

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

SWIANY SILVEIRA LIMA

Identificação de adesinas de *Leptospira interrogans* por shotgun phage display

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
27/11/2012

SWIANY SILVEIRA LIMA

Identificação de adesinas de *Leptospira interrogans* por shotgun phage display

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lima, Swiany Silveira

L732i Identificação de adesinas de *Leptospira interrogans* por shotgun
phage display / Swiany Silveira Lima. -- São Paulo, 2012.
125p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Ho, Paulo Lee

1. Bioquímica molecular 2. Plasmídeo : Engenharia genética
I. T. II Ho, Paulo Lee, orientador.

574.88 CDD

Ao Maycon, pelo carinho, amor e dedicação.

A meus pais e meu irmão, pelo amor, incentivo e
compreensão.

A Deus, por estar sempre presente em todos
os momentos de minha vida e pela
oportunidade de realizar meus sonhos...

AGRADECIMENTO(S)

Ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho, pela orientação, ensinamentos, valiosos conselhos e pela confiança em meu trabalho durante esse período de convivência.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela oportunidade em realizar o curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPESP, CAPES e Fundação Butantan pelo apoio financeiro.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Molecular I, Jô, Eneas, Léo e Eliane, pelo exemplo de trabalho e competência, pelo ajuda e conselhos.

Aos professores da pós-graduação em Bioquímica que contribuíram imensamente para minha formação, especialmente a professora Maria Tereza pelos aprendizados durante a monitoria.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, especialmente ao Kobashi, Aline, Izilda e Nídia, pelo apoio e disposição sempre.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular I, que tornaram o ambiente de trabalho agradável, meu “muito obrigado” pelo carinho, amizade, preocupação e pela convivência durante esse período de quatro anos.

Às amigas Regiane, Luciane, Liliane, Adriana, Carol e Agatha pela amizade, ajuda e disposição.

Ao Maycon, pelo apoio, compreensão, dedicação, carinho e amor sem o qual este trabalho não teria sido concluído.

Aos meus pais e irmão, que mesmo distantes, estiveram presentes em todos os momentos deste trabalho.

À Polyana e Talita, pela amizade incondicional.

Aos amigos conquistados em São Paulo.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão, carinho e respeito.

Não existe esforço em vão.

Fará crescer o seu valor, leva-lo-á ao caminho do sucesso.

Masaharu Taniguchi

RESUMO

Lima, S.S. **Identificação de adesinas de *Leptospira interrogans* por shotgun phage display.** 2012. 125p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em *Leptospira interrogans* algumas proteínas com capacidade de ligação aos componentes de matriz extracelular foram identificadas e, em sua maioria, são fatores de virulência. Phage display é considerada uma técnica poderosa na identificação de novos ligantes, inclusive de moléculas adesinas, importantes no primeiro estágio de infecção do hospedeiro. A técnica de shotgun phage display foi utilizada visando à obtenção de ligantes à células de mamíferos. Quatro bibliotecas, por inserção de fragmentos aleatórios obtidos por sonicação do DNA de *L. interrogans* nos fagomídeos pG8SAET (BBT1 e BBT2) e pG3DSS (BBT5 e BBT6), foram construídas. As bibliotecas BBT1 e BBT5 contém insertos maiores e as BBT2 e BBT6 contém insertos menores, com tamanhos médios de 1500 pb e 350 pb, respectivamente. Após ensaio de *panning* da BBT5 contra células de mamíferos e soro fetal bovino, as sequências de clones selecionados foram analisadas quanto a orientação correta e se a fusão estava em fase com a proteína pIII. As proteínas codificadas pelos genes LIC11719, LIC10769, LIC13143 e LIC12976 foram selecionadas com estas características. Os genes que codificam a LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418, tiveram sua conservação avaliada em diferentes sorovares da espécie patogênica *L. interrogans* e no sorovar Patoc da espécie de vida livre *L. biflexa*. As proteínas LIC12976 (selecionada pela técnica de phage display) e LIC13418 (selecionada por ferramentas de bioinformática)

tiveram suas sequências amplificadas por PCR, clonadas em pGEM T easy, subclonadas em vetor de expressão pAE e expressas na fração celular correspondente ao corpúsculo de inclusão em *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS e *E. coli* BL21 SI, respectivamente. Após renaturação e purificação destas proteínas por cromatografia de afinidade a metal bivalente, um grupo de cinco animais BALB/C fêmeas foi imunizado. Ambas as proteínas se mostraram imunogênicas com títulos dos soros policlonais 1:256000 e 1:512000, respectivamente. Em ensaio de *Western Blot* os soros foram específicos no reconhecimento das proteínas recombinantes e as proteínas nativas foram verificadas em extratos de sorovares patogênicos de *L. interrogans*. Em ensaios de adesão, as proteínas recombinantes aderiram às células A31, LLC-PK1 e Vero e especificamente à laminina. Em ensaios de interferência em células usando laminina houve um aumento da adesão das proteínas recombinantes, o que pode ser explicado pela ligação da laminina às células e uma maior ligação das LICs estudadas. Em ensaio de localização celular usando imunofluorescência e microscopia eletrônica, foi observado que ambas as proteínas se encontram na superfície da *L. interrogans*. No experimento de desafio animal, a LIC12976 e a LIC13418 não se mostraram protetoras. Este trabalho contribuiu para a identificação das novas adesinas LIC13418 e LIC12976 que podem participar da virulência de leptospiros patogênicos envolvendo a primeira etapa da infecção na interação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*, adesina, shotgun phage display, vacina

ABSTRACT

Lima, S.S. **Identification of *Leptospira interrogans* adhesins by shotgun phage display.** 2012. 125p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In *Leptospira interrogans*, proteins capable to bind to extracellular matrix components have been identified and most of them are important virulence factors. Phage display is a powerful technique to identify new ligands, including adhesin molecules that are important in the first stage of host infection. A shotgun phage display technique was used in order to obtain cell ligands. Four libraries were constructed by inserting random fragments obtained by sonication of *L. interrogans* DNA into phagemids pG8SAET (BBT1 and BBT2) and pG3DSS (BBT5 and BBT6). The libraries BBT1 and BBT5 contain larger inserts and BBT2 and BBT6 contain smaller inserts, with 1500 bp and 350 bp average sizes, respectively. After panning of BBT5 against mammalian cells and bovine fetal serum, the sequences of selected clones were analyzed for correct orientation and fusion with pIII protein. The proteins encoded by genes LIC11719, LIC10769, LIC13143 and LIC12976 were selected. The genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 and LIC13418 were evaluated for their conservation in different pathogenic serovars of *L. interrogans* and free-living *L. biflexa* serovar Patoc. Proteins LIC12976 (selected by phage display technique) and also LIC13418 that was selected by bioinformatic tools, were amplified by PCR, cloned into pGEM T easy, subcloned into expression vector pAE and expressed in cellular fraction corresponding to the inclusion

body in *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS and *E. coli* BL21 SI, respectively. After protein renaturation protocol and purification by affinity chromatography, a group of five BALB/c mice was immunized with the purified proteins. Both proteins were shown to be immunogenic with 1:256000 and 1:512000 polyclonal sera titers, respectively. In Western blot the sera were specific to recognize recombinant proteins and native proteins were detected in pathogenic *L. interrogans* serovars extracts. In binding assays, recombinant proteins bind to A31, LLC-PK1 and Vero cells and specifically to laminin. In interference cell assay using laminin there was an increase of recombinant protein bindings, which can be explained by the laminin binding to cells and further binding of the recombinant LICs. In cellular localization assay using immunofluorescence and electron microscopy, it was observed that both are surface proteins of *L. interrogans*. In the animal challenge, the LIC12976 and LIC13418 were not protective. As a whole, this work contributed to the identification of LIC12976 and LIC13418 as new adhesins and they can participate in the virulence of pathogenic *Leptospira* in the first stage of host pathogen interaction.

Keywords: *Leptospira interrogans*, adhesin, shotgun phage display, vaccine

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Leptospira e leptospirose</i>	13
1.2. <i>Phage Display</i>	20
1.3. <i>Adesinas</i>	25
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. <i>Organismos e vetores</i>	30
3.2. <i>Extração de DNA de L. interrogans</i>	31
3.3. <i>Construção das bibliotecas de phage display</i>	31
3.4. <i>Infecção e amplificação dos fagos auxiliares M13K07 e VCSM13</i>	33
3.5. <i>Titulação do fago auxiliar e fagomídeos</i>	34
3.6. <i>Biopanning</i>	34
3.6.1. <i>Panning contra Soro Fetal Bovino</i>	34
3.6.2. <i>Pré-adsorção</i>	36
3.6.3. <i>Panning contra células de mamíferos</i>	37
3.6.4. <i>Novo procedimento de panning contra células de mamíferos: Metodologia BRASIL</i>	40
3.7. <i>Sequenciamento, análise dos fagos recuperados e seleção de candidatos por técnicas de bioinformática</i>	41
3.8. <i>Amplificação dos genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 em diferentes sorovares</i>	42
3.8.1. <i>Reação de amplificação e adenilação do gene LIC12976</i>	43
3.8.2. <i>Reação de amplificação do gene LIC13418</i>	44
3.8.3. <i>Migração eletroforética</i>	46
3.9. <i>Clonagem dos genes</i>	46
3.9.1. <i>Clonagem em pGEM[®]-T easy vector e transformação em E. coli DH5α</i>	46
3.9.2. <i>Clonagem em vetor de expressão pAE</i>	47
3.10. <i>Expressão das proteínas recombinantes em linhagens de E. coli</i>	48
3.11. <i>Obtenção de soro policlonal contra as proteínas recombinantes purificadas LIC12976 e LIC13418 e titulação por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	51
3.12. <i>Ensaio de ligação das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418: células, ECM e proteínas plasmáticas</i>	54
3.13. <i>Ensaio de interferência com laminina</i>	55
3.14. <i>Western Blot</i>	56
3.15. <i>Ensaio de desafio animal</i>	57
3.16. <i>Ensaio de Imunofluorescência: LIC12976</i>	57
3.17. <i>Microscopia eletrônica</i>	58
4. RESULTADOS.....	59

4.1. Construção das bibliotecas de phage display, amplificação e titulação das bibliotecas, vetores e fagos auxiliares.....	59
4.2. Biopanning.....	61
4.3. Novo procedimento de panning contra células de mamíferos: Metodologia BRASIL.....	66
4.4. Análise de fase dos fagos recuperados após biopanning da biblioteca BBT5 contra células de mamíferos e soro fetal bovino.....	67
4.5. Amplificação dos genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 em diferentes sorovares.	76
4.6. Conservação dos genes LIC12976 e LIC13418 nos sorovares cujos genomas foram sequenciados.....	84
4.7. Clonagem dos genes LIC12976 e LIC13418.....	86
4.8. Purificação das proteínas LIC12976 e LIC13418.....	89
4.9. Western Blot.....	91
4.10. Ensaio de ligação das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418: células, ECM e proteínas plasmáticas.	92
4.11. Ensaio de interferência com laminina em células de mamíferos.....	95
4.12. Verificação da expressão da LIC12976 e LIC13418 na superfície celular de Leptospira.	98
4.13. Ensaio de desafio animal.....	99
5. DISCUSSÃO.....	102
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS.....	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leptospira* e leptospirose

O gênero *Leptospira* pertence à ordem *Spirochaetales* e família *Leptospiraceae* e é composto por bactérias espiroquetas com extremidades curvadas, organismos flexíveis e helicoidais com 6 a 20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro (Figura 1), visualizadas por microscopia de campo escuro. São altamente móveis devido à presença de dois flagelos subterminais localizados no espaço periplasmático. Crescem em pH de 7,2 a 7,6 e temperaturas entre 28 e 30 °C, sob aerobiose. Em condições ótimas de cultivo, essa bactéria possui tempo de geração de 6 a 8 horas com tempo de cultura, em geral, entre 3 a 10 dias (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Levett, 2001).

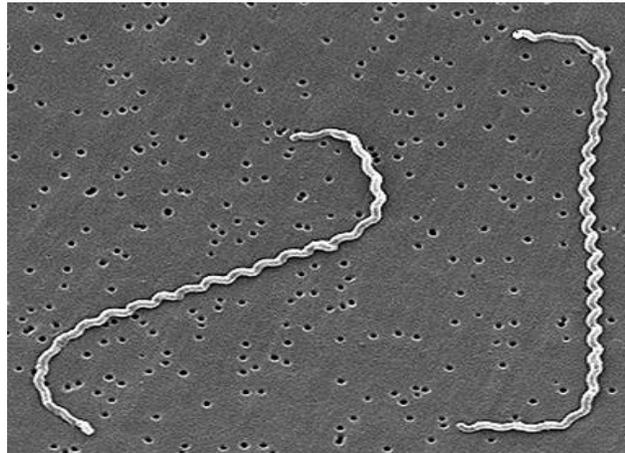


Figura 1. Micrografia eletrônica de *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* linhagem RGA em membrana de filtro de 0,22 μm . Reproduzido de Levett (2001).

As *Leptospiras* são quimiorganotróficas usando ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono. Podem ser cultivadas em meio líquido, semi-sólido ou sólido sendo o meio EMJH que contém tween 80 como fonte de carbono e BSA como agente detoxificante, o mais utilizado para crescimento *in vitro* (Faine et al., 1999).

As *Leptospiras* possuem características de bactérias gram-negativas, pois possuem estrutura de dupla membrana, e de gram-positiva, pois a parede celular de peptidoglicano está associada à membrana citoplasmática; além disso, são susceptíveis a antibióticos que são usados para combater infecções ocasionadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (Vijayachari et al., 2008). O LPS é o principal antígeno constituinte da membrana externa e é pouco tóxico a células ou animais sendo 12 vezes menos letal para camundongos que o LPS de *E. coli* (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010; Faine et al., 1999). É capaz de ativar células através do receptor Toll- like 2 devido a estrutura única do lipídeo A que possui o grupo 1-metilfosfato não encontrado em outras bactérias (McBride et al., 2005).

Até 1989, o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, patogênica, com mais de 200 sorovares, e *Leptospira biflexa*, saprófita e de vida livre, que inclui mais de 60 sorovares (Bharti et al., 2003; Levett, 2001). O sorovar é usado para classificar bactérias e é definido com base nas diferenças estruturais do LPS. Essa classificação usa a técnica de microaglutinação que permite estabelecer relação antigênica entre os sorovares e agrupá-los em sorogrupos (Cerqueira and Picardeau, 2009).

Mais recentemente, as linhagens deste gênero foram divididas em 20 espécies, definidas de acordo com os experimentos de hibridização em três subgrupos: o subgrupo das espécies saprofíticas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*), subgrupo das espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*) e o subgrupo intermediário (*L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*), cuja patogenicidade é indefinida (Cerqueira and Picardeau, 2009; Ko et al., 2009).

Leptospira é o agente etiológico da leptospirose, uma zoonose reconhecida como uma doença infecciosa emergente e extremamente difundida pelo mundo (Bharti et al., 2003; Levett,

2001; Palaniappan et al., 2007), com alta incidência em países tropicais como os da América Latina e da Ásia, devido à longa sobrevivência de *Leptospiras* em ambientes quentes com alta umidade. Em áreas temperadas como no Japão e nos países que compõem a União Europeia, a incidência é menor (Michel et al., 2002). Essa bactéria é capaz de sobreviver em solo alcalino, lama, pântanos, córregos, rios, órgãos e tecidos de animais vivos ou mortos (Faine et al., 1999).

A transmissão da doença, direta ou indiretamente, de animais para humanos (Figura 2), se dá por meio de abrasões e cortes na pele ou via conjuntiva, e pode ocorrer, também, em pele intacta depois de prolongada exposição à água contaminada com urina do animal infectado, pela inalação de água ou aerossóis por contaminação das vias de mucosas do trato respiratório. Nesta moléstia, a transmissão de humano para humano é rara (Levett, 2001).

Leptospiras patogênicas são mantidas na natureza pela colonização persistente do túbulo renal proximal de mamíferos reservatórios. Um animal infectado pode não apresentar sintomas e expelir bactérias pela urina por toda a vida (Faine et al., 1999; Vijayachari et al., 2008).

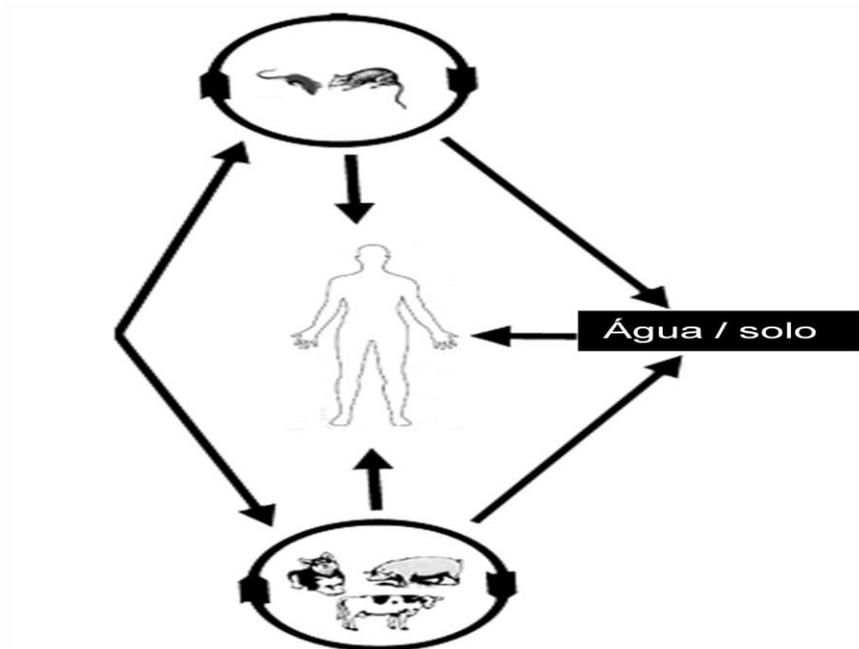


Figura 2. Transmissão da leptospirose. Adaptado de Adler & de la Pena Moctezuma (2010).

A leptospirose pode ser considerada uma doença ocupacional por estar associada a trabalhadores de minerações, matadouros e fazendas, entre outros. A extensão com que a doença é transmitida depende de muitos fatores, tais como o clima, a densidade populacional e o grau de contato entre reservatórios e hospedeiros acidentais (Bharti et al., 2003; Levett, 2001).

O entendimento do mecanismo de patogenicidade é limitado (Cinco, 2010) e as bases moleculares para virulência permanecem desconhecidas (Mohammed et al., 2011). Sabe-se que a motilidade é um mecanismo de virulência que permite a locomoção em meio viscoso e facilita a instalação da infecção. Primeiramente, as bactérias aparecem no sangue e daí disseminam-se para os órgãos alvos como o pulmão, fígado, rim, olho e cérebro (Levett, 2001; WHO, 2003). A severidade da leptospirose em humanos pode variar de acordo com o sorovar infectante, a quantidade de inóculo, a susceptibilidade do hospedeiro (idade e estado imunológico) e as características de virulência do patógeno (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010; McBride et al., 2005).

Em animais e humanos, a leptospirose varia de manifestações sub-clínicas, quando a infecção é assintomática, a clínicas com o aparecimento de uma série de sintomas incluindo nefrite, mastite, miocardite, meningite, crise de hemólise, falha renal, hemorragia pulmonar com falha respiratória e por fim a infecção de múltiplos órgãos levando a mortalidade (Levett, 2001).

A leptospirose é de difícil diagnóstico, pois os sintomas mais comuns são febre, dor de cabeça, mialgia, anorexia, náusea, vômito, prostração que podem ser confundidos com sintomas de outras doenças como gripe, hepatite, dengue, hantavirose, malária, pneumonia, febre tifoide, além de doenças entéricas. Por esse motivo, o número total de casos humanos é subestimado e não é conhecido precisamente. Segundo a World Health Organization (WHO, 2011), são estimados 500.000 ou mais casos por ano no mundo (Hartskeerl et al., 2011).

Apresentação clínica da leptospirose é bifásica (Figura 3): leptospirêmica com duração de cerca de uma semana, caracteriza-se por presença de febre, calafrios, dor de cabeça, mialgia severa, hemorragia conjuntival, anorexia, náusea, vômitos e prostração. A resolução destes sintomas coincide com a fase imune que é caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de Leptospiras na urina, presença de bactérias nos tecidos levando a complicações a partir da segunda semana com presença de febre, dor de cabeça, dor retro-orbital com fotofobia e meningite. A doença de Weil representa uma das mais severas formas da doença, desenvolvida após a fase septicêmica, sendo caracterizada por icterícia, falha renal e hemorragia, levando a fatalidade de 5 a 15 % dos casos. Além disso, pacientes podem apresentar um quadro pulmonar grave caracterizando a Síndrome Pulmonar Hemorrágica da Leptospirose que leva a óbito 50 % dos casos (Bharti et al., 2003; Levett, 2001; McBride et al., 2005).

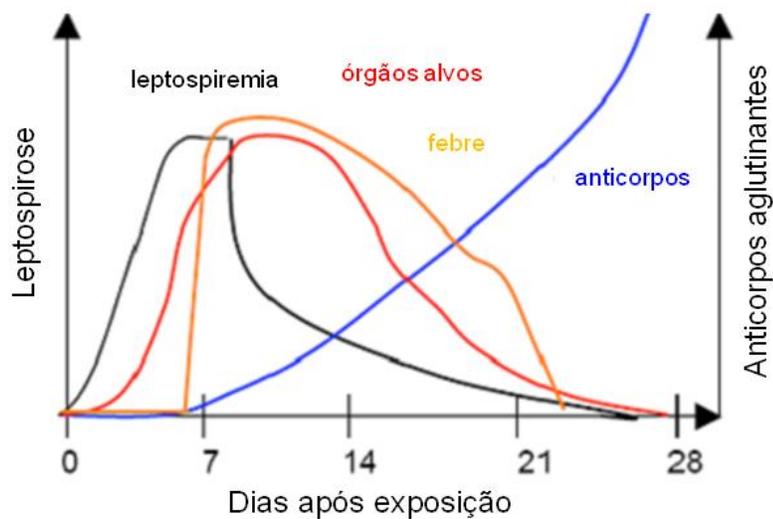


Figura 3. Diagrama esquemático da infecção por leptospirose. Adaptado de Ko et al. (2009).

Para o diagnóstico de uma suspeita clínica de leptospirose, o teste sorodiagnóstico usado internacionalmente é o MAT (Microscopic Agglutination Test) que é restrito a poucos laboratórios de referência. Neste teste o soro do paciente é incubado com suspensão de diferentes

sorovares de leptospira, a mistura é examinada microscopicamente para verificação da aglutinação e os títulos são determinados. É considerado um teste complexo e de difícil interpretação (Levett, 2001). Alguns testes baseados em ELISA e PCR estão disponíveis (Hartskeerl et al., 2011).

A doença é considerada um problema de saúde pública com um impacto médico e econômico, pois ao infectar humanos há necessidade de cuidados médicos e até mesmo internações. No Brasil, entre 2004 e 2008, foram confirmados 17533 humanos infectados com uma taxa de letalidade, em média, de 10,7 %. Afeta muitos animais domésticos e rebanhos, o que gera perdas econômicas, pois compromete o desempenho reprodutivo, com queda na fertilidade, abortos e redução na produtividade animal (Bharti et al., 2003; Faine et al., 1999; Hartskeerl, 2005; Martins et al., 2012; Mineiro et al., 2007). O tratamento da leptospirose difere dependendo da severidade e duração dos sintomas, em geral é realizado com antibiótico-terapia usando penicilina ou doxiciclina (Levett, 2001).

No Brasil, há alta incidência nas populações que vivem em aglomerações com condições inadequadas de saneamento e presença de roedores. Além disso, surtos podem estar associados às estações chuvosas com inundações que propiciam a disseminação e a persistência desta bactéria no ambiente (McBride et al., 2005).

Efetivamente, não existe vacina humana contra leptospirose (Palaniappan et al., 2007). Algumas vacinas derivadas de proteínas recombinantes, lipopolissacarídeos, microrganismos inativados ou atenuados e vacinas de DNA contra leptospirose foram desenvolvidas (Wang et al., 2007), mas nenhuma delas promove proteção efetiva contra a doença em humanos. Elas promovem somente certo grau de proteção, que é particularmente importante onde ocorrem as formas mais sérias da doença. Entretanto, a proteção tem uma duração relativamente curta (WHO, 2003) e a revacinação anual é recomendada para a manutenção da imunidade (Adler and

de la Pena Moctezuma, 2010). Já para uso veterinário, muitas vacinas (preparações de *Leptospiras* atenuadas ou inativadas) são comercialmente disponíveis em vários países, mas também, conferem imunidade incompleta devido à geração de imunidade específica para um determinado sorovar, como ocorre com as vacinas para humanos, além de também serem efêmeras (Srivastava, 2006). Vacinas humanas foram testadas em países como Cuba, China, França e Rússia (Hartskeerl et al., 2011; Ikoev et al., 1999; Martínez et al., 2004; Yan et al., 2003). No Brasil não existe vacina para uso humano (Saúde, 2012).

Na expectativa de que a genômica comparativa pudesse fornecer conhecimentos sobre especiação, diferenças no genótipo, fisiologia e mecanismos de patogenicidade e assim ajudar a estabelecer estratégias de controle da doença e auxiliar na identificação de possíveis candidatos no desenvolvimento de vacinas (Nascimento et al., 2004; Palaniappan et al., 2007), genomas de linhagens patogênicas e não patogênicas do gênero *Leptospira* foram sequenciados, a saber: *L. interrogans* linhagem Lai sorogrupo Icterohaemorrhagiae na China (Ren et al., 2003), *L. interrogans* linhagem Fiocruz L1-130 sorovar Copenhageni no Brasil (Nascimento et al., 2004); as linhagens JB197 e L550 sorovar Hardjo de *Leptospira borgpetersenii* na Austrália (Matsunaga et al., 2007), *Leptospira biflexa* linhagens Paris e Ames do sorovar Patoc na França (Picardeau et al., 2008).

Essas três espécies de *Leptospira* representam três diferentes estilos de vida. *L. biflexa* é saprofítica de vida livre; *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* causam doença em animais e humanos, entretanto *L. interrogans* é capaz de sobreviver no ambiente aumentando o risco de transmissão da doença enquanto *L. borgpetersenii* não sobrevive sem a presença de um hospedeiro (Xue et al., 2009).

Esses genomas possuem um conteúdo GC entre 35 e 41 % com dois cromossomos circulares de aproximadamente 4 Mb e 300 kb, e um replicon adicional de 74 kb que é

encontrado em *L. biflexa*. As três espécies compartilham 2.052 genes enquanto as espécies patogênicas possuem 656 genes específicos, não encontrados na espécie de vida livre e 59 % desses genes são desconhecidos sugerindo a existência de um mecanismo de patogenicidade único. Além disso, *L. borgpetersenii* possui o menor genoma indicando um processo de redução e especiação (Ko et al., 2009; Xue et al., 2009).

A disponibilidade destes múltiplos genomas sequenciados permite o uso de técnicas como phage display para identificação de novos antígenos vacinais que sejam conservados o suficiente para promover a proteção contra múltiplos sorovares de *Leptospira*. Além disso, recentemente tem-se desenvolvido ferramentas genéticas para a manipulação de *Leptospira* como o desenvolvimento do sistema de mutagênese que irá permitir uma investigação detalhada dos mecanismos patogênicos (Mohammed et al., 2011).

1.2. Phage Display

A técnica de phage display usando bacteriófagos filamentosos como vetor de expressão foi descrita pela primeira vez por Smith em 1985 (Smith, 1985). É considerada uma ferramenta extremamente poderosa na obtenção e identificação de ligantes usando bibliotecas de fagos contendo peptídeos ou proteínas que são usados na seleção (Benhar, 2001; Pande et al., 2010; Willats, 2002). O peptídeo/proteína é expresso na superfície da partícula viral em fusão com uma das proteínas do capsídio do fago (Jestin, 2008).

Essa tecnologia usa bacteriófagos filamentosos, f1, fd e M13 pertencentes ao gênero *Inovirus*, que são capazes de infectar bactérias gram-negativas por adsorção ao pilus sexual. Estes fagos possuem genoma de DNA fita simples (ssDNA) com cerca de 6,4 kb que é empacotado por cinco proteínas estruturais, pVI, pVII, pIX, pIII e pVIII, formando a partícula viral com aproximadamente 6,5 nm de diâmetro e 930 nm de tamanho. Geralmente, a incorporação de

fragmentos de DNA exógenos é realizada nos genes que codificam para as proteínas capsidiais pIII e pVIII, presentes em cinco e 2700 cópias, respectivamente (Arap, 2005; Barbas, 2001).

O ciclo de infecção (Figura 4) inicia-se pela adsorção da proteína pIII ao pilus sexual com posterior internalização do ssDNA, que no interior do hospedeiro é convertido em DNA dupla fita, o molde para a expressão das proteínas fágicas e para replicação do genoma por círculo rolante. A montagem da partícula viral ocorre na membrana citoplasmática e os fagos nascentes são secretados para o sobrenadante da cultura sem lisar a célula hospedeira. Durante o processo as células infectadas se mantêm capazes de crescer e dividir (Arap, 2005; Barbas, 2001; Kehoe and Kay, 2005).

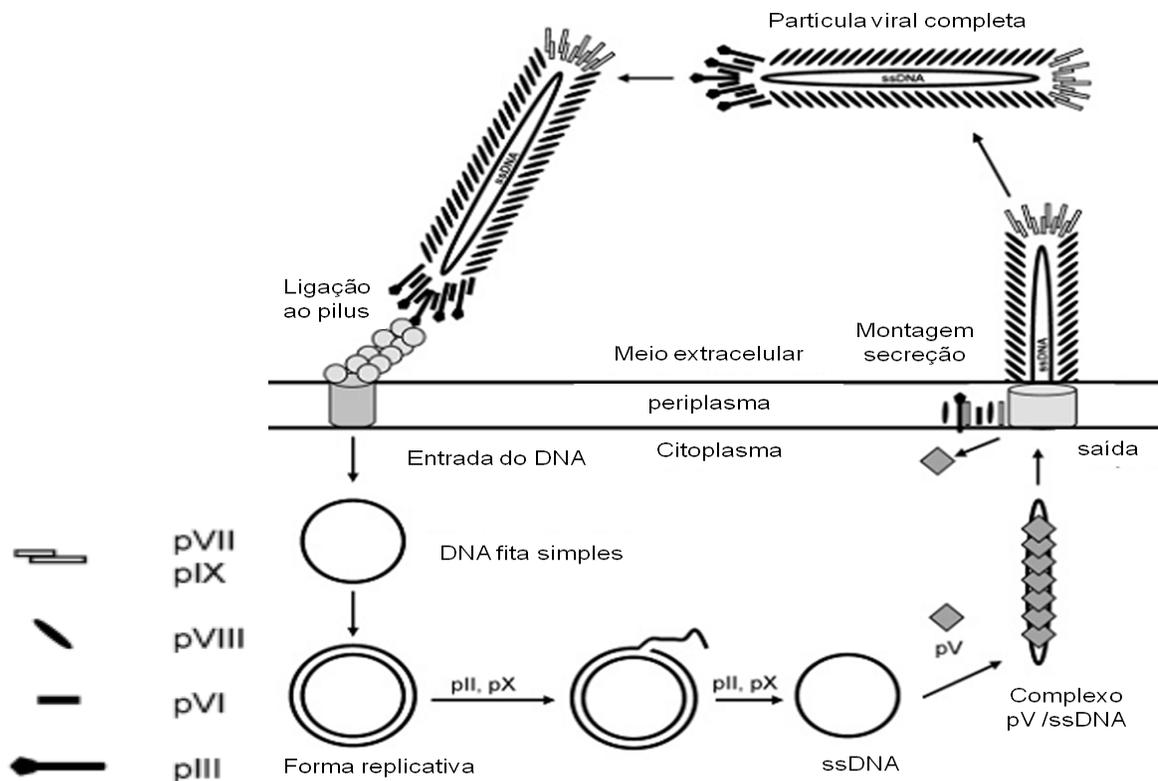


Figura 4. Ciclo de vida do fago M13. Adaptação de Kehoe & Kay (2005).

Neste sistema de apresentação, as sequências nucleotídicas como fragmentos de DNA, cDNAs e oligonucleotídeos sintéticos podem ser clonadas no genoma do bacteriófago (Beghetto and Gargano, 2011). As bibliotecas apresentadas em fagos também podem ser construídas em fagomídeos, que combinam elementos do genoma dos fagos com plasmídeos, pois contém origem de replicação de fagos como o M13, em geral o gene III ou VIII, origem de replicação de plasmídeo de *E. coli*, múltiplos sítios de clonagem e gene que confere resistência a antibiótico. Entretanto, faltam outros genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais necessárias à montagem do fago completo. Neste sistema, os fagomídeos podem se multiplicar como plasmídeos em *E. coli* ou serem empacotados quando um fago auxiliar como o M13K07 ou o VCSM13, que contém origem de replicação defectiva, infecta esta bactéria e fornece todos as proteínas necessárias a montagem da partícula viral (Azzazy and Highsmith, 2002; Mullen et al., 2006; Qi et al., 2012). Em geral, são mais utilizados devido as suas características como o genoma ser menor e poder acomodar fragmentos de DNA exógeno maiores, a eficiência de transformação é maior o que permite a obtenção de uma biblioteca com maior diversidade, presença de mais sítios de restrição que facilita a manipulação gênica, a expressão das proteínas de fusão pode ser modulada, além de serem geneticamente mais estáveis (Qi et al., 2012).

A expressão da proteína de fusão no capsídio do fago permite a seleção de ligantes específicos contra qualquer alvo de escolha, por um procedimento denominado *biopanning* (Figura 5), que envolve ciclos consecutivos de imobilização do alvo, incubação com a biblioteca de fagos, lavagem para remoção dos fagos não ligados, eluição das partículas ligadas e amplificação dos ligantes por infecção em *E. coli*, o que permite o enriquecimento do ligante (Konthur and Crameri, 2003; Pande et al., 2010; Smith and Petrenko, 1997).

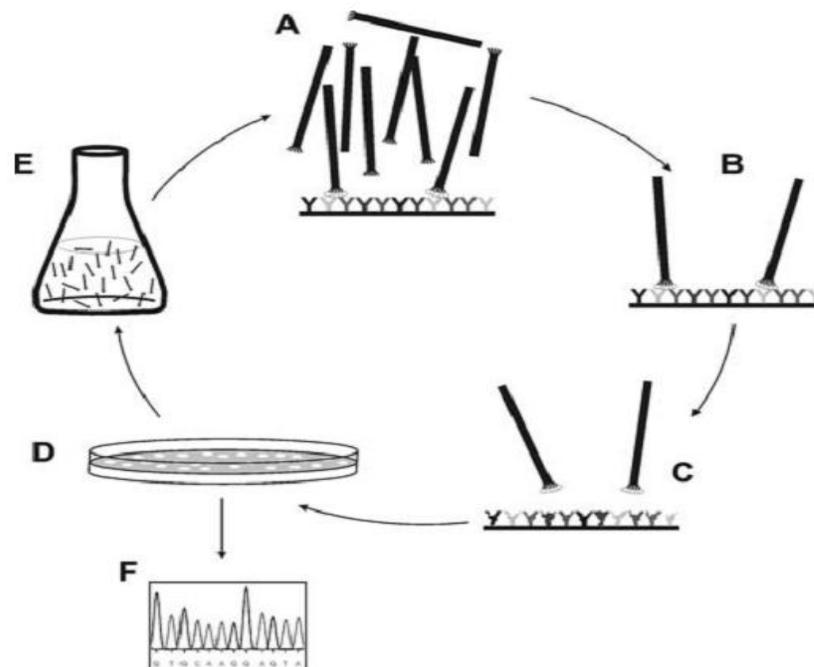


Figura 5. Phage display *biopanning*. (A) a biblioteca de fagos é incubada com o alvo imobilizado, (B) fagos não ligados são lavados, (C) fagos ligados são eluídos, (D) fagos eluídos são plaqueados, (E) amplificação em meio de cultura líquido, (F) determinação da sequência dos fagos selecionados. Reproduzido de Bratkovic (2010).

Outra metodologia para *screening* denominada BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*) foi desenvolvida por Giordano e colaboradores (Giordano et al., 2001) na tentativa de minimizar o número de fagos inespecíficos recuperados durante o procedimento de *panning* em células de mamíferos. A metodologia propõe a centrifugação diferencial, na qual uma suspensão celular incubada com a biblioteca de fagos é adicionada ao topo de um solvente orgânico não miscível. Assim, ao centrifugar, o sedimento celular que penetra através da fase orgânica é separado dos fagos não ligados que permanecem na fase aquosa superior. Essa técnica não requer passos posteriores de lavagens, pois o tubo de centrífuga é congelado em nitrogênio líquido e deste modo evita a contaminação do sedimento de células com fagos da fase aquosa; o tubo é cortado com auxílio de tesoura e os fagos ligados às células são eluídos por infecção com *E. coli*.

