharide (LPS) [1,2]. The diseases caused by pathogenic *Leptospira* include subclinical infection, self-limited anicteric febrile illness (both with and without meningitis), and the severe and potentially lethal Weil's syndrome that is characterized by hemorrhage, renal failure, and jaundice. The primary lesions to small

^{*} Corresponding authors. Fax: +55 11 3726 1505 (P.L. Ho).

⁰⁰⁰⁶⁻²⁹¹X/\$ - see front matter @ 2005 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.045

Contents lists available at ScienceDirect



Biochemical and Biophysical Research Communications



journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Corrigendum

Corrigendum to "Expression and characterization of HlyX hemolysin from Leptospira interrogans serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32" [Biochem. Biophys. Res. Commun. 333 (2005) 1341-1347]

Pricila Hauk^{a,b}, Soledad Negrotto^c, Eliete Caló Romero^d, Sílvio Arruda Vasconcellos^e, Margareth Élide Genovez^f, Richard John Ward^g, Mirta Schattner^c, Ricardo Martín Gómez^{h,*}, Paulo Lee Ho^{a,b,i,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

h Biochemistry and Molecular Biology Institute, Department of Biological Sciences, Faculty of Exact Sciences, National University of La Plata, CONICET, La Plata, Argentina ⁱ Instituto de Biociências e Instituto de Química da USP, São Paulo, Brazil

We reported the detection of hemolytic activity by HlyX and LipL32 of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. However, this activity was not confirmed and the hemolysis observed was due to traces of the detergent Triton X-114 used to remove endotoxins. The negative controls composed only of the specific sera against the recombinant proteins were able to abolish the hemolytic activity, probably due to the presence of plasma albumin, which binds the detergent [1,2]. All the other results described in the article were confirmed.

References

[1] W.W. Sukow, H.E. Sandberg, E.A. Lewis, D.J. Eatough, L.D. Hansen, Binding of the Triton X series of nonionic surfactants to bovine serum albumin, Biochemistry 19 (5) (1980) 912 - 917

[2] W.W. Sukow, J. Healey, P. Witkewicz, Binding of Triton X-114 to mammalian serum albumins at critical micelle concentration, Physiol. Chem. Phys. 10 (2) (1978) 133-138

DOI of original article: 10.1016/j.bbrc.2005.06.045.

^b Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, Brazil

^c Department of Thrombosis and Haemostasis, Hematological Research Institute, National Academy of Medicine, National Research Council (CONICET), Buenos Aires, Argentina ^d Departamento de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

^e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brazil

^f Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

^g Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, Brazil

Corresponding authors. Fax: +55 11 37261505 (P.L. Ho). E-mail addresses: rmg@biol.unlp.edu.ar (R.M. Goméz), hoplee@butantan.gov.br (P.L. Ho).

In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin[∇]

Pricila Hauk,^{1,2} Felipe Macedo,¹ Eliete Caló Romero,³ Sílvio Arruda Vasconcellos,⁴ Zenaide Maria de Morais,⁴ Angela Silva Barbosa,^{1,5}* and Paulo Lee Ho^{1,2}*

Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil¹; Programa de Pós-Graduação Interunidades em

Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil²;

Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, 01246-902 São Paulo, SP, Brazil³; Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270 São Paulo,

SP, Brazil⁴; and Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan,

05503-900 São Paulo, SP, Brazil⁵

Received 10 December 2007/Returned for modification 27 January 2008/Accepted 26 March 2008

LipL32 is the major leptospiral outer membrane lipoprotein expressed during infection and is the immunodominant antigen recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. In this study, we investigated novel aspects of LipL32. In order to define the immunodominant domains(s) of the molecule, subfragments corresponding to the N-terminal, intermediate, and C-terminal portions of the LipL32 gene were cloned and the proteins were expressed and purified by metal affinity chromatography. Our immunoblot results indicate that the C-terminal and intermediate domains of LipL32 are recognized by sera of patients with laboratory-confirmed leptospirosis. An immunoglobulin M response was detected exclusively against the LipL32 C-terminal fragment in both the acute and convalescent phases of illness. We also evaluated the capacity of LipL32 to interact with extracellular matrix (ECM) components. Dose-dependent, specific binding of LipL32 to collagen type IV and plasma fibronectin was observed, and the binding capacity could be attributed to the C-terminal portion of this molecule. Both heparin and gelatin could inhibit LipL32 binding to fibronectin in a concentration-dependent manner, indicating that the 30-kDa heparin-binding and 45-kDa gelatin-binding domains of fibronectin are involved in this interaction. Taken together, our results provide evidence that the LipL32 C terminus is recognized early in the course of infection and is the domain responsible for mediating interaction with ECM proteins.

Leptospirosis, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, is a widespread zoonosis that remains a public health concern, notably in tropical and subtropical regions. Humans become infected through contact with water, food, or soil containing urine from infected animals. Clinical manifestations range from mild (subclinical infection) to severe and potentially lethal forms characterized by high fever, intense jaundice, bleeding, renal and pulmonary dysfunction, neurologic alterations, and cardiovascular collapse. Pulmonary hemorrhage has been reported to be increasing in recent years, affecting up to 70% of the patients, and has been considered a serious life-threatening concern, becoming the main cause of death due to leptospirosis in some countries (3, 17, 26, 35).

Within the last few years, considerable research has been conducted on outer membrane proteins expressed by *Leptospira* spp. during infection, prompted by the necessity of developing subunit vaccines or characterizing antigens suitable for early immunodiagnosis of the disease. In this context, putative virulence factors presumed to have a role in adhesion to host tissues, such as the Lig proteins (11) and the leptospiral endostatin-like (Len) outer membrane proteins (1, 37), as well as in complement evasion (LenA/LenB) (37, 38), constitute attractive vaccine candidates.

The most abundant antigen found in the leptospiral total protein profile is LipL32 (40), a lipoprotein displaying a calculated molecular mass of 26.7 kDa but an observed electrophoretic mobility of approximately 32 kDa (22). LipL32 is highly conserved among pathogenic Leptospira species (22) but has no orthologs in the saprophyte Leptospira biflexa (32). It has been shown to enhance hemolysis mediated by sphingomyelinase SphH, and for this reason, the protein was also identified as hemolysis-associated protein Hap-1 (25). Expressed at high levels both during cultivation and during natural infection, LipL32 was shown to be surface exposed and highly immunogenic (14, 15, 21, 22). It has been evaluated as an antigen for immunodiagnosis (4, 16, 19) and as a vaccine antigen, showing protection against Leptospira interrogans challenge in animals immunized with recombinant adenovirus (6), DNA vaccine (7), or recombinant Mycobacterium bovis BCG (36).

In this work, we investigated novel aspects of LipL32. First, we aimed to define the immunogenic portions of the molecule. Our data indicate that both the C terminus and the intermediate portion of LipL32 are recognized by human sera, with the

^{*} Corresponding author. Mailing address for Angela Silva Barbosa: Centro de Biotecnologia/Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11-3726-7222, ext. 2261. Fax: 55-11-3726-1505. E-mail: angelabarbosa@butantan.gov.br. Mailing address for Paulo Lee Ho: Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11-3726-7222, ext. 2244. Fax: 55-11-3726-1505. E-mail: hoplee@butantan.gov.br.

⁷ Published ahead of print on 7 April 2008.

Crystallization and preliminary X-ray analysis of LipL32 from Leptospira interrogans sorovar Copenhageni

Pricila Hauk^{a,b}, Cristiane R. Guzzo^c, Paulo L. Ho^{a,b,c*} and Chuck S. Farah^{c*}

^aCentro de Biotecnologia, Instituto Butantan, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil and ^cDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP 05508-000, SP, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed

P.L.H.: hoplee@butantan.gov.br

C.S.F.: chsfarah@iq.usp.br

Abstract

014

036

042 043

044 045

061

LipL32 is a major surface protein expressed during infection by pathogenic *Leptospira*. Here, the crystallization of the 253-residue (27.68 kDa) LipL32 protein is described. Recombinant LipL32 containing selenomethionine was crystallized in space group P3₂21 and crystals diffracted to 2.25 Å resolution at a synchrotron source. The unit-cell parameters are a=b=126.725 Å and c= 95.996 Å. The calculated Mathews coefficient suggests the presence of two LipL32 molecules in the asymmetric unit.

Structure and calcium binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira sp.*

Pricila Hauk^{1,2#}, Cristiane Rodrigues Guzzo^{3#}, Henrique Roman Ramos^{1,3}, Paulo Lee Ho^{1,2,3*} and Chuck Shaker Farah^{3*}

¹Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil and ³Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP 05508-000, SP, Brazil.

These authors equally contributed to this work

* Correspondence: chsfarah@iq.usp.br and hoplee@butantan.gov.br

Running title: Structure and calcium binding activity of LipL32

Keywords: Leptospira, LipL32, jelly-roll fold, calcium-binding.