Essa técnica permite a verificação da relação direta existente entre fenótipo e genótipo com rápida identificação das sequências de ligantes, tais como, anticorpos, enzimas, inibidores, toxinas, receptores, adesinas, capazes de ligarem-se a vários alvos biológicos, entre o quais proteínas, células, órgãos e organismos vivos (Antonara et al., 2007; Smith and Petrenko, 1997).

As aplicações são inúmeras, incluindo a determinação de ligantes que participam da interação patógeno-hospedeiro, a identificação de alvos para inibição de tumores específicos, de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos, enzimas ou inibidores enzimáticos, ligantes envolvidos na transdução de sinal, na confecção de mapas de interação proteína-proteína, de drogas, na engenharia de anticorpos como o mapeamento de epítomos, no desenho de drogas e no desenvolvimento de vacinas (Jestin, 2008; Mullen et al., 2006; Pande et al., 2010).

Visando o desenvolvimento de vacinas, a técnica de phage display pode ser útil na identificação de candidatos vacinais (epítomos imunogênicos capazes de induzir uma resposta imune protetora) (Benhar, 2001; Mullen et al., 2006). Dentre estes, destacam-se as adesinas bacterianas que permitem a colonização da célula hospedeira. A inibição da adesão bacteriana tem um potencial uso terapêutico, mas requer o conhecimento das adesinas envolvidas no processo de infecção. Neste contexto, as bibliotecas apresentadas em fagos providenciam meios para caracterizar a interação entre adesina-receptor e assim identificar esses novos ligantes (Mullen et al., 2006).

Usando a técnica de shotgun phage display, uma variação da técnica de phage display, em que o DNA genômico é fragmentado aleatoriamente e clonado em vetor fagomídeo, e assim, polipeptídios de todos os genes presentes no cromossomo bacteriano são representados nos fagos da biblioteca (Jacobsson and Frykberg, 2001; Jacobsson et al., 2003), várias adesinas foram identificadas em bactérias, tais como *Staphylococcus epidermidis* (Nilsson et al., 1998; Williams et al., 2002a), *Streptococcus agalactiae* (Beckmann et al., 2002; Jacobsson, 2003), *Streptococcus*

dysgalactiae (Vasi et al., 2000), *Streptococcus equi* (Lindmark and Guss, 1999), *Staphylococcus aureus* (Bjerketorp et al., 2002; Heilmann et al., 2004), *Borrelia burgdorferi* (Antonara et al., 2007), *Haemophilus influenzae*, *Pasteurela multocida*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Mullen et al., 2007), *Bifidobacterium longum* (Shkoporov et al., 2008), *Lactobacillus casei* (Munoz-Provencio and Monedero, 2011), *Staphylococcus hyicus* (Rosander et al., 2010), *Staphylococcus lugdunensis* (Nilsson et al., 2004a; Nilsson et al., 2004b), *Helicobacter pylori* (Jonsson et al., 2004), *Brucella suis* (Posadas et al., 2012) e em *L. interrogans* (Ching et al., 2012).

1.3. Adesinas

Bactérias patogênicas possuem inúmeros mecanismos que causam a doença em humanos. O passo inicial para a interação patógeno-hospedeiro e colonização do tecido é a adesão à superfície do hospedeiro. Uma vez aderida a uma superfície celular, os patógenos são capazes de iniciar processos bioquímicos específicos que incluem proliferação, secreção de toxina e invasão celular que culminam com o aparecimento dos sintomas da doença (Wilson et al., 2002; Wilson, 2002). As adesinas são moléculas bem diversas, pois podem apresentar natureza protéica ou polissacarídica. As adesinas polissacarídicas, geralmente, são componentes da membrana, parede ou da cápsula, enquanto aquelas de natureza protéica podem estar presentes nas fímbrias ou em outra região da superfície celular que permita o contato íntimo com a célula hospedeira (Wilson et al., 2002).

As adesinas bacterianas são consideradas os fatores de aderência microbianos por reconhecer, especificamente, um receptor na superfície da célula alvo e dirigir o patógeno para uma localização específica no hospedeiro (Niemann et al., 2004). As moléculas que servem como receptores para os patógenos incluem proteínas presentes na superfície das membranas,

imunoglobulinas de superfície, glicolípídeos, glicoproteínas, e proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, colágeno, laminina, entre outras (Wilson et al., 2002).

A presença de adesinas foi verificada em várias bactérias patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Neisseria meningitidis* e *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Borrelia burgdorferi*, *Corynebacterium diphtheriae* (Linke and Goldman, 2011; Niemann et al., 2004).

Segundo Palaniappan e colaboradores (Palaniappan et al., 2007), a habilidade de *L. interrogans* causar doença é complexa e multifatorial. Alguns estudos mostraram que esta bactéria é capaz de entrar em células fagocíticas e não fagocíticas, além de interagir com culturas de fibroblasto, células epiteliais, endoteliais e microglia, indicando que moléculas da superfície do patógeno apresentam um papel importante na adesão e invasão do tecido hospedeiro (Cinco, 2010).

Leptospiras apresentam um repertório rico em adesinas dotadas de atividades biológicas multifuncionais como adesão a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, componentes do sistema complemento humano e proteínas da cascata de coagulação. Estas adesinas são proteínas ou lipoproteínas localizadas na membrana externa (Castiblanco-Valencia et al., 2012; Cinco, 2010).

Ao comparar o genoma de dois sorovares de *L. interrogans*, Copenhageni e Lai, Nascimento e colaboradores (Nascimento et al., 2004) descreveram genes possivelmente envolvidos na patogenicidade e virulência, dentre os quais, os responsáveis pelo processo de adesão ao hospedeiro como lipoproteínas, proteínas hemaglutinina-like, proteínas com domínios de imunoglobulinas e repetições FG-GAP, polissacarídeos capsulares e exopolissacarídeos.

Até o momento, adesinas foram identificadas em *Leptospira* e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Adesinas identificadas em *L. interrogans*

Adesina	Componente ao qual se liga	Referência
Lsa24 (LfhA ou LenA)	Laminina e fator H	(Barbosa et al., 2006), (Verma et al., 2006), (Stevenson et al., 2007)
Loa22	colágeno tipo I, colágeno tipo IV e fibronectina plasmática	(Barbosa et al., 2006)
LenB, LenC, LenD, LenE e LenF (parálogas a LenA)	fibronectina	(Stevenson et al., 2007)
LigA e LigB.	MECs imobilizadas e a proteínas plasmáticas como colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina, fibrinogênio, elastina, tropoelastina e a células MDCK, além de interagirem com reguladores do sistema complemento fator H, FHL-1, FHR-1 e C4BP. LigB também interage com heparan sulfato	(Castiblanco-Valencia et al., 2012; Choy et al., 2007; Lin and Chang, 2007; 2008; Lin et al., 2009a; Lin et al., 2009b; Lin et al., 2009c; Lin et al., 2010), (Ching et al., 2012)
LipL32	colágeno tipo IV e a fibronectina	(Hauk et al., 2008; Hoke et al., 2008)
Lsa21	laminina, colágeno tipo IV e a fibronectin	(Atzingen et al., 2008);
Lsa63	laminina e colágeno tipo IV	(Longhi et al., 2009)
Lsa27	laminina	(Longhi et al., 2009)
TlyC	laminina, colágeno IV e fibronectina	(Carvalho et al., 2009)
Lp95	laminina e fibronectina	(Atzingen et al., 2009)
LipL53	laminina, colágeno IV, fibronectina plasmática e celular	(Oliveira et al., 2010)
LcpA	regulador do sistema complemento humano C4BP	(Barbosa et al., 2010)
OmpL37	elastina, fibrinogênio, fibronectina plasmática e laminina	(Pinne et al., 2010)
Lsa66	laminina e fibronectina plasmática	(Oliveira et al., 2011)
Lsa20	laminina e plasminogênio	(Mendes et al., 2011)
Lsa30	laminina e fibronectina plasmática, além de ser receptor de plasminogênio e se ligar ao regulador do sistema complemento C4BP	(Souza et al., 2012)

Neste contexto, adesinas de diferentes bactérias patogênicas são testadas como potenciais candidatas para o desenvolvimento de vacinas (Kline et al., 2009).

Deste modo, este trabalho pretende contribuir para a identificação de novas adesinas de *L. interrogans* por meio experimental utilizando a técnica shotgun phage display, e assim, contribuir para o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro deste microrganismo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi identificar e caracterizar adesinas codificadas por *L. interrogans* utilizando a técnica de shotgun phage display.

Objetivos específicos

- Desenvolver a técnica de shotgun phage display por meio da construção da biblioteca apresentada em fago;
- Selecionar e identificar novas adesinas com capacidade de ligação à superfície das células de mamíferos;
- Caracterizar a atividade de adesina e verificar sua atividade antigênica como possível candidata vacinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismos e vetores

Todos os organismos, fagos, fagomídeos e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 2. A linhagem Fiocruz L1-130 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, código BAA-1198). O cultivo foi realizado em meio EMJH (*Ellinghausen McCoullough Johnson & Harris*) líquido (Difco) complementado com suplemento à base de BSA (Difco) sob condições de aerobiose a temperatura de 29 a 30 °C.

Escherichia coli TG1 e *E. coli* XL1 Blue foram crescidas em meio líquido 2YT, sob agitação a 250 rpm, ou em meio sólido LB, mantidas a 37 °C. Para tentativas de expressão de proteínas recombinantes foram utilizadas as linhagens *E. coli* C43 (DE3), *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21 Star (DE3)-pLysS ou *E. coli* Origami crescidas em meio LB a 37 °C ou *E. coli* BL21 SI, mantida em meio LBon a 30 °C.

Tabela 2. Bactérias, células de mamíferos, fagomídeos, fagos e plasmídeos utilizados

BACTÉRIAS	SOROVARES
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni, Autumnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes
<i>L. biflexa</i>	Patoc
ESTIRPES	
<i>E. coli</i>	TG1, XL1 Blue, C43 (DE3), BL21(DE3), BL21 Star (DE3)-pLysS e Origami
FAGOMÍDEOS	pG8SAET e pG3DSS
FAGOS AUXILIARES	M13K07 e VCSM13
PLASMÍDEOS	pGEM [®] -T easy vector e pAE
CÉLULAS DE MAMÍFEROS	A31, LLC-PK1 e Vero

3.2. Extração de DNA de *L. interrogans*

O DNA genômico da cultura de *L. interrogans* foi extraído com a solução de guanidina-detergente (DNAzol Reagent, Invitrogen), seguindo orientações do fabricante com algumas adaptações. Resumidamente, cinco mL de DNAzol foram adicionados ao sedimento de bactérias e homogeneizados com auxílio de pipeta; a amostra foi centrifugada a 10000 *g* por 10 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi transferido para novos tubos e precipitado com 0,5 volume de etanol. Após misturar por inversão e incubar por 3 minutos à temperatura ambiente, o DNA foi enrolado e transferido para um novo tubo com o auxílio de uma pipeta, lavado duas vezes com um mL de etanol 75 % e após a remoção deste, o DNA foi solubilizado em NaOH 8 mM.

3.3. Construção das bibliotecas de phage display

A biblioteca de shotgun phage display foi construída de acordo com o protocolo estabelecido (Jacobsson et al., 2003).

Os fagomídeos, pG8SAET e pG3DSS foram cedidos, gentilmente, por Karin Jacobsson do Departamento de Microbiologia da Universidade Sueca de Ciências Agrárias, Suécia. Os vetores foram digeridos com a enzima *Sna*BI (Fermentas), que gera fragmentos abruptos, e tratados com fosfatase alcalina (Invitrogen), para evitar a auto-ligação do vetor durante as reações de ligação subsequentes.

Cinco µg de DNA de *L. interrogans* foram fragmentados por sonicação durante os tempos de 40, 60, 80 e 100 segundos (Homogeneizador 4710 Cole Parmer). Os dois primeiros e os dois últimos tempos foram unidos e submetidos à migração eletroforética em gel de agarose 1 % e a seguir, os fragmentos foram purificados (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare), tratados com T4 DNA Polimerase (Fermentas) e fosforilados com T4 Polinucleotideo Kinase (Fermentas). Os fragmentos de DNA de *L. interrogans*, denominados de

maiores e menores, juntamente com os vetores, pG8SAET e pG3DSS, foram submetidos à reação de ligação com uma relação de moléculas de 1:1 (vetor:inserto) na presença de T4 DNA ligase (New England, Biolabs), acrescida de 5 % de PEG, como recomendado.

O volume de 10 μL da reação foi precipitado com a adição de 2,5 μL de tRNA de levedura (Invitrogen), 1,5 μL de acetato de sódio 3 M e 30 μL de etanol absoluto gelado, incubados por uma hora a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitados vigorosamente e centrifugados a 14000 g por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com etanol 70 % e seco por 10 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, três μL de água ultra pura (Milli-Q, Millipore Corporation) foram adicionados à reação de ligação.

O volume de dois μL foi usado na eletrotransformação (2.5 kV, 25 μF e 400 Ω em cubetas de 2 mm) de *E. coli* XL1 Blue eletrocompetente, previamente preparada segundo protocolo estabelecido por Barbas e colaboradores (2001). Imediatamente após a transformação, as bactérias foram transferidas para frascos contendo três mL de meio SOC e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Alíquotas da cultura, um, 10 e 100 μL , foram retiradas para a determinação da eficiência de transformação (número de transformantes) e alguns clones foram sequenciados através do método de Sanger, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer), para certificar a correta inserção dos fragmentos clonados. Ao volume restante, foram adicionados sete mL de 2YT acrescido de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora sob agitação de 250 rpm; posteriormente, ampicilina foi adicionada para a concentração final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a cultura incubada sob as mesmas condições.

Para a amplificação da biblioteca, as bactérias foram infectadas com um mL do fago auxiliar M13K07 (título de $7,0 \times 10^9$ fagos/mL) e o volume foi completado para 100 mL com meio 2YT acrescido de ampicilina (concentração final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tetraciclina (concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após a incubação, por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação, o antibiótico

canamicina (concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado e a cultura foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$, durante a noite, a 250 rpm. No dia posterior, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 12860 g por 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante da cultura, contendo a biblioteca amplificada, foi estocado a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 6). Os vetores vazios, pG8SAET e pG3DSS também foram utilizados para eletroporação de *E. coli* XL1 Blue e amplificados conforme descrito anteriormente.

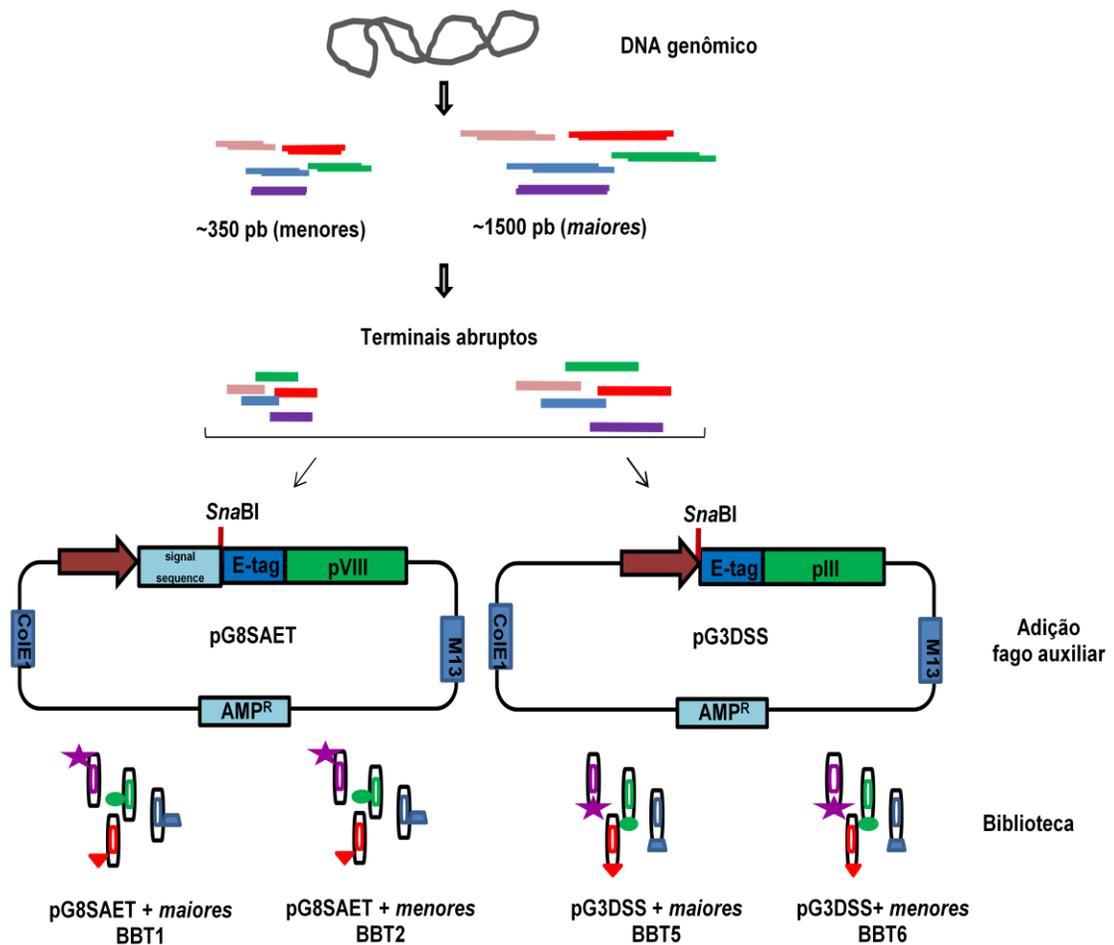


Figura 6. Esquema da construção das bibliotecas de shotgun phage display.

3.4. Infecção e amplificação dos fagos auxiliares M13K07 e VCSM13

Este procedimento visou à estocagem de fagos auxiliares que seriam usados na amplificação dos fagos eluídos durante os procedimentos de *biopanning*.

Uma colônia de *E. coli* linhagem TG1 foi crescida em meio LB até a DO_{600} igual a 0,6; fagos auxiliares M13K07 e VCSM13 foram usados para infecção de um mL de bactéria e incubados a 37 °C por 30 minutos. Para a amplificação, 100 mL de 2YT foram adicionados à infecção e incubados a 37 °C por 30 minutos sob agitação de 250 rpm; canamicina na concentração de 20 µg/mL foi adicionada e a cultura incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 12860 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante, contendo os fagos auxiliares, foram estocados a 4 °C (Clackson and Lowman, 2004).

3.5. Titulação do fago auxiliar e fagomídeos

Colônias de *E. coli* linhagem TG1 foram crescidas em meio 2YT até a DO_{600} igual a 0,6; 100 µL dos fagos auxiliares (M13K07 e VCSM13) e das amplificações de cada ciclo foram usados para infecção de um mL de bactéria e incubados a 37 °C por 30 minutos. Após a infecção, procedeu-se a diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} nas quais 10 µL da infecção eram diluídos em 990 µL de meio 2YT. O volume de 100 µL das diluições foram plaqueadas em meio LB contendo o antibiótico adequado (canamicina - 20 µg/mL ou ampicilina - 50 µg/mL) e as placas incubadas a 37 °C durante a noite (Clackson and Lowman, 2004).

3.6. Biopanning

3.6.1. Panning contra Soro Fetal Bovino

O soro fetal bovino foi escolhido como alvo para *panning*, pois é um componente do meio de cultivo de células animais e poderia ser um contaminante presente durante a seleção em

células. Além disso, pode ser um alvo interessante para a interação da *Leptospira*, uma vez que esta bactéria tem uma fase de infecção septicêmica.

Com o objetivo de determinar o que liga em Soro Fetal Bovino (SFB) e comparar com os ligantes achados em células, quatro poços foram revestidos com um μg de BSA (o controle do que liga especificamente em BSA foi realizado pela Dra Regiane Degan Fávaro, uma vez que este é o principal componente do soro e também é usado como bloqueio nestes experimentos) e outros quatro com SFB 100 % (placa de 24 poços), foram incubados a 37 °C durante a noite. Após retirar as proteínas, os poços foram bloqueados com BSA 2 % por uma hora a temperatura ambiente e lavados três vezes com PBS-T. Em seguida, a biblioteca BBT5 foi incubada no poço denominado de BSA por 1 hora a 37 °C, os fagos não ligados no primeiro foram misturados ao tampão de ligação composto por BSA 2 % e 0,05 % de Tween® 20 e então incubados no poço denominado de SFB sob as mesmas condições. Os fagos não ligados foram descartados e o poço lavado cinco vezes com PBS-T e outras cinco com PBS. Tampão glicina 0,1 M, pH 2,1 foi utilizado para a eluição dos fagos ligados a SFB por 10 minutos a temperatura ambiente e a suspensão foi neutralizada com tampão Tris 1 M, pH 8,0. A seguir, o volume total de fagos eluídos infectou *E. coli* linhagem TG1 por 15 minutos a temperatura ambiente, o volume da infecção foi completado para 10 mL com 2YT e 100 μL desta foi retirado para determinação do título. Ampicilina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi acrescida e a cultura incubada a 37 °C por uma hora a 250 rpm. Após este intervalo, mais ampicilina (para a concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionada e a incubação seguiu as mesmas condições.

Para a amplificação dos fagos recuperados, um mL do fago auxiliar M13K07 (título de $7,0 \times 10^9$ fagos/mL) foi adicionado, o volume foi completado para 50 mL com meio 2YT acrescido de ampicilina (para a concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após a incubação, sob as mesmas condições anteriores, o antibiótico canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado e a cultura

incubada a 37 °C, durante a noite, sob agitação de 250 rpm. No dia posterior, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 12860 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante da cultura, contendo o amplificado do primeiro ciclo, foi estocado a 4 °C para ser usado no próximo ciclo de seleção. Sob as mesmas condições descritas anteriormente, foram realizados quatro ciclos de *panning* (Figura 7). A cada ciclo de *panning*, amostras de fagomídeos foram extraídas e sequenciadas (Mullen et al., 2007; Watters et al., 1997).

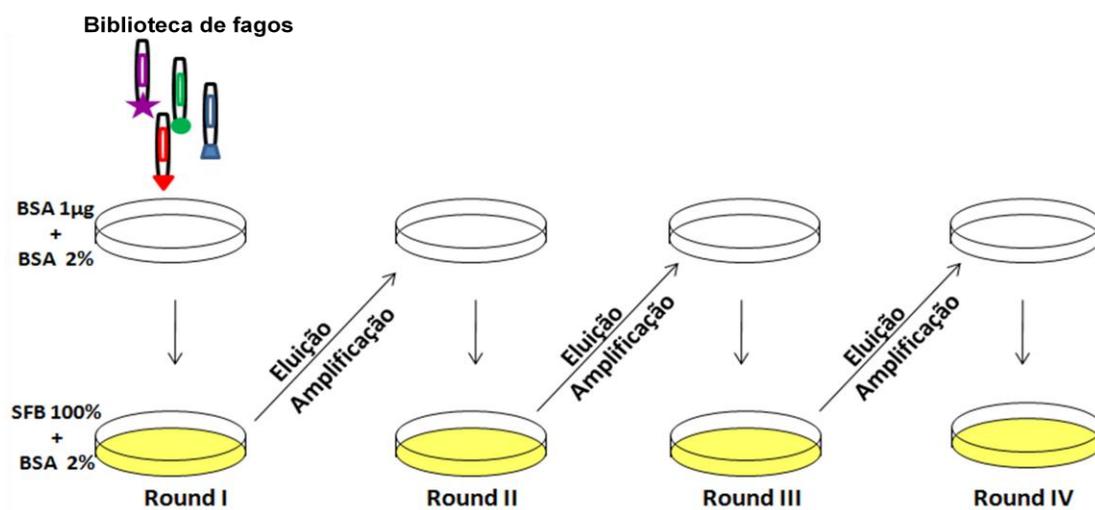


Figura 7. Esquema representando o procedimento de *panning* em soro fetal bovino. Primeiramente a biblioteca BBT5 foi incubada em BSA e os fagos não ligados a BSA foram incubados com SFB, os fagos especificamente ligados a SFB foram eluidos e amplificados por infecção em *E. coli* e utilizados para nova incubação em BSA e assim sucessivamente até o round IV.

3.6.2. Pré-adsorção

O *biopanning* para a seleção de fagos ligantes às células de mamíferos foi realizado em duas etapas. A primeira etapa denominada de pré-adsorção foi utilizada para retirar fagos que se ligam inespecificamente a BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, USA) e a SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab, BRA).

Para a pré-adsorção, foi utilizada uma placa de 24 poços (Corning, USA), dos quais quatro poços foram revestidos com um µg de BSA e outros quatro com SFB 100 % e incubados a

4 °C durante a noite. Após retirar as proteínas, os poços foram bloqueados com BSA 2 % por uma hora a temperatura ambiente, lavados três vezes com PBS-T (PBS acrescido de 0,05 % de Tween® 20, Sigma, USA). Em seguida, a biblioteca BBT5 foi incubada no poço denominado de BSA por 1 hora a 37 °C e os fagos não ligados no primeiro foram incubados no poço denominado de SFB sob as mesmas condições. Foram efetuados quatro ciclos de pré-adsorção, sem amplificação entre os ciclos (Figura 8). Os fagos não ligados ao SFB do ciclo IV foram nomeados de BBT5 BSA⁻ SFB⁻ e guardados a 4 °C.

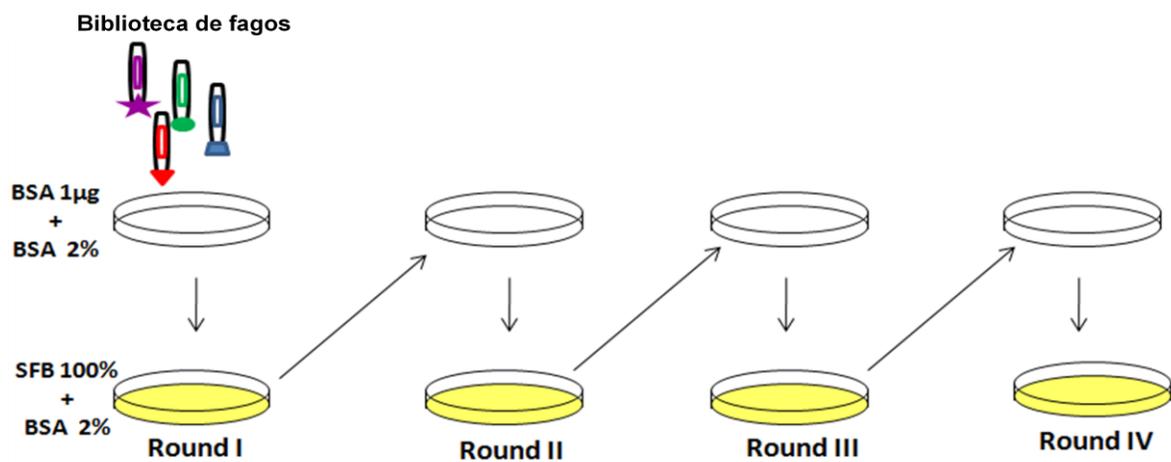


Figura 8. Esquema da pré-adsorção da BBT5. A BBT5 foi incubada em BSA, os fagos não ligados foram incubados em SFB, os fagos não ligados a SFB foram incubados novamente em BSA e assim sucessivamente até o round IV. Os fagos não foram amplificados neste procedimento.

3.6.3. Panning contra células de mamíferos

As células BALBc/3T3 clone A31 (fibroblasto de embrião de *Mus musculus*) e Vero (epitelial renal de *Cercopithecus aethiops*) foram usadas no procedimento de *panning*. A célula Vero foi escolhida para uso no procedimento de *panning* devido ao rim ser o principal órgão alvo para a *Leptospira* e a célula A31 foi utilizada como um controle para verificar o que liga especificamente à célula epitelial renal, além de ser um alvo importante para *panning*, pois já foi

verificado que *Leptospira* tem capacidade de se ligar à fibroblasto. As células foram mantidas em meio DMEM (Sigma, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 5mM de L-glutamina (Gibco), 100 µg/mL de ampicilina e estreptomicina e mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂.

Para o procedimento de *panning*, a densidade de 4×10^5 células em meio DMEM foi aderida à placa de cultura de 24 poços e mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂ durante a noite. A seguir, o meio foi retirado, as células lavadas três vezes com PBS e então gentilmente fixadas com uma solução de formaldeído 1 % preparada em PBS por 10 minutos a 37 °C. Após uma lavagem com PBS contendo 0,2 M de lisina para neutralizar o formaldeído remanescente, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e bloqueadas com BSA 2 % por uma hora a temperatura ambiente, lavadas com PBS quatro vezes para retirar o excesso da solução de bloqueio e então incubadas por uma hora com 100 µL da BBT5 BSA⁻ SFB⁻ na presença de tampão de ligação (PBS contendo 10 % de SFB). Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 5 % de SFB), três vezes com PBS-T e duas vezes com PBS para remoção dos fagos não ligados. Os fagos ligados às células foram eluídos com tampão glicina 0,1 M, pH 2,1 por 10 minutos a temperatura ambiente e a suspensão foi neutralizada com tampão Tris 1 M pH 8,0 (Clackson and Lowman, 2004; Watters et al., 1997; Williams et al., 2002b).

A seguir, o volume total de fagos eluídos infectou *E. coli* linhagem TG1 por 15 minutos a temperatura ambiente, o volume da infecção foi completado para 10 mL com 2YT e 100 µL deste foi retirado para determinação do título. Ampicilina (40 µg/mL) foi acrescida e a cultura incubada a 37 °C por uma hora a 250 rpm, após este intervalo, mais ampicilina (para a concentração final de 100 µg/mL) foi adicionada e a incubação seguiu as mesmas condições.

Para a amplificação dos fagos recuperados, um mL do fago auxiliar M13K07 (título de $7,0 \times 10^9$ fagos/mL) foi adicionado, o volume foi completado para 50 mL com meio 2YT acrescido de ampicilina (para a concentração final de $100 \mu\text{g/mL}$). Após a incubação, sob as mesmas condições anteriores, o antibiótico canamicina ($50 \mu\text{g/mL}$) foi adicionado e a cultura incubada a 37°C , durante a noite, sob agitação de 250 rpm. No dia posterior, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a $12860 g$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante da cultura, contendo o amplificado do primeiro ciclo, foi estocado a 4°C para ser usado no próximo ciclo de seleção. Sob as mesmas condições descritas anteriormente, foram realizados quatro ciclos de *panning* (Figura 9). A cada ciclo de *panning*, amostras de fagomídeos foram extraídas e sequenciadas (Mullen et al., 2007; Watters et al., 1997).

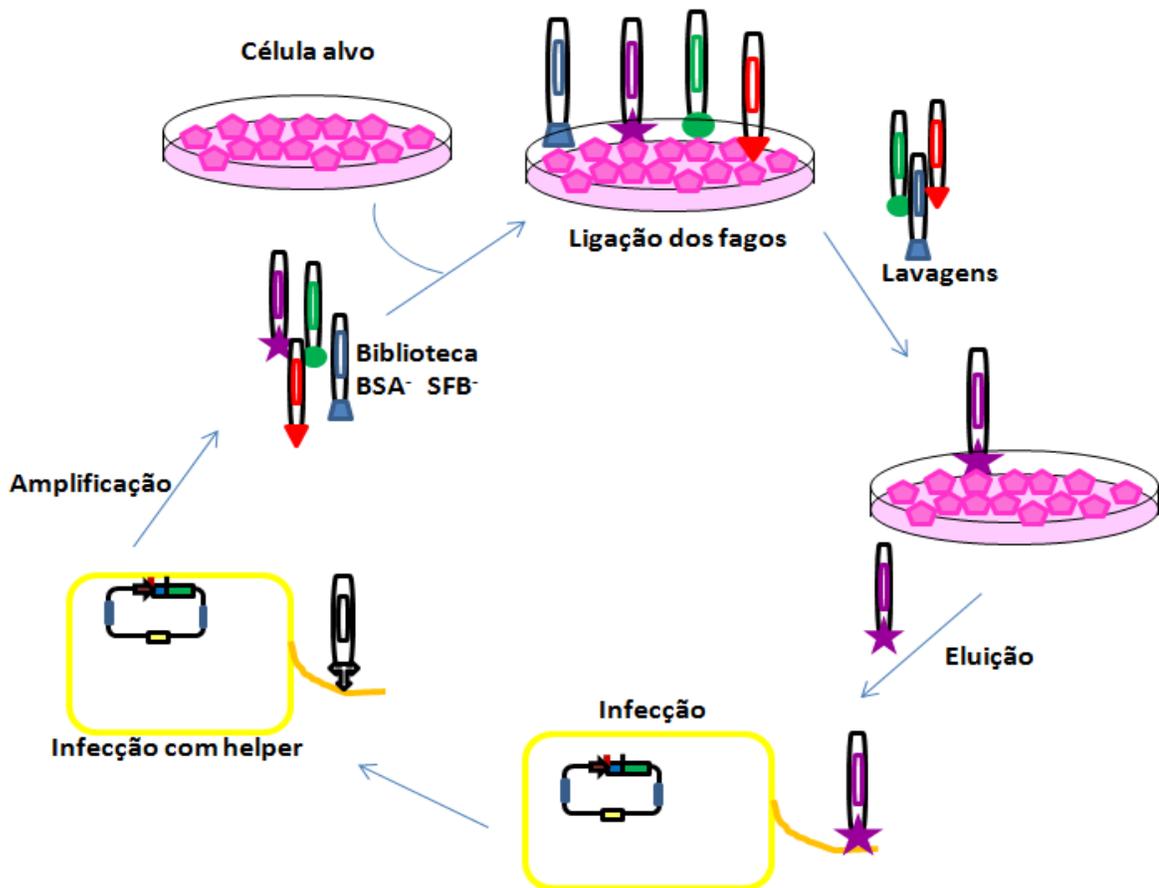


Figura 9. Esquema do procedimento de *panning* em células de mamíferos A31 e Vero.

3.6.4. Novo procedimento de *panning* contra células de mamíferos: Metodologia BRASIL

A metodologia BRASIL, desenvolvida por Giordano e colaboradores (2001), foi utilizada com modificações. A célula LLC-PK1 (célula epitelial do túbulo proximal de rim de porco- *Sus scrofa*) foi escolhida para uso no procedimento de *panning* devido ao rim ser o principal órgão alvo para a *Leptospira*. Células LLC-PK1 foram coletadas com solução de cinco mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, Sigma, USA), preparada em tampão PBS pH 7,4, centrifugadas a 289 g por cinco minutos, lavadas uma vez em meio DMEM e após nova centrifugação sob as mesmas condições, o sedimento celular, 1×10^6 células, foi ressuscitado com 100 μ L da suspensão de fagos da biblioteca BBT5 em meio DMEM contendo BSA 1 %. Após incubação por quatro horas no gelo, toda a suspensão de células-fagos foi transferida para tubos do tipo Eppendorf de 500 μ L contendo 200 μ L da fase orgânica, dibutil-ftalato:ciclohexano (9/1 V/V). Os tubos foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e a região inferior do tubo contendo o sedimento (constituído de fagos ligados às células) foi cortada com auxílio de tesoura.

Foram utilizadas duas estratégias de eluição: eluição por infecção e eluição por diminuição de pH. Na primeira os fagos ligados a LLC-PK1 foram misturados a suspensão de 200 μ L de *E. coli*, incubados por 30 minutos a 37 °C e a seguir, o volume de 10 μ L da infecção foi utilizada para titulação. Na segunda estratégia, os fagos foram eluídos com a utilização de 20 μ L de glicina pH 2,1 por 10 minutos e neutralizada com 10 μ L de tampão Tris 1 M pH 8,0; o volume foi completado para 110 μ L com DMEM contendo BSA 1 % e então centrifugados para retirar restos celulares (este procedimento foi denominado de eluição I). O sobrenadante contendo fagos sem amplificação foi guardado a 4 °C para posterior incubação com células LLC-PK1

novamente (procedimento denominado de eluição II). O volume de 10 μ L de ambos os ciclos de seleção sem amplificação foram utilizados para titulação dos fagos recuperados (Figura 10).

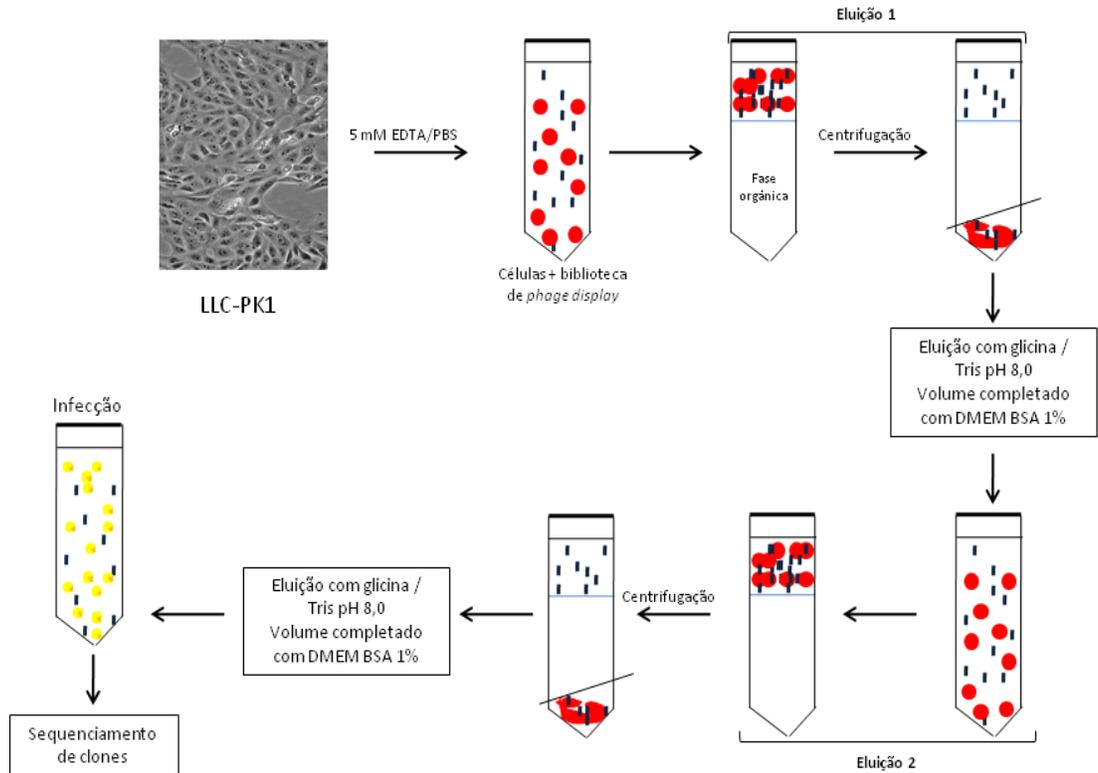


Figura 10. Esquema da adaptação da metodologia BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*).

3.7. Sequenciamento, análise dos fagos recuperados e seleção de candidatos por técnicas de bioinformática

Após os procedimentos de *panning*, alguns clones recuperados foram escolhidos aleatoriamente e tiveram o DNA extraído por lise alcalina (Sambrook and Russell, 2001) e a sequência do inserto determinada pelo método de Sanger, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer), com o kit BigDye terminator (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram editadas pelo software Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, USA), seguida por identificação da sequência no GenBank com o

programa BLAST client, ou blastcl3, que interage diretamente com o NCBI BLAST usando o comando para busca com software online BLAST-X (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), que permite realizar a pesquisa com sequências múltiplas.

Os produtos foram anotados e separados de acordo com a orientação de clonagem. Somente aqueles que apresentaram orientação correta foram verificados quanto a fusão com a proteína pIII codificada pelo vetor pG3DSS, além de terem suas sequências analisadas por softwares específicos. A topologia de proteínas transmembrana foi predita através do programa TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). O programa PSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>) foi utilizado para avaliar a localização celular especificamente de proteínas bacterianas e SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para a predição de peptídeo sinal. A busca por domínios conservados que poderiam evidenciar a função protéica foi realizada pelo Pfam 24.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). E por último, o programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) foi usado como ferramenta para identificação e anotação de arquitetura de domínios, identificar regiões de composição tendenciosa como peptídeo sinal e região transmembrana (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). A página da WEB do projeto genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>) também foi consultada.

3.8. Amplificação dos genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 em diferentes sorovares

Os genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 3) e o DNA genômico de sorovares Copenhageni, Autumnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae,

Pomona, Pyrogenes da espécie *L. interrogans* e o sorovar Patoc da espécie *L. biflexa* como molde.

As reações de amplificação continham um volume final de 50 μ L com 20 ng do DNA molde; 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) e tampão apropriado para o funcionamento da enzima de acordo com a recomendação do fabricante. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar a desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de desnaturação a 94 °C por 30 segundos. A temperatura e o tempo de anelamento dos oligonucleotídeos variaram de acordo com o gene (LIC10768 e LIC10769, 56 °C por 1 minuto; LIC12976 e LIC13418, 55 °C por 30 segundos). Da mesma forma, o tempo de polimerização variou de 2 minutos e 30 segundos a 3 minutos a 72 °C de acordo com o tamanho do gene. Foram realizados 40 ciclos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Reações controle (branco) sem DNA foram realizadas.

3.8.1. Reação de amplificação e adenilação do gene LIC12976

A reação de amplificação continha um volume final de 50 μ L com 50 ng do DNA molde; 25 pmoles de cada oligonucleotídeo, 200 mM de cada dNTP e 1 μ L de *Pfu* DNA polimerase e tampão apropriado para o funcionamento da enzima acrescido de 50 mM de $MgCl_2$. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar a desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 5 minutos, e uma extensão final de 72 °C por 6 minutos. Uma reação controle (branco) sem DNA foi realizada.

Após migração em gel, o fragmento amplificado foi purificado do gel utilizando o kit GFX Gel Band Purification (GE HealthCare®), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA amplificado foi submetido à reação de adenilação em termociclador por 30 minutos a 72 °C: Para cada reação de 50 µL, foram utilizados 40 µL do DNA purificado, 1X de tampão da *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 50 mM de MgCl₂, 20 mM de dATP, 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e H₂O.

O produto da reação de adenilação foi submetido à precipitação por 30 minutos a -20 °C com 300 mM de acetato de sódio pH 5,2 e um volume de isopropanol 100 % gelado. Após incubação, a reação foi centrifugada a 4 °C por 30 minutos a 16000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado por 15 minutos sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi novamente descartado, o sedimento seco a temperatura ambiente e ressuspenso em cinco µL de água ultra pura.

3.8.2. Reação de amplificação do gene LIC13418

A reação de amplificação continha um volume final de 50 µL com 40 ng do DNA molde; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 unidade de Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) e tampão apropriado para o funcionamento da enzima de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado para realizar a desnaturação inicial a 94 °C por cinco

Tabela 3. Oligonucleotídeos (senso, F e antisense, R) utilizados na amplificação dos genes LIC12976, LIC10768, LIC10769, LIC13418.

Oligonucleotídeos	Sequências
LIC12976F	5'-TAGGCTCGAGGAACGTCATTCTCTTC- 3' <i>XhoI</i>
LIC12976R	5'- ACCAAGCTTCTAAAAACGTTCCGAATT- 3' <i>HindIII</i>
LIC10768F	5'- GCGGATCCATGACCAGAACCTTTCAAATGGAAAAC - 3' <i>BamHI</i>
LIC10768R	5'- GATCTCGAGCTAGATATCGTGATGGTGATGGTGATGGATATCGTTACCTGCTCCTTTTGCGGG - 3' <i>XhoI</i> <i>EcoRV</i> <i>EcoRV</i>
LIC10769F	5'- GCGGATCCATGCCCGGAGATTTTGTAAGAC - 3' <i>BamHI</i>
LIC10769R	5'-GTACTCGAGCTAGATATCGTGATGGTGATGGTGATGGATATCAGGAATCCTTTCTTCTGGCG - 3' <i>XhoI</i> <i>EcoRV</i> <i>EcoRV</i>
LIC13418F	5'-CCGCTCGAGTTGAATGAAGTTGTTTTAGAC- 3' <i>XhoI</i>
LIC13418R	5'- CCCAAGCTTTTAAAGTGCAGCGTTCAAC- 3' <i>HindIII</i>

minutos, seguida de desnaturação a 94 °C por 30 segundos. A temperatura e o tempo de anelamento dos oligonucleotídeos foram 55 °C por 30 segundos. O tempo de polimerização foi de 2 minutos e 30 segundos a 72 °C. Foram realizados 35 ciclos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Reações controle (branco) sem DNA foram realizadas.

Após migração em gel, o fragmento amplificado foi purificado do gel utilizando o kit GFX Gel Band Purification (GE HealthCare®), de acordo com as instruções do fabricante.

3.8.3. Migração eletroforética

Os produtos das ampliações foram analisados por migração eletroforética em gel de agarose 1 %, contendo brometo de etídeo (0,5 g/L) em tampão TAE 1X, visualizados por exposição à luz UV e digitalizados utilizando o sistema de fotodocumentação. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, amostra de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizada como marcador de tamanho molecular.

3.9. Clonagem dos genes

3.9.1. Clonagem em pGEM[®]-T easy vector e transformação em *E. coli* DH5 α

Os fragmentos amplificados e adenilados dos genes LIC12976 e LIC13418 foram clonados no vetor pGEM[®]-T easy vector (Figura 11) utilizando o pGEM[®]-T easy vector system (Promega). A reação de ligação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e incubada a 16 °C *overnight*.

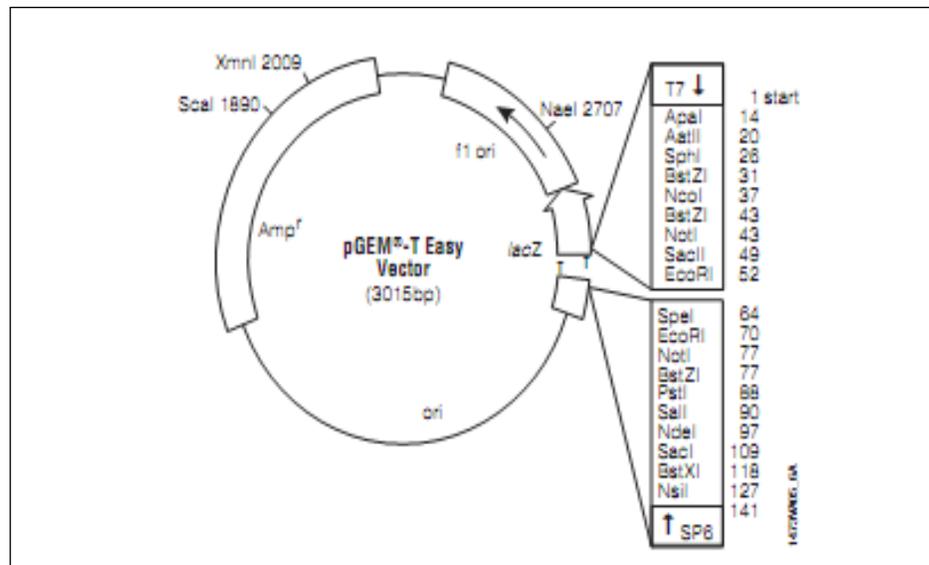


Figura 11. Mapa do plasmídeo pGEM[®]-T easy vector (Promega) utilizado para clonagens.

A reação de ligação foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α preparadas segundo protocolo estabelecido por Sambrook e Russel (2001). O volume de 50 μ L de bactérias quimiocompetentes foi incubado com 5 μ L da reação de ligação por 30 minutos em gelo, a mistura foi submetida a choque térmico a temperatura de 42 °C por 2 minutos e imediatamente incubada em gelo por 5 minutos. As bactérias foram recuperadas por 1 hora a 37 °C, após adição de 350 μ l de LB. Células transformantes foram selecionadas em meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina.

Transformantes tiveram seu DNA plasmideal purificado e submetido à sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, usando oligonucleotídeos específicos, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer), com o kit BigDye terminator (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.2. Clonagem em vetor de expressão pAE

Os clones positivos pGEM + LIC12976 e pGEM + LIC13418 foram digeridos, com as enzimas de restrição *Xho*I e *Hind*III (Fermentas), de acordo com instruções do fabricante. As mesmas enzimas de restrição também foram utilizadas para a digestão do vetor de expressão pAE (Ramos et al., 2004) (Figura 12), que permite a expressão da proteína recombinante com cauda de 6X His na extremidade N-terminal.

Os produtos das digestões com as endonucleases foram submetidos à migração eletroforética em gel de agarose 1 % e as bandas relativas aos insertos liberados e ao vetor linearizado foram purificadas do gel utilizando o kit GFX Gel Band Purification (GE HealthCare®), de acordo com as instruções do fabricante.

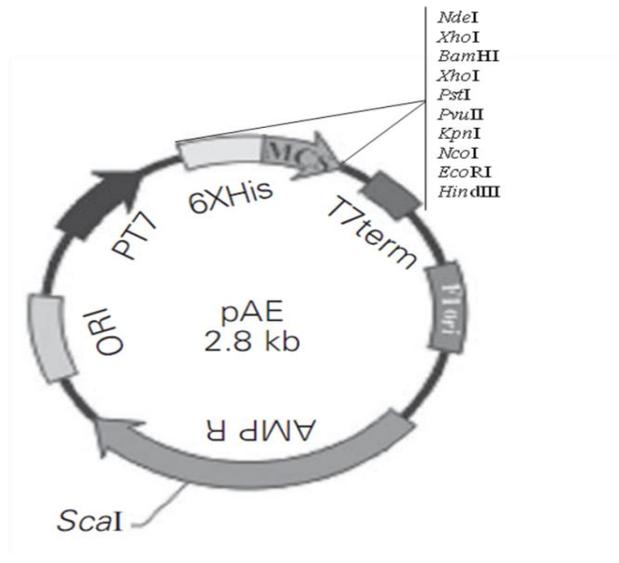


Figura 12. Mapa do vetor pAE utilizado para a expressão de proteínas heterólogas.

A reação de ligação dos insertos com pAE (Ramos et al. 2004), previamente digeridos, foi realizada com a T4 DNA ligase (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante e incubada *overnight* a 16 °C.

A reação de ligação foi utilizada para transformação de *E. coli* DH5 α e transformantes foram analisados como descrito no item 3.9.1.

3.10. Expressão das proteínas recombinantes em linhagens de *E. coli*

As construções plasmideais pAE+LIC12976 e pAE+LIC13418, clones positivos, foram utilizadas para transformar, como descrito no item 3.9.1. linhagens de *E. coli* usadas para a expressão de proteínas recombinantes (Tabela 4).

Transformantes de cada linhagem bacteriana foram selecionados aleatoriamente e crescidos em meio contendo antibiótico apropriado *overnight* (Tabela 4). Alíquotas destes inóculos foram estocadas a - 80 °C após adição de glicerol para a concentração final de 25 %.

Para verificar a expressão das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418 em pequena escala, 3 % das culturas das linhagens recombinantes crescidas *overnight* foram inoculadas em meio novo e incubadas como descrito na Tabela 4 até atingirem a DO_{600} 0,8. Alíquotas das culturas não induzidas foram reservadas. A indução foi realizada com um mM de IPTG para as linhagens C43 (DE3), BL21 (DE3), BL21 Star (DE3)-pLysS e Origami e com 300 mM de NaCl para a linhagem BL21 SI. As alíquotas induzidas e não induzidas foram centrifugadas a 12860 g, os sedimentos foram ressuspensos em tampão de amostra contendo SDS e β -mercaptoetanol para eletroforese de proteínas, as células foram lisadas com auxílio de uma seringa e então as proteínas desnaturadas a 95 °C por 10 minutos para obtenção do extrato protéico total. A presença das proteínas recombinantes foi verificada por SDS-PAGE 12 %.

O extrato total de proteínas também foi obtido das linhagens de *E. coli* C43 (DE3), BL21 (DE3), BL21 Star (DE3)-pLysS e Origami não transformadas para controle negativo.

Tabela 4. Linhagens de *E. coli* usadas durante a expressão de proteínas heterólogas

Linhagem	Meio de cultivo	Resistência a antibiótico	Temperatura de cultivo	Indução	Empresa
C43 (DE3)	LB	-	37 °C	IPTG 1 mM	Lucigen
BL21(DE3)	LB	-	37 °C	IPTG 1 mM	Invitrogen
BL21 Star (DE3)-pLysS	LB	Clorafenicol (34 μ g/mL)	37 °C	IPTG 1 mM	Invitrogen
BL21 SI	LBON*	-	30 °C	NaCl 300 mM	Gibco
Origami	LB	Canamicina (15 μ g/mL) Tetraciclina (12,5 μ g/mL)	37 °C	IPTG 1 mM	Novagen

* LBON: meio LB sem a adição de NaCl, pois este é o indutor da expressão da T7 RNA polimerase que está sob o controle da sequência promotora do gene *proU* na linhagem BL21 SI.

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside.

E. coli BL21 Star-pLysS contendo a construção pAE + LIC12976 foi inoculada em meio líquido LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de clorafenicol e incubada a 37 °C *overnight*. Os 3 % deste pré-inóculo foram inoculados em 1 litro de LB contendo ampicilina e clorafenicol nas mesmas concentrações anteriores e incubados a 37 °C sob agitação de 230 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,8. Um mL da cultura foi retirado antes da indução com um mM de IPTG e então a cultura foi incubada a 20 °C *overnight* sob as mesmas condições de agitação.

E. coli BL21 SI contendo a construção pAE + LIC13418 foi inoculada em meio líquido LBon acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 30 °C *overnight*. Os 3 % deste pré-inóculo foram inoculados em 1 litro de LBon contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 30 °C sob agitação de 230 rpm até atingir a DO₆₀₀ de 0,6. A cultura foi induzida por 3 horas sob as mesmas condições de incubação após adição de 300 mM de NaCl.

As culturas bacterianas foram centrifugadas por 15 minutos a 12860 g, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 100 mL de tampão PBS, agitados vigorosamente até a homogeneização e congelados a -80 °C.

As bactérias foram lisadas por pressão no French Pressure[®] e centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 12860 g. Para a determinação da localização da proteína, as frações solúvel e insolúvel (corpúsculos de inclusão) após a solubilização em tampão de amostra foram checados em gel de SDS-PAGE 12 %.

Os corpúsculos foram solubilizados em solução com uréia 8 M e diluídos lentamente em 2 litros de tampão PBS sob agitação para renaturação. A seguir, a solução foi adsorvida em coluna cromatográfica. A coluna cromatográfica contendo sefarose quelante foi previamente carregada com uma solução 300 mM NiSO₄, lavada e equilibrada com PBS. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, a amostra foi injetada à coluna com fluxo contínuo de 1,0 mL/min. As lavagens foram realizadas com três volumes das soluções contendo 5, 20, 40, 60, 100, 200, 400 e 1000

mM de imidazol preparado em tampão PBS. A presença da proteína recombinante foi observada após migração em SDS-PAGE 12 %. As frações eluídas foram dialisadas em tampão PBS e as proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418 foram quantificadas por Bradford (Bio-Rad Protein Assay) de acordo com as recomendações do fabricante.

A sequência codificando a região C-terminal da LigA (resíduos 631-1225) foi clonada em vetor pAE como descrito previamente (Castiblanco-Valencia et al., 2012). Expressão e purificação da proteína recombinante com o tag de 6xHis na extremidade N-terminal foram feitas seguindo o protocolo descrito por Barbosa e colaboradores (2010).

3.11. Obtenção de soro policlonal contra as proteínas recombinantes purificadas LIC12976 e LIC13418 e titulação por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Um grupo de cinco camundongos BALB/c fêmeas foi imunizado pela via intraperitoneal com 500 µL de solução contendo 10 µg de cada proteína recombinante e 100 µg de hidróxido de alumínio (adjuvante) diluídos em salina estéril. Foram realizadas quatro imunizações com intervalo de uma semana entre cada uma delas. A sangria dos animais foi realizada uma vez por semana pelo plexo retroorbital a partir do 21º dia (uma semana após a terceira imunização) até o 60º dia. O soro policlonal do *pool* de cinco animais foi obtido após incubação do sangue a 37 °C por 30 minutos e 4 °C por 10 minutos para a retenção do coágulo. A seguir, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 400 g e o soro armazenado a -20 °C (Figura 13).

Para a titulação dos soros, os poços da placa de microtítulo (Maxisorp-NUNC®) foram revestidos com 1 µg/mL de cada proteína recombinante em 0,05 M de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (100 µL) e incubados a 4 °C *overnight*. A placa foi lavada três vezes com

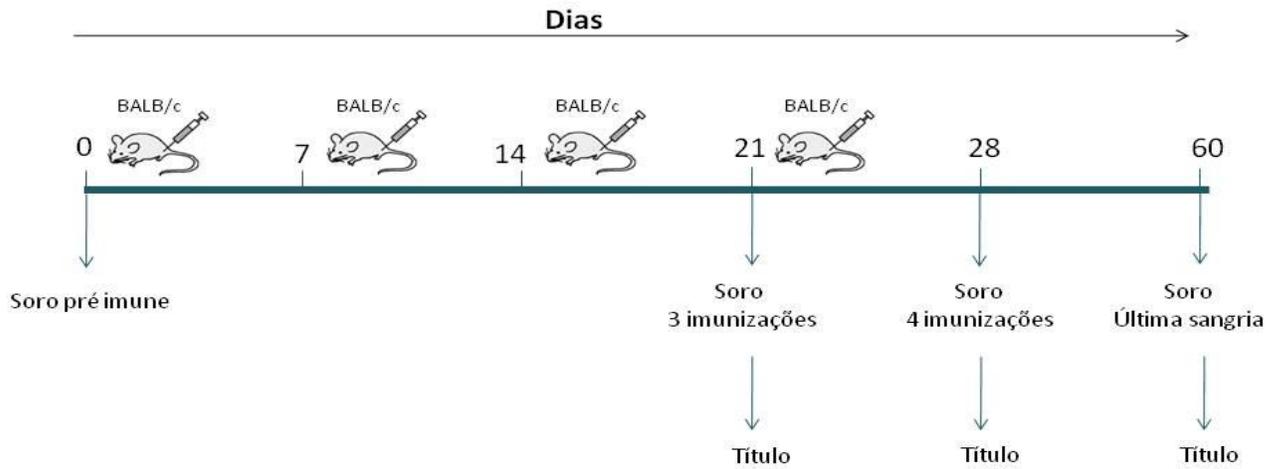


Figura 13. Esquema do regime de imunização em camundongos BALB/c para obtenção de soro policlonal.

tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,05 % de Tween 20 (PBST) e então bloqueada com 100 μ L de leite desnatado Molico[®] 10 % preparado em PBST por 1 hora a 37 °C; logo após, os poços foram lavados três vezes com PBST. Foi realizada a diluição seriada dos soros obtidos em tampão PBST acrescido de BSA 1 %; na primeira diluição um μ L de cada soro foi acrescentado a 999 μ L de tampão (diluição 1:1000) e 200 μ L foram adicionados ao primeiro poço. Para proceder a diluição seriada, 100 μ L da primeira diluição foram adicionados ao segundo poço que continha previamente 100 μ L do tampão, o volume do poço foi homogeneizado e então 100 μ L foram adicionados ao terceiro poço contendo 100 μ L do tampão para preparo da diluição 1:4000, e assim sucessivamente até a diluição de 1:1024000. A placa foi incubada a 37 °C por 1 hora e posteriormente lavada três vezes com PBST. O volume de 100 μ L do anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição 1:20000 preparada em PBST acrescido de BSA 1 % foi adicionado aos poços e a placa incubada a 37 °C por uma hora. Após três lavagens com PBST, a placa foi revelada com adição de 100 μ L da solução contendo 10 mg de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) preparado em 20 mL de tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0

contendo 10 μL de H_2O_2 30 %; a reação foi interrompida com uso de 50 μL de H_2SO_4 4 M e absorvância foi mensurada no comprimento de onda de 492 nm.

O soro pré-imune (controle) foi obtido antes das imunizações com as proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418. Uma semana após a terceira imunização foi obtido o soro “3 imunizações” e uma semana após a quarta e última imunização foi obtido o soro “4 imunizações”. Estes animais foram sangrados semanalmente até 1 mês após a última imunização e o último soro obtido foi denominado de “última sangria” (Figura 14 e 15).

A LIC12976 mostrou-se imunogênica sendo capaz de gerar uma resposta imune intensa em camundongos, pois com apenas três doses obteve-se um título de 1:32000. Ao aplicar a quarta dose da proteína recombinante observa-se que houve um aumento no título do soro para 1:256000 que se manteve 4 semanas após a última imunização.

A LIC13418 também mostrou-se imunogênica sendo capaz de gerar uma resposta imune intensa em camundongos, com apenas três doses obteve-se um título de 1:512000 que se manteve 4 semanas após a última imunização.

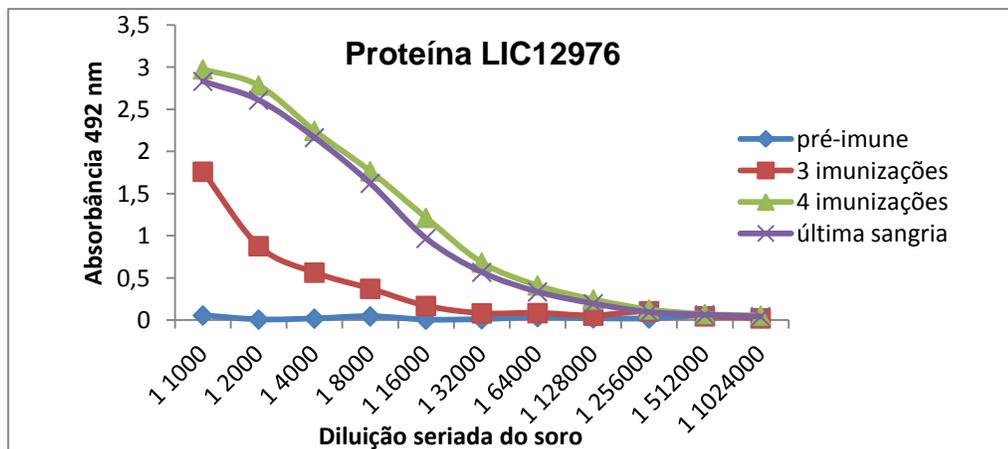


Figura 14. Titulação dos soros obtidos contra proteína LIC12976 por meio do ELISA. O soro “pré-imune” foi obtido anterior as imunizações, o soro “3 imunizações” foi obtido uma semana após a terceira imunização, o soro “4 imunizações” foi obtido uma semana após a quarta imunização e o soro “última sangria” foi obtido 4 semanas após a última imunização.

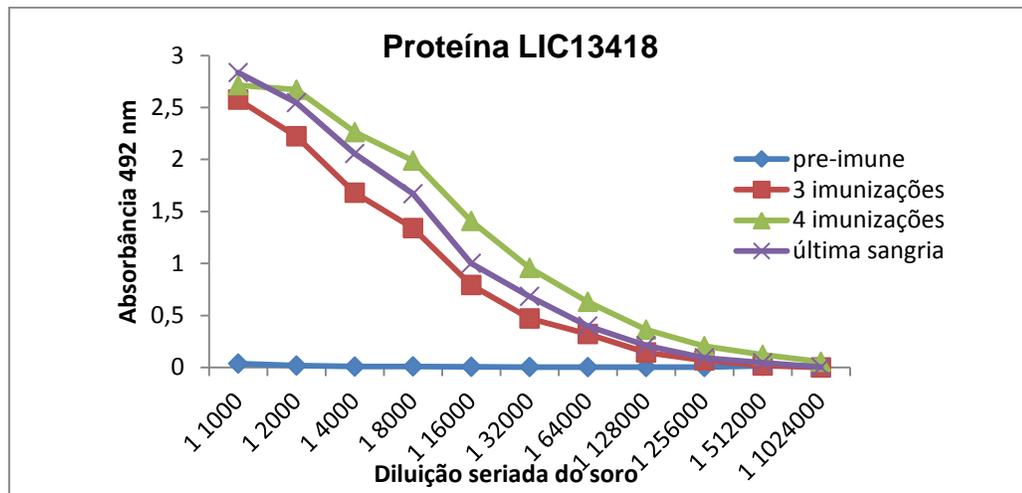


Figura 15. Titulação dos soros obtidos contra proteína LIC13418 por meio do ELISA. O soro pré-imune foi obtido anterior as imunizações, o soro “3 imunizações” foi obtido uma semana após a terceira imunização, o soro “4 imunizações” foi obtido uma semana após a quarta imunização e o soro “última sangria” foi obtido 4 semanas após a última imunização.

3.12. Ensaio de ligação das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418: células, ECM e proteínas plasmáticas

As células A31 (fibroblasto de camundongo BALB/c-3T3 clone A31 - *Mus musculus*), Vero (epitelial renal de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) e LLC-PK1 (epitelial renal de porco - *Sus scrofa*) na densidade de 1×10^5 células em meio DMEM acrescido de soro fetal bovino 10 % foram aderidas à placa de cultura de 96 poços e mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂ por 4 horas. A seguir, o meio foi retirado, as células lavadas três vezes com PBS e fixadas com uma solução de formaldeído 1 % preparada em PBS por 10 minutos a 37 °C e lavadas com PBS. O bloqueio da placa de cultura foi realizado com 200 µL de BSA 1 % preparado em PBST e incubado a 37 °C por 1 hora e a seguir, *overnight* a 4 °C. Os procedimentos seguintes foram iguais para as placas revestidas com proteínas.

Os poços da placa de 96 poços (Maxisorp-NUNC®) foram revestidos com um µg de proteínas plasmáticas e componentes da matriz extracelular diluídas em 100 µL de PBS,

incubados na geladeira *overnight* e lavados três vezes com PBST (Tween 0,1%). Os componentes de matriz extracelular laminina e fibronectina celular e as proteínas plasmáticas fibrinogênio, fibronectina plasmática e soroalbumina bovina (BSA), além do gangliosídeo GM1 foram usados.

O bloqueio da placa de ELISA foi realizado com 200 μL de BSA 10 % preparado em PBST e incubado a 37 °C por 1 hora e a seguir, *overnight* a 4 °C. Após três lavagens com PBST, um μg de cada proteína recombinante diluída em PBS foi adicionado a cada poço e incubada por 1 hora e 30 minutos a 37 °C e os poços foram lavados por seis vezes com PBST. A detecção da proteína recombinante aderida a cada poço foi realizada pela incubação com anti-soro policlonal na diluição 1:5000 por 1 hora a 37 °C, seguida de três lavagens com PBST e nova incubação com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição 1:10000. Após três lavagens com PBST, a placa foi revelada com adição de 100 μL da solução contendo 10 mg de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) preparado em 20 mL de tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0 contendo 10 μL de H_2O_2 30 %; a reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 4 M e a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 492 nm.

3.13. Ensaio de interferência com laminina

As células A31, Vero e LLC-PK1 na densidade de 5×10^4 células em meio DMEM acrescido de soro fetal bovino 10 % foram aderidas à placa de cultura de 96 poços e mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO_2 *overnight*. A seguir, o meio foi retirado, as células lavadas três vezes com PBS e fixadas com uma solução de formaldeído 1 % preparada em PBS por 10 minutos a 37 °C e lavadas com PBS. O bloqueio da placa de cultura foi realizado com 200 μL de BSA 10 % preparado em PBST e incubado a 37 °C por 1 hora e a seguir, *overnight* a 4 °C.

Após três lavagens com PBST, um μg de cada proteína recombinante diluída em PBS foi incubada com quantidades crescentes de laminina (0; 0,5; 1; 5 μg) por 1 hora e 30 minutos a 37

°C e em seguida incubadas nos poços contendo células pelo mesmo tempo. Os poços foram lavados por seis vezes com PBST e a detecção da proteína recombinante ou da laminina aderida a cada poço foi realizada pela incubação com anti-soro policlonal e anti-laminina na diluição 1:5000 por 1 hora a 37 °C, seguida de três lavagens com PBST e nova incubação com anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho, respectivamente, conjugado a peroxidase na diluição 1:10000. Após três lavagens com PBST, a placa foi revelada com adição de 100 µL da solução contendo 10 mg de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) preparado em 20 mL de tampão citrato-fosfato 0,2 M, pH 5,0 contendo 10 µL de H₂O₂ 30 %; a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 4 M e a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 492 nm.

3.14. Western Blot

As proteínas recombinantes LIC12976, LIC13418, LigA, LipL32, TlyC, LIC11319, LIC13435 e os extratos de *L. biflexa* sorovar Patoc e *L. interrogans* sorovares Copenhageni, Australis, Bratislava, Canicola, Pyrogenes e Hardjo foram submetidos à migração em SDS-PAGE 12 % e transferidos para membrana de nitrocelulose a amperagem constante de 350 mA por 1 hora e 30 minutos com auxílio do sistema de transferência úmido (Biorad Biosystems). As membranas foram bloqueadas a 4 °C *overnight* com 10 % de leite desnatado Molico[®] preparado em PBST e então incubadas com a diluição 1:10000 do anti-soro policlonal em BSA 2 % (acrescido de extrato de *E. coli* sem o vetor) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após três a cinco lavagens a temperatura ambiente com PBST por 10 minutos, a membrana foi incubada com a diluição 1:10000 em BSA 2 % de anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação e lavada como descrito previamente, posteriormente revelada com reagente ECL plus (GE Healthcare).

3.15. Ensaio de desafio animal

Um grupo de 10 hamsters machos (Golden Syrian) com quatro semanas de idade foi imunizado duas vezes em intervalos de duas semanas com injeções subcutâneas de PBS, vacina comercial (bacterina) ou 50 µg de proteína recombinante (LigAC, rLIC12976 ou rLIC13418) usando hidróxido de alumínio (Alhydrogel) como adjuvante (500 µg de íon alumínio). Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados intraperitonealmente com 2×10^5 leptospiras correspondendo a 1000 vezes a LD50 (50 % da dose letal) (Reed and Muench, 1938). Os hamsters que sobreviveram foram eutanaziados 21 dias após o desafio e amostras dos rins foram coletadas, o tecido homogeneizado gentilmente e duas diluições seriadas de 10 vezes foram inoculadas em meio semi-sólido. Para verificar a presença de bactérias, culturas foram examinadas periodicamente usando microscopia de campo escuro por um mês.

3.16. Ensaio de Imunofluorescência: LIC12976

O ensaio de imunofluorescência foi realizado como descrito por Pinne & Haake (Pinne and Haake, 2011) com modificações. Lâminas foram tratadas com poli-D-Lisina (1 mg/mL), a cultura de *Leptospira* foi fixada com paraformaldeído 2 %, adicionada na lâmina e incubada a 30 °C por 80 min. 100 µL do meio de enriquecimento EMJH (Difco) foi usado como tampão de bloqueio para bloquear sítios inespecíficos a 30 °C por 90 minutos.

Diluições dos soros não imune, anti-LipL32 (Hauk et al., 2008) e anti-LIC12976 (1:500) foram incubadas a 30 °C por 1 h. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com a diluição 1:1000 de anticorpo secundário conjugado a FITC e DAPI na concentração de 1 µg/mL, diluídos em tampão de bloqueio e incubados a 30 °C por 45 min. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com água destilada e deixadas secar por 10 min. O meio de montagem “antifade” foi utilizado e a lamínula foi selada com esmalte.

3.17. Microscopia eletrônica

A verificação se a LIC13418 é expressa na superfície de *L. interrogans* assim como a LipL32 foi realizada como descrito por Barbosa e colaboradores (Barbosa et al., 2010) com modificações. Cultura de *Leptospira* foi fixada com paraformaldeído 2 % e 7 µL da suspensão de células foram aplicados na telinha (grade) de níquel previamente recoberta com parlodium/carbono por 5 min a temperatura ambiente. O excesso de líquido foi removido com papel filtro e as telinhas incubadas por 60 min com os soros pré-imune, anti-LipL32 e anti-LIC13418 diluídos 1:100 em PBS 0,02 M pH 8,0 contendo BSA 1,5 % e Tween 20 0,01 %. Após quatro lavagens em solução de PBS pH 7,4 acrescido de BSA 1,5 % e Tween 20 0,01 %, as telinhas foram incubadas com proteína G-ouro de 10 nm (Aurion, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, USA) na mesma solução de PBS por 60 min. As telinhas foram lavadas com PBS 0,02 M pH 7,4 e água destilada. Após secar ao ar, as lâminas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Germany) a 80 kV de voltagem de aceleração. Esse ensaio foi realizado com a ajuda da pesquisadora Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

4. RESULTADOS

4.1. Construção das bibliotecas de phage display, amplificação e titulação das bibliotecas, vetores e fagos auxiliares

Para a construção das bibliotecas, o DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (o sorovar Copenhageni é o mais frequente no país e a linhagem Fiocruz L1-130 foi escolhida, pois o genoma foi sequenciado no Brasil), fragmentado aleatoriamente, com tamanhos variando de 2,3 kb a 565 pb (fragmentos maiores) e de 565 pb a 125 pb (fragmentos menores) foram clonados no sítio *Sna*BI dos vetores pG8SAET e pG3DSS (Figura 6).

O título primário, ou seja, o número de clones obtidos após a transformação está apresentado na Tabela 5. Dez clones de cada biblioteca foram selecionados aleatoriamente e sequenciados. 100 % das sequências da BBT1 e 90 % das BBT2, BBT5 e BBT6 deram identidade com sequências presentes no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130.