SUMMARY

Leptospirosis, a spirochaetal zoonotic disease caused by Leptospira, has been recognized as an important emerging infectious disease. LipL32 is the major exposed outer membrane protein (OMP) found exclusively in pathogenic leptospires, where it accounts for up to 75% of the total OMPs. It is highly immunogenic, and recent studies have implicated LipL32 as an extracellular matrix (ECM) binding protein, interacting with collagens, fibronectin and laminin. In order to better understand the biological role and the structural requirements for the function of this important lipoprotein, we have determined the 2.25 Å resolution structure of recombinant LipL32 protein corresponding to residues 21-272 of the wild-type protein (LipL32₂₁₋₂₇₂). The LipL32₂₁₋₂₇₂ monomer is made of a jelly-roll fold core from which protrude several peripheral secondary structures. LipL32₂₁₋₂₇₂ is structurally similar to several other jelly-roll proteins, some of which bind calcium ions and extracellular matrix proteins. Indeed, spectroscopic data (circular dichroism, intrinsic tryptophan fluorescence and extrinsic 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid fluorescence) confirmed the calcium binding properties of LipL32₂₁₋₂₇₂. Ca²⁺-binding resulted in a significant increase in the thermal stability of the protein and binding was specific for Ca²⁺ as no structural or stability perturbations were observed for Mg²⁺, Zn²⁺ or Cu²⁺. Careful examination of the crystallographic structure suggests the locations of putative regions that could mediate Ca²⁺ binding as well as binding to other interacting host proteins, such as collagens, fibronectin and laminin.

INTRODUCTION

A significant increase in the knowledge of *Leptospira interrogans* biology has been obtained in recent years^{1; 2}. However, many fundamental aspects of virulence and pathogenicity of this worldwide and disseminated zoonotic spirochete remain unknown. Bacterial outer membranes mediate the principal interactions between the pathogen and its host. For this reason, a great deal of effort is being invested in understanding the properties of the leptospiral outer membrane components. The most abundant antigen found in the leptospiral total protein profile is LipL32³. This lipoprotein is highly conserved among pathogenic Leptospira species ⁴ but not observed in the non-pathogenic saprophytic *L*. *biflex*^{4; 5}, though an ortholog protein was identified in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* genome ⁶. Expressed at high levels both during cultivation and natural infection, LipL32 was shown to be the most abundant outer membrane surface-exposed antigen and to be highly immunogenic. LipL32 is anchored to the outer membrane via removal of an Nterminal signal peptide and covalent modification of the amino-terminal cysteine residue by a fatty acid at the nitrogen atom and a diacylglyceryl at the sidechain sulfur ^{4; 7; 8; 9; 10}. This protein was also considered a promising target for vaccine development^{11; 12; 13} and diagnosis^{9; 14; 15; 16} of leptospirosis. Immunoblot studies indicated that the C-terminal and intermediate domains of LipL32 are recognized by sera of patients and an IgM response was detected exclusively against the LipL32 C-terminus in both the acute and convalescent phases of illness¹⁷. LipL32 has also been shown to interact with extra-cellular matrix

(ECM) proteins. Specific binding of LipL32 to collagen I, collagen V, laminin⁶, collagen IV and plasma fibronectin¹⁷ has been observed. Furthermore, dosedependent binding to collagen IV and fibronectin could be attributed to the Cterminal portion of this molecule (amino acids 185-272) in a manner comparable to that observed for the fragment corresponding to the full-length mature protein minus the N-terminal cysteine (LipL32₂₁₋₂₇₂)¹⁷. Recently, studies using a *lipL32* mutant obtained by transposon mutagenesis in Leptospira interrogans showed that LipL32 does not play a essential role in either acute or chronic models of animal infection ¹⁸. While these data did not identify an indispensible role in pathogenesis, it does not exclude an important function for LipL32 in mediating the host-pathogen interaction. In the present study, we have solved the tertiary structure of LipL32₂₁₋₂₇₂ as a fundamental step towards understanding of its structure-function relationships. The resolved tertiary structure showed a jelly roll fold similar to those presented by some calcium-binding and ECM-binding proteins. Additional biochemical characterizations confirmed the capacity of LipL32 to bind calcium ions.

RESULTS AND DISCUSSION

LipL32 Structure

Recombinant LipL32₂₁₋₂₇₂ containing selenometionine was crystallized in space group P3₂21¹⁹. This fragment corresponds to the full-length protein minus the N-terminal lipid-anchored cysteine residue. The datasets from two crystals ¹⁹ were used to resolve the structure. Initial phases were estimated by multiwavelength anomalous dispersion (MAD) phasing using a dataset that diffracted to 2.93 Å. These phases were subsequently extended to higher resolution using a dataset that contained reflections to 2.25 Å ¹⁹. While the initial Matthews coefficient analysis suggested 3 or 4 molecules in the asymmetric unit, the final model contained only two monomers (Mathews coefficient = 4.03) and 69.5% solvent. The refined structure converged to Rwork and Rfree values of 0.184 and 0.227, respectively. Refinement data statistics are shown in Table 1. The two monomers in the asymmetric unit are related by a non-crystallographic two-fold axis and are very similar in structure, with a RMSD of 0.6 Å for all atoms. Residues 21-23, 40-45, 160-163, 265-272 from chain A and residues 21-24, 159-164, 263-272 from chain B could not be modeled due to absence of electron density. 295 water molecules were modeled, as well as one chloride ion, one triethanolamine and two oxalate ions (see below).

The monomer has approximate dimensions of 36 Å x 46 Å x 42 Å (not including the β 1- β 2 hairpin) and is built around a central jelly-fold β -sandwich topology of 8 β -strands (strands 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12) from which protrude loops that carry the other secondary structure elements (Fig. 1a,b). Some of these peripheral structures are β -strands (β 4, β 7 and β 13) that associate with

the edges of the central β -sandwich. Four alpha helices and two 3₁₀ helices are also found in these loops (Fig. 1a,b). The two 3₁₀ helices are both found in a stretch between β 10 and β 11. 3₁₀1 is two turns in length (residues 193-198) while 3₁₀2 is made up of only one turn (residues 201-203). The loop between α 3 and β 9 (residues 154-169), contains a large proportion of acidic amino acids (AKPVQK<u>LDDD</u>DDGDD) of which those underlined are disordered with no significant electron density in both monomers).

One conspicuous feature of the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure is an N-terminal β -hairpin (β 1- β 2) that protrudes from the more compact portion of the molecule. This hairpin has a β -bulge at its base in which the T49 carboxyl group forms hydrogen bonds with the backbone amides of L35 and S36. The hairpin is preceded by an N-terminal linker that adopts a non-repetitive, extended and highly solvent-exposed conformation (Fig. 1a). This linker interacts with the external face of one of the β -sandwich layers via a small set of hydrophobic and polar interactions.

Monomer contacts in the crystal and possible quarternary structure

Size exclusion chromatography analysis shows that LipL32₂₁₋₂₇₂ migrates with an apparent molecular mass of 34 kDa in Superdex 75 size exclusion chromatography in 150 mM TrisHCI (pH 8), 50 mM KCI, +/- 2 mM CaCl₂ (data not shown). This value is slightly greater than the calculated molecular mass of 28 kDa. Analysis of the contacts between monomers in the crystal revealed two monomer-monomer interactions that bury a significant amount of surface area. The greatest amount of buried surface is found at the

dimer interface observed between the two monomers in the asymmetric unit dimer (PISA server Complexation Significance Score = 0.967; ²⁰ (Fig. 1c). This interface (interface 1) buries a total of 1156 Å² per monomer and can be divided into two regions: i) Contacts between equivalent surfaces of the N-terminal β1β2 hairpins (Fig. 1c,d) that involves the side-chains of some hydrophobic as well as several hydrophilic residues (L35, S36, D38, I40, P41, V47, T49, L50, L51, P52). The electron density for some of these side-chains are not well defined in the electron density map, so specific hydrogen bond contacts could not be identified with confidence. ii) Contacts mediated by residues in the following loops from each monomer: $\beta 6$ - $\beta 7$, $\alpha 2$ - $\beta 8$, $\beta 9$ - $\beta 10$, $\beta 11$ - $\beta 12$. Here all hydrophobic and hydrogen bonding contacts are well defined in the electron density maps.

A second dimer interface (interface 2) identified by the PISA server involves A and B chains from asymmetric units related by a crystallographic two-fold axis (symmetry operation x-y,-y+1,-z+1/3)(Fig. 1e). This interface has a less significant Complexation Significance Score of 0.455, buries 832 Å² per monomer and involves the following loops from each monomer β 5- β 6, β 8- α 3, α 3- β 9 (acidic loop), the loop between β 10 and β 11 containing the two 3₁₀ helices, β 12- β 13 and the C-terminus of α 4. Combining these two interfaces produces a linear zig-zag polymer that runs parallel to the crystallographic *a*axis (Supplementary information Figure S1).