Tabela 5. Número de clones obtidos após transformação e título após amplificação das bibliotecas, vetores e fagos auxiliares

		Número de clones (após transformação)	Número de clones (após amplificação)
BBT1	pG8SAET + maiores	$2,5 \times 10^5$ UFC	$7,7 \times 10^8$ fagos/mL
BBT2	pG8SAET + menores	$6,4 \times 10^4$ UFC	$9,6 \times 10^9$ fagos/mL
BBT5	pG3DSS + maiores	$2,8 \times 10^5$ UFC	$2,2 \times 10^9$ fagos/mL
BBT6	pG3DSS + menores	$9,1 \times 10^4$ UFC	$6,27 \times 10^9$ fagos/mL
pG8	pG8SAET	$1,90 \times 10^6$ UFC	$6,0 \times 10^9$ fagos/mL
pG3	pG3DSS	$1,00 \times 10^5$ UFC	$1,2 \times 10^{11}$ fagos/mL
M13K07	Fago auxiliar	-	$7,0 \times 10^9$ fagos/mL
VCSM13	Fago auxiliar	-	$7,7 \times 10^8$ fagos/mL

Os fagos auxiliares, M13K07 e VCSM13, após amplificação apresentaram títulos de $7,0 \times 10^9$ fagos/mL e $7,7 \times 10^8$ fagos/mL, respectivamente. Como o número de partículas virais por mL do M13K07 foi cerca de 10 vezes maior, este foi utilizado para a amplificação das bibliotecas.

As bibliotecas foram amplificadas e usadas para procedimentos de *panning*. Os títulos obtidos variaram de $7,7 \times 10^8$ fagos/mL a $9,6 \times 10^9$ fagos/mL (Tabela 5).

O número de clones obtidos após transformação das bibliotecas variou de $2,8 \times 10^5$ para a BBT5 até $6,4 \times 10^4$ para a BBT2. O menor número de clones requeridos para a cobertura total do genoma pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-a/b)$$

Onde, **N**= número de clones requeridos; **P**= probabilidade de se isolar uma dada sequência específica (99 % de chance de isolar qualquer dada sequência presente em uma única cópia em um genoma); **a**= média dos tamanhos dos fragmentos e **b**= tamanho do genoma (Jacobsson et al., 2003). Além deste cálculo, é necessário lembrar que apenas um clone em 18 está na orientação correta e codifica uma ORF em fase de leitura aberta correta, pois um clone em três começa corretamente, um em três termina corretamente e um em dois clones está na orientação correta (Jacobsson et al., 2003; Mullen et al., 2007; Zacchi et al., 2003).

O genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 consiste de dois cromossomos circulares com tamanho total de 4.627.366 pb, cujo cromossomo I possui 4.277.185 pb e o cromossomo II, 350.181 pb (Nascimento et al., 2004) e considerando que o tamanho médio dos fragmentos maiores são 1500 pb; para cobrir todo o genoma desta bactéria, o valor de mínimo de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) das bibliotecas contendo fragmentos maiores deve ser $2,55 \times 10^5$ clones e para as bibliotecas contendo fragmentos menores são

necessários $1,1 \times 10^6$ clones, uma vez que o tamanho médio dos fragmentos clonados foi de 350 pb. No caso das bibliotecas construídas com fragmentos maiores (BBT1 e BBT5), a cobertura do genoma é de uma vez, mas as BBT2 e BBT6, construídas com os fragmentos menores, o título primário não foi suficiente para que todo o genoma fosse representado. Por este motivo, resolvemos trabalhar primeiramente com a BBT5, que apresentou maior cobertura do genoma.

4.2. *Biopanning*

Para selecionar fagos ligantes a SFB, a biblioteca amplificada BBT5 foi incubada primeiramente em BSA para retirar os fagos que se ligam a esta proteína e posteriormente incubada em SFB. A albumina é a proteína majoritária do SFB e com este procedimento, espera-se selecionar ligantes específicos a proteínas de SFB, excetuando a albumina.

Este procedimento de *panning* foi realizado como controle, para verificar a especificidade dos fagos ligantes nos outros substratos, pois o meio de cultivo de células de mamífero contém SFB. Além disso, esse substrato também pode ser importante na interação com *L. interrogans*.

O número de partículas virais obtidas em cada ciclo de seleção em soro fetal está representado na Tabela 6.

Tabela 6. Número de partículas virais obtidas em cada ciclo de seleção em soro fetal bovino

SFB	Início	Fim	Amplificado
Ciclo I	$2,2 \times 10^8$ PFU	$4,1 \times 10^3$ fagos/mL	$1,1 \times 10^{10}$ fagos/mL
Ciclo II	$1,1 \times 10^9$ PFU	$2,8 \times 10^3$ fagos/mL	$3,0 \times 10^8$ fagos/mL
Ciclo III	$3,0 \times 10^9$ PFU	$1,6 \times 10^4$ fagos/mL	$8,0 \times 10^8$ fagos/mL
Ciclo IV	$8,0 \times 10^7$ PFU	$7,0 \times 10^3$ fagos/mL	$3,0 \times 10^9$ fagos/mL

Anteriormente ao *panning* em células, foi realizada uma etapa de pré-adsorção para subtrair da biblioteca BBT5 fagos que pudessem interagir com BSA ou com SFB, restando assim, aqueles capazes de interagir especificamente com as células.

O número de partículas virais obtidas em cada ciclo de seleção em células A31 e Vero estão representados na Tabela 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Número de partículas virais obtidas em cada ciclo de seleção em células A31

A31	Início	Fim	Amplificado
Ciclo I	2,2 x 10 ⁸ PFU	1,6 x 10 ⁴ fagos/mL	5,1 x 10 ⁹ fagos/mL
Ciclo II	5,1 x 10 ⁸ PFU	1,3 x 10 ⁴ fagos/mL	7,3 x 10 ⁹ fagos/mL
Ciclo III	7,3 x 10 ⁸ PFU	6,4 x 10 ³ fagos/mL	2,3 x 10 ⁸ fagos/mL
Ciclo IV	2,3 x 10 ⁷ PFU	4,0 x 10 ³ fagos/mL	2,8 x 10 ⁹ fagos/mL

Tabela 8. Número de partículas virais obtidas em cada ciclo de seleção em células Vero

Vero	Início	Fim	Amplificado
Ciclo I	2,2 x 10 ⁸ PFU	1,5 x 10 ⁴ fagos/mL	4,5 x 10 ⁹ fagos/mL
Ciclo II	4,5 x 10 ⁸ PFU	1,1 x 10 ⁴ fagos/mL	1,3 x 10 ¹⁰ fagos/mL
Ciclo III	1,3 x 10 ⁹ PFU	2,1 x 10 ³ fagos/mL	2,3 x 10 ⁹ fagos/mL
Ciclo IV	2,3 x 10 ⁸ PFU	4,7 x 10 ³ fagos/mL	5,1 x 10 ⁸ fagos/mL

Para identificar as proteínas codificadas pelos clones selecionados e verificar um enriquecimento em termos de sequência no *panning* em SFB, 159 clones, aleatoriamente escolhidos, foram submetidos ao sequenciamento de DNA, dos quais 24 foram provenientes dos ciclos I e II, 18 do ciclo III e 93 do último. A busca por similaridade foi realizada com o software BLAST-X e as sequências então anotadas.

A análise dos clones do ciclo I demonstrou que 61 % das sequências apresentaram orientação correta, enquanto 30 % dos insertos estavam em orientação incorreta e 9 % tiveram identidade com sequência do vetor vazio (sem inserto). Nos ciclos seguintes de seleção houve um aumento na porcentagem de insertos clonados na orientação incorreta, 42, 61 e 52 % nos ciclos II, III e IV, respectivamente; e uma redução no número de clones na orientação correta, de 61 % no primeiro ciclo para 29 % no último ciclo. No ciclo II, não houve o aparecimento do vetor pG3DSS vazio, mas nos III e IV, este apareceu nas porcentagens de 6 e 19 %, respectivamente (Figura 16).

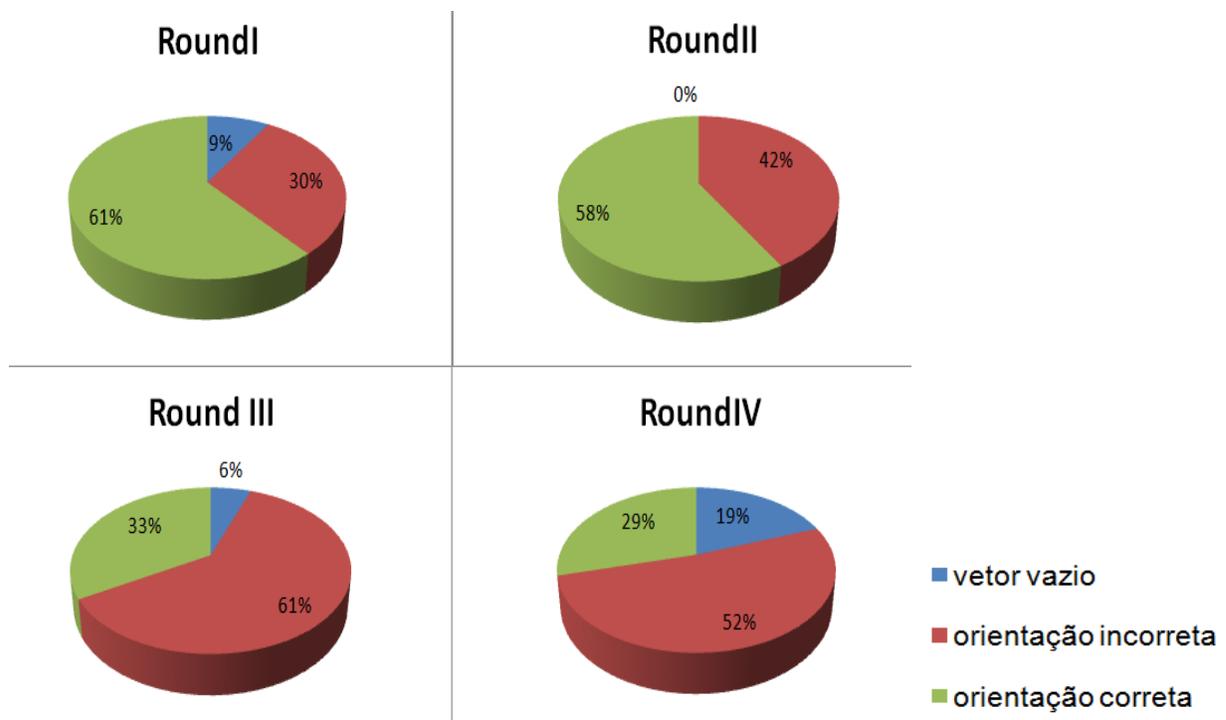


Figura 16. Análise das sequências dos clones eluídos em cada ciclo de *panning* em Soro Fetal Bovino.

Para identificar as proteínas codificadas pelos clones recuperados e verificar um enriquecimento em termos de sequência, 276 clones do experimento de *panning* em células A31,

aleatoriamente escolhidos, foram submetidos ao sequenciamento de DNA, dos quais 24 foram provenientes do ciclo I, 23 do ciclo II, 93 do ciclo III e 136 do último. A busca por similaridade foi realizada com o software BLAST-X e as sequências então anotadas.

A análise dos clones do ciclo I demonstrou que 35 % das sequências apresentaram orientação correta, enquanto 61 % dos insertos estavam em orientação incorreta e 4 % tiveram identidade com sequência do vetor vazio (sem inserto). Nos ciclos seguintes de seleção houve um aumento na porcentagem de insertos clonados na orientação incorreta, 79, 74 e 62 % nos ciclos II, III e IV, respectivamente. O número de clones na orientação correta foi reduzido para 21 %, 18 % e 29 % nos ciclos II, III e IV, respectivamente. No ciclo II, não houve o aparecimento do vetor pG3DSS vazio, mas nos ciclo III e IV, este apareceu nas porcentagens de 8 e 9 %, respectivamente (Figura 17).

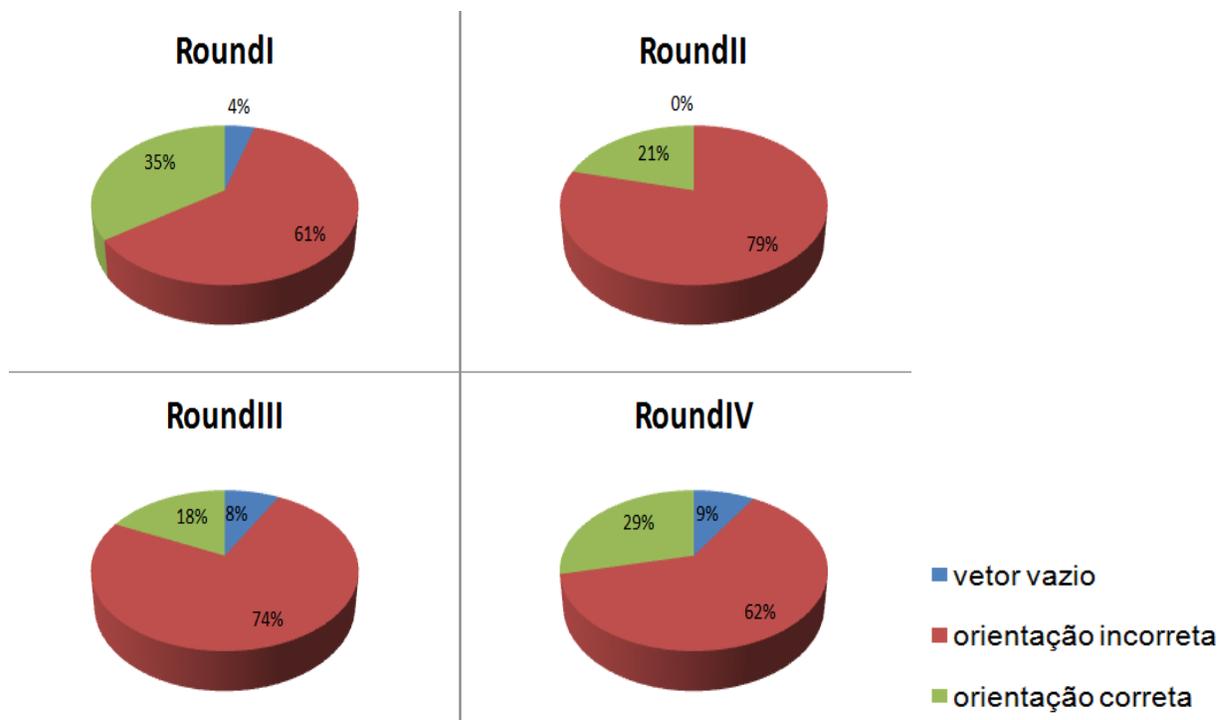


Figura 17. Análise das sequências dos clones eluídos em cada ciclo de *panning* em células A31.

Para identificar as proteínas codificadas pelos clones recuperados após ensaio de seleção e verificar um enriquecimento em termos de sequência, 318 clones do experimento de *panning* em células Vero, aleatoriamente escolhidos, foram submetidos ao sequenciamento de DNA, dos quais 23 foram provenientes dos ciclos I e II, respectivamente; 93 do ciclo III e 179 do último. A busca por similaridade foi realizada com o software BLAST-X e as sequências então anotadas.

A análise dos clones do ciclo I demonstrou que 56 % das sequências apresentaram orientação correta, enquanto 35 % dos insertos estavam em orientação incorreta e 9 % tiveram identidade com sequência do vetor vazio (sem inserto). Nos ciclos seguintes de seleção houve um aumento na porcentagem de insertos clonados na orientação incorreta, 52, 60 e 55 % nos ciclos II, III e IV, respectivamente. O número de clones na orientação correta foi reduzido para 31 %, 29 % e 36 % nos ciclos II, III e IV, respectivamente. No ciclo II, 17 % das sequências eram do vetor pG3DSS vazio, 11 % no ciclo III e 9 % no último (Figura 18).

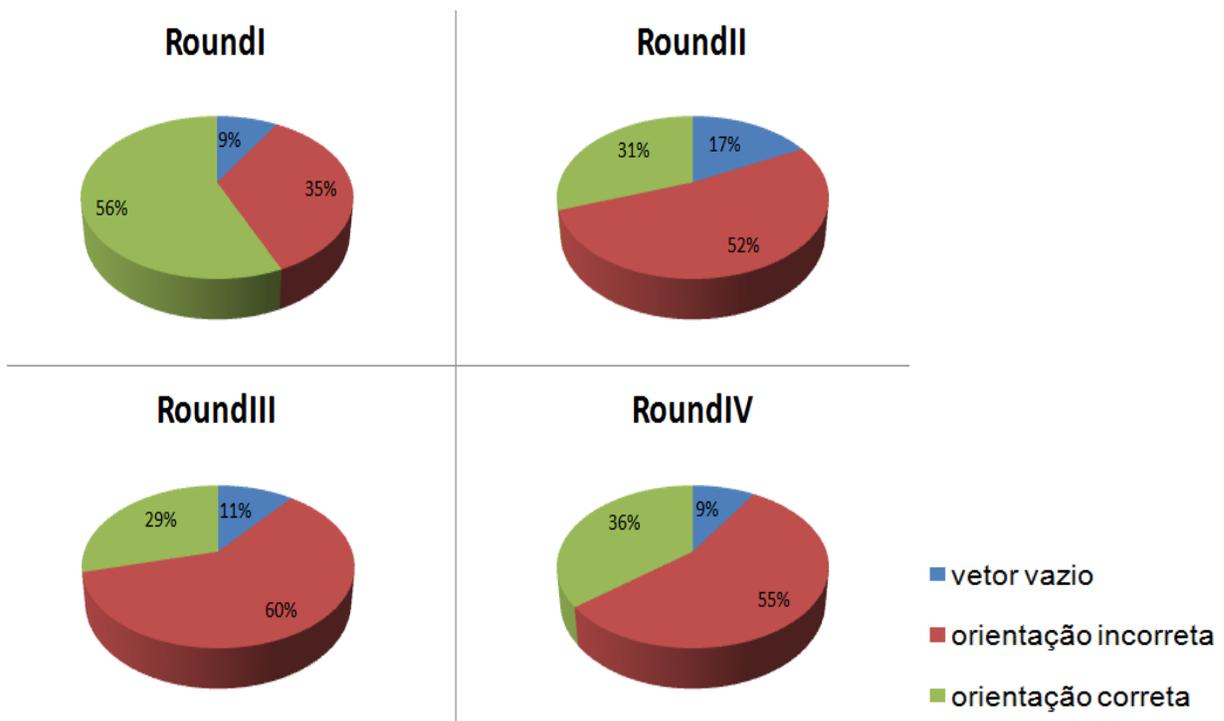


Figura 18. Análise das sequências dos clones eluídos em cada ciclo de *panning* em células Vero.

4.3. Novo procedimento de *panning* contra células de mamíferos: Metodologia BRASIL

A biblioteca BBT5 (pG3DSS + fragmentos maiores) em DMEM acrescido de BSA 1 %, com o título de $1,6 \times 10^{12}$ fagos/mL, foi incubada com a célula LLC-PK1.

Quando o primeiro ciclo (LLCPKB5) foi realizado utilizando a metodologia BRASIL, um número muito alto, $8,0 \times 10^6$ fagos, foi recuperado após eluição por infecção (Tabela 9) e em decorrência deste fato, muitos ligantes inespecíficos presentes poderiam ser amplificados e ao final de três ciclos não haveria enriquecimento de um clone específico. Deste modo, optou-se por um segundo passo de seleção em LLC-PK1 sem amplificação, para evitar que fagos inespecíficos fossem selecionados (Markland et al., 1996).

Como adaptação a metodologia BRASIL, $1,6 \times 10^{12}$ fagos/mL da BBT5 foram incubados com a célula LLC-PK1 durante o primeiro procedimento de *panning* denominado de eluição I (LB5L1), na qual a eluição dos fagos adsorvidos ocorreu por redução do pH, $1,0 \times 10^6$ fagos foram recuperados e então incubados pela segunda vez com as células. Na eluição II (LB5L2), $6,61 \times 10^4$ fagos foram reavidos (Tabela 9).

Tabela 9. Número de partículas virais obtidas após seleção em células LLC-PK1

Experimento	Metodologia	Início	Fim
LB5L1	BRASIL (adaptada)	$1,6 \times 10^{11}$ fagos	$1,0 \times 10^6$ fagos
LB5L2		$1,0 \times 10^6$ fagos	$6,61 \times 10^4$ fagos
LLCPKB5	BRASIL (Ciclo I)	$1,6 \times 10^{11}$ fagos	$8,0 \times 10^6$ fagos

Para identificar as proteínas codificadas pelos clones recuperados após eluição II (LB5L2), 286 clones do experimento de *panning* em células LLC-PK1, aleatoriamente

escolhidos, foram submetidos ao sequenciamento de DNA. A busca por similaridade foi realizada com o software BLAST-X e as sequências então anotadas, onde 1,4 % tiveram identidade com sequência do vetor vazio (sem inserto), 0,35 % dos insertos estavam em orientação incorreta e 98,25 % das sequências apresentaram orientação correta (Figura 19).

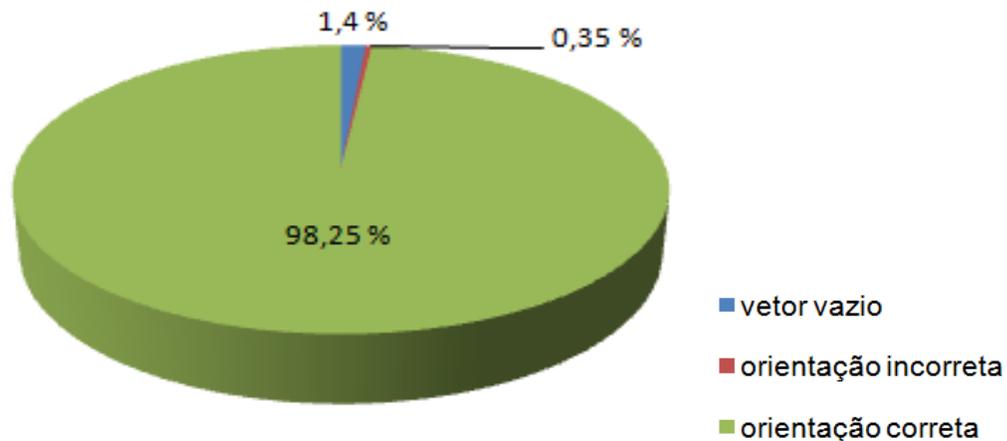


Figura 19. Análise das sequências dos clones eluídos das células LLC-PK1 durante o procedimento denominado de eluição II.

4.4. Análise de fase dos fagos recuperados após *biopanning* da biblioteca BBT5 contra células de mamíferos e soro fetal bovino

Todas as sequências obtidas após sequenciamento dos ensaios descritos acima foram anotadas com auxílio do software BLAST-X e aquelas que codificaram para proteínas com orientação correta foram analisadas para verificar a fusão com o vetor e o enriquecimento de uma dada sequência. Tanto as que enriqueceram quanto as que codificam proteínas com função importante para a patogenicidade e virulência de *L. interrogans* (mas não enriqueceram) foram analisadas.

As proteínas em fase estão listadas na Tabela 10. A LIC11719 e LIC10769 foram selecionadas em soro fetal bovino, o clone LIC13143 em células de fibroblasto A31 e a LIC12976 em células epiteliais LLC-PK1, respectivamente.

Tabela 10. Clones em fase com a proteína pIII obtidos após *panning* contra células de mamíferos e soro fetal bovino (SFB)

LICs	Produto	Substrato	ciclo	Número de clones	Fusão	Tamanho do fragmento peptídico apresentado pelo fago (aa)	Tamanho da proteína nativa inteira (aa)
LIC11719	hypothetical protein	SFB	IV	5/28	sim	166	315
LIC10769	processing metalloprotease	SFB	I	1/15	sim	121	557
LIC13143	TlyC	A31	IV	1/39	sim	145	444
LIC12976	putative lipoprotein	LLC-PK1	-	1/286	sim	80	418

As sequências dos fragmentos peptídicos expressas pelos fagos LIC11719, LIC10769, LIC13143 e LIC12976 estão apresentadas nas figuras 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

```

1      TTGTCGGAAAACAAGGTTAACACTTTAATCACAGATTCAACTTCGGAGGCGGCAAAAATT
1      M S E N K V N T L I T D S T S E A A K I

61     TTGCTGAAAGGAGGGCTTGTCTTTTTCTACGGAAACGGTCTATGGCATCGGAGCTTCC
21     L L K G G L V V F P T E T V Y G I G A S

121    GCTTTTGACATAGACGCTTGTAACGAATCTATAAAGTAAAGAACAGACCTTCCGACAAT
41     A F D I D A C K R I Y K V K N R P S D N

181    CCTCTTATACTTCACGTGGCAAATTTTTCTTCTCTTAAAGATTGTGGGGAAATTGACGAT
61     P L I L H V A N F S S L K D C G E I D D

241    AGGCCAATCTGGTTTTTCCAAAACCTTCTCCTGGCCCGATTACAGGAATTTTCAAAAAG
81     R A N L V F Q K L S P G P I T G I F K K

301    AAAATCAAAATCTTTTTACAGCTGGATTAGATTCCGGTTGCCATTCGAATTCCTTCCAAT
101    K N Q N L F T A G L D S V A I R I P S N

361    CCTACAGCTTTAGGTTTTTTAAAATTCTGTAAAATTCCGGTTGCAGCTCCTTCTGCTAAT
121    P T A L G F L K F C K I P V A A P S A N

421    TTTTCGGGAAAACCATCCTTAACAAAATAGAATATATTTTGGAAAGATTTATTGGAAAA
141    F S G K P S L T K I E Y I L E E F I G K

481    GTGGACTGTATTCTAAAAGGTGAAGAACCTCAAATAGGAATTGAATCCACGGTGGTTGAT
161    V D C I L K G E E P Q I G I E S T V V D

541    TTTATTTCTAAACCTCCAATTTTACTTCGCCCTGGTTTTTATAGATAAAAATGACCTTTCA
181    F I S K P P I L L R P G F I D K N D L S

601    GAAATTTTACCAGACCTTCAAGAAATGAAATCATTAGACAAAAATTCCTATACGACGCCT
201    E I L P D L Q E M K S L D K N S Y T T P

661    ATAAGTCCTGGTCTTAAATACAAACATTATTCTCCCAATTGCAAAGTTATATTCAAAAAT
221    I S P G L K Y K H Y S P N C K V I F K N

721    TCTTTAAAAGGAATTCCTAAAGAATTTGCTCAAATTTGGTTTTTCATTTTGAATCCAATTCG
241    S L K G I P K E F A Q I G F H F E S N S

781    GTTTATCAAGTTTTAGTTTCATCTAACAAAGAATATATGAAGGAAATCTATTCTTTTTTTT
261    V Y Q V L V S S N K E Y M K E I Y S F F

841    GTGGAATGCGATCGTAGAGGAATTACAGAAGCATGGTGTGAAATTCAAAAGAAGAGAAA
281    V E C D R R G I T E A W C E I P K E E K

901    TGGAAAGAAGTGCTGATTAATCGAATTTCAAAGCTGCTTCAAATAA

```

Figura 20. Sequência de nucleotídeos (948 pb) e aminoácidos (315 aa) da LIC11719. A sequência de aminoácidos codificada pelo fago está em azul.

```

1      ATGAAATGCTTAAAAGACGTCATGGTTTATCAAACGTATAAATTTAGAACTATTAGAAAAA
1      M K C L K D V M V Y Q T Y N L E L L E K
61     TATAATTTGTTTTTTCTAGATTTTTAAAGTTATAAAGATCGATTTTTGAATTTGTATCT
21     Y N F V F S R F L S Y K D R F L N L Y S
121    AGGTTTTATTTTTTACCAAATAGATTGTTAATTTTTTTTCGAAAAAGATTTTTGTTTTAAA
41     R F Y F L P N R L F N F F R K R F L F K
181    AGAAAGTCTTTC AATCTGCGGATGGGGTCCGATCTGAAAAGAATCGGTTTTAAAAATAAAA
61     R K S F N L R M G S D L K R I G L K I K
241    AATTACTATAGTAGAATATTCTATTATTCTATTTTTACTTTTTTATTTTTGCGACTTCTTTT
81     N Y Y S R I F Y Y S I L L F I F A T S F
301    TTAGAAGCTGCTCCCGGAGATTTTTGTAAAAGACGTAAAAATTCCTCCCCTCACTTTTGAA
101    L E A A P G D F V K D V K I P P L T F E
361    TTTCCAGAAGTGAAAGTTTTTGGTGTGGAAAAGGAACGGAGGTTTATTTTTTACGGGGA
121    F P E V K V F G V G K G T E V Y F L P G
421    GAAGAATTCCTCTCAGAAATTTAGAAATTCATATTTATGCAGGAGTTTGTACAACCCG
141    E E F P L R N L E I H I Y A G V L Y N P
481    AATCTTCCTCCCGAAGTTCGGAACTTTTTGTTCAAGCTTGGAAACACGGAGGAGTTCCT
161    N L P P E V P E L F V Q A W K H G G V P
541    TCAGCGCCAGGAAGTAAGTTTATAGAAACTTTAGAAGGTTACGGAGCCAAAATTGATACA
181    S A P G S K F I E T L E G Y G A K I D T
601    GACGTAAATTCGAAAAAATTATATTCACGATTTCTTATCTTTCTAGATTCGAAAAAGAA
201    D V N S E K I I F T I S Y L S R F E K E
661    GTAGTTCCTCTGATTCGTGAATTTATTACCTCTCCGTTATTTAAACGAAGAAGGTTTTGCG
221    V P L I R E F I T S P L L N E E G F A
721    GTTGCAAAACTCAACTTAGAGGAATCGATCAAAAAGAAGAAACGATAAGATTTCCGATATT
241    V A K L N L E E S I K R R N D K I S D I
781    GCTTATCGTAAAACCGCAGA AACTTGTCTATAAAGGAACCGTTTTTAGGTAAAAGTGTGAG
261    A Y R K T A E L V Y K G T V L G K S V E
841    TTGGATTCTCTTGCAAAAATCAACTCTAAGGATATTAAGAATACTTTGATAAAGCCGTT
281    L D S L A K I N S K D I K E Y F D K A V
901    TCTACTTCTAAAAGAATCGTTCTACTTACGGGAGATTTACAAAAAGAAGAAGCAGA AACT
301    S T S K R I V L L T G D L Q K E E A E L
961    TTGATCGCTTCTATTTTTACCTTTGAGAGAAAATTTTCGTAAGGAAACTTCAGTAAAAATC
321    L I A S I L P L R E N F R K E T S V K I
1021   GATACACAAATTTTAAAGAAAAATTTGGATTCTCTTTCTTTCAAGTTTTAGGTGTGGAT
341   D T Q I L K K N L D S L S F Q V L G V D
1081   AAAGAAGCGACTCAAAGTGTAGTGATGATGACCCGGAATTCCTTCCTGCACATAGAGATCCT
361   K E A T Q S V V M M T G I L P A H R D P
1141   GATTTTTATGCAATTCAGTTGGCGAATTATATCATCGGAGGTGGAGTTTTAGTCTTAT
381   D F Y A I Q L A N Y I I G G G G F S S Y
1201   TTGATGCAAAAGATTCGTTCTGATCGAGGACTTGCTTATTCTTCAGGTAGTTCTACTCAT
401   L M Q K I R S D R G L A Y S S G S S T H
1261   TTTGAGAAGGATTATGGAGTGGTCTATTTTACTACTCAGACAAAACCTTCTACGACTAAA
421   F E K D Y G V V Y F T T Q T K T S T T K
1321   GAAGTCTACGATCTGATGCGTGAGATCCTAAGTGAAGAAACGATTTCTAAAATTACAGAA
441   E V Y D L M R E I L S E E T I S K I T E
1381   AAGGAAC TGGAATCTGCAAAACAATCTATCGTCAATCGGTTTATCTTTCAATTTGTAGAT
461   K E L E S A K Q S I V N R F I F Q F V D
1441   AAGATGGGAATTCCTTCATAACTTTCTTCGGTTTTCAAGAACATGGTATGCCAAACGATTAT
481   K M G I L H N F L R F Q E H G M P N D Y
1501   TTA AAAACGTATCGAGATAAAAATCAAGCAGTTACGTTAGGCGATCTTAAAAGAGTAGGA
501   L K T Y R D K I Q A V T L G D L K R V G
1561   AAAAAATATTTTGTAAAGCTCTTCTGTAAAACGATTTTGACCGGTCCAAAAACATTACA
521   K K Y F V S S S V K T I L T G P K N I T
1621   AAAGGTTTTAAATGAATCCGTAAAACACATTACGCCAGAAGAAAGGATTCCTTAG
541   K G L N E S V K H I T P E E R I P *

```

Figura 21. Sequência de nucleotídeos (1674 pb) e aminoácidos (557 aa) da LIC10769. A sequência de aminoácidos codificada pelo fago está em azul.

```

1      ATGGAATTAATCGGCTTTTTTATAATCGTTTTACTTATATTTGCGAACGGATTTTTTCGTT
1      M E L I G F F I I V L L I F A N G F F V
61     TCCGAGAGTTTGGCTTTGGTTTTGATTTCGTCTTCTCGTTTAGAGGAATTGATCAAGGAA
21     S A E F A L V S I R P S R L E E L I K E
121    AATAAACCTCTTGCATTTATTACCAAACGCGCGGCTCAAAAACCAATGACATGTTATCC
41     N K P L A F I T K R A A Q K L N D M L S
181    GTATGTCAGGTAGGAATTACCATCGCCAGTCTTTTGTAGGTTGGGTGGGGGAAGGTTAC
61     V C Q V G I T I A S L L L G W V G E G Y
241    GTTTCTAGATGGCTTATTTTTCTTTTTGGAAATGTTTGGCTATTCCGCAAACGAAGCAACT
81     V S R W L I F L L E M F G Y S A N E A T
301    GTTCACGGTTTGGCGATTACTATTTTCGTTTACGATTATTACGTTTCTACATATACTTTTA
101    V H G L A I T I S F T I I T F L H I L L
361    GGAGAACTTCTTCTAAGACAGTAGCAATTCAGAACACGGAAACGATTGCACCTTTTTTATT
121    G E L L P K T V A I Q N T E T I A L F I
421    AGCATTCTTTTATTCTTCTTTTTATTATCTATTTTTATCCAATTACTTTCTTCTTAAATGAA
141    S I P L F F F Y Y L F Y P I T F F L N E
481    ATGACATCTTTTTCTTTTGAAGCTGATTGGAATCGAAGCAAACAAAAGCAGAATGATGCAT
161    M T S F L L K L I G I E A N K S R M M H
541    TCTCCTGAAGAATTGATGATCATCATAGAAGAGCAAAACAAACAAGGTAAGATCGATCAG
181    S P E E L M I I I E E Q N K Q G K I D Q
601    GAAGAATTTCAAATCATTAGAATACGTTTCAGTTTTTCAGAACATCAAGCAAAGGATGTG
201    E E F Q I I Q N T F Q F S E H Q A K D V
661    ATGACTCATCGTTTGGAGTATCATTGGGATTCCGCATGATACCTTCTATGGATTCTTTGATT
221    M T H R L S I I G I P H D T S M D S L I
721    TCTATCATTGCAGAACACCATTTTTCTAGATATCCTATTTATGAAGGCAGTACAGATAAA
241    S I I A E H H F S R Y P I Y E G S T D K
781    ATTATTGGAATCATTACGTTTCAGACGTATCTTACTTGGTTGTCTAATTCTAAAAAAGGT
261    I I G I I H V Q T Y L T W L S N S K K G
841    AGAAAAGAAAAAGTTACCGCAATTATGCAACCTCCGATTTTTGTTCCCGAAGGTCCTTTCCG
281    R K E K V T A I M Q P P I F V P E G L S
901    ATAGAAAAGGTGATGCAAAAACCTCCGAGAAAACAACAACACATGGCGATCGTTATAGAT
301    I E K V M Q K L R E N K Q H M A I V I D
961    GAGTACGGTGGAGTTGCGGGTCTTCTTACATTAGAGGATATTATCGAAGAAATTTTTGGA
321    E Y G G V A G L L T L E D I I E E I F G
1021   CAGATCCGAGATGAAACGGACGATCATGAGACGGATCCGTTCCCTACTCAACATTCAGAC
341   Q I R D E T D D H E T D P F P T Q H S D
1081   AGTTTTACGATCGACGGCGAAGCGGAGTTAGACGATCTAAAAGAAATCTTGTAGGAGTC
361   S F T I D G E A E L D D L K E I L V G V
1141   CAAGAAGAAGAGATCAAAGATATTCGTACGATTGCAGGTTTTATCTTAGGTCGTTTAGAA
381   Q E E E I K D I R T I A G F I L G R L E
1201   GATATGCCGGAAGAAGGTTCTACAATTTCTCTTCAAACAGGAACTCTTACCGTTGAGAAA
401   D M P E E G S T I S L Q T G T L T V E K
1261   ATGGAAGGTAATAAAATTTCTTTTCGGTTTCGTTTTACAAGAGTTAGCTTAAATAATCGAGCT
421   M E G N K I L S V R F T R V S L N N R A
1321   CAGTCTAAAAAATGA
441   Q S K K *

```

Figura 22. Sequência de nucleotídeos (1335 pb) e aminoácidos (444 aa) da LIC13143. A sequência de aminoácidos codificada pelo fago está em azul.

```

1      ATGAAAATCGCAATCTTAGGAAGTGAATCGCGGGGTTAAGCGCGTGTGGTATTTAAGC
1      M K I A I L G S G I A G L S A C W Y L S
61     AAAGAACATGACGTAATTTTAATTGAACGTCATTCTCTTCCCAGGAATGGATGCGCATGGA
21     K E H D V I L I E R H S L P G M D A H G
121    ACGGATATATCTTTAAAGGACGGAGTTTTTAGATTTGACGTTCTTTTAGAGCGTTCAAA
41     T D I S L K D G V F R F D V P F R A F K
181    CAAAATTATTATCCTTGTCTAATAGAAATGTATAACGAAGCCGGAATTGAGTTTAGACCG
61     Q N Y Y P C L I E M Y N E A G I E F R P
241    GTAGATTATTCTTTTTCTTTGAGTGAAAGGGACGGAACACTATTATTTTCAATTTGCTACG
81     V D Y S F S L S E R D G T T Y F Q F A T
301    ATCGGGATCGGAGGAAATTTTTACCCATTCGTTTCTCCGGTTTGTTTTAAAAACGGTGAA
101    I G I G G N F Y P F V S P V C F K N G E
361    TCTAGAAAAATTTTTCTGATACAATTCGTTTTTATGGCGAATCTGCAAAACAATTAGAG
121    S R K I F S D T I R F Y G E S A K Q L E
421    TCCCTGCGTGGAGAACAACTTACGATTTCCGGATTCTTACAAAGATTCCGGATATTCTAAA
141    S L R G E Q L T I S G F L Q R F G Y S K
481    GAATTTGAAAATAAATATCTGATTCCAATGTTCCGCCACCATTAATACGTGTACGATTCTA
161    E F E N K Y L I P M F A T I N T C T I L
541    AGTGCAAAAAATTATCCAGCGGAAGCGGTGATTTCGTTATCATTCTAAGGGACTGAAGTTT
181    S A K N Y P A E A V I R Y H S K G L K F
601    TTACGATTTTTAACC GCAAGTCATGGAACCAAGGACATTACAGAAAAACTTTCCATTGGA
201    L R F L T A S H G T K D I T E K L S I G
661    GCAAAAGAACTTAGATTAAAAACCAATCCTAGAAAGATAGAACAGAATGGAAAAAAGTA
221    A K E L R L K T N P R K I E Q N G K K V
721    TTTGTTTCTTTTGATGACGGAAAAGAAGATTTGATCGAGTAATTATAGCCACCCCGGCA
241    F V S F D D G K E E F D R V I I A T P A
781    AATCAGGCGATTTTCGTTGCTTCCAGATGAGATGGCTCCGGAAAAAGAGCTTCTGTCTTCG
261    N Q A I S L L P D E M A P E K E L L S S
841    TTTCAATTATGAAGAATCGGAAATTTTAATGCATACCGATCCTTCTTTTATGCCAAATAAA
281    F H Y E E S E I L M H T D P S F M P N K
901    AAAAGACATTGGGCCCCACTTTGTTTTACTCTTTTCGCCGGAGACAGACAAACCTTCTGCT
301    K R H W A P L C F T L S P E T D K P S A
961    ACGATTCGTTTGAACAAGGTCCTTCCGGAAATTGGAAAGGTTGAAATCTTTCAAACCTGG
321    T I R L N K V L P E I G K V E I F Q T W
1021   AATCCATTAGAAGAACCTAAACGAGGCACCTTTGATTTCCC GTTCTCGATTTGAAAGACCG
341   N P L E E P K R G T L I S R S R F E R P
1081   ATCATCGATTTGAAAAATCAAAAAACGGTAGAGAACTAAAAGCTCTTCAAGAACAGCCT
361   I I D L K N Q K T V E K L K A L Q E Q P
1141   GGAAGAAAAATCTGGTTTTGTGGCTCTTATGCAAGATATGGAATTCCTCTATTAGAAGCA
381   G R K I W F C G S Y A R Y G I P L L E A
1201   GGGGTATCCACTTCTTTAGATGTAAAACGTTGGGTAGAAAATTCGGAACGTTTTTAG
401   G V S T S L D V K R W V E N S E R F *

```

Figura 23. Sequência de nucleotídeos (1257 pb) e aminoácidos (418 aa) da LIC12976. A sequência de aminoácidos codificada pelo fago está em azul.

Estas proteínas foram analisadas pelos algoritmos Signal P, TMHMM, pSORTb, Pfam e Smart quanto a presença de peptídeo sinal, regiões transmembrana, presença e função de domínios caracterizados e quanto a sua localização celular (Tabela 11).

Tabela 11. Análise de sequência dos clones em fase

LICs	Smart	Signal P	TMHMM	Pfam	Psort
LIC11719		-	-	YrdC/SUA5	-
LIC10769		-	1	Peptidase M16 inativo	-
LIC13143		1-17	4	DUF21/CBS/CorC_HlyC	Membrana citoplasmática
LIC12976	Peptídeo sinal de 1 a 16	-	-		-

Estas análises demonstraram que a LIC11719 é uma proteína hipotética com tamanho de 315 resíduos de aminoácidos, apareceu cinco vezes entre 28 no ciclo IV de *panning*. Segundo as predições, esta proteína não apresenta peptídeo sinal, domínio transmembrana e sua localização celular é desconhecida. Mas, o algoritmo Pfam determinou a presença de domínios YrdC e SUA5 com função de ligação preferencial a dsRNA, o que sugere localização citoplasmática.

A LIC10769 é uma metaloprotease de processamento com tamanho de 557 resíduos de aminoácidos que aparece apenas uma vez em 15 no ciclo I, não apresenta peptídeo sinal nem localização celular predita, mas apresenta um domínio transmembrana e pertence à família de peptidases M16, subfamília M16B (<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>). A família M16 é subdividida em três subfamílias de acordo com a estrutura primária (Figura 24).

No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, *upstream* ao gene da LIC10769, está a LIC10768 (Figura 25). Este gene codifica para uma metaloprotease da família M16 e possui o motivo HXXEH e aquele gene codifica uma proteína que não possui motivo de ligação a

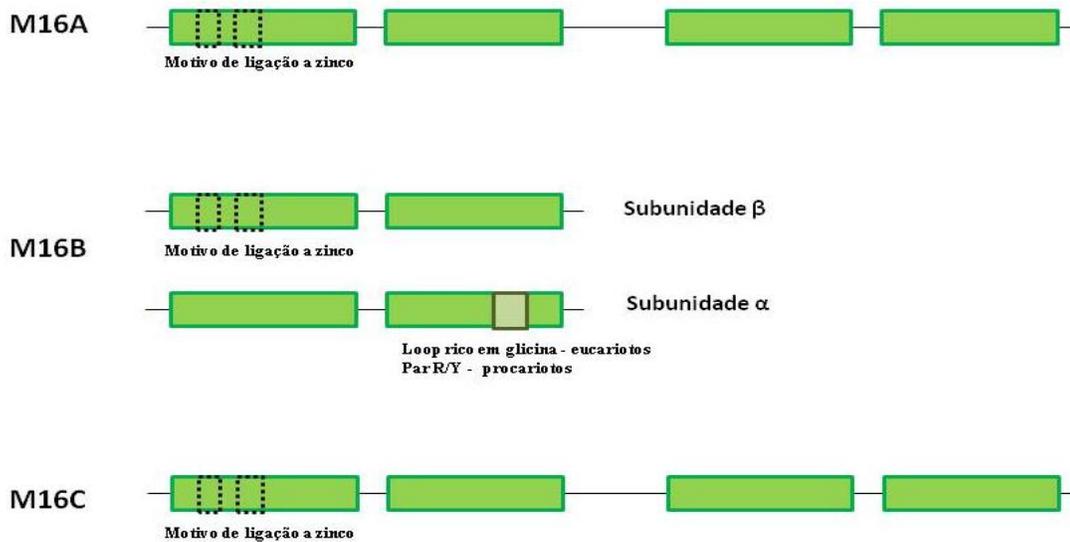


Figura 24. Esquema da organização dos domínios das peptidases da família M16, subfamílias M16A, B e C. Adaptado de Ohtsuka et al., 2009.

zinco, mas conserva o par R/Y no sítio ativo (C-terminal). Por predição (Microbes Online Operon Predictions for *Leptospira interrogans*, L1-130), estes genes juntamente com a LIC10770 e a LIC10771 estão organizados em um mesmo operon.

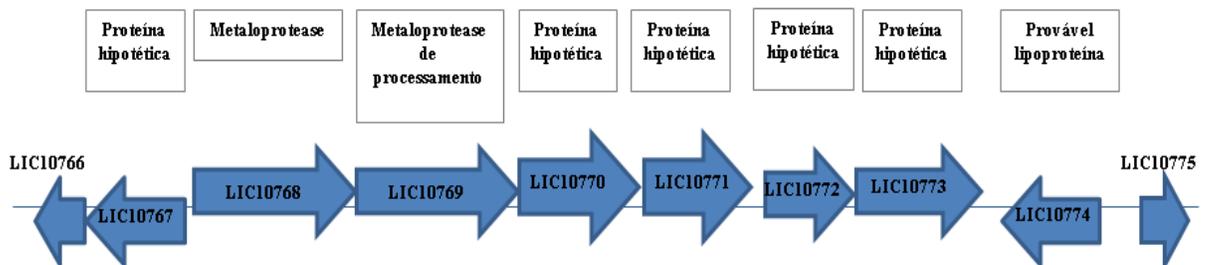


Figura 25. Esquema representando a organização dos genes LIC10768 e LIC10769 no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

O alinhamento entre as sequências protéicas codificadas pelos genes LIC10768 e LIC10769 de *L. interrogans* com outras proteínas pertencentes à subfamília M16B (SPH2681 e SPH2682 de *Sphingomonas* sp., MPP subunidade α e β de levedura e a proteína BHP de *Bacillus halodurans*, um homodímero) é mostrado na Figura 26.

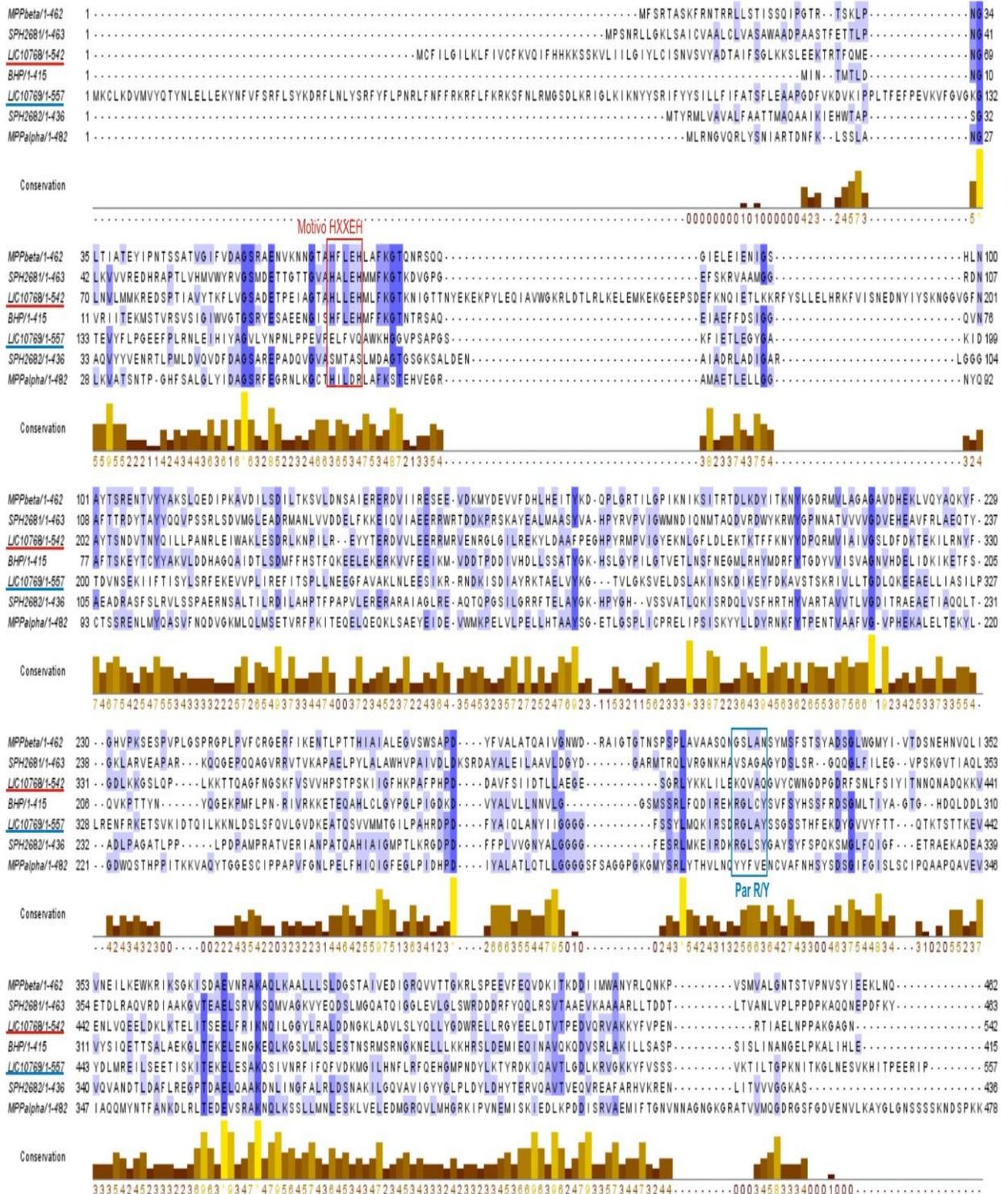


Figura 26. Alinhamento da estrutura primária da LIC10768, LIC10769, BHP, SPH2681, SPH2682 e MPP subunidade α e β . O motivo HXXEH está em vermelho e o par R/Y em azul. Os resíduos de aminoácidos conservados entre as diferentes proteínas estão marcados em roxo.

Com 444 resíduos de aminoácidos, a TlyC (LIC13143) apresenta quatro regiões que se inserem na membrana citoplasmática. Foi predita a existência de domínios CBS (cystathionine-beta-synthase) que podem agir como sensores da energia celular, pois se ligam a AMP, ATP, entre outros. Esse domínio também pode estar presente em canais de membrana. O domínio CorC HlyC (domínio associado a transportador) é encontrado em proteínas que apresentam o domínio CBS, em antiporters Na^+/H^+ e também está envolvido com o efluxo de magnésio e cobalto. O domínio DUF (Domain of Unknown Function) também foi encontrado. Esta proteína foi caracterizada como adesina por Carvalho e colaboradores (2009).

A LIC12976 foi selecionada em células epiteliais renais LLC-PK1 pela metodologia BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*). Com 418 aminoácidos, essa proteína codifica uma possível lipoproteína sem região transmembrana predita (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) contendo peptídeo sinal com lipobox (Setubal et al., 2006).

4.5. Amplificação dos genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 em diferentes sorovares.

A LIC13418 codifica uma proteína hipotética. Este gene foi selecionado adicionalmente àqueles selecionados pela técnica de shotgun phage display. Não tem função predita nem domínio conhecido (não foi selecionado pela técnica de shotgun phage display), mas possui localização extracelular predita (<http://www.psort.org/psortb>) e provavelmente está ancorada na membrana externa (Viratyosin et al., 2008).

A análise da conservação do gene da LIC12976 em diferentes sorovares de *Leptospira* foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (Figura 27).

Na figura 28 pode-se visualizar que este gene é amplificado em todos os sorovares da espécie *L. interrogans*, pois há amplificação do fragmento de aproximadamente 1,2 kb como esperado. No sorovar Patoc da espécie *L. biflexa* não houve amplificação deste fragmento.

A análise da conservação dos genes das LIC10768 e LIC10769 em diferentes sorovares de *Leptospira* foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Figuras 29 e 30).

Nas Figuras 31 e 32 visualiza-se que os genes LIC10768 e LIC10769 são amplificados em todos os sorovares da espécie *L. interrogans*, pois há amplificação dos fragmentos de 1449 pb e 1359 pb, respectivamente. No sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*, partindo da mesma quantidade de DNA molde, não há amplificação desses mesmos fragmentos.

A análise da conservação do gene da LIC13418 em diferentes sorovares de *Leptospira* foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (Figura 33). Na figura 34 pode-se visualizar que este gene é amplificado em todos os sorovares da espécie *L. interrogans*, pois há amplificação do fragmento de 1026 pb como esperado. No sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*, partindo da mesma quantidade de DNA molde não há amplificação, mesmo o gene se encontrando presente nesta espécie.

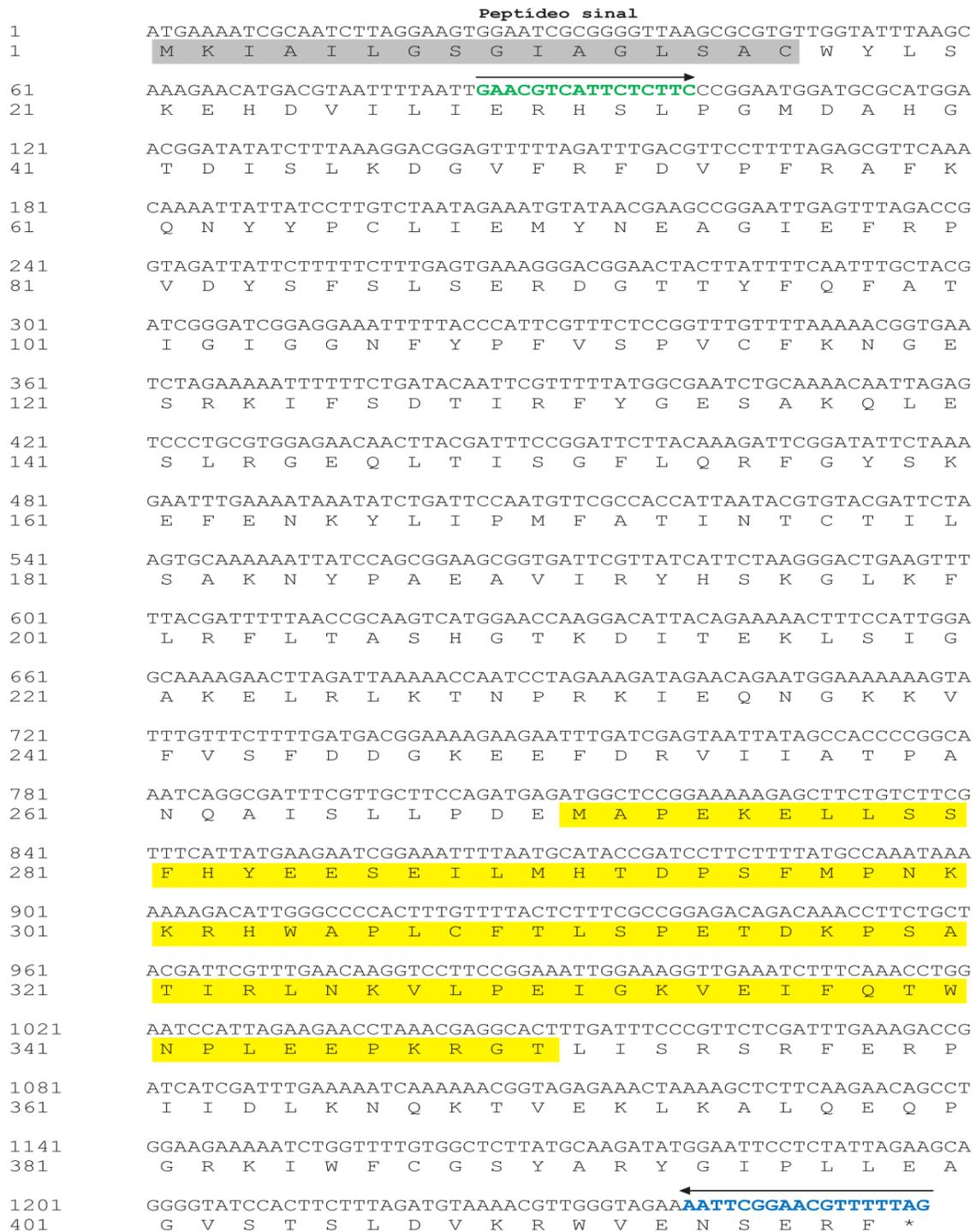


Figura 27. Sequência de nucleotídeos (1257 pb) e aminoácidos (418 aa) da LIC12976. A sequência de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene está marcada em verde (oligonucleotídeo iniciador *forward*) e em azul (oligonucleotídeo iniciador *reverse*). A sequência sinal de 16 aa predita pelo programa SMART está marcada em cinza. A região do fago está marcada em amarelo. A amplificação deste gene iniciou-se na posição 29 aa, excluindo-se a porção hidrofóbica inicial.

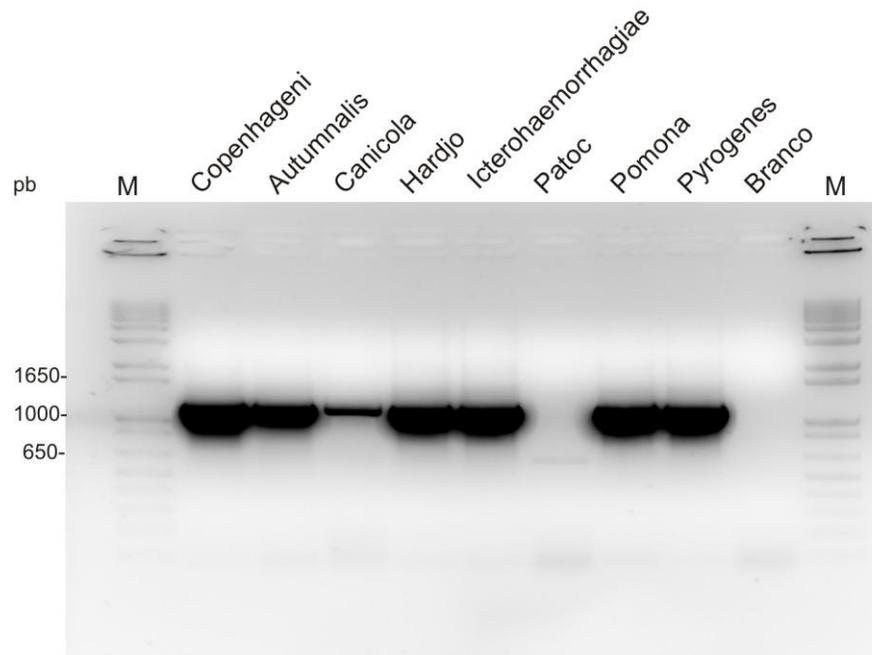


Figura 28. Amplificação por PCR do gene que codifica a LIC12976 nos sorovares Copenhageni, Autumnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes de *L. interrogans* e no sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*. O Branco é o controle negativo da reação e M é o marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen).

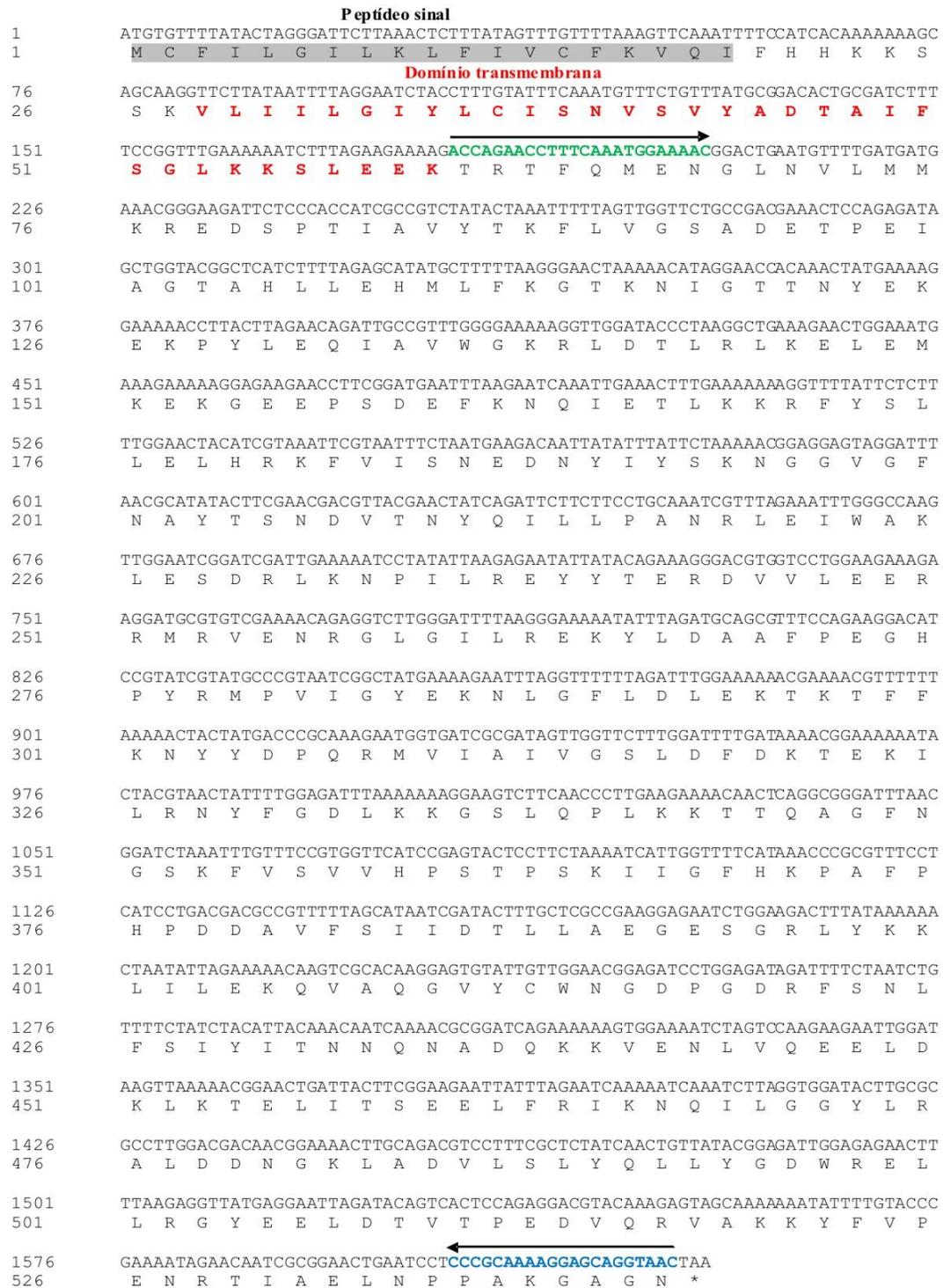


Figura 29. Sequência de nucleotídeos (1629 pb) e aminoácidos (542 aa) da LIC10768. A sequência de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene está marcada em verde (oligonucleotídeo iniciador *forward*) e em azul (oligonucleotídeo iniciador *reverse*). A sequência sinal de 19 aminoácidos predita pelo programa SMART está marcada em cinza e a região transmembrana está marcada em vermelho. A amplificação deste gene iniciou-se na posição 61 aa, excluindo-se a porção hidrofóbica inicial.

```

1 ATGAAATGCTTAAAAGACGTCATGGTTTATCAAACGTATAATTTAGAACTATTAGAAAAATATAATTTGTTT
1 M K C L K D V M V Y Q T Y N L E L L E K Y N F V F
76 TCTAGATTTTTAAGTTATAAAGATCGATTTTTGAATTTGTATTCTAGGTTTATTTTTTACCAAATAGATTGTT
26 S R F L S Y K D R F L N L Y S R F Y F L P N R L F
151 AATTTTTTCGAAAAAGATTTTTGTTTAAAAGAAAGTCTTCAATCTGCGGATGGGGTCCGATCTGAAAAGAATC
51 N F F R K R F L F K R K S F N L R M G S D L K R I
226 GGTTTAAAAATAAAAAATTACTATAGTAGAATATCTATATTCTATTTTACTTTTTATTTTTGCGACTTCTTT
76 G L K I K N Y Y S R I F Y Y S I L L F I F A T S F
301 TTAGAAGCTGCTCCCGGAGATTTGTAAAAGACGTAAAAATTCCTCCCTCACTTTTGAATTTCCAGAAGTGAAA
101 L E A A P G D F V K D V K I P P L T F E F P E V K
376 GTTTTTGGTGTGGAAAAGGAACGGAGGTTTATTTTTTACCGGGAGAAGAATTCCTCTCAGAAATTTAGAAAT
126 V F G V G K G T E V Y F L P G E E F P L R N L E I
451 CATATTTATGCAGGAGTTTGTACAACCCGAATCTTCTCCCGAAGTTCGGAACTTTTTGTCAAGCTTGAAAA
151 H I Y A G V L Y N P N L P P E V P E L F V Q A W K
526 CACGGAGGAGTTCCTTCAGCGCCAGGAAGTAAGTTATAGAAACTTTAGAGGTTACGGAGCCAAAATTGATACA
176 H G G V P S A P G S K F I E T L E G Y G A K I D T
601 GACGTAATTCGAAAAAATTATATTCAGGATTTCTTATCTTTCTAGATTTCGAAAAAGAAGTAGTTCTCTGATT
201 D V N S E K I I F T I S Y L S R F E K E V V P L I
676 CGTGAATTTATTACCTCTCCGTATTAAACGAAGAAGGTTTTCGGTTGCAAAACTCAACTTAGAGGAATCGATC
226 R E F I T S P L L N E E G F A V A K L N L E E S I
751 AAAAGAAGAAACGATAAGATTTCCGATATGCTTATCGTAAAACCGCAGAACTTGCTATAAAGGAACCGTTTA
251 K R R N D K I S D I A Y R K T A E L V Y K G T V L
826 GGTAAAAGTGTGAGTTGGATTCTTTGCAAAAATCAACTCTAAGGATATTAAAGAATACTTTGATAAAGCCGTT
276 G K S V E L D S L A K I N S K D I K E Y F D K A V
901 TCTACTTCTAAAAGAATCGTTCTACTTACGGGAGATTTACAAAAAGAAGCAGAACTTTTGATCGCTTCTATT
301 S T S K R I V L L T G D L Q K E E A E L L I A S I
976 TTACCTTTGAGAGAAAATTTTCGTAAGGAAACTTCAGTAAAAATCGATACAAAATTTTAAAGAAAATTTGGAT
326 L P L R E N F R K E T S V K I D T Q I L K K N L D
1051 TCTCTTCTTTCAAGTTTGTAGGTGTGGATAAAGAAGCGACTCAAAGTGTAGTGATGATGACCGGAATTTCTCCT
351 S L S F Q V L G V D K E A T Q S V V M M T G I L P
1126 GCACATAGAGATCCTGATTTTTATGCAATTCAGTTGGCGAATTATATCATCGGAGGTGGAGTTTTAGTCTTAT
376 A H R D P D F Y A I Q L A N Y I I G G G G F S S Y
1201 TTGATGCAAAAGATTCGTTCTGATCGAGGACTTGCTTATCTTTCAGGTAGTTCTACTCATTGAGAAGGATTAT
401 L M Q K I R S D R G L A Y S S G S S T H F E K D Y
1276 GGAGTGGTCTATTTACTACTCAGACAAAACCTTACGACTAAAGAAGTCTACGATCTGATGCGTGAGATCCTA
426 G V V Y F T T Q T K T S T T K E V Y D L M R E I L
1351 AGTGAAGAAACGATTTCTAAAATTACAGAAAAGGAACTGGAATCTGCAAAACAATCTATCGTCAATCGGTTTATC
451 S E E T I S K I T E K E L E S A K Q S I V N R F I
1426 TTTCAATTTGTAGATAAGATGGGAATTTTCATAACTTTCTTCGGTTTCAAGAACATGGTATGCCAAACGATTAT
476 F Q F V D K M G I L H N F L R F Q E H G M P N D Y
1501 TTAAAACGTATCGAGATAAAATTCAGCAGTTACGTTAGGCGATCTTAAAGAGTAGGAAAAAATATTTTGT
501 L K T Y R D K I Q A V T L G D L K R V G K K Y F V
1576 AGCTCTTCTGTTAAAACGATTTTGACCGGTCCAAAAACATTACAAAAGGTTTAAATGAATCCGTAAAACACATT
526 S S S V K T I L T G P K N I T K G L N E S V K H I
1651 ACGCCAGAAGAAAGGATTCCTTAG
551 T P E E R I P *

```

Figura 30. Sequência de nucleotídeos (1674 pb) e aminoácidos (557 aa) da LIC10769. A sequência de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene está marcada em verde (oligonucleotídeo iniciador *forward*) e em azul (oligonucleotídeo iniciador *reverse*). A região transmembrana está marcada em vermelho. A região do fago está marcada em amarelo. A amplificação deste gene iniciou-se na posição 105 aa, excluindo-se a porção hidrofóbica inicial.

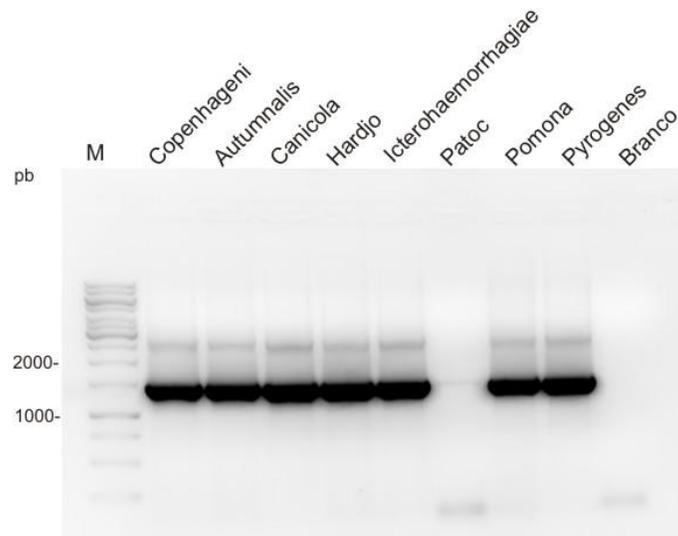


Figura 31 Amplificação por PCR do gene que codifica a LIC10768 nos sorovares Copenhagani, Autumnnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes de *L. interrogans* e no sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*. O Branco é o controle negativo da reação e M é o marcador molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

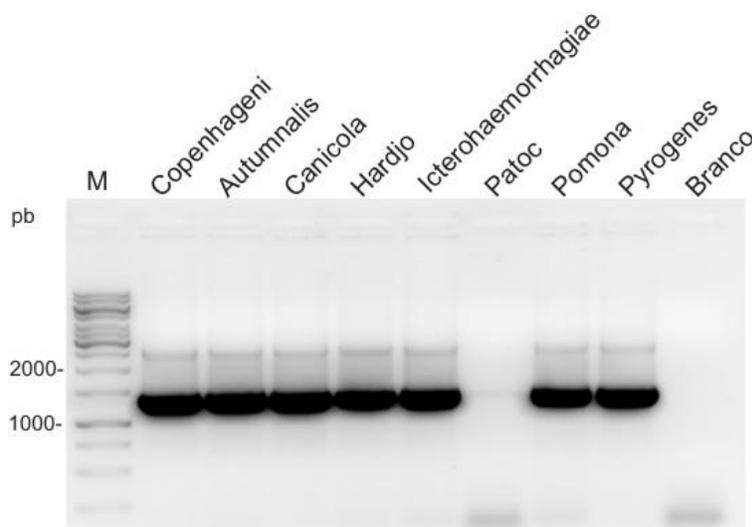


Figura 32. Amplificação por PCR do gene que codifica a LIC10769 nos sorovares Copenhagani, Autumnnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes de *L. interrogans* e no sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*. O Branco é o controle negativo da reação e M é o marcador molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

1 **TTGAATGAAGTTGTTTTAGAC**GTTTATAATATAGATGTGGTTAAAAATGGATTCCCTCAAACCACTCCTTCTTCT
 1 L N E V V L D V Y N I D V V K K W I P Q T T P S S
 76 ACTGCAGATGACGTCCTAGCTCAAACCGTAAAAAGCAAACGACATGCTTTACACGACAGGTTTTAGACTTACA
 26 T A D D V L A Q N R K K Q N D M L Y T T G F R L T
 151 AACAGAACCAACAAGAACAACCTTCCCTCAAGGAAGAGGTTGGGACTGGACAATCGAAAGTGCTTGGCAAACGGT
 51 N R T N K N N L P Q G R G W D W T I E S A W Q N G
 226 TATAATGGCCAACGAATTCATCAAAGTTCTTTGGTTATGATCTTCCGGCTACAACAGAAGACGGTATTCCTCTT
 76 Y N G Q R I H Q K F F G Y D L P A T T E D G I P L
 301 GCTAATACTAAAACGGAAAGAGTCAAGTACTCAGGACAATTTTCATGTAGTTCAAACCGGTTATACTTTGCGGAA
 101 A N T K T E R V K Y S G Q F H V V Q T G Y T F A E
 376 AAGTTAAGAATAGGCGCTCAATATACCTACGCTCCGGAGACAACAATAGGGCCGATGGAAGTATTTCTACTTTC
 126 K L R I G A Q Y T Y A S G D N N R A D G S I S T F
 451 CAAACTCTTGCAATCCTCGTTTTGGAGTGATTCCTTATTGGAATAACGTGGCGGGTCTTCCGAAAATATTGAT
 151 Q T L V N P R F G V I P Y W N N V A G L S E N I D
 526 ACTAAAAATCTAAGTTCTTGGAACGCGAACATTACTTATAAAAAATGAAAAATGGGGTATGTTCCAAATCGCTTAT
 176 T K N L S S W N A N I T Y K N E K W G M F Q I A Y
 601 ATTATCAATGATAAGGTTTCAGAAAAATGACGCTTGGTACGCGATCAACGGTGGTGCAAATTCATCGCAGGTTCC
 201 I I N D K V Q K N D A W Y A I N G G A N S I A G S
 676 GCACCTCTTCTCCTGTAGCAACGTCGACTAACGCAACTGGTGAACCACTGCCCGGTTCCGACCGAAAATTAT
 226 A L S S P V A T S T N A T G G T T A A G S T E N Y
 751 ACTGGAATTCTTTTACACAACCGTATTCAACAGGTAGAAATATTTATAACGAATTGGATCTAACTTGGATGTTT
 251 T G N S F T Q P Y S T G R N I Y N E L D L T W M F
 826 CAGATAAATGACAATGTATCTATTTGGACAGGTGCAGGTTTCCTAATTGCTGGTAATTCAAATTCGAAATTATAGA
 276 Q I N D N V S I W T G A G F L I A G N S I R N Y R
 901 AACAGTCCCTTGATATACAACAACAACAACGAATTTGAATTAATTCGCCCGGTTTATGAAACAACATACC
 301 N S P L I Y N T T T N E F E L N S A A F M K Q H T
 976 TCAGCAAACAACGCGAGCGTATTTTTCTTT**CAGTTGAACGCTGCACTTTAA**
 326 S A N N A S V F F F Q L N A A L *

Figura 33. Sequência de nucleotídeos (1026 pb) e aminoácidos (341 aa) da LIC13418. A sequência de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene está marcada em verde (oligonucleotídeo iniciador *forward*) e em azul (oligonucleotídeo iniciador *reverse*).