Comparison of LipL32₂₁₋₂₇₂ with other protein structures

LipL32₂₁₋₂₇₂ has no significant sequence similarity with proteins of known structure. We therefore used the Dali program ²¹ to search for protein structures with topologies similar to that of LipL32₂₁₋₂₇₂. This analysis found a small group of proteins with Z-scores above 5.0 (Table 2). They can be arranged into the following groups: mammalian calpains, a bacterial collagenase, bacterial toxins, viral coat proteins and the kexin2 peptidase and representative examples are shown in Fig. 1f. All these proteins share a common jelly-roll fold topology at their core (shown in blue in Figs 1a and 1f) but all differ in the nature and number of secondary structure elements inserted in the loops between these strands.

The structure with the highest Dali z-score (8.8) was that of the isolated domain III from human calpain 7 (pdb 2qfe; unpublished) which is distinguished from the others by the presence of a C-terminal β -strand that is topologically analogous to β 13 of LipL32₂₁₋₂₇₂ (Fig. 1a and 1f). Van Itallie *et al.* ²² recognized a structural relationship between the receptor binding domains of several bacterial toxins including *Clostrifium perfringens* enterotoxin (pdb 2quo), *C. histolyticum* class I collagenase ColG C-terminus (1nqd) and the large Cry family of toxins (Figure 1f). The first two are significantly similar to the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure (Table 2) but differ due the presence of an N-terminal β -strand that runs anti-parallel to β 13 in LipL32₂₁₋₂₇₂ (Fig. 1a, and 1f). An interesting feature of these proteins is that residues in their C-terminal regions are involved in binding to their protein targets ^{23; 24}.

Possible calcium-binding sites in LipL32

The protein structure-function relationships between these jelly-roll fold domains are not clear but many listed in Table 2 have been shown to bind calcium ions. For example, domain III from calpain, collagen-binding domain (CBD) from CoIG, and many icosahedral RNA coat proteins, undergo significant structural rearrangements upon binding calcium^{24; 25; 26; 27}. In the case of CoIG, the Ca²⁺-bound structure of the collagen-binding domain adopts a jelly-roll fold with two extra N-terminal β -strands ²⁴ (Fig. 1f). This domain binds two Ca²⁺ ions in a single site made up of two loops, each of which is bounded by a pair of β strands. One pair of β -strands comes from one edge of the jelly-roll β -sandwich while the other pair is derived from the N-terminal extension ²⁴ (Fig. 2a). The Ca²⁺ ions are both surrounded by seven oxygen ligands (Fig. 2a) derived from side-chain and main-chain functional groups from residues E899, E901, N903, D904, S922, D927, R929, and D930. Interestingly, in the absence of Ca²⁺, the N-terminal β -strand and its associated loop (containing the first four of the above residues) rotates almost 180° and adopts an α -helical conformation in the crystal structure of the isolated domain ²⁴. Though the structure of full-length ColG has not been determined, these observations suggest that Ca²⁺ binding to ColG may be associated with a significant structural rearrangement²⁴.

We therefore analyzed the superposition of the LipL32₂₁₋₂₇₂ and ColG collagen binding domain structures to determine if LipL32₂₁₋₂₇₂ could present a similar Ca²⁺ binding site. Figure 2a shows that the loop between β 3 and β 5 (that contains the short β 4 strand) in LipL32₂₁₋₂₇₂ corresponds well with one of the ColG Ca²⁺-binding loops. LipL32₂₁₋₂₇₂ also has a β -strand (β 7) that superposes

well with the N-terminal β -strand of ColG, though these strands are not topologically equivalent. However, after β 7, the LipL32₂₁₋₂₇₂ polypeptide chain veers in a direction opposite to that observed in ColG, the result being that LipL32₂₁₋₂₇₂ does not present a structure that completely superposes with the N-terminal Ca²⁺-binding loop of ColG (Fig. 2).

We then analyzed this region of the LipL32₂₁₋₂₇₂ surface to see if it could present functional groups which could be poised to bind a divalent cation. Figure 2b shows that LipL32₂₁₋₂₇₂ residues Y59, Y62, Q67, A68, D70, Y81, S114, and S247 all present side chain or main chain oxygens that line a cavity that superposes with the ColG Ca²⁺-binding site. This cavity has an approximate diameter of 8 Å however, significantly greater than the 5 Å oxygenoxygen distances observed in Ca²⁺-ColG structure. Small adjustments in side chain and main chain torsion angles could bring these oxygen atoms in closer proximity. We note that only one of the residues in this putative Ca²⁺-binding site is negatively charged, suggesting that it would be able to accommodate only one Ca²⁺ ion. Another curious feature of this cavity is the presence of a region of significant electron density which extended from the S114 side chains of both monomers (Fig 2c). This density could not be satisfactorily modeled as water molecules nor as a spherically symmetric Ca²⁺ ion (Ca²⁺ was not included in the crystallization solution). The most satisfactory interpretation of the electron density was achieved by the insertion of an oxalate ion. After refinement, this oxalate positioned as to make clear hydrogen-bond contacts with Y59, Y62, Q67 and S114 (Fig. 2c). If this oxalate ion in fact co-purified with LipL32, it could contribute to the Ca^{2+} -binding site by providing not only two oxygen ligands but also a second neutralizing negative charge. Another possibility is that this electron density is due to an immobilized portion of a citrate ion, present at 1.4 M in the crystal mother liquor. Coincidentally or not, leptospires colonizes the free surfaces of renal proximal tubular epithelial cells from the kidney, locally and potentially enriched in oxalic acid and calcium ions²⁸. Physiologically, oxalate is removed from the body almost exclusively by filtration at the renal glomerulus and by secretion in the early portions of the proximal tubules. Kidney is well known for the production of oxalate and its level can exceed those of blood. Decreased renal clearance, local oxalate overproduction or accumulation may cause supersaturation, leading to the formation of local calcium oxalate crystals²⁹.

LipL32₂₁₋₂₇₂ specifically binds calcium ions.

The above observations led us to test whether LipL32₂₁₋₂₇₂ is capable of interacting with calcium ions. We therefore used circular dichroism and fluorescence spectroscopy to detect structural changes in LipL32₂₁₋₂₇₂ induced by the addition of calcium ions. Circular dichroism spectra of LipL32₂₁₋₂₇₂ clearly demonstrate a change in secondary structure content upon the addition of Ca²⁺ but not upon the addition of Mg²⁺ (Fig. 3a). Consistent with this interpretation, in fluorescence spectroscopy experiments, a significant blue-shift in the LipL32₂₁₋₂₇₂ tryptophan emission was observed upon the addition of 1 mM CaCl₂ but not upon addition of 1 mM MgCl₂ (Fig. 3b). LipL32₂₁₋₂₇₂ possesses three tryptophan residues, Trp85, Trp130 and Trp134 all of which are significantly buried within the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure. Furthermore, the fluorescence of 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid (ANS) was observed to increase upon the addition of Ca²⁺ (Fig. 3c), indicating an overall structural change with an increase in the surface

hydrophobicity of the LipL32₂₁₋₂₇₂ molecule. We also tested the ability of LipL32₂₁₋₂₇₂ to bind Zn^{2+} and Cu^{2+} ions but we did not observe any significant changes in the CD or intrinsic fluorescence spectra (data not shown).

Calcium binding by LipL32₂₁₋₂₇₂ increases protein stability.

We then tested whether the addition of Ca^{2+} affected the conformational stability of LipL32₂₁₋₂₇₂. CD and ANS fluorescence were monitored during thermal denaturation of the protein in the presence or absence of Ca^{2+} (Fig. 3d and e respectively). In the CD experiments, the midpoint of the conformational transition (Tm) was observed to increase from 50°C in the absence of Ca^{2+} to 56°C in the presence of Ca^{2+} while only a very small change in the Tm (+1°C) was observed upon addition of MgCl₂ (Fig. 3d). A similar result was obtained by monitoring ANS fluorescence: in the presence or absence of Mg²⁺ the Tm was 51°C while in the presence of Ca^{2+} it increased to 58°C (Fig. 3e and data not shown). Finally, we did not observe any change in CD spectra, fluorescence spectra or thermal stability in the presence of 1 mM ZnCl₂ or CuCl₂ (data not shown).

One putative Ca²⁺-binding sites in LipL32 has been discussed above (Fig. 2a,b,c). Another possible site corresponds to the loop between α 3 and β 9 that contains seven aspartate residues within an eight amino acid stretch (residues 161-168) (Fig. 2d). A portion of this loop containing the first three aspartates (residues 161-168) are absent in our crystal structure due to lack of electron density. Two more acidic residues within β 9, E172 and E173, are also near this loop (Fig. 2d). This region of the molecule is therefore also a potential

Ca²⁺-binding site which could adopt a more ordered structure upon ligand binding.

A putative polypeptide binding groove on the LipL32₂₁₋₂₇₂ surface

The first of the two putative Ca^{2+} -binding sites described above (Fig. 2a,b) lies above a hydrophobic pocket lined by the side-chains of residues V63, Y80, F214 and F226. This hydrophobic pocket is found in the middle of a deep groove that extends over half the circumference of the monomer surface (Fig 4a). While the bottom of the groove to one side of the hydrophobic pocket is also lined with hydrophobic side chains (Y59, W85, P97, P243, L244, I245), the other branch of the groove is lined with hydrophilic side chains (Y81, R136, E138, Y170, E172, R211, S213). Furthermore, both branches of this groove are exposed to solvent in the possible dimeric and polymeric structures that are suggested by the observed contacts in the LipL32₂₁₋₂₇₂ crystal (Supplementary Information Figure S1a).

These grooves have features that could indicate their involvement in binding to polypeptides. LipL32₂₁₋₂₇₂ has been shown to bind to extracellular matrix proteins such as collagen, fibronectin and laminin^{6; 17} and ColG of course binds collagen. While the collagen-binding domain of ColG has not been crystallized bound to its substrate, mutational analysis and computational docking studies have identified seven ColG residues that may mediate its interactions with collagen and are in the vicinity of the ColG Ca²⁺-binding site²⁴. These residues are highlighted in Fig. 4b and lie on the same face of the β-sandwich as do the LipL32₂₁₋₂₇₂ residues that contribute to the hydrophilic branch of the putative polypeptide-binding groove mentioned above (compare

Fig. 4b with the right-most LipL32₂₁₋₂₇₂ structure in Fig 4a). As already mentioned, these grooves are all highly exposed in the possible dimeric and oligomeric structures that are suggested by the observed contacts in the LipL32₂₁₋₂₇₂ crystal (Fig. S1a). Therefore, if these grooves meditate LipL32₂₁₋₂₇₂ binding to collagens or to other extracellular matrix proteins, its dimerization or oligomerization on the bacterial surface would not impede these interactions and could instead provide a mechanism by which it increases the local concentration of ECM protein binding sites.

Other possible polypeptide interacting sites on the LipL32₂₁₋₂₇₂ surface

Besides the presence of the putative polypeptide binding groove on the LipL32₂₁₋₂₇₂ surface, it is also possible the presence of other domains in the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure that could mediate interactions with other polypeptides. For instance, the presence of the acidic loop between α 3 and β 9 (residues 154-169, AKPVQKLDDDDDGDD, Figs. 1b, 2d and 5a) could mediate the binding to positively-charged ligand domains. Although in principle this region could be involved in the binding to laminin ⁶ or plasma fibronectin¹⁷ (both proteins present positively charged domains that binds to negatively charged molecules like heparin/heparan sulfate), experimental data suggest that this is not the case and that the binding to these ligands instead involves the C-terminal segment of LipL32 molecule. Recombinant LipL32₂₀₁₋₂₇₂, corresponding to the last 72 LipL32 residues was shown to be able to interact to plasma fibronectin and collagen IV¹⁷. These results imply that a putative interaction site resides in the segment between amino acids 185/201 and 272 of LipL32. Of this region of the

14

protein, residues 263-272 seem to be disordered since no corresponding electron density was observed in the electron density map. Also, the region comprising residues 185-243 correspond to secondary structure elements $3_{10}1$, $3_{10}2$, β 11 and β 12. As β 11 and β 12 do not interact with each other within the β -sandwich, it is difficult to imagine how these sections of the molecule could fold correctly in the context of a C-terminal LipL32 fragment. However, residues 244-262 make up the α 4 and β 13 motifs that interact with each other within the LipL32 structure and could possible remain folded in a Lipl32 C-terminal fragment. This motif is highly exposed in the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure and is located contiguous to the putative polypeptide binding groove (the exposed surface immediately below the colored sections in the middle of Fig 2a).

Conserved residues in LipL32 homologs points to functionally important regions of the protein.

LipL32 proteins from *Leptospira* species are highly similar (\geq 95% identity, results not shown). The only significant variability that can be observed in LipL32 sequences from several dozen species is the length of the C-terminal extensions beyond the last helix (α 4). We can therefore propose that this unstructured region is not required for LipL32 function. A Blast search on the sequence databanks revealed that only three other bacterial proteins present significant similarity to LipL32: gi|88860771| from *Pseudoalteromonas tunicata* D2, originally isolated from the marine tunicate *Ciona intestinalis* (43% identical), gi|149911212| from *Moritella* sp. PE36, a deep-sea piezophile heterotroph, adapted to high pressure (34% identical), and gi|149370508| from an unidentified eubactérium SCB49 (35% identical). Though all have been

named LipL32, only that from *P. tunicata* has been shown to be functionally similar to its *Leptospira* orthologs ⁶. An alignment of these sequences is shown in Fig. 5a. A few observations may be made from this alignment. Firstly, the acidic nature of the loop between α 3 and β 9 in the Leptospira protein is maintained in the Pseudoalteromonas tunicata protein but is significantly reduced in LipL32 from other species (Fig 5a). This suggests that the role this loop plays in LipL32 function may differ across species. Secondly, some of these absolutely conserved residues cluster to form two extensive patches on the LipL32₂₁₋₂₇₂ surface (Fig 5b). One of these patches includes residues that lie at the interface between LipL32₂₁₋₂₇₂ monomers in the asymmetric unit (P52, S99, P100, F131, Y178, N179 and F226). This may indicate a possible physiological role for monomer-monomer interactions across this interface. The other surface patch of conserved residues corresponds very well to the central portion of the putative polypeptide binding groove described above (Figs. 5b). This same patch also includes four of the residues putatively involved in Ca²⁺ binding (Y59, Y62, D70, Y81).

Final Considerations

The importance of calcium as a key regulator in several fundamental aspects of eukaryote biology is well established. An increasing importance for a role for calcium in prokaryotes is also being implicated in several processes, including signal transduction ³⁰, cell cycle and division control ³¹, competence ³², pathogenesis ³³, motility and chemotaxis ^{34; 35}, host-pathogen interactions^{36; 37}, stability and integrity of the outer lipopolysaccharide layer and bacterial cell wall³⁸ and specific enzyme activity^{39; 40; 41} (for review see ^{42; 43; 44; 45}). Calcium

ions are absolutely required for *Leptospira spp* to grow and survive^{46; 47}. Interestingly, calcium chloride, zinc chloride, or copper chloride have been described as necessary to enhance the stability of LipL32 during its extraction from the outer membrane $^{3; 4}$.

Our data strongly indicate that LipL32 binds Ca²⁺. The data also suggest that LipL32 does not bind Mg2+, Zn2+ or Cu2+ ions, at least not in a manner similar to that observed for Ca²⁺, since no significant structural changes or increases in thermal stability were observed in these cases. Several calciumbinding motifs in bacterial proteins have already been identified, such as EFhand domains ⁴², leukotoxin⁴⁸, RTX-toxin domains^{49; 50}, Greek key motif observed in βy crystallins⁵¹, and some jelly roll fold proteins²⁴ and putative orphan motifs rich in oxygen atoms provided by negatively charged glutamate or aspartate⁴². Two putative Ca²⁺-binding sites in LipL32 have been discussed above (Fig. 2). One is located above the central part of the putative polypeptidebinding groove and superposes with the Ca²⁺-binding site of CoIG (Fig. 2a). The other corresponds to the loop between α 3 and β 9 that contains seven aspartate residues within an eight amino acid stretch (residues 161-168) as well as two glutamate residues within β 9 (Fig. 2d). A large part of this loop is either poorly defined or absent in our crystal structure. However, this loop is located precisely at the end of the hydrophilic branch of the putative polypeptide-binding groove, suggesting that it may be involved in this function. Recently, LigB, a member of an important family of leptospiral proteins possessing bacterial immunoglobulinlike (Blg) domains (also found in LigA), was also shown to bind calcium ions ⁵². Both LigA and LigB present the Blg domains consisting of 90 amino acid tandem repeats. These proteins have identical N-terminal sequences but the C-

17

termini are variable ^{53; 54; 55}, LigB presenting a C-terminal extension. Like LipL32, LigA and LigB interact with extracellular matrix components fibronectin, fibrinogen, laminin and collagen^{56; 57; 58}. Although, the calcium binding motif was not absolutely identified in LigB, it has been suggested that it may adopt a Ca²⁺- binding Greek key motif observed in $\beta\gamma$ crystallins⁵² and seems to be distinct from those possible calcium binding sites for LipL32 described here.