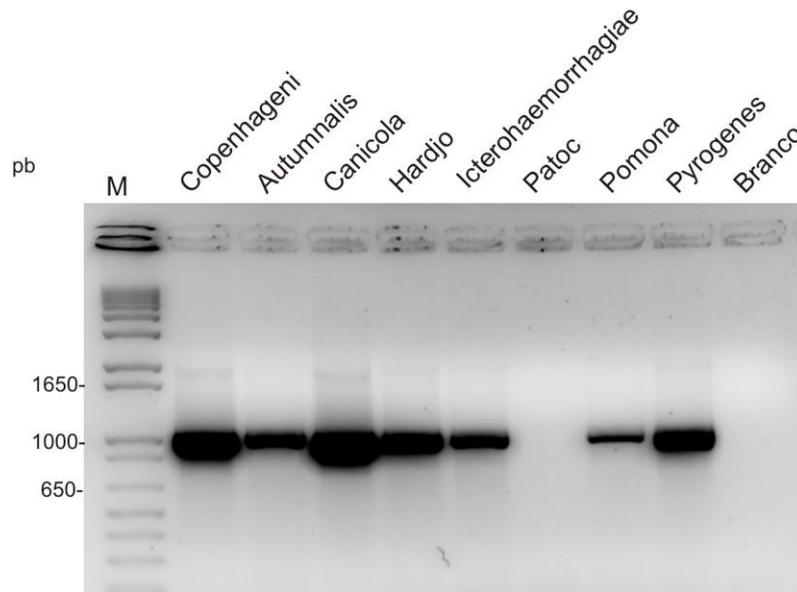


Figura 34. Amplificação por PCR do gene que codifica a LIC13418 nos sorovares Copenhageni, Autumnalis, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes de *L. interrogans* e no sorovar Patoc da espécie *L. biflexa*. O Branco é o controle negativo da reação e M é o marcador de tamanho molecular 1 kb plus (Invitrogen).

4.6. Conservação dos genes LIC12976 e LIC13418 nos sorovares cujos genomas foram sequenciados

Ao analisar a identidade do gene LIC12976 nas espécies sequenciadas em comparação com *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 verificou-se que este se encontra presente em *L. interrogans* sorovar Lai linhagem 56601 com 100 % de identidade, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis linhagens L550 e JB197 com 89 % de identidade e na espécie de vida livre *L. biflexa* sorovar Patoc linhagens Ames e Paris com 39 % de identidade (Figura 35).

```

Fiocruz 1 MKIAILGSGIAGLSACWYLSKEHDVILIERHSLPGMDAHGTDISLKDGVFRFDVPPFRAFK 60
Lai 1 MKIAILGSGIAGLSACWYLSKEHDVILIERHSLPGMDAHGTDISLKDGVFRFDVPPFRAFK 60
L550 1 MKIAILGTGIAGLSACWYLSKEHDVILIERHSLPGMDAHGTDVLEKDGTFRFDVPPFRAFK 60
JB197 1 MKIAILGTGIAGLSACWYLSKEHDVILIERHSLPGMDAHGTDVLEKDGTFRFDVPPFRAFK 60
Paris 1 -MIAIVGSGITGLTAAWALNKFCEVSLYEKHSVDGMAAFGAKQMIGGNEVEFDIPFRTIK 59
Ames 1 -MIAIVGSGITGLTAAWALNKFCEVSLYEKHSVDGMAAFGAKQMIGGNEVEFDIPFRTIK 59
      ***:*.**:***:*.* ** * : * * ** * ** * * : . . . . ** : *** : ** :

Fiocruz 61 QNYYPCLIEMYNEAGIEFRPVDYSFSLSERDGTTFYQFATIGIGGNFYFPVSPVCFKNGE 120
Lai 61 QNYYPCLIEMYNEAGIEFRPVDYSFSLSERDGTTFYQFATIGIGGNFYFPVSPVCFKNGE 120
L550 61 QNYYPCLIEMYNEAGIAFRPVDYSFSLSERDGTTFYQFSTFGFGGNFYFPFISPVCFKNAE 120
JB197 61 QNYYPCLIEMYNEAGIAFRPVDYSFSLSERDGTTFYQFSTFGFGGNFYFPFISPVCFKNAE 120
Paris 60 RDIYPTLFQVYDRADIQTKVVDYSFRVDSSD-QSVFGFFSKNIFGHHFGFPTADVFLSKK 118
Ames 60 RDIYPTLFQVYDRADIQTKVVDYSFRVDSSD-QSVFGFFSKNIFGHHFGFPTADVFLSKK 118
      : : *** * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Fiocruz 121 SRKIFSDTIRFYGESAKQLESRLRGEQLTISGFLQRFYSGYKFEFENKYLIPMFATINTCTIL 180
Lai 121 SRKIFSDTIRFYGESAKQLESRLRGEQLTISGFLQRFYSGYKFEFENKYLIPMFATINTCTIL 180
L550 121 SRKIFSDTIRFYGESANQWELLKGEQLTISGFLQRFYSGYKFEFEDKYLIPMFATINTCTLK 180
JB197 121 SRKIFSDTIRFYGESANQWELLKGEQLTISGFLQRFYSGYKFEFEDKYLIPMFATINTCTLK 180
Paris 119 GRNIFSDLLKFYTNAKTDWKNEP-NITILDFLKKNYSHEFIFEFLLPTFALVNTCKTD 177
Ames 119 GRNIFSDLLKFYTNAKTDWKNEP-NITILDFLKKNYSHEFIFEFLLPTFALVNTCKTD 177
      . * : *** * : : * : : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Fiocruz 181 SAKNYPAEAVIRYHSKGLKFLRFLTASHGTDITEKLSIGAKELRLKTNPRKIEQNGKKV 240
Lai 181 SAKNYPAEAVIRYHSKGLKFLRFLTASHGTDITEKLSIGAKELRLKTNPRKIEQNGKKV 240
L550 181 SAKNYPAEAVIRYHSNGLKFLRFLTASRGTRDITEKLSIGAKELRLKSNPKRIEQNGKKV 240
JB197 181 SAKNYPAEAVIRYHSNGLKFLRFLTASRGTRDITEKLSIGAKELRLKSNPKRIEQNGKKV 240
Paris 178 TVALYPAETIIGYHSRGYSYTPQETAKFGTRDIVNRLTGELKHLHLNANIQKIYKKSKT 237
Ames 178 TVALYPAETIIGYHSRGYSYTPQETAKFGTRDIVNRLTGELKHLHLNANIQKIYKKSKT 237
      : . * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

Fiocruz 241 FVSFDDGKEEFDRVVIATPANQAI SLLPDEMAPEKELLSSFHYYEESIIMHTDPSFMPNK 300
Lai 241 FVSFDDGKEEFDRVVIATPANQAI SLLPDEMAPEKELLSSFHYYEESIIMHTDPSFMPNK 300
L550 241 FVSFDDGKEEFDRIVVATPANQAI PLLPNEMTQEKKLLSSFRYYEESIIMHTDSSFMPNK 300
JB197 241 FVSFDDGKEEFDRIVVATPANQAI PLLPNEMTQEKKLLSSFRYYEESIIMHTDSSFMPNK 300
Paris 238 IIQFESEKEFEHVILSTQANQAQNLGNGFESEKEILNEFRYEASDVVLHTDPSYFKNP 297
Ames 238 IIQFESEKEFEHVILSTQANQAQNLGNGFESEKEILNEFRYEASDVVLHTDPSYFKNP 297
      : : * : . : * * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : *

Fiocruz 301 KRHWAPLCFTLSPETDKPSATIRLNKVLPEIGKVEIFQTWNPLEEPKRGTLSRSRFRFP 360
Lai 301 KRHWAPLCFTLSPETDKPSATIRLNKVLPEIGKVEIFQTWNPLEEPKRGTLSRSRFRFP 360
L550 301 KRHWAPLCFTLSPETDKPSATIRLNKVLPEIGKIEIFQTWNPLEEPQQGTLSRSRFRFP 360
JB197 301 KRHWAPLCFTLSPETDKPSATIRLNKVLPEIGKIEIFQTWNPLEEPQQGTLSRSRFRFP 360
Paris 298 T---VSLVFNIRDGYDKPEVTLDLGRIIPELKGKQVFQTWNPBKLPKQILKLAKFERP 354
Ames 298 T---VSLVFNIRDGYDKPEVTLDLGRIIPELKGKQVFQTWNPBKLPKQILKLAKFERP 354
      . . * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

Fiocruz 361 IIDLKNQKTVEKLLKALQEQPGRKIWFVCGSYARYGIPLLEAGVSTSLDVK-----RWVENS 415
Lai 361 IIDLKNQKTVEKLLKALQEQPGRKIWFVCGSYARYGIPLLEAGVSTSLDVK-----RWVENS 415
L550 361 IIDLKNRNTIEELKALQEQPGRKIWFVCGSYARYGIPLLEAGVSTSLDVR-----RWVENS 415
JB197 361 IIDLKNRNTIEELKALQEQPGRKIWFVCGSYARYGIPLLEAGVSTSLDVR-----RWVENS 415
Paris 355 VMDERTAKAIQRISLHADPNCKLWLCGSYSYLYGIPLLEAGAKSALQVTSQILKQSIDEI 414
Ames 355 VMDERTAKAIQRISLHADPNCKLWLCGSYSYLYGIPLLEAGAKSALQVTSQILKQSIDEI 414
      : * : . : : : : * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

Fiocruz 416 ERF 418 100% identidade
Lai 416 ERF 418 100% identidade
L550 416 IRS 418 89% identidade
JB197 416 IRS 418 89% identidade
Paris 415 IKT 417 39% identidade
Ames 415 IKT 417 39% identidade

```

Figura 35. Alinhamento da sequência LIC12976 em diferentes linhagens de *Leptospira*. Fiocruz- sequência da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (GenBank Accession YP_002889); Lai- sequência da *Leptospira interrogans* sorovar Lai linhagem 56601 (GenBank Accession NP_710783); L550- sequência da *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis L550 (GenBank Accession YP_798794); JB197- sequência da *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis JB197 (GenBank Accession YP_800034); Paris- sequência da *Leptospira biflexa* sorovar Patoc linhagem Patoc 1 (Paris) (GenBank Accession YP_001838255); Ames- sequência da *Leptospira biflexa* sorovar Patoc linhagem Patoc 1 (Ames) (GenBank Accession YP_001961932). Os resíduos de aminoácidos estão identificados abaixo do alinhamento como conservado (*), altamente similar (:), e similar (.). O provável peptídeo sinal da LIC12976 está sublinhado, o lipobox está em itálico e a sequência de aminoácidos codificada pelo fago selecionado está em cinza.

Ao analisar a identidade do gene LIC13418 nas espécies sequenciadas em comparação com *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 verificou-se que este gene é menor neste sorovar e se alinha com os genes dos outros sorovares na metade *downstream*, assim ao adicionar a sequência do gene LIC13417 ao alinhamento percebe-se que este gene e o gene LIC13418 estão separados por um códon de parada que não existe nos outros genomas sequenciados, ou seja nos outros sorovares estes dois genes correspondem a um único gene (Figura 36). Sendo assim, o alinhamento dos genes LIC13418 e LIC13417 (considerando a sequência da LIC13418) com o presente nos outros genomas mostrou que em *L. interrogans* sorovar Lai linhagem 56601 possui 99 % de identidade, em *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis linhagem L550 30 % de identidade e na linhagem JB197 82 % de identidade. Na espécie de vida livre *L. biflexa* sorovar Patoc linhagem Ames 22 % e Paris possui 28 % de identidade.

4.7. Clonagem dos genes LIC12976 e LIC13418

Os genes LIC12976 e LIC13418 foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130. Os produtos das ampliações com tamanhos de aproximadamente 1,2 e 1,0 kb, estão apresentados na figura 37 e 38, respectivamente.

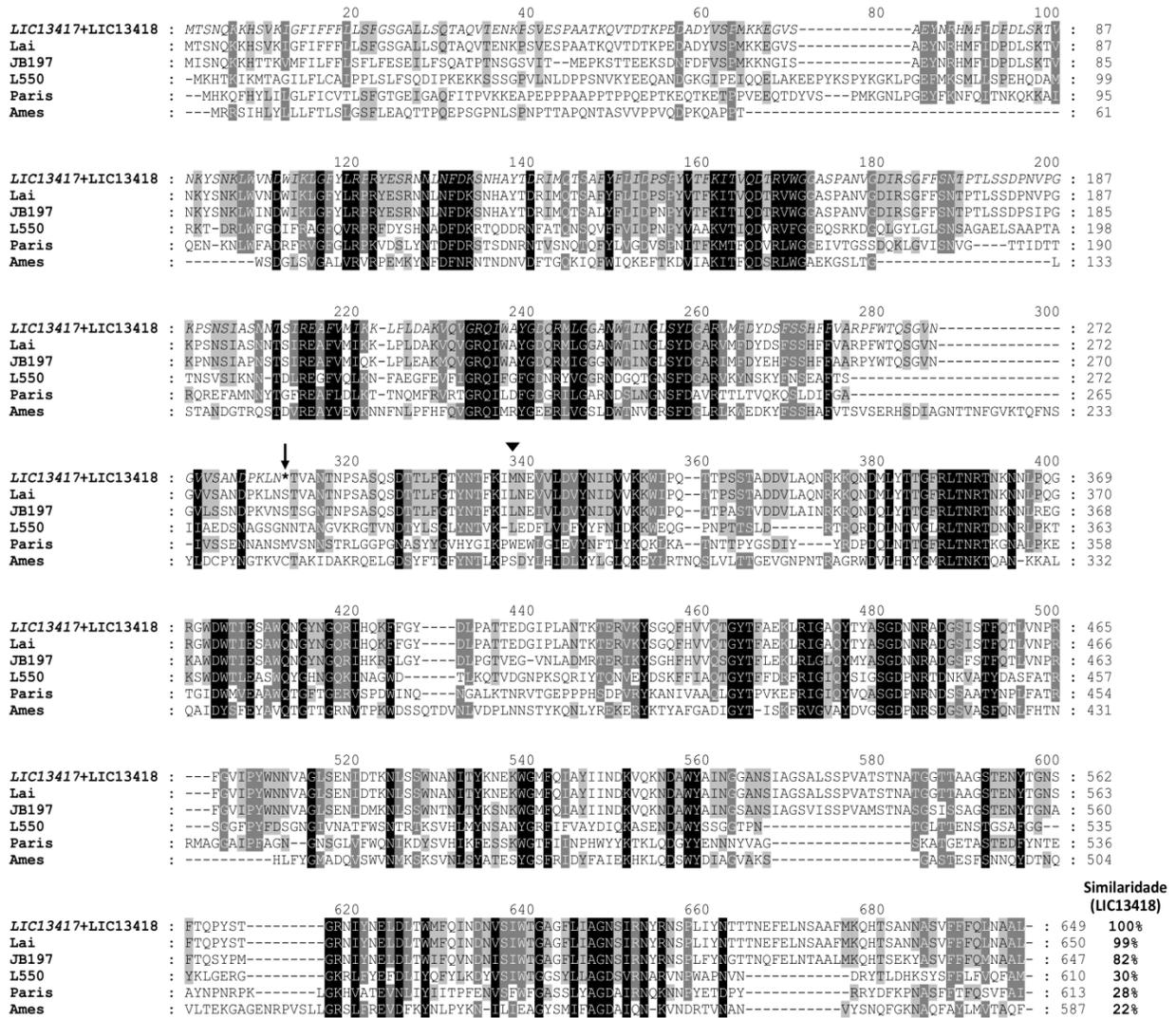


Figura 36. Alinhamento dos genes LIC13417 e LIC13418 da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (GenBank Accession YP_003320 e YP_003321, respectivamente) com os outros genomas sequenciados: Lai- sequência da *Leptospira interrogans* sorovar Lai linhagem 56601 (GenBank Accession NP_714452); L550- sequência da *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis L550 (GenBank Accession YP_796675); JB197- sequência da *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis JB197 (GenBank Accession YP_802097); Paris- sequência da *Leptospira biflexa* sorovar Patoc linhagem Paris (GenBank Accession YP_001840377); Ames- sequência da *Leptospira biflexa* sorovar Patoc linhagem Ames (GenBank Accession YP_001963983). Resíduos de aminoácidos conservados estão indicados no alinhamento em preto. A seta aponta para o códon de parada da LIC13417 e a ponta da flecha indica o códon de iniciação da LIC13418.

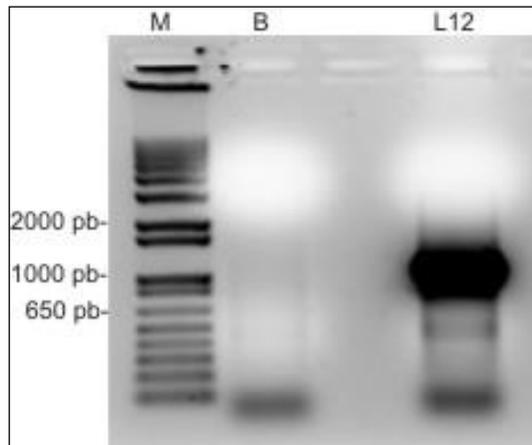


Figura 37. Amplificação por PCR do gene LIC12976. M - marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), B - Branco, L12- amplificação do gene LIC12976 com tamanho de aproximadamente 1,2 kb.

Os fragmentos amplificados foram purificados do gel e clonados em pGEM T-easy vector. O sequenciamento das construções em pGEM T-easy vector demonstrou que os fragmentos foram clonados corretamente.

Os insertos liberados após digestão das construções pGEM + LIC12976 e pGEM + LIC13418 foram purificados do gel e clonados em pAE, previamente digerido. As construções dos vetores de expressão foram sequenciadas.

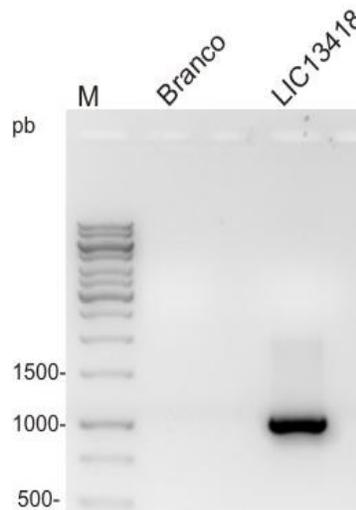


Figura 38. Amplificação por PCR do gene LIC13418. O Branco é o controle negativo da reação e M é o marcador de tamanho molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

A Tabela 12 resume as características dos fragmentos clonados e das proteínas nativas e recombinantes com a massa molecular e o ponto isoelétrico preditos (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Tabela12. Tamanho dos fragmentos amplificados e características das proteínas nativas e recombinantes

Proteína	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Número de aminoácidos da proteína (aa)	Massa molecular da proteína nativa (kDa)	Massa molecular da proteína recombinante (kDa)*	Ponto isoelétrico (pI)*
LIC12976	1173	418	47,774	45,8	8.58
LIC13418	1026	342	38,03	39,2	7.14

* considerando a sequência expressa pelo vetor de expressão pAE.

4.8. Purificação das proteínas LIC12976 e LIC13418

As linhagens de *E. coli* BL21 Star pLysS e *E. coli* BL21 SI foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes LIC12976 com indução *overnight* a 20 °C e LIC13418 com indução por 3 horas a 30 °C, respectivamente.

Após lise por pressão das bactérias, foi verificado que as proteínas LIC12976 e LIC13418 foram expressas na fração celular correspondente ao corpúsculo de inclusão. Depois do processo de renaturação das proteínas em tampão apropriado, foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel.

A proteína recombinante LIC12976 foi eluída nas concentrações de 60 mM a 1 M, de imidazol (Figura 39) e as frações correspondente a 100, 200 e 400 mM foram reunidas. A proteína LIC13418 (Figura 40) foi eluída nas lavagens de 60 mM frações 4 e 5; 100 mM todas as frações e 200 mM frações 1 e 2 de imidazol que foram reunidas. Ambas as proteínas foram dialisadas e armazenadas a 4 °C para posterior uso.

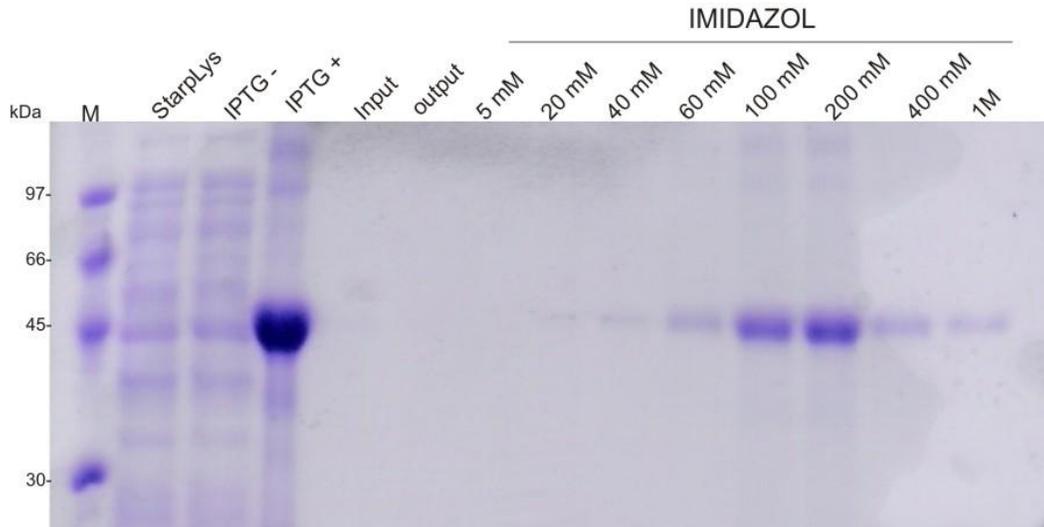


Figura 39. SDS-PAGE 12 % da expressão em larga escala da proteína LIC12976. M é o padrão de massa molecular, LMW. StarpLys é o extrato total *E. coli* Star pLysS vazia, IPTG- refere-se ao extrato total *E. coli* Star pLysS recombinante não induzido, IPTG+, corpúsculo de inclusão; Input, proteína após renaturação que entrou na coluna; output, fração não ligada a coluna; 5 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM e 1 M referem-se as eluições com estas concentrações de imidazol.

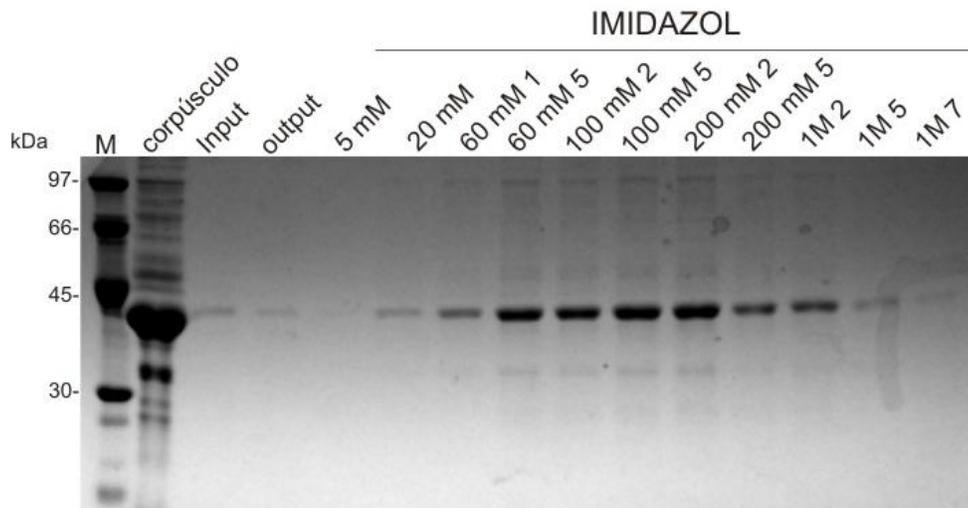


Figura 40. SDS-PAGE 12 % da expressão em larga escala da proteína LIC13418. M é o padrão de massa molecular, LMW. Corpúsculo refere-se ao corpúsculo de inclusão solubilizado em ureia 8 M obtido após a expressão em bactéria BL21 SI; Input, proteína após renaturação que entrou na coluna; output, fração não ligada a coluna; 5 mM, 20 mM, 60 mM 1, 60 mM 5, 100 mM 2, 100 mM 5, 200 mM 2, 200 mM 5, 1 M 2, 1 M 5 e 1 M 7 referem-se as frações das lavagens com estas concentrações de imidazol.

4.9. Western Blot

Os soros policlonais contra as proteínas recombinantes LIC12976 (Figura 41) e LIC13418 (Figura 42) gerados em camundongos foram usados no ensaio de *Western Blot* e foram específicos no reconhecimento da proteína recombinante homóloga. Outras proteínas recombinantes como a LigA, LipL32, TlyC, LIC11399 e LIC13435 de *L. interrogans* foram testadas e o soro não reconheceu cruzadamente outra proteína recombinante de *L. interrogans*.

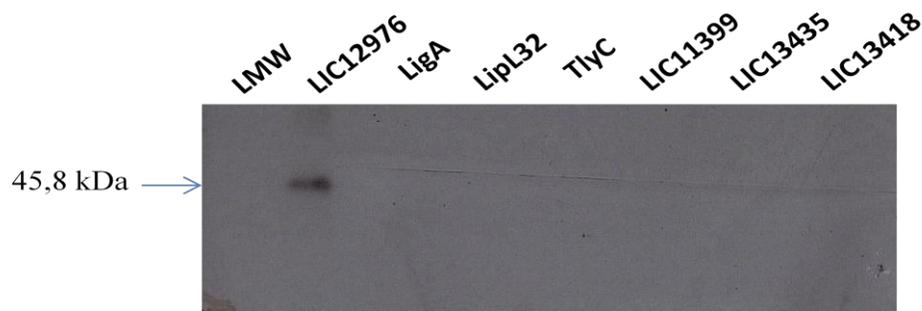


Figura 41. Soro policlonal gerado contra LIC12976 é específico contra a proteína homóloga recombinante. Outras proteínas recombinantes foram testadas como LigA, LipL32, TlyC, LIC11399, LIC13435, LIC13418.

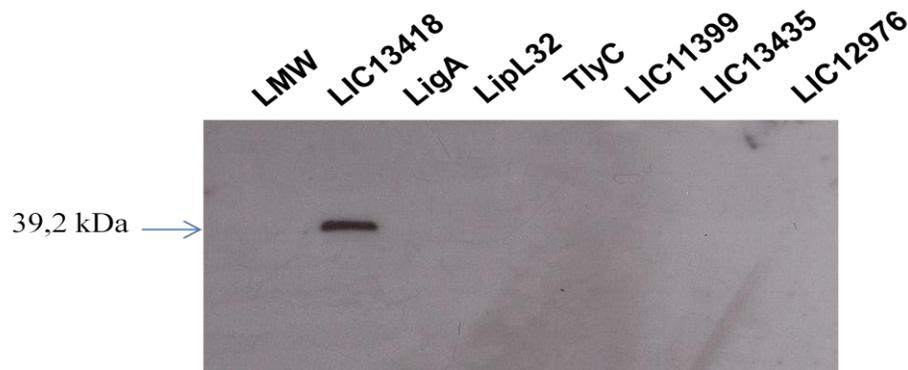


Figura 42. Soro policlonal gerado contra LIC13418 é específico contra a proteína homóloga recombinante. Outras proteínas recombinantes foram testadas como LigA, LipL32, TlyC, LIC11399, LIC13435, LIC12976.

Foi verificado que a LIC12976 é expressa em *L. interrogans* sorovares virulentos e não no sorovar Patoc de *L. biflexa* (Figura 43), enquanto foi possível verificar que a LIC13418 é expressa em cultura *in vitro* de segunda passagem de *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (Figura 44), cultura considerada virulenta.

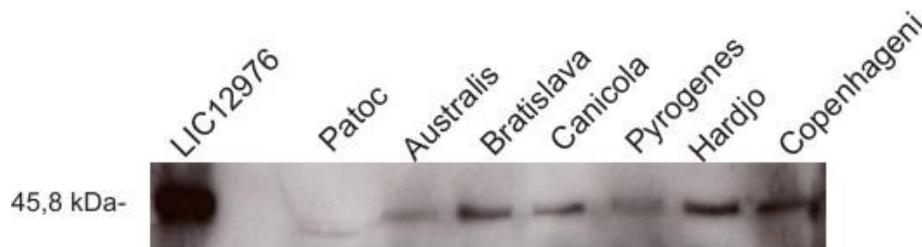


Figura 43. Presença da proteína LIC12976 em sorovares de *L. interrogans*. Soro produzido em camundongos imunizados com a LIC12976 reage com a proteína nativa presente no extrato de *L. interrogans* dos sorovares Australis, Bratislava, Canicola, Pyrogenes, Hardjo e Copenhageni, mas não é capaz de reconhecer no extrato de *L. biflexa* sorovar Patoc. O soro também reage com a LIC12976 recombinante.



Figura 44. LIC13418 é expressa em *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130.

4.10. Ensaio de ligação das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418: células, ECM e proteínas plasmáticas.

O ensaio de adesão das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418 às células, aos componentes de matriz extracelular e às proteínas plasmáticas imobilizadas demonstrou que estas proteínas foram capazes de se ligar às células A31, LLC-PK1 e Vero (Figuras 45 e 46) e ao componente de matriz laminina (Figuras 47 e 48). As proteínas recombinantes TlyC (Carvalho et

al., 2009) e LIC13435 (Hashimoto et al., 2011) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente (dados não mostrados).

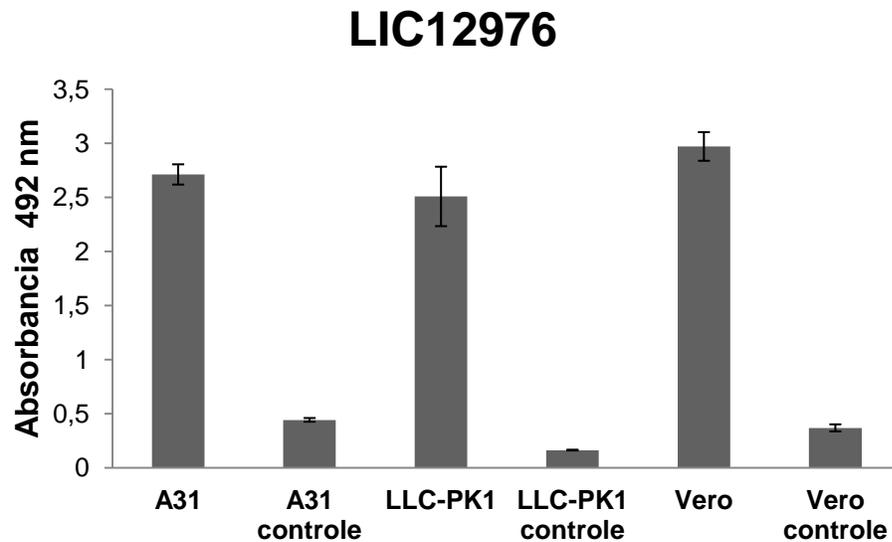


Figura 45. Adesão da proteína recombinante LIC12976 à células. As células A31, LLC-PK1 e Vero foram aderidas a placa de cultura de 96 poços e incubadas com um μg de proteína recombinante. No controle, as células A31, LLC-PK1 e Vero foram incubadas com os anticorpos primário e secundário somente, sem a proteína recombinante. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA.

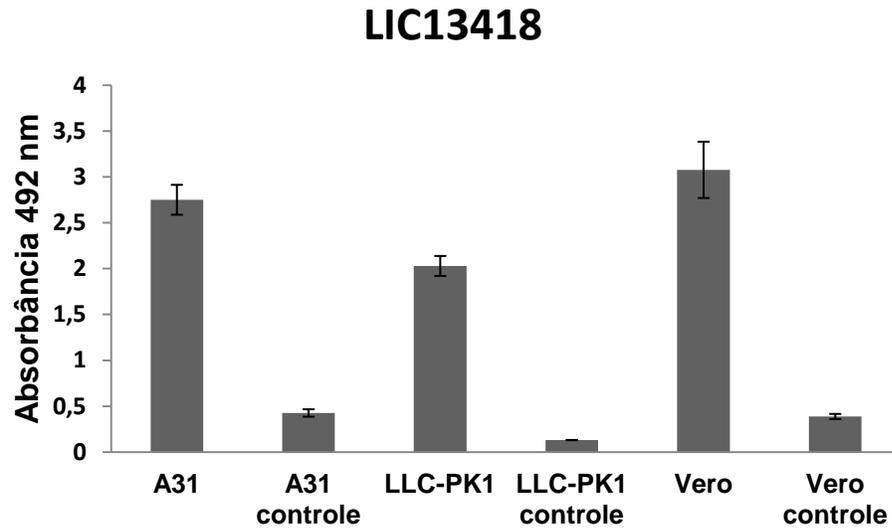


Figura 46. Adesão da proteína recombinante LIC13418 à células. As células A31, LLC-PK1 e Vero foram aderidas a placa de cultura de 96 poços e incubadas com um μg de proteína recombinante. No controle, as células A31, LLC-PK1 e Vero foram incubadas com os anticorpos primário e secundário somente, sem a proteína recombinante. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA.

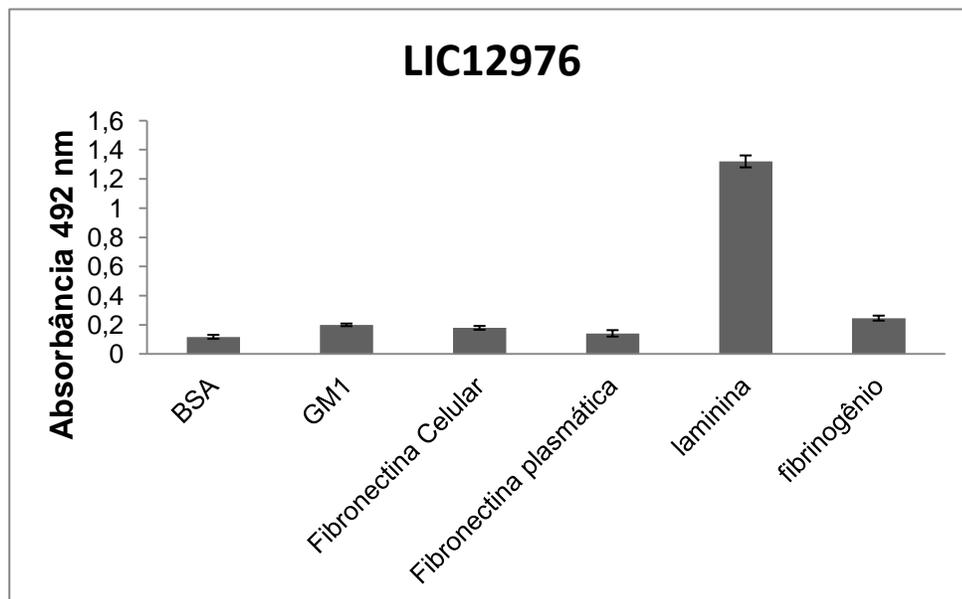


Figura 47. Adesão da proteína recombinante LIC12976 aos componentes da matriz extracelular e a proteínas plasmáticas. Um μg de BSA, GM1, fibronectina plasmática, fibronectina celular, fibrinogênio e laminina foram usados para revestir microplacas de 96 poços. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA.