Hoke *et al* ⁶ and Hauk *et al* ¹⁷ showed that the C-terminal portion of the LipL32 molecule (amino acids 185/201 to 272) is sufficient to mediate binding to different ECM proteins. Of these residues, only those corresponding to β 13 and α 4 form secondary structures that could be expected to associate with one another in a native-like manner. Besides this region, we have also described other possible polypeptide interacting regions, one involving a clusters of acidic residues between α 3 and β 9 and the other, a groove that crosses one face of the LipL32 surface and contains several absolutely conserved residues in LipL32 homologs. These observations suggest that LipL32 may possess more than one site that mediates its interactions with several different host proteins (collagens, plasma fibronectin, and laminin) ^{6; 17}. The crystal structure of this important leptospiral protein has provided a wealth of information from which to raise hypothesis regarding the molecular mechanisms by which LipL32 interacts with Ca²⁺ and with ECM proteins. These hypotheses will be addressed in future experimental studies using site-directed LipL32 mutants.

MATERIALS AND METHODS

LipL32 expression and purification

The following primers were used to amplify a L. interrogans sorovar Copenhageni fragment coding for residues 21-272, preceeded by an initiation 5'-CTCGAGCATATGGGTGCTTTCGGTGGTCTG-3' methionine: and 5'-AAGCTTACTTAGTCGCGTCACCTAATCCTCCA-3'. The amplified product was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) and then into the pAE expression vector ⁵⁹ as described ⁶⁰. Selenomethionine-containing LipL32₂₁₋₂₇₂ was expressed in *E. coli* strain BL21 SI (Gibco/BRL, ⁶¹) as described ⁶⁰. Cells from 1 I culture were collected by centrifugation, resuspended in 100 ml of 20 mM triethalolamine pH 7.8 and lysed in a French press (Thermo Spectronic). The soluble and insoluble fractions were isolated by centrifugation at 8,400 X g for 10 min. Purification of Selenomethionine LipL32₂₁₋₂₇₂ proceeded in three steps as follows. The soluble fraction was applied onto a column (1-cm diameter) containing 5ml of Q-Sepharose Fast Flow resin (GE HealthCare) equilibrated with 20 mM triethanolamine pH 7.8. The unbound fraction containing LipL32₂₁₋₂₇₂ was then applied to a column of similar dimensions containing SP-Sepharose Fast Flow resin (GE HealthCare). The resin was washed with 10 column volumes of 20 mM triethanolamine pH 7.8 containing 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 M NaCl. Fractions containing LipL32₂₁₋₂₇₂ were pooled, NaCI was added to a final concentration of 3M and this mixture was then added to a Phenyl-Sepharose Fast Flow column (GE HealthCare) previously equilibrated with 20 mM triethanolamine pH 7.8 and 3 M NaCl. LipL32₂₁₋₂₇₂ was eluted using a decreasing 2.5-0 M NaCl gradient in 20 mM trietanolamine pH 7.8. Fractions containing LipL32₂₁₋₂₇₂ were dialyzed in three steps with 2 liters of 20 mM trietanolamine pH 7.8 and concentrated using an Amicon ultrafiltration system with a 10 kDa cut-off membrane.

Protein decalcification

For calcium binding studies, proteins were decalcified as previously described ⁵². Briefly, proteins were incubated for 60 minutes at 25°C in 3mM EDTA followed by buffer exchange with Chelating Sepharose-treated Tris buffer. All buffer solutions used for calcium binding studies were passed through Chelating Sepharose resin and stored in plasticwares.

Spectroscopic and protein stability studies

CD measurements were carried out on a J-810 Circular Dichroism Spectropolarimeter (Jasco Inc.) coupled to a Peltier Jasco PFD-425S system for temperature control. Far-UV spectra were recorded in the spectral range 195-260 nm and averaged over ten scans at 20°C, using a 1 mm path length quartz cell, 0.5 nm step resolution, 50 nm/min speed, 8 s response time, and 1 nm bandwidth. Protein concentration was 10 μ M in 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 50 mM KCl and either 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄ or 1 mM CuCl₂. Spectral correction was performed by subtracting the blank. The measured ellipticity, θ (mdegree), was converted to molar ellipticity, [θ] (degree cm² dmol⁻¹). For thermal unfolding studies, change in the secondary structure was followed by measuring [θ] at 216 nm at temperatures between 30 °C and 70 °C at 2 °C steps. Fluorescence spectroscopy studies were carried out on an Aviv ATF105 Fluorimeter using a 1 mm path length quartz cell, 1 nm excitation bandwidth and 10 nm emission bandwidth. Protein concentration was 2 μ M in 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 50 mM KCl and either 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄ or 1 mM CuCl₂. Intrinsic tryptophan fluorescence was measured with an excitation wavelength set at 285 nm and emission spectra were recorded in the spectral range 310-400 nm ⁶². Alternatively, thermal unfolding studies were carried out in the presence of 8 μ M 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid (ANS). The temperature range tested was between 20°C and 70°C. The change in the secondary structure was followed by measuring ANS fluorescence at 470 nm with an excitation wavelength of 380 nm⁵². In both circular dichroism and fluorescence thermal denaturation experiments the fraction of folded protein was calculated by using the pre-transition and post-transition baselines to calculate the fractional change in signal at each temperature point and assuming that the CD and fluorescence signals of the folded and unfolded states are linear functions of temperature in the transition region⁶³.

LipL32₂₁₋₂₇₂ structure determination

LipL32₂₁₋₂₇₂ containing selenomethionione was crystallized as described elsewhere and datasets from two crystals were collected ⁶⁰. A multiple wavelength anomalous dispersion (MAD) data set was collected using one crystal at two wavelengths, 0.97814 and 0.978308 Å, corresponding to the peak and infection points of the fluorescence spectrum, respectively. This crystal diffracted to 2.93 Å, though data collected up to 2.6 Å was used for phase determination and for initial LipL32 initial model building. The program SHELXD⁶⁴ was used to find 12 selenium sites in the asymmetric unit. Se positions were subsequently refined and phases were calculated up to 2.6 Å resolution using the program SHARP⁶⁵. Phases were refined by density modification using the programs SOLOMON⁶⁶ and DM^{67; 68}. The resulting electron-density map was used to construct a preliminary polyalanine model using the program ARP/wARP⁶⁹ that contained 303 residues distributed over 27 peptide segments. Interpretation of electron-density maps and construction of missing residues was performed using the program COOT ⁷⁰. Subsequently, a second dataset was collected from a new crystal (crystal 2 in Hauk et al^{60}) that diffracted at 2.25 Å resolution using 1.459 Å radiation⁶⁰. The initial model was used to calculate phases for the 2.25 Å resolution dataset using the Phaser program^{67; 71}. Structural refinement of the LipL32 model was done using ARP/wARP⁶⁹, REFMAC⁷², CNS⁷³, and COOT⁷⁰. TLS was used in the final cycles of refinement with each chain in the asymmetric unit divided into 15 independent group segments⁷⁴. Water molecules were added with ARP/wARP, REFMAC, and directly by COOT. The final Rwork, Rfree and FOM values are 0.184, 0.227 and 0.839, respectively. 91.5% of the residues are in the most favored regions and 8.5% are in additionally allowed regions in the Ramachandran plot. The refinement data statistics are shown in Table 2. The coordinates of final LipL32₂₁₋₂₇₂ model have been deposited in the Protein database with accession code 3FRL.

Table 1: Refinement statistics for P3₂21 LipL32₂₁₋₂₇₂ crystal structure.

Refinement (35.0 – 2.25 Å)	
No. of molecules/A.U. residues/chain waters	2 254 295
R _{factor} [¬]	0.184
R _{free} [¬]	0.227
R.m.s.d. bond lengths (Å) bond angles (°)	0.017 1.582
% of residues in Ramachandran regions: most favored additional allowed generously allowed disallowed	91.5 8.5 0.0 0.0

 $\mathbf{R}_{factor} = \Sigma |F_{O} - F_{C}| / \Sigma F_{O}$

5% of the data were excluded for $R_{\mbox{\tiny free}}$ calculation.

Z-score	RMSD (Å)	PDB	Protein	Organism
8.8-6.7	3.2-4.9	2QFE, 1KFU, 1QXP, 1U5I, 1DF0, 1KFX, 3BOW, 3DFO, 1KFX,	calpain-7, calpain-2	Homo sapiens, Rattus norvegicus
6.3	3.1	1PM4	Y.pderived mitogen a	Yersinia pseudotuberculosis
5.4	2.4	2QUO	C. perfringens enterotoxin	Clostridium perfringens
6.3 - 5.8	2.4	1NQJ, 1NQD, 2080	class 1 collagenase	Clostridium histolyticum
5.9-5.0	3.2-4.0	1F15, 1LAJ, 1ZA7, 1GFF, 1WCD	Icosahedral RNA virus coat proteins	Cucumber mosaic vírus, Tomato asp. virus, Cowpea c. m. virus, Bacteriophage g4, Avian inf. B. d. virus
5.3-5.2	4.2	2ID4, 1R64, 1OT5	kexin2 peptidase	Saccharomyces cerevisiae

Table 2. Proteins structurally similar to LipL32₂₁₋₂₇₂ identified using the Dali server²¹.