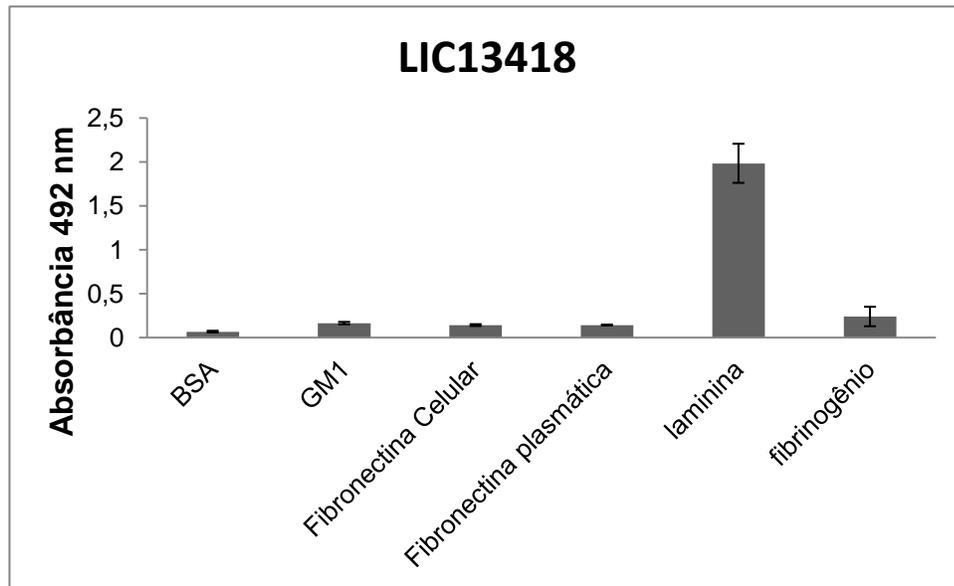


Figura 48. Adesão da proteína recombinante LIC13418 aos componentes da matriz extracelular e a proteínas plasmáticas. Um μg de BSA, GM1, fibronectina plasmática, fibronectina celular, fibrinogênio e laminina foram usados para revestir microplacas de 96 poços. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA.

4.11. Ensaio de interferência com laminina em células de mamíferos

Ensaio de interferência foi utilizado para investigar se laminina é capaz de interferir com a ligação das proteínas recombinantes, LIC12976 e LIC13418, às células A31, LLC-PK1 ou Vero. Para esse propósito, diferentes concentrações de laminina (0 μg , 0,5 μg , 1,0 μg e 5 μg) foram utilizadas e observou-se um aumento de adesão das proteínas recombinantes às células (Figuras 49 e 51). Quando o experimento foi revelado com soro anti-laminina, foi observado que a laminina adicionada às culturas foi capaz de se ligar a células, provavelmente resultando num aumento da ligação das proteínas recombinantes, uma vez que estas se ligam a laminina (Figuras 50 e 52).

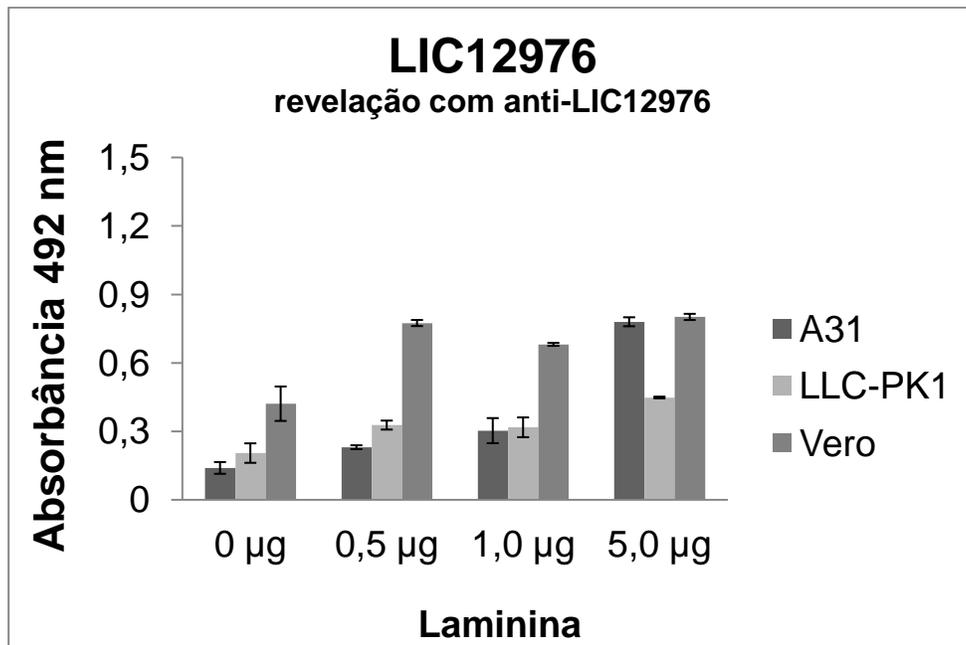


Figura 49. Adesão da proteína recombinante LIC12976 às células em ensaio de interferência com laminina. Quantidades crescentes de laminina (0,5 µg, 1,0 µg, 5 µg) foram incubadas com um µg de proteína recombinante. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA usando o soro anti-LIC12976.

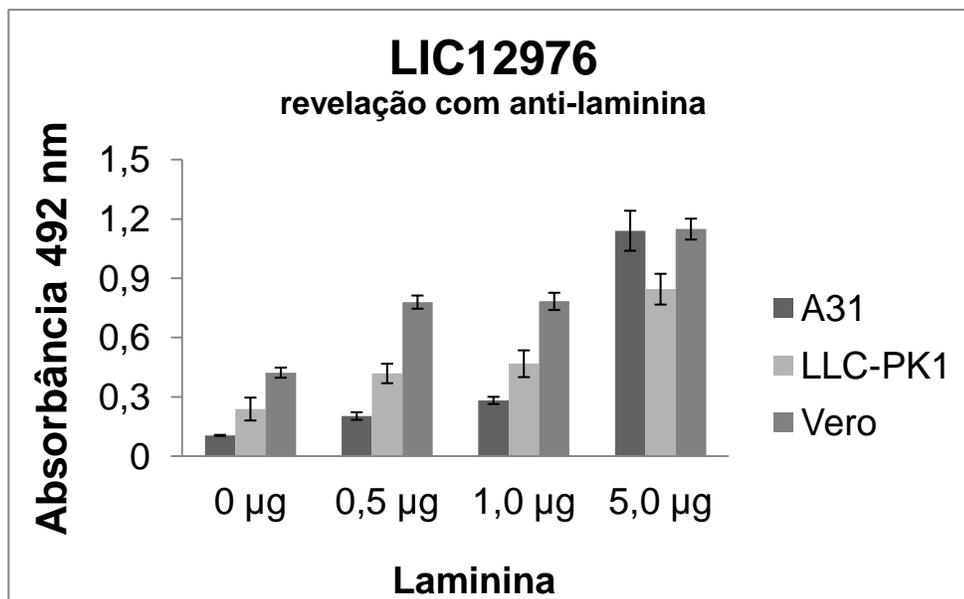


Figura 50. Adesão da laminina às células em ensaio de interferência com laminina. Quantidades crescentes de laminina (0,5 µg, 1,0 µg, 5 µg) foram incubadas com um µg da LIC12976 recombinante. A detecção da adesão da laminina foi realizada pelo método de ELISA usando soro anti-laminina.

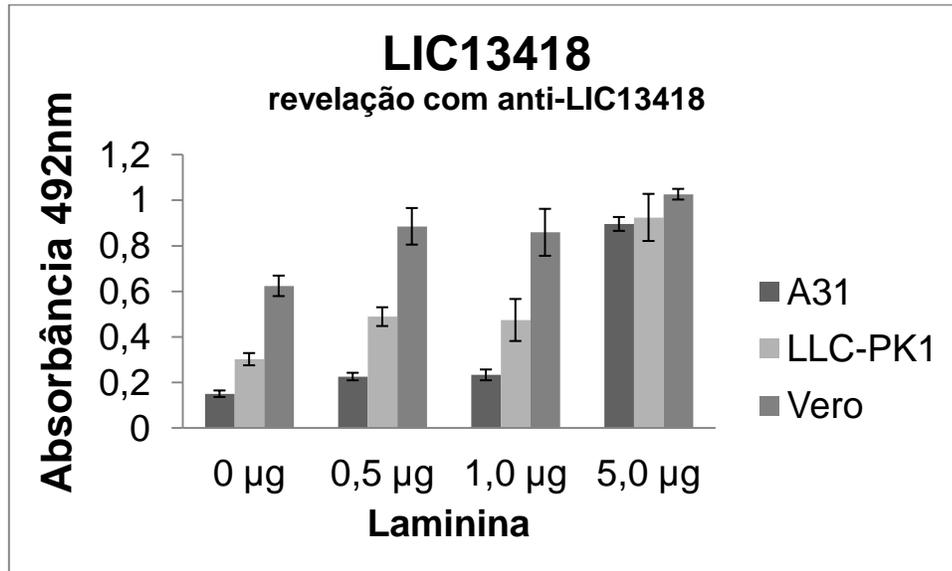


Figura 51. Adesão da proteína recombinante LIC13418 às células em ensaio de interferência com laminina. Quantidades crescentes de laminina (0,5 µg, 1,0 µg, 5 µg) foram incubadas com um µg de proteína recombinante. A detecção da adesão da proteína recombinante foi realizada pelo método de ELISA usando o soro anti-LIC13418.

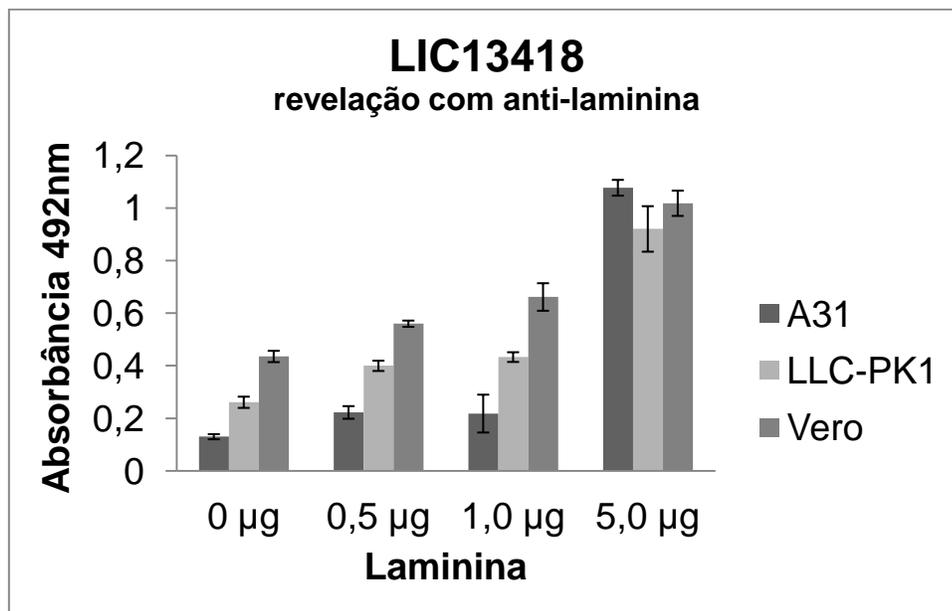


Figura 52. Adesão da laminina às células em ensaio de interferência com laminina. Quantidades crescentes de laminina (0,5 µg, 1,0 µg, 5 µg) foram incubadas com um µg da LIC13418 recombinante. A detecção da adesão da laminina foi realizada pelo método de ELISA usando soro anti-laminina.

4.12. Verificação da expressão da LIC12976 e LIC13418 na superfície celular de *Leptospira*.

A localização celular da LIC12976 nativa foi realizada por imunofluorescência utilizando soro policlonal anti-LIC12976 e células de *L. interrogans* sorovar Copenhageni não permeabilizadas. Como pode ser observado na Figura 53, o anti-soro se ligou a superfície da bactéria num padrão de pontilhado que sugere que a LIC12976 está localizada em porções especiais da superfície bacteriana. Esse resultado não parece ser um artefato desde que é reprodutível e a presença desses pontos está quase sempre associada com a presença da bactéria. Anti-soro anti-LipL32 e anti-soro não imune foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente.

A localização celular da LIC13418 foi visualizada por microscopia eletrônica, onde a cultura de *L. interrogans* foi incubada com anti-LIC13418, anti-LipL32 (controle positivo) e soro pré-imune (controle negativo). Como pode ser observado na figura 54, partículas de ouro foram ligadas a superfície da bactéria provando que a LIC13418 assim como a LipL32 se localiza na superfície celular.

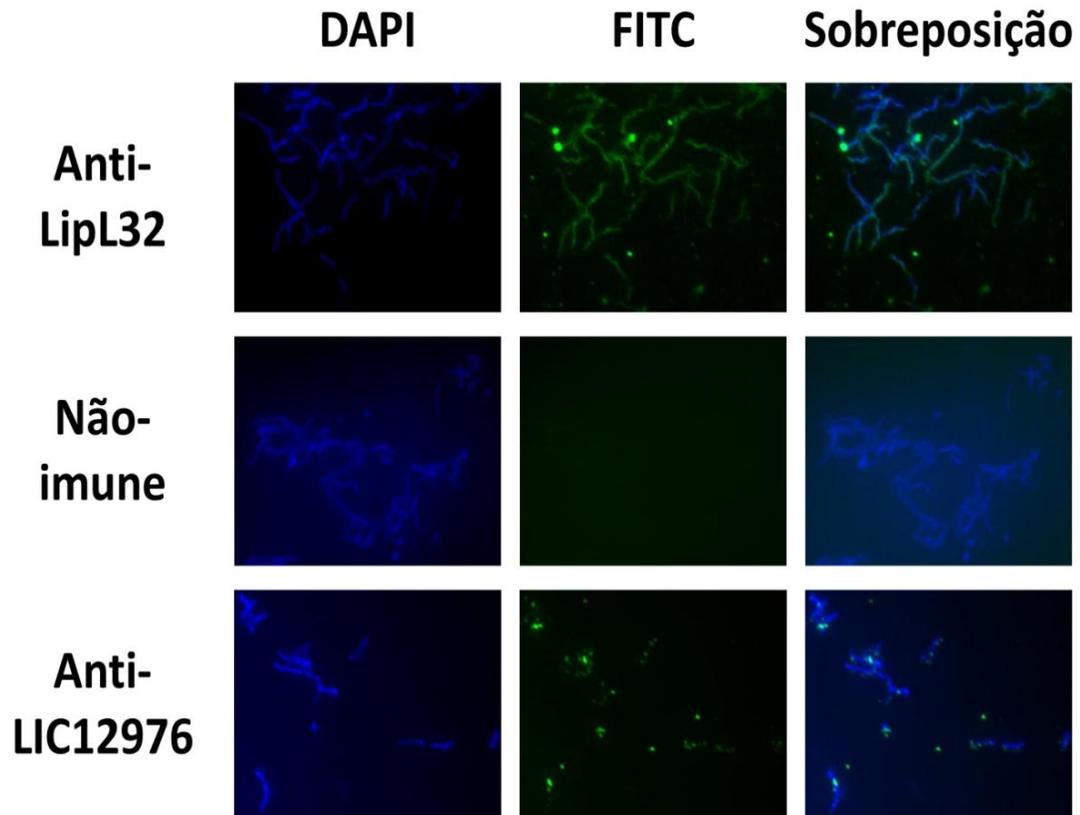


Figura 53. Detecção da LIC12976 e da LipL32 na superfície de *L. interrogans* por imunofluorescência. Soro não imune foi utilizado como controle negativo. Aumento de 1000X.

4.13. Ensaio de desafio animal

Para avaliar o potencial das proteínas recombinantes LIC12976 e LIC13418 como candidatas vacinais contra a leptospirose, hamsters foram imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Foi observado que a LIC12976 e a LIC13418 não foram antígenos protetores (Figuras 55 e 56) em contraste com a proteína recombinante LigAC e a vacina comercial (bacterina) - FarrowSure®B da Pfizer para uso em suínos. Vacina contra erisipela, leptospirose e parvovirose. Os sorovares Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona inativadas quimicamente compõem a vacina - usadas como controle positivo.

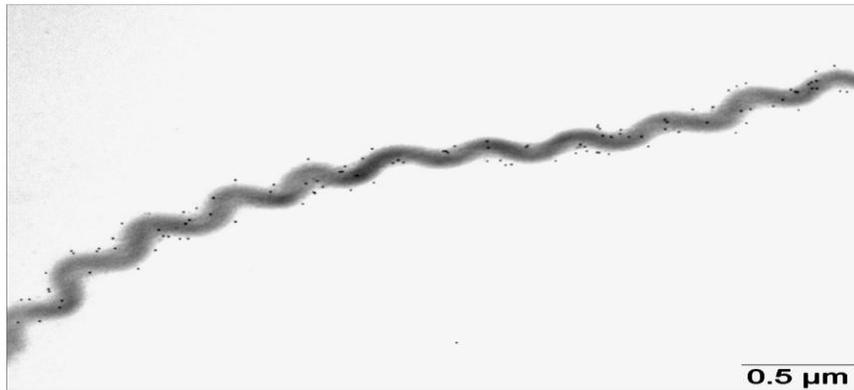
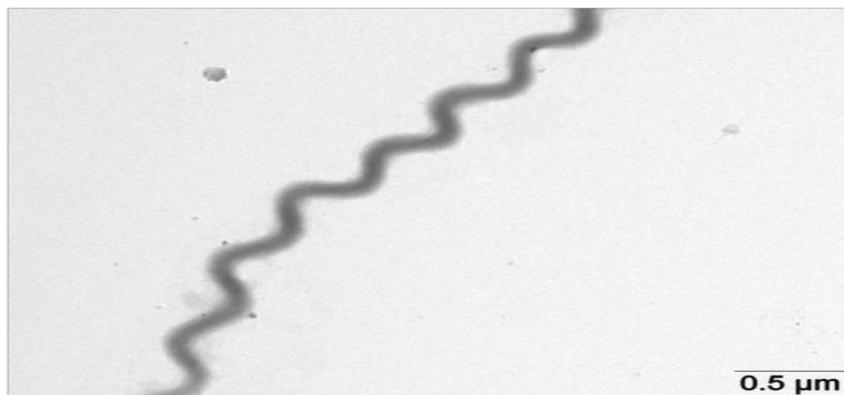
A. Anti-LipL32**B. Anti-LIC13418****C. Não-imune**

Figura 54. Detecção da expressão de LIC13418 na superfície de *L. interrogans* por microscopia eletrônica, partículas de ouro se ligaram a superfície das Leptospiras. A bactéria foi tratada com anti-LipL32, usado como controle positivo (A), anti-LIC13418 (B) e soro não imune utilizado como controle negativo (C).

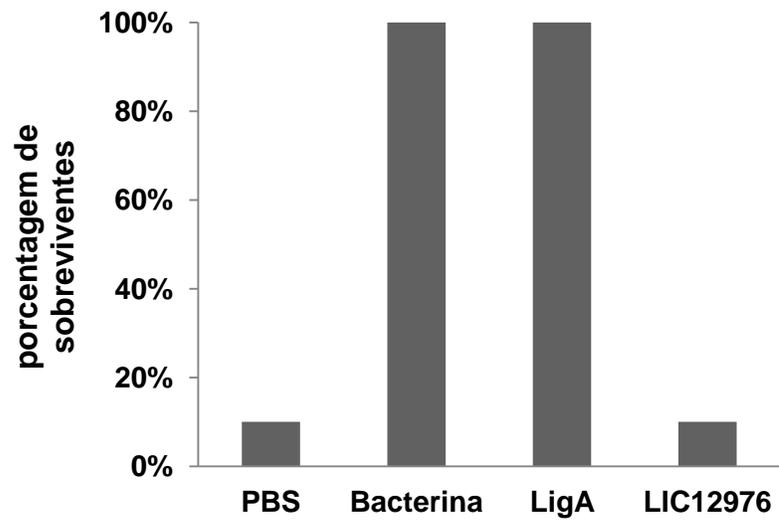


Figura 55. Porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters vacinados com PBS, bacterina (Vacina comercial), LigA e LIC12976.

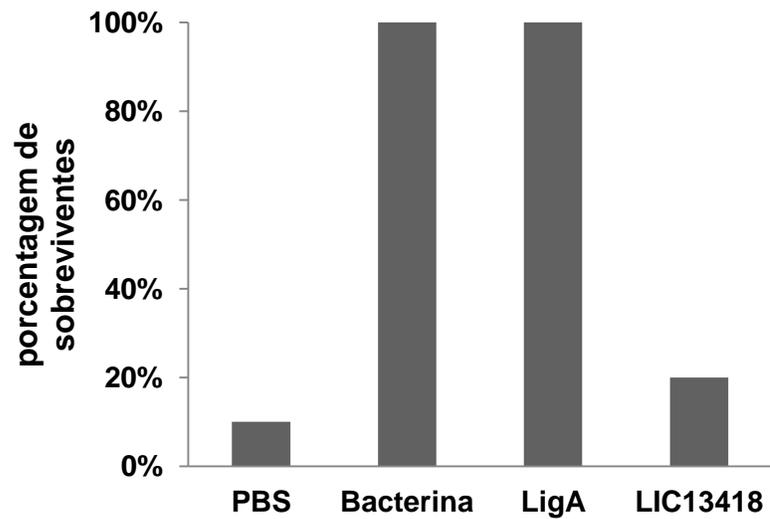


Figura 56. Porcentagem de sobrevivência dos grupos de hamsters vacinados com PBS, bacterina (Vacina comercial), LigA e LIC13418.

5. DISCUSSÃO

Neste tipo de abordagem experimental de shotgun phage display, teoricamente todos os genes do cromossomo bacteriano estão representados na biblioteca construída. Esta técnica está sendo utilizada para identificar adesinas e proteínas extracelulares em diversas bactérias (Antonara et al., 2007; Beckmann et al., 2002; Bjerketorp et al., 2002; Bjerketorp et al., 2004; Jankovic et al., 2007; Mullen et al., 2007; Munoz-Provencio and Monedero, 2011; Nilsson et al., 2004a; Nilsson et al., 2004b; Nilsson et al., 1998; Rosander et al., 2002; Rosander et al., 2003; Rosander et al., 2010; Shkoporov et al., 2008; Wall et al., 2003; Williams et al., 2002b).

Neste trabalho utilizamos os fagomídeos pG8SAET e PG3DSS para a construção de quatro bibliotecas genômicas (BBT1, BBT2, BBT5 e BBT6).

O fagomídeo pG8SAET (Jacobsson et al., 2003; Zhang et al., 1999) possui o promotor e o peptídeo sinal derivado do gene *Staphylococcal protein A* (Spa) e o sítio de clonagem *SnaBI/NcoI* anterior ao E-tag fusionado ao gene pVIII. A presença do peptídeo sinal é requerida para que a proteína de fusão seja endereçada ao periplasma, local em que a partícula viral é montada. O peptídeo sinal e o E-tag não estão na mesma fase aberta de leitura, assim a inserção de um fragmento de DNA é requerido para a expressão da proteína de fusão/E-tag/pVIII. O E-tag codifica para 15 aminoácidos reconhecidos por anticorpo monoclonal e desta forma permite o monitoramento do enriquecimento de clones corretos após ciclos consecutivos de *panning*, além de permitir a purificação da proteína recombinante. O fagomídeo pG3DSS (Rosander et al., 2002) é derivado do pG8SAET, o qual apresenta os polipeptídios clonados fusionados ao gene III (o gene da proteína III substitui o gene da pVIII).

As taxas de cobertura de genoma são variáveis. A biblioteca genômica construída a partir de DNA de *Streptococcus agalactiae* obteve 4×10^6 clones individuais, fato que permitiu uma cobertura do genoma de pelo menos 200 vezes (Beckmann et al., 2002). Segundo Shkoporov e

colaboradores (Shkoporov et al., 2008), o mesmo título primário obtido para *S. agalactiae*, foi suficiente para representar todas as ORFs presentes no genoma de *Bifidobacterium longum*.

Seria interessante uma maior cobertura do genoma, pois nem todos os clones replicam-se igualmente e a expressão de certas proteínas de fusão pode ser tóxica para *E. coli*. Além disso, a apresentação destas proteínas depende de fatores como a compatibilidade com a maquinaria de secreção, a presença e manutenção do polipeptídeo no espaço periplasmático e a taxa de incorporação ao capsídeo viral. Todos estes fatores podem contribuir para uma representação reduzida de certos clones na biblioteca (Rosander, 2004). Em geral, uma grande diversidade da biblioteca permite o sucesso na seleção de ligantes com afinidade alta (Bratkovic, 2010).

Como o resultado do *panning* depende diretamente da qualidade da biblioteca (Arap, 2005), durante os experimentos de *panning* não foi possível observar um enriquecimento no número de clones obtidos após os quatro ciclos de seleção. O resultado esperado para este tipo de experimento seria um aumento no número de fagos recuperados após cada ciclo, assim os fagos adsorvidos no ciclo IV de seleção deveriam ter a maior contagem de UFC (Beckmann et al., 2002; Bjerketorp et al., 2002; Williams et al., 2002b). Esse não enriquecimento também foi verificado por Mullen e colaboradores (Mullen et al., 2007), ao avaliarem o número de fagos ligados ao fim de três ciclos consecutivos em cinco experimentos de *panning* diferentes com bibliotecas de shotgun phage display construídas a partir de DNA genômico de bactérias da família *Pasteurellaceae* (*Haemophilus influenzae* versus componentes da matriz extracelular-ECM; *Pasteurella multocida* versus BSA e ECM; *Actinobacillus actinomycetemcomitans* versus BSA e *Aggregatibacter pleuropneumoniae* versus fibronectina).

Além do tamanho da biblioteca e dos fragmentos clonados, outros fatores podem afetar o procedimento de *panning* tais como a condição de eluição e as características do ligante (substrato), como quantidade, qualidade e pureza (Jacobsson et al., 2003), o que justificaria o não

enriquecimento em número de partículas virais após sucessivos ciclos, pois o fato de haver várias lavagens manuais poderia promover uma redução tanto de proteínas quanto das células aderidas em proporções desiguais ao longo dos ciclos. Deste modo, a variação na quantidade do ligante aderido poderia afetar a quantidade de fagos recuperados.

Além disso, para eliminar a seleção de fagos não específicos às células, primeiramente foi permitida a ligação da biblioteca com BSA e SFB imobilizados, assim após *screening* negativo, permaneceriam os fagos capazes de ligar especificamente às células (Pande et al., 2010).

Nos três ensaios executados com a BBT5 (SFB, células A31 e Vero), construída no vetor pG3DSS, um grande número de clones com orientação incorreta foi recuperado. Esse problema poderia ser reduzido com o uso de anticorpo monoclonal, o qual reconhece os 15 aminoácidos codificados pelo E-tag quando este se encontra em fase com a proteína de fusão, assim clones reconhecidos pelo anticorpo (positivos para E-tag), provavelmente codificariam para proteínas reais presentes no genoma de *L. interrogans* (Jacobsson et al., 2003; Rosander et al., 2002).

Segundo Rosander e colaboradores (2002), após o *panning* da biblioteca contra o anticorpo monoclonal anti E-tag, a maioria dos fagos selecionados apresentam fragmentos clonados em fase com a proteína pIII. Em 2003, Rosander e colaboradores durante a identificação de proteínas presentes na superfície celular da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* usando esta mesma técnica demonstraram que somente o primeiro ciclo de *panning* era suficiente para obter cerca de 90 % de clones corretos (em fase com a proteína de fusão). Bjerketorp e colaboradores (2004), após o primeiro *panning* contra anticorpo anti E-tag, mostraram que aproximadamente 50 % dos clones estavam corretos e somente um clone que não estava em fase com o vetor foi verificado após o sequenciamento do segundo e terceiro ciclos. Entretanto, esta ferramenta não foi utilizada nestes ensaios, pois não dispúnhamos do reagente devido à parada de comercialização do mesmo pela Amersham (GE Healthcare Life Sciences). Algum tempo depois,

obtivemos o anticorpo monoclonal da empresa Abnova, mas após o procedimento de *panning* contra este substrato ainda recuperávamos grande parte dos fagos da biblioteca na orientação incorreta (dados não mostrados).

Devido a estes problemas, a técnica BRASIL (Giordano et al., 2001), que objetiva a diminuição de fagos inespecificamente ligados no procedimento de *panning*, com modificações, foi introduzida nos experimentos com a célula LLC-PK1. Optou-se por um segundo passo de seleção em LLC-PK1 sem amplificação, para evitar que fagos inespecíficos fossem selecionados (Markland et al., 1996).

Mesmo com os problemas encontrados durante a execução da técnica de shotgun phage display foram selecionados quatro clones: a LIC11719, LIC10769, LIC13143 e LIC12976.

Decidimos não trabalhar com os clones LIC11719 e LIC13143 (TlyC). O primeiro, mesmo tendo enriquecido em número de sequências, inferimos se tratar de uma proteína citoplasmática. A TlyC também não foi escolhida por se tratar de uma adesina já caracterizada por nosso grupo, onde Carvalho e colaboradores (Carvalho et al., 2009) mostraram que a TlyC está presente na superfície celular de *L. interrogans* e é capaz de se ligar a componentes de matriz extracelular, mas não apresenta atividade hemolítica como predito.

Dentre os clones obtidos pela técnica de shotgun phage display decidimos iniciar os estudos com a LIC10769 e com a LIC12976. Além disso, selecionamos a LIC13418 devido a suas características como proteína com função desconhecida, mas predita como presente na membrana externa (Viratyosin et al., 2008). Considera-se que as Leptospiras possuem um mecanismo de virulência único, pois há ausência de fatores de virulência homólogos a outras espécies e os genes com função desconhecida representam 60 % do conjunto de genes específicos de *L. interrogans* (Adler et al., 2011). Nesse contexto, a sequência completa do genoma bacteriano representa um vasto reservatório de genes que codificam potenciais antígenos, em

geral, proteínas expostas na superfície celular, que podem ser selecionados e testados como candidatos vacinais (Serruto et al., 2009). Recentemente, visando o melhor entendimento da patogenicidade, os genomas de mais duas espécies de *Leptospira*, *Leptospira santarosai* pertencente ao subgrupo das patogênicas e a *Leptospira licerasiae* do subgrupo intermediário foram sequenciados (Chou et al., 2012; Ricaldi et al., 2012).

A LIC10769 é uma metaloprotease de processamento e pertence à família de peptidases M16, subfamília M16B. No genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, *upstream* ao gene da LIC10769, está a LIC10768 também uma metaloprotease da família M16 e as duas, provavelmente, são expressas em uma única unidade transcricional.

Em eucariotos, são conhecidas como proteases de processamento, pois clivam a sequência sinal de proteínas transportadas para mitocôndria e cloroplasto. Mas em procariotos, a função biológica das proteínas que pertencem a essa subfamília é desconhecida. A família M16 é subdividida em três subfamílias de acordo com a estrutura primária. Os membros das subfamílias M16 A e C possuem aproximadamente 100 kDa com 4 domínios presentes em uma única cadeia polipeptídica e os representantes da subfamília M16B formam heterodímero e cada monômero tem aproximadamente 50 kDa. A subunidade β possui motivo de ligação a zinco e a subunidade α possui um loop rico em glicina no domínio C-terminal. Entre as enzimas que faltam o loop rico em glicina encontra-se o par R/Y conservado, presente, em geral, em proteínas de procariotos (Aleshin et al., 2009; Ohtsuka et al., 2009).

Semelhante a organização predita dos genes LIC10768 e LIC10769 em *L. interrogans*, a bactéria *Sphingomonas* sp. possui dois genes presentes numa mesma unidade transcricional que codificam metaloproteases pertencentes a subfamília M16B, a SPH2681 (48 kDa cell surface protein), proteína periplasmática com motivo HXXEH de ligação a zinco e que não exibe atividade como monômero e a SPH2682 que não possui motivo de ligação a zinco e conserva o

par R/Y no sítio ativo (domínio C-terminal). Somente o heterodímero formado pelas proteínas SPH2681 e SPH2682 é ativo (Maruyama et al., 2011).

A LIC12976 selecionada pela metodologia BRASIL é uma provável lipoproteína contendo lipobox (Setubal et al., 2006). A LIC12976 também foi selecionada em *panning in vivo* contra rim de hamster pela aluna de doutorado Ana Tung Ching Ching. Lipoproteínas bacterianas são um conjunto de proteínas de membrana com muitas funções diferentes, localizam-se em sua maioria na face periplasmática ou na membrana externa de bactérias gram-negativas e muitas vezes são requeridas para a virulência de inúmeras bactérias patogênicas, nas quais desempenham uma série de papéis na interação patógeno-hospedeiro que vão desde a adesão a superfície do hospedeiro com indução de processos inflamatórios até a translocação de fatores de virulência para o interior do citoplasma da célula hospedeira (Kovacs-Simon et al., 2011). Para *Leptospiras*, as lipoproteínas têm papel estrutural e funcional importantes, pois podem ser enzimas, transportadores, adesinas, toxinas entre outras proteínas essenciais para a virulência da bactéria (Madan Babu and Sankaran, 2002). O genoma de *Leptospira* spp codifica mais lipoproteínas que genomas de bactérias não espiroquetas (Ko et al., 2009), são as proteínas mais abundantes nas membranas desses organismos (Haake, 2000). Diante disso, tem-se um grande interesse no desenvolvimento de vacinas de subunidade usando lipoproteínas recombinantes para prevenir a doença (Haake, 2000; Wang et al., 2007).

A extração do DNA de diferentes sorovares seguida da técnica de PCR permite a análise da conservação dos genes como LIC10768, LIC10769, LIC12976 e LIC13418, mostrando que são conservados em todos os sorovares patogênicos testados, mas não conservados na linhagem de vida livre *L. biflexa* mesmo com os ortólogos estando presentes. Esse tipo de abordagem é especialmente importante quando se objetiva a produção de vacina (Hashimoto et al., 2011), pois sabe-se que há uma grande diversidade de composição antigênica entre os sorovares de *L.*

interrogans (Levett, 2001). Nesse contexto, a proteína de membrana Loa22 que demonstrou ser importante para a virulência em modelo animal também está presente no genoma de *L. biflexa* (Picardeau et al., 2008; Ristow et al., 2007). A adesina Lsa27 mostrou-se conservada somente nos sorovares Copenhageni e Icterohemorrhagiae não estando presente no genoma de *L. biflexa* (Longhi et al., 2009). A mesma técnica demonstrou que os genes LIC10368 e LIC12099 que codificam para Lsa21 e LipL53, respectivamente, estão presentes somente nos sorovares patogênicos (Atzingen et al., 2008; Oliveira et al., 2010).

A LIC12976 e a LIC13418 foram clonadas e expressas na forma de corpúsculo de inclusão. *E. coli* é a bactéria mais usada como hospedeiro para a expressão de proteínas recombinantes, devido as facilidades do sistema de expressão como a relativa simplicidade, baixo custo, obtenção de altas densidades bacterianas, ao conhecimento da genética dessa bactéria e ao grande número de ferramentas moleculares disponíveis para este organismo. Em contrapartida, a expressão de proteínas recombinantes neste hospedeiro pode levar a formação de proteínas insolúveis em corpúsculos de inclusão (Sorensen and Mortensen, 2005). Quando os corpúsculos de inclusão são formados, a sua solubilização é difícil e requer agentes caotrópicos como a uréia (Sorensen et al., 2004). A renaturação é iniciada pela redução da concentração do agente desnaturante, transferindo-se as moléculas de proteína para um tampão sem o agente desnaturante (Tsumoto et al., 2003).

Mesmo a expressão sendo em corpúsculo de inclusão, essas proteínas foram possivelmente renaturadas por diluição e utilizadas para a imunização de camundongos. O potencial antigênico das proteínas foi avaliado pela técnica de ELISA demonstrando que são altamente imunogênicas uma vez que a resposta humoral foi alta além de específica, pois os soros não foram capazes de reconhecer outras proteínas recombinantes de *L. interrogans* como demonstrado por Hashimoto e colaboradores (2011) com a rLIC13435.

Pela técnica de *Western Blot* foi verificado que a LIC12976 é expressa em todos sorovares virulentos de *L. interrogans* testados e a LIC13418 é expressa no sorovar Copenhageni de *L. interrogans*. Nos ensaios de *Western Blot* realizados utilizando diferentes sorovares de *L. interrogans* não foi possível verificar se a LIC13418 é também expressa nos outros sorovares e se o seu tamanho é maior que a observada para *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Essa técnica também foi utilizada para demonstrar que Lsa63, uma adesina de *L. interrogans*, mesmo tendo ortólogo no genoma de *L. biflexa* com 39 % de identidade, mostrou-se expressa e conservada somente em extratos de proteínas totais dos sorovares virulentos (Vieira et al., 2010), e que os soros produzidos contra LipL32 e seus fragmentos são capazes de reconhecer a proteína nativa somente em extratos proteicos virulentos corroborando com o fato de *L. biflexa* não apresentar este gene em seu genoma (Hauk et al., 2008; Picardeau et al., 2008). TlyB mas não TlyC foi identificada na espécie saprofítica, mesmo os genes estando presentes no genoma dessa espécie (Carvalho et al., 2009). Também com esta técnica foi verificado que a OmpL37 é expressa somente nos sorovares de espécies patogênicas (Pinne et al., 2010).