* All Dali server hits with Z-score > 5.0 are listed.
FIGURE LEGENDS

Figure 1. LipL32₂₁₋₂₇₂ structure and crystal contacts. (a) Cartoon model of the LipL32₂₁₋₂₇₂ monomer. The N- and C-termini are indicated. β -strands, α helices and 3₁₀ helicies are numbered in the order in which they appear in the sequence. Helices are colored red, the eight β -strands that form the core jellyroll topology are shown in blue, while the other β -strands are show in yellow. (b) Topology diagram for LipL32₂₁₋₂₇₂ in which helices are represented as red rectangles and β -strands as arrows. (c) Cartoon model of the LipL32₂₁₋₂₇₂ dimer within the asymmetric unit. Monomers are related by a non-crystallographic twofold axis (vertical). Residues at the dimer interface (interface 1 in the text) are shown as sticks and are colored in yellow for the monomer at the left and cyan for the monomer at the right. (d) Interface between the N-terminal β -hairpin structures observed between the two monomers in the asymmetric unit. This interface involves the side-chains of some hydrophobic as well as several hydrophilic residues (L35, S36, D38, I40, P41, V47, T49, L50, L51, P52). These residues are shown as stick models (only some are labeled with their residue number). Coloring is as in (c). (e) Cartoon model of a LipL3221-272 dimer by a crystallographic two-fold axis (vertical). Residues at the dimer interface (interface 2 in the text) are shown as sticks and are colored in yellow for the monomer at the left and cyan for the monomer at the right. (f) Representative structures in the protein data bank that present significant structural similiarity to LipL32₂₁₋₂₇₂. All structures are colored as in (a) and are oriented so as to superpose with the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure as shown in (a). 2QFE (Calpain-7, chain A) ⁷⁵, 1PM4 (YPMa toxin, chain A)⁷⁶, 2QUO (Heat-labile toxin, chain A)²², 1NQD (Class 1 collagenase, chain A)²⁴, 1ZA7 (Coat Protein, chain A)²⁶ and 1R64 (Kexin2, residues 460-601, chain A)⁷⁷. Parts (a) and (c) to (f) of this figure were generated using $PyMOL^{78}$.

Figure 2. Possible Ca²⁺-binding sites in LipL32₂₁₋₂₇₂. (a) Superposition of LipL32₂₁₋₂₇₂ with the structure of the collagen binding domain of CoIG (1nqd; ²⁴) at the ColG Ca²⁺-binding site. The two Ca²⁺-binding loops of ColG are shown as a dark blue cartoon with Ca²⁺-coordinating residues depicted with dark blue lines except for oxygen atoms which are red. The two Ca²⁺ ions are shown as two small green spheres. The LipL32₂₁₋₂₇₂ backbone is depicted as a green ribbon. Putative LipL32₂₁₋₂₇₂ Ca²⁺-binding residues are colored yellow, except for oxygen and nitrogen atoms which are colored red and blue respectively. (b) Depiction of the putative LipL32₂₁₋₂₇₂ Ca²⁺-binding cavity in which the solventexposed surfaces of candidate Ca²⁺-binding residues are depicted. An oxalate ion, modeled in the same position within the cavity of both monomers of the asymmetric unit is also shown. The LipL32₂₁₋₂₇₂ orientation is very similar to that in (a) and the coloring is the same. (c) 2Fo-Fc electron density map of a portion of the putative Ca^{2+} -binding cavity contoured at 1.5 σ . Distances compatible with hydrogen bonds involving the modeled oxalate ion are shown. (d) Cartoon depiction of the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure near the loop between α 3 and β 9. The acidic sequence DDGDD (residues 164-168) is shown as orange sticks orange while the rest of the loop (residues 154-159 and residue 169) is shown as a blue ribbon. The gap in the loop corresponds to acidic residues 160-163 (LDDD) which are omitted from the model due to a lack of electron density. Nearby residues E172 and E173 within β 9 are depicted as red sticks. Parts (a), (b) and (d) were produced using $PyMOL^{78}$; part (c) was produced using Coot ⁷⁰.

Figure 3. Ca²⁺-induced conformational and stability changes in LipL32₂₁. ₂₇₂. (a) Circular dichroism (CD) spectra of LipL32₂₁₋₂₇₂ in the absence or presence of Ca²⁺ or Mg²⁺. CD experiments were performed with 10 μ M protein in 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM KCl in the presence or absence of either 1 mM CaCl₂ or 1 mM MgCl₂. (b) LipL32₂₁₋₂₇₂ tryptophan fluorescence in the absence of divalent metals or in the presence of Ca²⁺ or Mg²⁺. A blue-shift in Trp emission is observed in the presence of Ca²⁺. Intrinsic fluorescence experiments were performed with 2 μ M protein in 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM KCl in the presence or absence of either 1mM CaCl₂ or 1mM MgCl₂. Excitation wavelength was 285 nm. (c) Ca^{2+} -binding to LipL32₂₁₋₂₇₂ induces a change in ANS fluorescence. For these experiments, 8 μ M ANS was added to 2 μ M protein in 10 mM Tris-CI pH 8.0, 50mM KCI in the presence or absence of 1mM CaCl₂. Excitation wavelength was set at 380 nm and emission wavelength set at 470 nm. (d) Thermal stability of LipL32₂₁₋₂₇₂ in different conditions. Circular dichroism was used to detect temperature-induced changes in LipL32₂₁₋₂₇₂ secondary structure (see Materials and Methods). Conditions were the same as in part (a). (e) The thermal stability of LipL32₂₁₋₂₇₂ in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ was measured by monitoring changes in ANS fluorescence (see Materials and Methods). For this experiment, 8 mM ANS were added to 2 μ M protein in 10mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM KCl, in the presence of either 1mM MgCl₂ or 1mM CaCl₂. When this experiment was performed in the absence of divalent metal ions, the thermal denaturation curve was essentially identical to that observed for LipL32₂₁₋₂₇₂ in the presence of Mg²⁺ (data not shown).

Figure 4. A putative polypeptide-binding groove in LipL32₂₁₋₂₇₂. (a) Surface depictions of LipL32₂₁₋₂₇₂ in which residues Y59, W85, P97, P243, L244, I245 are shown in blue, V63, Y80, F214 and F226 are shown in yellow, Y81, R136, E138, Y170, E172, R211, and S213 are shown in red and the rest is shown in green. The indicated residues line the bottom of a deep and continuous groove that runs along half the circumference of the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure. The groove can be divided into a hydrophilic branch (red) and a hydrophobic branch (blue and yellow). The putative Ca²⁺-binding site depicted in Fig. 3 lies above the cavity depicted in yellow. The three views depicted are related by rotations of about 70° each about a vertical axis. (b) Surface depiction of the collagenbinding domain of ColG in which seven residues that may mediate its interactions with collagen, identified by mutational analysis and computational docking ²⁴ are depicted in red. Of these, six occupy positions that correspond to residues in the hydrophilic branch of the groove depicted in part (a). The ColG structure is oriented as to be aligned with the LipL32₂₁₋₂₇₂ structure shown to the right in (a). The two bound Ca^{2+} ions are depicted as dark spheres in the top left corner of the ColG structure (arrow). Figures were produced using PvMOL⁷⁸.

Figure 5. Conserved residues in the LipL32 family map to the LipL32₂₁₋₂₇₂ asymmetric unit dimer interface and to the putative polypeptide groove and Ca²⁺-binding sites. (a) Sequence alignment of LipL32 proteins from Leptospira interrogans (gi|45657230|), Pseudoalteromonas tunicata (gi|88860771), Moritella sp. (gi|149911212) and unidentified eubacterium SCB49 (gil149370508)). Secondary structure elements are indicated above the L. interrogans sequence. Absolutely conserved (*), highly similar (:) and similar (.) residues are indicated below the alignment. The lipobox containing C20, the fatty acid acceptor, as well as the highly acidic stretch of amino acids between α 3 and β 9 are boxed. The sequence of recombinant LipL32₂₁₋₂₇₂ begins at G21 and is preceded by an initiation methionine. Aligments were performed using the ClustalW program⁷⁹ followed by manual adjustment. (b) Solvent-exposed surface of the LipL32₂₁₋₂₇₂ monomer in which residues absolutely conserved in LipL32 homologs are colored yellow (F214 and F226), red (Y81 and R211), blue (Y59, W85 and P87) or cyan (P52, S99, P100, F131, Y178, N179 and F226) All other absolutely conserved residues are shown in orange. Two views of the molecule are shown, related by an approximately 180[°] rotation about the vertical axis, in order to depict the two largest solvent exposed surface patches of conserved residues. On the left, the orientation is similar to that shown in the middle of Fig. 4a and the largest patch of conserved residues corresponds to the putative polypeptide binding groove (colored blue, yellow or red as in Fig. 4a). On the right, some of conserved residues (cyan) are buried at the dimer interface in the asymmetric unit (interface 1, Fig 1c). Non-conserved surface residues are shown in green. Figures were produced using PyMOL⁷⁸.

REFERENCES

- 1. McBride, A. J., Athanazio, D. A., Reis, M. G. & Ko, A. I. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* **18**, 376-86.
- Palaniappan, R. U., Ramanujam, S. & Chang, Y. F. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 20, 284-92.
- 3. Zuerner, R. L., Knudtson, W., Bolin, C. A. & Trueba, G. (1991). Characterization of outer membrane and secreted proteins of Leptospira interrogans serovar pomona. *Microb Pathog* **10**, 311-22.
- 4. Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L., Barnett, J. K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P. N. & Bolin, C. A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* **68**, 2276-85.
- Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., Creno, S., Kuczek, E. S., Bommezzadri, S., Davis, J. C., McGrath, A., Johnson, M. J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R. L., Rood, J. I., Lajus, A., Davies, J. K., Medigue, C. & Adler, B. (2008). Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* **3**, e1607.
- 6. Hoke, D. E., Egan, S., Cullen, P. A. & Adler, B. (2008). LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of Leptospira spp. and Pseudoalteromonas tunicata. *Infect Immun* **76**, 2063-9.
- Cullen, P. A., Cordwell, S. J., Bulach, D. M., Haake, D. A. & Adler, B. (2002). Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai. *Infect Immun* 70, 2311-8.
- Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A. I., Haake, D. A. & Adler, B. (2005). Surfaceome of Leptospira spp. *Infect Immun* 73, 4853-63.
- 9. Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galvao Reis, M., Levett, P. N., Ko, A. I. & Haake, D. A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* **69**, 4958-68.
- 10. Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* **146 (Pt 7)**, 1491-504.
- Branger, C., Chatrenet, B., Gauvrit, A., Aviat, F., Aubert, A., Bach, J. M. & Andre-Fontaine, G. (2005). Protection against Leptospira interrogans sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* **73**, 4062-9.
- Branger, C., Sonrier, C., Chatrenet, B., Klonjkowski, B., Ruvoen-Clouet, N., Aubert, A., Andre-Fontaine, G. & Eloit, M. (2001). Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of Leptospira interrogans by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 69, 6831-8.
- Seixas, F. K., da Silva, E. F., Hartwig, D. D., Cerqueira, G. M., Amaral, M., Fagundes, M. Q., Dossa, R. G. & Dellagostin, O. A. (2007). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen

of Leptospira interrogans protects hamsters from challenge. *Vaccine* **26**, 88-95.

- Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F. P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E. D., Ferreira, A. G., Riley, L. W., Reis, M. G., Haake, D. A. & Ko, A. I. (2001). Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* **39**, 3303-10.
- 15. Bomfim, M. R., Ko, A. & Koury, M. C. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* **109**, 89-94.
- Dey, S., Mohan, C. M., Kumar, T. M., Ramadass, P., Nainar, A. M. & Nachimuthu, K. (2004). Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol* **103**, 99-106.
- Hauk, P., Macedo, F., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., de Morais, Z. M., Barbosa, A. S. & Ho, P. L. (2008). In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun* **76**, 2642-50.
- 18. Murray, G. L., Srikram, A., Hoke, D. E., Wunder, E. A., Jr., Henry, R., Lo, M., Zhang, K., Sermswan, R. W., Ko, A. I. & Adler, B. (2008). The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans. *Infect Immun*.
- 19. Hauk, P., Guzzo, C.R., Ho, P.L., Farah, C.S. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of LipL32 from Leptospira interrogans sorovar Copenhageni. *submitted*.
- 20. Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-97.
- 21. Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P. & Schenkel, A. (2008). Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* **24**, 2780-1.
- 22. Van Itallie, C. M., Betts, L., Smedley, J. G., 3rd, McClane, B. A. & Anderson, J. M. (2008). Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin. *J Biol Chem* **283**, 268-74.
- Hanna, P. C., Mietzner, T. A., Schoolnik, G. K. & McClane, B. A. (1991). Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J Biol Chem* 266, 11037-43.
- 24. Wilson, J. J., Matsushita, O., Okabe, A. & Sakon, J. (2003). A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J* **22**, 1743-52.
- 25. Johnson, J. E. (2003). Virus particle dynamics. *Adv Protein Chem* **64**, 197-218.
- Speir, J. A., Bothner, B., Qu, C., Willits, D. A., Young, M. J. & Johnson, J. E. (2006). Enhanced local symmetry interactions globally stabilize a mutant virus capsid that maintains infectivity and capsid dynamics. *J Virol* 80, 3582-91.

- 27. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. & Friedrich, P. (2001). Domain III of calpain is a ca2+-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1333-9.
- 28. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. Second Edition edit, MedSci., Melbourne.
- 29. Worcester, E. M., Nakagawa, Y., Bushinsky, D. A. & Coe, F. L. (1986). Evidence that serum calcium oxalate supersaturation is a consequence of oxalate retention in patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* **77**, 1888-96.
- 30. Dominguez, D. C. (2004). Calcium signalling in bacteria. *Mol Microbiol* **54**, 291-7.
- 31. Yu, X. C. & Margolin, W. (1997). Ca2+-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J* **16**, 5455-63.
- 32. Trombe, M. C., Rieux, V. & Baille, F. (1994). Mutations which alter the kinetics of calcium transport alter the regulation of competence in Streptococcus pneumoniae. *J Bacteriol* **176**, 1992-6.
- Straley, S. C., Plano, G. V., Skrzypek, E., Haddix, P. L. & Fields, K. A. (1993). Regulation by Ca2+ in the Yersinia low-Ca2+ response. *Mol Microbiol* 8, 1005-10.
- 34. Tisa, L. S. & Adler, J. (1992). Calcium ions are involved in Escherichia coli chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11804-8.
- 35. Tisa, L. S. & Adler, J. (1995). Cytoplasmic free-Ca2+ level rises with repellents and falls with attractants in Escherichia coli chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10777-81.
- 36. Dardanelli, M., Angelini, J. & Fabra, A. (2003). A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can J Microbiol* **49**, 399-405.
- Izutsu, K. T., Belton, C. M., Chan, A., Fatherazi, S., Kanter, J. P., Park, Y. & Lamont, R. J. (1996). Involvement of calcium in interactions between gingival epithelial cells and Porphyromonas gingivalis. *FEMS Microbiol Lett* 144, 145-50.
- 38. Smith, R. J. (1995). Calcium and bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**, 83-133.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2000). Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275, 31219-25.
- 40. Smith, C. A., Toogood, H. S., Baker, H. M., Daniel, R. M. & Baker, E. N. (1999). Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of Bacillus Ak.1 protease at 1.8 A resolution. *J Mol Biol* **294**, 1027-40.
- 41. Zakharov, S. D., Li, X., Red'ko, T. P. & Dilley, R. A. (1996). Calcium binding to the subunit c of E. coli ATP-synthase and possible functional implications in energy coupling. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 483-94.
- 42. Michiels, J., Xi, C., Verhaert, J. & Vanderleyden, J. (2002). The functions of Ca(2+) in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends Microbiol* **10**, 87-93.

- Norris, V., Chen, M., Goldberg, M., Voskuil, J., McGurk, G. & Holland, I. B. (1991). Calcium in bacteria: a solution to which problem? *Mol Microbiol* 5, 775-8.
- 44. Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F. N., Toth, I., Trinei, M., Modha, K. & Norman, R. I. (1996). Calcium signalling in bacteria. *J Bacteriol* **178**, 3677-82.
- 45. Onek, L. A. & Smith, R. J. (1992). Calmodulin and calcium mediated regulation in prokaryotes. *J Gen Microbiol* **138**, 1039-49.
- 46. Johnson, R. C. & Gary, N. D. (1963). Nutrition of Leptospira Pomona. Iii. Calcium, Magnesium, and Potassium Requirements. *J Bacteriol* **85**, 983-5.
- 47. Shenberg, E. (1967). Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media. *J Bacteriol* **93**, 1598-606.
- 48. Cruz, W. T., Young, R., Chang, Y. F. & Struck, D. K. (1990). Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the Pasteurella leukotoxin. *Mol Microbiol* **4**, 1933-9.
- 49. Chang, Y. F., Shi, J., Ma, D. P., Shin, S. J. & Lein, D. H. (1993). Molecular analysis of the Actinobacillus pleuropneumoniae RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell Biol* **12**, 351-62.
- Chenal, A., Guijarro, J. I., Raynal, B., Delepierre, M. & Ladant, D. (2009). RTX Calcium Binding Motifs Are Intrinsically Disordered in the Absence of Calcium: IMPLICATION FOR PROTEIN SECRETION. *J Biol Chem* 284, 1781-9.
- 51. Jobby, M. K. & Sharma, Y. (2005). Calcium-binding crystallins from Yersinia pestis. Characterization of two single betagamma-crystallin domains of a putative exported protein. *J Biol Chem* **280**, 1209-16.
- 52. Lin, Y. P., Raman, R., Sharma, Y. & Chang, Y. F. (2008). Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. *J Biol Chem* **283**, 25140-9.
- Matsunaga, J., Barocchi, M. A., Croda, J., Young, T. A., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A. & Ko, A. I. (2003). Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49, 929-45.
- Palaniappan, R. U., Chang, Y. F., Hassan, F., McDonough, S. P., Pough, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Mohammed, H. O., Shin, S., McDonough, P., Zuerner, R. L., Qu, J. & Roe, B. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by Leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol* 53, 975-84.
- Palaniappan, R. U., Chang, Y. F., Jusuf, S. S., Artiushin, S., Timoney, J. F., McDonough, S. P., Barr, S. C., Divers, T. J., Simpson, K. W., McDonough, P. L. & Mohammed, H. O. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of Leptospira interrogans. *Infect Immun* **70**, 5924-30.
- 56. Choy, H. A., Kelley, M. M., Chen, T. L., Moller, A. K., Matsunaga, J. & Haake, D. A. (2007). Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* **75**, 2441-50.

- 57. Lin, Y. P. & Chang, Y. F. (2007). A domain of the Leptospira LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 443-8.
- 58. Lin, Y. P. & Chang, Y. F. (2008). The C-terminal variable domain of LigB from Leptospira mediates binding to fibronectin. *J Vet Sci* **9**, 133-44.
- 59. Ramos, C. R., Abreu, P. A., Nascimento, A. L. & Ho, P. L. (2004). A highcopy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1103-9.
- 60. Hauk, P., Guzzo, C.R., Ho, P.L., Farah, C.S. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of LipL32 from Leptospira interrogans sorovar Copenhageni. *in press*.
- 61. Bhandari, P. & Gowrishankar, J. (1997). An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**, 4403-6.
- 62. Ramos, C. R., Spisni, A., Oyama, S., Sforça, M.L., Roman-Ramos, H., Vilar, M.M., Alves, A.C., Figueredo, R.C.R., Tendler, M., Zanchin, N.I.T., Pertinhez, T.A., Ho, P.L. (2009). Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: Structural and functional characterization of a vaccine candidate. . *Biochim. Biophys. Acta* in press.
- 63. Pace, C. N., Scholtz, M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A practical approach.* (Creighton, T. E., ed.), pp. 299-321. IRL Press, New York.
- 64. Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002). Substructure solution with SHELXD. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58, 1772-9.
- 65. La Fortelle, E. d., Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* **276**, 472-494.
- 66. Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 30-42.
- 67. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-3.
- 68. Cowtan, K. (1994). An automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34-38.
- 69. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**, 458-63.
- 70. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-32.
- 71. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658-674.
- 72. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-55.

- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-21.
- 74. Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 439-50.
- 75. Walker, J. R., Cuerrier, D., Ravulapalli, R., Weigelt, J., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Bochkarev, A., Dhe-Paganon, S. . (To be Published). Structure of the C2 Domain of Human Calpain-7.
- Donadini, R., Liew, C. W., Kwan, A. H., Mackay, J. P. & Fields, B. A. (2004). Crystal and solution structures of a superantigen from Yersinia pseudotuberculosis reveal a jelly-roll fold. *Structure* 12, 145-56.
- Holyoak, T., Kettner, C. A., Petsko, G. A., Fuller, R. S. & Ringe, D. (2004). Structural basis for differences in substrate selectivity in Kex2 and furin protein convertases. *Biochemistry* 43, 2412-21.
- 78. DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. <u>http://www.pymol.org</u>.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-8.

TABLES

Refinement (35.0 – 2.25 Å)	
No. of molecules/A.U. residues/chain waters	2 254 295
R _{factor} [¬]	0.184
R _{free} [¬]	0.227
R.m.s.d. bond lengths (Å) bond angles (°)	0.017 1.582
% of residues in Ramachandran regions: most favored additional allowed generously allowed disallowed	91.5 8.5 0.0 0.0

Table 1: Refinement statistics for P3₂21 LipL32₂₁₋₂₇₂ crystal structure.

^T $\mathbf{R}_{\text{factor}} = \Sigma |F_{\text{O}} - F_{\text{C}}| / \Sigma F_{\text{O}}$

5% of the data were excluded for $R_{\mbox{\tiny free}}$ calculation.

Z-score	RMSD (Å)	PDB	Protein	Organism
8.8-6.7	3.2-4.9	2QFE, 1KFU, 1QXP, 1U5I, 1DF0, 1KFX, 3BOW, 3DFO, 1KFX,	calpain-7, calpain-2	Homo sapiens, Rattus norvegicus
6.3	3.1	1PM4	Y.pderived mitogen a	Yersinia pseudotuberculosis
5.4	2.4	2QUO	C. perfringens enterotoxin	Clostridium perfringens
6.3 - 5.8	2.4	1NQJ, 1NQD, 2080	class 1 collagenase	Clostridium histolyticum
5.9-5.0	3.2-4.0	1F15, 1LAJ, 1ZA7, 1GFF, 1WCD	Icosahedral RNA virus coat proteins	Cucumber mosaic vírus, Tomato asp. virus, Cowpea c. m. virus, Bacteriophage g4, Avian inf. B. d. virus
5.3-5.2	4.2	2ID4, 1R64, 1OT5	kexin2 peptidase	Saccharomyces cerevisiae

Table 2. Proteins structurally similar to LipL32₂₁₋₂₇₂ identified using the Dali server²¹.

* All Dali server hits with Z-score > 5.0 are listed.



Figure 1b Click here to download high resolution image







Figure 1e Click here to download high resolution image











а

b

Leptospira interrogans Pseudoalteromonas tunicata Moritella eubacterium SCB49

Leptospira interrogans Pseudoalteromonas tunicata Moritella eubacterium SCB49 MKKLSILAISVALFABITACSAFGGLPSLKSSFVLSEDTIPGTNETVKTL 50 -MKIKLVVAALSLVSSTAFAGFSLNSLTDGDGLPSLTSSKTKSLGFTKVA MKKGIATKLLPLLAIVTLAGC-----MSTGPHLKSSNKESIAGMEVR -MKIKLVVLSVFTFCC------IFNAEAQKLKRFGSSVEKKIGPKTIK * 1 + 1 ++ +1 125 83 84 85 86 LPYGUVINYYGYVKPGQAPDGLVDGNKKAYYLYVWIPAVIAEMGVRMIHP 100 LPYANTVNYFGYIDKDSKPDETIKG-KDAYYLYIWVPAALDELGVFMISP AFYINYTSYFGYVDDSVTPDGKIKG-KFAYYLYAWVPAVIDEIGVSMISF VPYTDVISYLGYASTGNE-DAVVDG-KKFHYIYIWVPAVAPELGVRMLSF ** . .* ** . . * :.* * :*:* *:**. *:** *:** β7 α1 α2 β8 α3 TGEIGEPGDGDLVBDAFKAATPEEKSMPHNFDTWIRVEFMSAIMPDQIAK 150 VGDLAKPEKSDFVQEGFADKLKADK--EKWPDTWIRVERMDVISPEKIKD A--EATFAEGDEVQSTFEASLQSDP--NKYFDTYITLDRLNIVDNAKINK VAKTKVKN-~AISSEAYTENASSSD----YFDTYITLERSTIFKKEDINV · :***:* ::* · 1 ... 1 ÷. . . \$10 **長**9 3,,1 -AAKAKPVOKIDDDDDDDDDDTYKEERHNKYNSLTRIKIFNFFKSFDDLKNI 199 -AKSVFSVL--DTDDDGDDTYEEKRHAKYNSLTRIESQVS-------GGKVLQAL--NYNDDTSELPANPSGSSYNSLLRQVSEVS------DAAKNATWTQLASNDDSSEMPKQPSGSSYNSLLRYKSEIG------812 B11 B13 3...2 DTKKLLVRGLYRISFTTYKPGEVKGSFVASVGLLFPFGIPGVSPLINSNP 249 KFEKALVRGLYRVAFTTYKTGKVEGSFVATVGSNVPG------ITMATSL SPTKALVRGVYRISFTSFR-SAIEGSFEATIGTWVPG-----VKIAASL BPTKALTAGLYRIGFTTYKTGEVKGTFLAEVAAPVKLPG----VVMAKTI .. * *. *:**:.**::: . ::*:* * :. . 1.3 $\alpha 4$ EELQKQAIAAEEBLEKAASDATE 272 EQLHKAVNK-----

β1

62