Em ensaio de localização celular usando técnicas de microscopia como imunofluorescência e eletrônica observamos que *L. interrogans* apresenta as proteínas LIC12976 e LIC13418 nativas na sua superfície. A LipL32 foi utilizada como controle positivo por se localizar na membrana externa em múltiplas cópias (Hauk et al., 2008). Utilizando técnicas similares, outras proteínas também foram confirmadas estarem presentes na superfície bacteriana como OmpL1, LenA, LenD, Loa22 (Ko et al., 2009), TlyC (Carvalho et al., 2009), Lsa63 (Vieira et al., 2010), Lsa30 (Souza et al., 2012), Lsa27 (Longhi et al., 2009), Lsa21 (Atzingen et al., 2008), LipL53 (Oliveira et al., 2010).

Como a LIC12976 e a LIC13418 localizam-se na superfície celular de *L. interrogans* serovar Copenhageni, nós fomos avaliar a capacidade de interação com o hospedeiro.

Em ensaio de adesão foi verificado que tanto a LIC12976 quanto a LIC13418 são capazes de ligarem-se as células A31, LLC-PK1 e Vero e especificamente a laminina. A adesão da bactéria ao tecido hospedeiro é um fator de extrema importância para o desenvolvimento da infecção e em bactérias a molécula laminina serve como substrato para essa adesão (Mecham, 1991). Muitas adesinas de *L. interrogans* foram caracterizadas pela capacidade de ligação ao componente de matriz extracelular laminina (Atzingen et al., 2008; Atzingen et al., 2009; Barbosa et al., 2006; Carvalho et al., 2009; Longhi et al., 2009; Mendes et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2010; Pinne et al., 2010; Souza et al., 2012; Vieira et al., 2010). Essa grande quantidade de adesinas identificadas pode representar um processo redundante de interação com o hospedeiro para assegurar o sucesso durante a infecção.

No ensaio de interferência com laminina observou-se que as proteínas recombinantes se aderem mais às células quanto mais laminina estava presente, indicando que a LIC12976 e a LIC13418 se aderem a laminina em solução e esta por sua vez se adere à superfície das células imobilizadas na placa. Isso pode ser explicado devido à capacidade das moléculas de laminina se aderir a várias superfícies celulares por meio de receptores como é o caso das integrinas, as moléculas mais bem caracterizadas receptoras de matriz extracelular (Mecham, 1991; Singh et al., 2012).

In vitro, foi demonstrado que a *L. interrogans* é capaz de se ligar mais eficientemente a células que aos componentes da matriz extracelular (Breiner et al., 2009). Além disso, leptospiros patogênicas ao contrário da não patogênica se aderem ou entram mais eficientemente nas células epiteliais renais, endoteliais, fibroblastos e macrófagos (Breiner et al., 2009; Yang, 2007). São capazes de penetrar em células do hospedeiro e translocar através das monocamadas de células polarizadas. Não são consideradas patógenos intracelulares, há somente uma passagem transiente no interior das células cujo processo de entrada é desconhecido e não obrigatório. As leptospiros

internalizadas são observadas no citoplasma e dentro de compartimentos fagossomais sugerindo um mecanismo de propagação para órgãos alvo e de evasão do sistema imune (Ko et al., 2009; Toma et al., 2011).

Mesmo assim, os mecanismos de virulência e a biologia do agente causador da leptospirose permanecem desconhecidos, fatores de virulência identificados até o momento, como é o caso da LIC12976 e LIC13418, são em geral proteínas de superfície que medeiam a interação da bactéria com o tecido hospedeiro (Ko et al., 2009). Sabe-se que após penetração no organismo do hospedeiro e disseminação no sistema circulatório, as bactérias se espalham através das junções intercelulares. O rim é o principal órgão alvo da bactéria na infecção aguda e na infecção crônica, leptospiras podem colonizar e persistir no túbulo proximal levando a nefrite crônica e fibrose (Yang, 2007).

As vacinas desenvolvidas para leptospira possuem baixa eficácia, são sorovar específicas e a imunidade passageira (Hashimoto et al., 2011) havendo necessidade de revacinação anual (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). Assim, devido ao grande número de casos de leptospirose torna-se emergencial o desenvolvimento de vacina que possa prevenir a doença, nesse sentido proteínas recombinantes de *Leptospira* têm sido testadas como candidatas vacinais, entre elas tem-se maior interesse pelas lipoproteínas, proteínas de membrana externa e fatores de virulência (Vijayachari et al., 2008). Como exemplo, tem-se a co-administração da OmpL1 e LipL41 que exibem um sinergismo e levam a 71 % de imunoproteção (Haake et al., 1999), a OmpL1 também foi testada como vacina de DNA levando a um retardamento do tempo de morte (Maneewatch et al., 2007). A LipL32 foi capaz de induzir resposta imune protetora como vacina de DNA (Branger et al., 2005), quando expressa em adenovirus (Branger et al., 2001), como BCG recombinante (Seixas et al., 2007), coadministrada ou fusionada com a subunidade B da enterotoxina termo-lábil de *E. coli* (LTB) (Grassmann et al., 2012), LigA e LigB foram capazes

de induzir resposta imune protetora em modelo murino (Koizumi and Watanabe, 2004). A LigA, porção carboxi-terminal, é um bom controle positivo para ensaios de desafio animal, pois confere até 100 % de proteção aos hamsters desafiados com leptospiras mesmo não sendo esterilizante (Silva et al., 2007). Coutinho e colaboradores (2011) demonstraram que três domínios da proteína LigA conferem imunidade com 100 % de sobrevivência (Coutinho et al., 2011).

No nosso experimento, a LIC12976 e a LIC13418 foram ineficazes como candidatas vacinais em comparação com os 100 % de proteção dos controles positivos bacterina e a proteína recombinante LigAC. Similarmente, a rLIC13435 e as esfingomielinases Sph2 e SphH não foram capazes de gerar proteção em hamsters (Carvalho et al., 2010; Hashimoto et al., 2011) e a adesina LipL53 gerou somente 30 % de sobrevivência em comparação com a bacterina, que neste ensaio, protegeu 80 % dos animais (Oliveira et al., 2010). Com as proteínas recombinantes rLIC12730 e rLIC10494 foi obtida uma imunoproteção parcial não esterilizante (Atzingen et al., 2010).

Este trabalho contribuiu para a identificação das novas adesinas LIC13418 e LIC12976. Esta última usando a técnica de shotgun phage display. Adesinas contribuem para a virulência bacteriana. A ligação à célula hospedeira é uma das mais importantes habilidades para o estabelecimento da doença. Portanto, a pesquisa envolvendo a caracterização de adesinas pode contribuir para o conhecimento da primeira etapa envolvida na interação patógeno-hospedeiro. Além disso, a pesquisa por adesinas pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas que poderiam bloquear o primeiro passo da infecção (adesão celular), prevenindo assim a infecção bacteriana (Wizemann et al., 1999). Infelizmente, nenhuma das duas adesinas caracterizadas neste trabalho teve capacidade protetora em hamsters.

6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho em que bibliotecas de shotgun phage display foram construídas com o objetivo de selecionar adesinas de *L. interrogans* capazes de ligarem-se às células. Deste modo, foi possível construir quatro bibliotecas e a biblioteca BBT5 com maior cobertura do genoma foi utilizada nos experimentos de *panning*.

Apesar dos problemas inerentes da técnica, como a falta de enriquecimento característico, provavelmente devido a presença de fragmentos de DNA genômicos clonados fora de fase com a pIII, a baixa cobertura do genoma e a presença de dois fragmentos gênicos diferentes num mesmo inserto, os clones LIC11719, LIC10769, LIC13143 e LIC12976 foram selecionados. Além disso, a LIC13418 foi incorporada ao trabalho devido suas características como proteína hipotética e possivelmente de membrana externa podendo desempenhar a função de adesina.

Os genes LIC12976, LIC10768, LIC10769 e LIC13418 mostraram-se conservados em diferentes sorovares patogênicos, sendo uma característica importante para o desenvolvimento de vacina.

A expressão heteróloga mesmo em corpúsculo de inclusão, das proteínas LIC12976 e LIC13418 utilizando *E. coli* como hospedeira foi importante para a obtenção de grandes quantidades de proteínas para ensaios biológicos e obtenção de vacina de subunidade.

Estas proteínas se mostraram imunogênicas em camundongos permitindo a obtenção de soros com altos títulos capazes de reconhecer especificamente a proteína recombinante homóloga e a proteína nativa em *L. interrogans*.

A caracterização das proteínas LIC12976 e LIC13418 mostrou que são capazes de ligar a células e especificamente a laminina desempenhando um papel de adesina neste patógeno.

As proteínas foram testadas como vacina de subunidade não sendo observada atividade protetora em animais desafiados com *L. interrogans*.

As proteínas recombinantes e os soros obtidos são ferramentas importantes que poderão auxiliar nos estudos do papel destas proteínas na biologia da interação patógeno-hospedeiro na leptospirose.

7. REFERÊNCIAS

- Adler B, de la Pena Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology* 140(3-4):287-296.
- Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. 2011. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Veterinary microbiology* 153(1-2):73-81.
- Aleshin AE, Gramatikova S, Hura GL, Bobkov A, Strongin AY, Stec B, Tainer JA, Liddington RC, Smith JW. 2009. Crystal and solution structures of a prokaryotic M16B peptidase: an open and shut case. *Structure* 17(11):1465-1475.
- Antonara S, Chafel RM, LaFrance M, Coburn J. 2007. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. *Molecular microbiology* 66(1):262-276.
- Arap WA. 2005. Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology* 28(1):1-9.
- Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Lima DM, Abreu PA, Nascimento AL. 2008. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC microbiology* 8:70.
- Atzingen MV, Gómez RM, Schattner M, Pretre G, Gonçalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2009. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *Journal of Infection* 59(4):264-276.
- Atzingen MV, Goncales AP, de Moraes ZM, Araujo ER, De Brito T, Vasconcellos SA, Nascimento ALTO. 2010. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. *Journal of Medical Microbiology* 59(9):1005-1015.
- Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35(6):425-445.
- Barbas CF. 2001. *Phage display : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1 v. (various pagings) p.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infection and immunity* 74(11):6356-6364.
- Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, Isaac L, Abreu PA. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infection and immunity* 78(7):3207-3216.
- Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE. 2002. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infection and immunity* 70(6):2869-2876.
- Beghetto E, Gargano N. 2011. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. *Molecules* 16(4):3089-3105.
- Benhar I. 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology advances* 19(1):1-33.

- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases* 3(12):757-771.
- Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh A, Flock JI, Jacobsson K, Frykberg L. 2002. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 148(Pt 7):2037-2044.
- Bjerketorp J, Rosander A, Nilsson M, Jacobsson K, Frykberg L. 2004. Sorting a *Staphylococcus aureus* phage display library against ex vivo biomaterial. *J Med Microbiol* 53(Pt 10):945-951.
- Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, Andre-Fontaine G. 2005. Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infection and immunity* 73(7):4062-4069.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski 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. *Infection and immunity* 69(11):6831-6838.
- Bratkovic T. 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci* 67(5):749-767.
- Breiner DD, Fahey M, Salvador R, Novakova J, Coburn J. 2009. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infection and immunity* 77(12):5528-5536.
- Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, Cianciarullo AM, Hauk P, Abreu PA, Fiorini LC, Oliveira ML, Romero EC, Goncales AP, Morais ZM, Vasconcellos SA, Ho PL. 2009. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS letters* 583(8):1381-1385.
- Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, Oliveira ML, Romero EC, Goncales AP, Morais ZM, Vasconcellos SA, Ho PL. 2010. Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases. *Curr Microbiol* 60(2):134-142.
- Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *The Journal of infectious diseases* 205(6):995-1004.
- Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9(5):760-768.
- Ching AT, Fávoro RD, Lima SS, de Alencar Muniz Chaves A, de Lima MA, Nader HB, Abreu PA, Ho PL. 2012. *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW. 2012. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene* 511(2):364-370.

- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and immunity* 75(5):2441-2450.
- Cinco M. 2010. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *New Microbiologica* 33:283-292.
- Clackson T, Lowman HB. 2004. *Phage Display: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, Aleixo JA, Haake DA. 2011. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12):e1422.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, editors. 1999. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci.
- Giordano RJ, Cardo-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. 2001. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nature medicine* 7(11):1249-1253.
- Grassmann AA, Felix SR, dos Santos CX, Amaral MG, Seixas Neto AC, Fagundes MQ, Seixas FK, da Silva EF, Conceicao FR, Dellagostin OA. 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol* 19(5):740-745.
- Haake DA. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146 (Pt 7):1491-1504.
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and immunity* 67(12):6572-6582.
- Hartskeerl RA. 2005. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. *Rev Cubana Med Trop* 57(1):7-10.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17(4):494-501.
- Hashimoto VL, Moraes ZM, Gonçalves AP, Vasconcellos SA. 2011. Failure of LIC13435 Protein of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni to Confer Protection in Immunized Hamsters. *Journal of Vaccines & Vaccination* 02(03).
- Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS, Ho PL. 2008. 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* 76(6):2642-2650.
- Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE, Peters G. 2004. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *Journal of infectious diseases* 190(2):321-329.

- Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and immunity* 76(5):2063-2069.
- Ikoev VN, Gorbunov MA, Vachaev BF, Iagovkin EA, Kondratenko VF, Anan'ina Iu V, Ansimova TI, Kostina NI, Iur'eva IL, Nikitin MG. 1999. [The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(4):39-43.
- Jacobsson K. 2003. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Veterinary microbiology* 96(1):103-113.
- Jacobsson K, Frykberg L. 2001. Shotgun phage display cloning. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 4(2):135-143.
- Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L. 2003. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biological procedures online* 5:123-135.
- Jankovic D, Collett MA, Lubbers MW, Rakonjac J. 2007. Direct selection and phage display of a Gram-positive secretome. *Genome Biol* 8(12):R266.
- Jestin JL. 2008. Functional cloning by phage display. *Biochimie* 90(9):1273-1278.
- Jonsson K, Guo BP, Monstein HJ, Mekalanos JJ, Kronvall G. 2004. Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):1852-1857.
- Kehoe JW, Kay BK. 2005. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev* 105(11):4056-4072.
- Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5(6):580-592.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7(10):736-747.
- Koizumi N, Watanabe H. 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22(11-12):1545-1552.
- Konthur Z, Cramer R. 2003. High-throughput applications of phage display in proteomic analyses. *Targets* 2:261-270.
- Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. 2011. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity* 79(2):548-561.
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews* 14(2):296-326.
- Lin YP, Chang YF. 2007. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 362(2):443-448.
- Lin YP, Chang YF. 2008. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. *J Vet Sci* 9(2):133-144.
- Lin YP, Greenwood A, Nicholson LK, Sharma Y, McDonough SP, Chang YF. 2009a. Fibronectin binds to and induces conformational change in a disordered region of leptospiral immunoglobulin-like protein B. *J Biol Chem* 284(35):23547-23557.
- Lin YP, Greenwood A, Yan W, Nicholson LK, Sharma Y, McDonough SP, Chang YF. 2009b. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira*

- immunoglobulin-like protein, LigB. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389(1):57-62.
- Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF. 2009c. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* 284(29):19380-19391.
- Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF. 2010. The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *. PloS one* 5(6): e11301.
- Lindmark H, Guss B. 1999. SFS, a Novel Fibronectin-Binding Protein from *Streptococcus equi*, Inhibits the Binding between Fibronectin and Collagen. *Infection and immunity* 67(5):2383-2388.
- Linke D, Goldman A. 2011. *Bacterial Adhesion Chemistry, Biology and Physics*. Springer. 374 p.
- Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncales AP, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2009. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol* 58(Pt 10):1275-1282.
- Madan Babu M, Sankaran K. 2002. DOLOP--database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics* 18(4):641-643.
- Maneewatch S, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Klayying B, Tongtawe P, Chaisri U, Songserm T, Wongratanacheewin S, Srimanote P, Chongsa-Niguan M, Chaicumpa W. 2007. OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous *Leptospira* spp. challenge. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 25(1):75-82.
- Markland W, Ley AC, Ladner RC. 1996. Iterative optimization of high-affinity protease inhibitors using phage display. 2. Plasma kallikrein and thrombin. *Biochemistry* 35(24):8058-8067.
- Martínez R, Pérez A, M.C. Q, Cruz R, Álvarez Á, Armesto M, Fernández C, Menéndez J, Rodríguez I, Baró M, Díaz M, Rodríguez J, Sierra G, Obregón AM, Toledo ME, Fernández N. 2004. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Revista Panamericana de Salud Pública* 15:249-255.
- Martins G, Penna B, Hamond C, Leite RC, Silva A, Ferreira A, Brandão F, Oliveira F, Lilenbaum W. 2012. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 44(4):773-777.
- Maruyama Y, Chuma A, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. 2011. Heterosubunit composition and crystal structures of a novel bacterial M16B metallopeptidase. *J Mol Biol* 407(1):180-192.
- Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA. 2007. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infection and immunity* 75(6):2864-2874.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. 2005. Leptospirosis. *Current opinion in infectious diseases* 18(5):376-386.

- Mecham RP. 1991. Laminin receptors. *Annu Rev Cell Biol* 7:71-91.
- Mendes RS, Von Atzingen M, de Moraes ZM, Goncales AP, Serrano SM, Asega AF, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2011. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infection and immunity* 79(11):4657-4667.
- Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G. 2002. Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* 54(1):7-10.
- Mineiro ALBB, Bezerra EEA, Vasconcellos AS, Costa FAL, Macedo NA. 2007. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. *Arq Bras ed Vet Zootec* 59:1103-1109.
- Mohammed H, Nozha C, Hakim K, Abdelaziz F, Rehia B. 2011. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 2(6):1000120.
- Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Henderson B. 2006. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol* 14(3):141-147.
- Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Williams RJ, Henderson B. 2007. Comparative functional genomic analysis of Pasteurellaceae adhesins using phage display. *Veterinary microbiology* 122(1-2):123-134.
- Munoz-Provencio D, Monedero V. 2011. Shotgun phage display of *Lactobacillus casei* BL23 against collagen and fibronectin. *J Microbiol Biotechnol* 21(2):197-203.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of bacteriology* 186(7):2164-2172.
- Niemann HH, Schubert WD, Heinz DW. 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6(1):101-112.
- Nilsson M, Bjerketorp J, Guss B, Frykberg L. 2004a. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS microbiology letters* 241(1):87-93.
- Nilsson M, Bjerketorp J, Wiebensjo A, Ljungh A, Frykberg L, Guss B. 2004b. A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS microbiology letters* 234(1):155-161.
- Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity* 66(6):2666-2673.
- Ohtsuka J, Ichihara Y, Ebihara A, Nagata K, Tanokura M. 2009. Crystal structure of TTHA1264, a putative M16-family zinc peptidase from *Thermus thermophilus* HB8 that is

- homologous to the beta subunit of mitochondrial processing peptidase. *Proteins* 75(3):774-780.
- Oliveira R, de Moraes ZM, Goncalves AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2011. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS one* 6(7):e21962.
- Oliveira TR, Longhi MT, Goncalves AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2010. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12(3):207-217.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Current opinion in infectious diseases* 20(3):284-292.
- Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. 2010. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology advances* 28(6):849-858.
- 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, 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(2):e1607.
- Pinne M, Choy HA, Haake DA. 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis* 4(9):e815.
- Pinne M, Haake D. 2011. Immuno-fluorescence assay of leptospiral surface-exposed proteins. *J Vis Exp*(53).
- Posadas DM, Ruiz-Ranwez V, Bonomi HR, Martín FA, Zorreguieta A. 2012. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cellular microbiology* 14(6):965-982.
- Qi H, Lu H, Qiu HJ, Petrenko V, Liu A. 2012. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J Mol Biol* 417(3):129-143.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 37(8):1103-1109.
- Reed LJ, Muench H. 1938. a simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422(6934):888-893.

- Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, Lehmann JS, Purushe J, Sanka R, Torres M, Webster NJ, Vinetz JM, Matthias MA. 2012. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* 6(10):e1853.
- Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Girons IS, Ko AI, Picardeau M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* 3(7):e97.
- Rosander A. 2004. Novel Applications of Shotgun Phage Display: Swedish University of Agricultural Sciences. 46 p.
- Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L, Jacobsson K. 2002. Phage display as a novel screening method to identify extracellular proteins. *Journal of microbiological methods* 51(1):43-55.
- Rosander A, Frykberg L, Ausmees N, Muller P. 2003. Identification of extracytoplasmic proteins in *Bradyrhizobium japonicum* using phage display. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 16(8):727-737.
- Rosander A, Guss B, Pringle M. 2010. An IgG-binding protein A homolog in *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary microbiology* 149(1-2):273-276.
- Sambrook J, Russell DW, editors. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saúde Md. 2012. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1562.
- Seixas FK, da Silva EF, Hartwig DD, Cerqueira GM, Amaral M, Fagundes MQ, Dossa RG, Dellagostin OA. 2007. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 26(1):88-95.
- Serruto D, Serino L, Masignani V, Pizza M. 2009. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens. *Vaccine* 27(25-26):3245-3250.
- Setubal JC, Reis M, Matsunaga J, Haake DA. 2006. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology* 152(Pt 1):113-121.
- Shkoporov AN, Khokhlova EV, Kafarskaia LI, Pavlov KA, Smeianov VV, Steele JL, Efimov BA. 2008. Search for protein adhesin gene in *Bifidobacterium longum* genome using surface phage display technology. *Bull Exp Biol Med* 146(6):782-785.
- 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. 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 25(33):6277-6286.
- Singh B, Fleury C, Jalalvand F, Riesbeck K. 2012. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol Rev* 36(6):1122-1180.
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, NY)* 228(4705):1315-1317.
- Smith GP, Petrenko VA. 1997. Phage Display. *Chemical reviews* 97(2):391-410.

- Sorensen HP, Kristensen JE, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK. 2004. Soluble expression of aggregating proteins by covalent coupling to the ribosome. *Biochem Biophys Res Commun* 319(3):715-719.
- Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4(1):1.
- Souza NM, Vieira ML, Alves IJ, de Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2012. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. *Microbial pathogenesis* 53(3-4):125-134.
- Srivastava SK. 2006. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian journal of medical microbiology* 24(4):331-336.
- 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. 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PloS one* 2(11):e1188.
- Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. 2011. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cellular microbiology* 13(11):1783-1792.
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28(1):1-8.
- Vasi J, Frykberg L, Carlsson LE, Lindberg M, Guss B. 2000. M-like proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. *Infection and immunity* 68(1):294-302.
- Vieira ML, de Morais ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. 2010. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect* 60(1):52-64.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 33(4):557-569.
- Viratyosin W, Ingriswang S, Pacharawongsakda E, Palittapongarnpim P. 2008. Genome-wide subcellular localization of putative outer membrane and extracellular proteins in *Leptospira interrogans* serovar Lai genome using bioinformatics approaches. *BMC Genomics* 9:181.
- Wall T, Roos S, Jacobsson K, Rosander A, Jonsson H. 2003. Phage display reveals 52 novel extracellular and transmembrane proteins from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016(T). *Microbiology* 149(Pt 12):3493-3505.
- Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact* 6:39.
- Watters JM, Telleman P, Junghans RP. 1997. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* 3(1):21-29.
- WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. In: Organization WH, editor.
- WHO. 2011. Weekly epidemiological record. In: organization WHO, editor.
- Willats WG. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant molecular biology* 50(6):837-854.

- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. 2002a. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity* 70(12):6805-6810.
- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. 2002b. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity* 70(12):6805-6810.
- Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate medical journal* 78(918):216-224.
- Wilson M, editor. 2002. *Bacterial Adhesion to Host Tissues Mechanisms and Consequences*. New York: Cambridge University Press.
- Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. 1999. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging infectious diseases* 5(3):395-403.
- Xue F, Yan J, Picardeau M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11(3):328-333.
- Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Zhang A, Zhou W, Gao Z, Ye X, Xiao Y. 2003. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to *leptospira*. *Journal of the Chinese Medical Association* 66(4):224-230.
- Yang CW. 2007. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int* 72(8):918-925.
- Zacchi P, Sblattero D, Florian F, Marzari R, Bradbury AR. 2003. Selecting open reading frames from DNA. *Genome Res* 13(5):980-990.
- Zhang L, Jacobsson K, Strom K, Lindberg M, Frykberg L. 1999. *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology* 145 (Pt 1):177-183.

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

1 - Dados Pessoais

Nome Swiany Silveira Lima

Local de nascimento: Ubá –Minas Gerais

Data de nascimento: 19/07/1982

2 - Formação acadêmica

2008 - atual Doutorado em Ciências: Bioquímica (Conceito CAPES: 7) .
Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
Título: Identificação de adesinas de *Leptospira interrogans* por shotgun phage display
Orientador: Paulo Lee Ho.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2006 - 2008 Mestrado em Microbiologia Agrícola (*Conceito CAPES: 6*)
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.
Título: Incidência, diversidade e transmissão de dsRNA em *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).
Orientador (a): Marisa Vieira de Queiroz.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2001 – 2006 Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.
Título: Caracterização de micovírus em *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, agente etiológico da mancha-angular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)
Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.
Bolsista do: Programa de Educação Tutorial (PET) - Secretaria de Educação Superior (SESu/MEC), Brasil.
Tutor: Lucio Antonio de Oliveira Campos

1998 - 2000 Ensino Médio (2º grau).
Colégio Sagrado Coração de Maria, Ubá-MG, Brasil.

1990 – 1997 Ensino Fundamental (1º grau).
Colégio Sagrado Coração de Maria e Escola Estadual Cândido Martins de Oliveira, Ubá-MG, Brasil.

3. - Artigos publicados

1. **LIMA, S.S.**, CHING, A.T., FÁVARO, R.D., DA SILVA, J.B., OLIVEIRA, M.L., CARVALHO, E., ABREU, P.A., VASCONCELLOS, S.A., HO, P.L. Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431(2):342-7, 2013.
2. CHING, A.T., FÁVARO, R.D., **LIMA, S.S.**, CHAVES, A. de A., de LIMA, M.A., NADER, H.B., ABREU, P.A., HO, P.L. *Lepstospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427(4):774-9, 2012.
3. ABADIO, A. K. K. ; **LIMA, S. S.**; SANTANA, M. F.; SALOMAO, T. M. F.; SARTORATO, A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Genetic diversity analysis of isolates of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11: 1272-1279, 2012.
4. **LIMA, S.S.**, ABADIO, A.K.R., ARAÚJO, E.F., KITAJIMA, E.W., SARTORATO, A., QUEIROZ, M.V. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the Causal Agent of Angular Leaf Spot in Common Bean. *Canadian Journal of Microbiology*, 56: 358–365, 2010.
5. LIMA, M. M.; CARLOS, J.; AREAL, R. B.; SOUZA, R. J. S.; **LIMA, S. S.**; FILARDI, M. P.; CAMPOS, L. A. O.; EISENLOHR, P. V. Conhecimento da população de Viçosa, MG, sobre as formas de transmissão da AIDS. *Revista Ciência e Saúde Coletiva* vol.13(6):1879-1888, 2008.

4 – Manuscritos em preparação

1. **LIMA, S.S.**, FÁVARO, R.D., CHING, A.T., da SILVA, J.B., OLIVEIRA, M.L.S., CARVALHO, E., ABREU, P.A.E., VASCONCELLOS, S.A., HO, P.L. Characterization of LIC13418, a novel *Leptospira interrogans* adhesin.
2. SOARES, M.A., **LIMA, S.S.**, ARAÚJO, E.F., LANGIN, T., QUEIROZ M.V. Partial sequence of mitochondrial genome of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* LV49.

5 – Resumos em congressos

1. **LIMA, S.S.**; FAVARO R.D.; CHING A.T.C.; HO, P.L. *Leptospira interrogans* Hypothetical Protein is an Adhesin. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular–SBBq. Foz do Iguaçu - PR, 19 a 22 de Maio de 2012.
2. **LIMA, S.S.**; FAVARO R.D.; CHING A.T.C.; HO, P.L. BRASIL Methodology for Selection of *Leptospira interrogans* Adhesins. XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. 30 de novembro a 03 de dezembro de 2011, São Paulo, SP.

3. **LIMA, S.S.**; FAVARO R.D.; CHING A.T.C.; HO, P.L. Shotgun Phage Display System for Selection of *Leptospira interrogans* Adhesins Using the BRASIL Methodology. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular–SBBq. Foz do Iguaçu - PR, 30 de Abril a 3 de Maio de 2011.
4. **LIMA, S.S.**; FAVARO R.D.; CHING A.T.C.; HO, P.L. Identification of *Leptospira interrogans* adhesions by shotgun phage display. XII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. 01 a 03 de dezembro de 2010, São Paulo, SP.
5. CHING, A T C; FAVARO, R. D. ; **LIMA, S. S.**; Ho, P. L. . Preliminary screening for *Leptospira* adhesins through in vivo phage display. 2010. XII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. 01 a 03 de dezembro de 2010, São Paulo, SP.
6. CHING A.T.C.; FAVARO R.D.; **LIMA, S.S.**; HO, P.L. Identification of Spirochetal adhesins by in vivo phage display. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular –SBBq. Foz do Iguaçu - PR, maio de 2010.
7. SILVA JB; CARVALHO E; CHING AT; FAVARO RD; **LIMA, SS**; MOREIRA VB; MATTARAIA VG; FRANCO M; PEREIRA MM; HO, PL; MARTINS EA. Evaluation of MIP-2 and TNF- α expression on the immunological response of C3H/HeJ mice during infection with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. XXXIV Congress of Brazilian Society for Immunology and X International Symposium on Allergy and Clinical Immunology. Salvador- BA, setembro-2009.
8. GONZAGA, L.L. Santos, L.V. **LIMA, S.S.**; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Análise da diversidade genética em isolados de *Pseudocercospora griseola* empregando marcadores IRAP e REMAP. 55º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia-SP setembro 2009.
9. GONZAGA, L.L.; **LIMA, S. S.**; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Obtenção e regeneração de protoplastos em *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum. 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador – BA, setembro 2008.
10. **LIMA, S.S.**, RIBEIRO, R.A., ARAÚJO, E.F., QUEIROZ, M.V. Caracterização de micovírus de RNA dupla fita em *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia-SP, setembro 2007.
11. **LIMA, S. S.**; RIBEIRO, R.A.; ARAÚJO, Elza Fernandes; QUEIROZ, Marisa Vieira. Micovirus em *Phaeoisariopsis griseola* agente etiológico da mancha angular do feijoeiro. In: XVI Simpósio de Iniciação Científica, 2007, Viçosa. XVI Simpósio de Iniciação Científica, 2007.
12. **LIMA, S. S.**; SANTOS, M. L; MARTHE, J. B.; TEIXEIRA, M. C. C. Abordagem do tema transversal saúde em escolas do município de Viçosa-MG. XV Simpósio de Iniciação Científica, V Mostra Científica da Pós-Graduação e III Simpósio de Extensão Universitária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, março de 2006.
13. REIS, R. S.; Queiroz, M. V.; **LIMA, S. S.**; SOARES, M. A.; ARAUJO, E. F. Identificação e Análise de Genes de Patogenicidade de *Colletotrichum lindemuthianum*, Agente Causador da Antracnose do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), por Meio de REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). In: 58ª Reunião Anual da SBPC, 13ª JORNADA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2006, Florianópolis. 58ª Reunião Anual da SBPC, 13ª JORNADA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, julho de

2006.

14. REIS, R. S.; QUEIROZ, M. V.; LIMA, S. S.; SOARES, M. A.; ARAÚJO, E. F. Identificação e análise de genes de patogenicidade de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), por meio de REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). XV Simpósio de Iniciação Científica, V Mostra Científica da Pós-Graduação e III Simpósio de Extensão Universitária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, março de 2006.
15. SOARES, M. A.; LIMA, S. S.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. RFLP telomérico de isolados brasileiros de *Colletotrichum lindemuthianum*. XXV Reunião de Genética de Microrganismos, São Pedro-SP, março de 2006.
16. LIMA, M. M.; EISENLOHR, P. V.; LIMA, S. S.; CAMPOS, O. C.; FILARDI, M. P.; SOUZA, R. J. S.; AREAL, R. B.; CARLOS, J.; CAMPOS, L. A. O. Conhecimento da população do município de Viçosa - MG a respeito das formas de transmissão da AIDS. XV Simpósio de Iniciação Científica, V Mostra Científica da Pós-Graduação e III Simpósio de Extensão Universitária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, março de 2006.
17. LIMA, S. S.; SOARES, M. A.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Obtenção de Mutante Auxotrófico e Não Patogênico de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de Mutagênese Inercial. XIV Simpósio de Iniciação Científica, IV Mostra Científica da Pós-Graduação e II Simpósio de Extensão Universitária. Viçosa-MG, 2004.
18. SOARES, M. A.; LIMA, S. S.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Isolamento de Mutantes Não Patogênicos e Auxotróficos de *Colletotrichum lindemuthianum*. XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, Gramado-RS, 2004.

6- Participação em cursos

1. Curso: Phage Display of Proteins & Peptides. Cold Spring Harbor Laboratory, 09 a 22 de novembro de 2010.
2. Curso Prático “Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes” no CTCMol da Universidade Federal de São Paulo no período de 19 a 30 de julho de 2010. Carga horária: 80 horas
3. Curso: “Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes” no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, no período de 20 a 31 de julho de 2009. Carga horária: 30 horas.
4. Curso de Proteoma Bacteriano – Teoria e Aplicação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia- Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.
5. Curso de Bioinformática e Anotações promovido pelo Grupo de Estudos em Genética e Melhoramento (GenMelhor), Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. Carga horária: 12 horas.
6. IV Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular, ministrado pelo Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, julho de 2005. (Carga horária: 40 horas de atividades teóricas).

6 – Realização de estágios

1. Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Departamento de Microbiologia/ BIOAGRO, UFV; durante 4 anos, sob orientação da Professora Marisa Vieira de Queiroz, desenvolvendo as atividades de transformação, análise de mutantes (patogenicidade e auxotróficos), caracterização de micovírus e análise da variabilidade genética dos fungos fitopatogênicos *Phaeoisariopsis griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum*.
2. Estágio supervisionado em RNA de Interferência no Laboratório do Prof. Dr. Fernando Luiz de Lucca realizado durante o IV Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, julho de 2005. (Carga horária: 40 horas).
3. Laboratório de Morfofisiologia Animal, Departamento de Biologia Animal, UFV; sob orientação da Professora Eliane Menin, desenvolvendo a atividade de Estudo Anatomico-histológico funcional comparativo do aparelho digestório de peixes: um modelo de estudo morfológico de aparelhos de vertebrados. (Carga horária: 60 horas).

7 – Prêmios e Títulos

1. MEDALHA DE PRATA PRESIDENTE BERNARDES - em reconhecimento ao desempenho no curso de Ciências Biológicas tendo em vista os excelentes rendimentos durante a vida acadêmica. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2006.
2. VOTOS DE LOUVOR - concedido pela Comissão Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas com base no desempenho acadêmico dos formandos do primeiro semestre de 2006, por ter se destacado entre seus pares no transcorrer do curso. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2006.
3. MENÇÃO HONROSA - XV Simpósio de Iniciação Científica, III Simpósio de Extensão Universitária, V Mostra Científica da Pós-Graduação, Universidade Federal de Viçosa, pelo trabalho REIS, R. S.; QUEIROZ, M. V.; LIMA, S. S.; SOARES, M. A.; ARAÚJO, E. F. Identificação e análise de genes de patogenicidade de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), por meio de REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). Viçosa-MG, março de 2006.



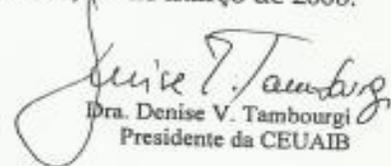
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

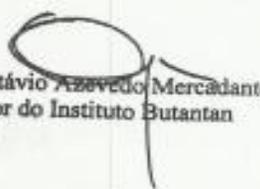
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 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:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

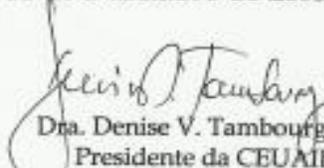
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

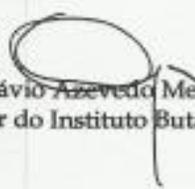
Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação de adesinas bacterianas por *phage display*", protocolo nº 564/08, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/12/2008.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
01/2009 - 12/2011	180 / hamster - <i>Mesocricetus auratus</i> - recém desmamado

São Paulo, 11 de Dezembro de 2008.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan