

NATALIE MICHELE DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DE TRÊS PROTEÍNAS DE
LEPTOSPIRA INTERROGANS EXPRESSAS EM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2013

NATALIE MICHELE DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DE TRÊS PROTEÍNAS DE
LEPTOSPIRA INTERROGANS EXPRESSAS EM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Souza, Natalie Michele de.

Avaliação da atividade imunogênicas de três proteínas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli* / Natalie Michele de Souza.
-- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genômica funcional.

Versão do título para o inglês: Immunogenic activity evaluation of three proteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli*.

1. Leptospirose 2. Proteínas recombinantes 3. Vacinas
4. Genomas 5. *Leptospira interrogans* 6. *Spirochaetales* I.
Nascimento, Profa. Dra. Ana Lucia Tabet Oller do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB027/2013

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

Candidato(a): Natalie Michele de Souza.

Título da Dissertação: Avaliação da atividade imunogênicas de três proteínas de
Leptospira interrogans expressas em *Escherichia coli*.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2163 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade imunogênica de duas proteínas preditas de membrana de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli*", **protocolo n° 851/11**, sob a responsabilidade de Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento e Natalie Michele de Souza - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como 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 10/11/2011.

We certify that the research entitled "Immunogenic activity evaluation of two predicted membrane proteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli*", **protocol number 851/11**, under the responsibility of Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento and Natalie Michele de Souza - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/11/2011.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
08/2011 - 07/2013 Laboratório de Centro de Biotecnologia	125 camundongos Balb/c (F) / 30 hamsters Golden (F)

São Paulo, 11 de novembro de 2011.


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho ao meu
bom Deus, que colocou
pessoas maravilhosas em
meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Á Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento que confiou o desenvolvimento deste trabalho á mim e me incentivou no decorrer do mesmo.

Á coorientação e auxilio dos pesquisadores Dr. Gustavo Maia de Cerqueira e Dra. Mônica Larruci Vieira.

Aos meus amigos Aline Rodrigues Florêncio Teixeira e Luis Guilherme Virgilio Fernandes pelos conselhos, apoio, discussão do trabalho e companheirismo.

Aos colegas de laboratório e técnicos do laboratório de biotecnologia molecular II e do centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Ao Dr. Silvio A. Vasconcellos e Zenaide M. de Moraes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo que nos forneceram as culturas e apoio científico em experimentos de desafio.

Á Dra. Eliete C. Romero do Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Medica que nos cedeu amostra de sangue de paciente.

Á professora Dra Toshie Kawano, Alexsander S. Souza e Henrique Krambeck Rofatto do departamento de Parasitologia do Instituto Butantan pelo auxílio no uso do microscópio confocal.

Aos meus familiares em especial meus pais Maria e Messias, avós Joana e Sebastião, irmãos Anne Marcey e Marcel Matheus.

Ao meu “namorado” e irmão em Cristo Izaac S Silva. Agradeço o apoio que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha tia Maria Lúcia Anjos Silva que me forçou a estudar, possibilitando a confecção deste trabalho.

As agencias de fomento FAPESP, CNPq e Fundação Butantan

“Havendo, pois, o SENHOR Deus formado da terra todo o animal do campo, e toda a ave dos céus, os trouxe a Adão, para este ver como lhes chamaria...” (Gênesis 2:19a)
Bíblia Sagrada

RESUMO

SOUZA, N. M. **Avaliação da atividade imunogênica de três proteínas de *Leptospira interrogans* expressas em *Escherichia coli***. 2013. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A leptospirose é uma zoonose que causa impacto na saúde pública de países em desenvolvimento. Esta doença é causada por bactérias do gênero *Leptospira* e é transmitida pela urina de animais infectados. No mundo aproximadamente 500.000 casos são reportados a cada ano com 10% de taxa de mortalidade. No entanto, os dados podem estar subestimados devido ao difícil diagnóstico da doença. As manifestações clínicas da leptospirose são variadas. Após a infecção, pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar quadros clínicos mais severos com falência pulmonar, renal e hepática (síndrome de *Weil*). Os mecanismos de controle desta doença compreendem medidas de difícil adoção e ineficazes. Vacinas contra leptospirose atualmente são baseadas em células inativadas e possuem desvantagens como toxicidade, curto período de proteção e a impossibilidade de proteção contra sorovares não presentes na preparação. O sequenciamento de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni identificou proteínas hipotéticas de membrana externa que podem ter implicações na patogenicidade da bactéria. Após análise do genoma, os genes LIC11121, LIC11087, LIC11228 e LIC11084 foram escolhidos para caracterização da imunogenicidade de suas respectivas proteínas. As proteínas codificadas pelos genes LIC11087, LIC11228 e LIC11084 foram identificadas na membrana externa de *L. interrogans* por imunofluorescência. Esses genes foram amplificados com o emprego de oligonucleotídeos específicos e clonados no vetor de expressão pAE. A clonagem foi confirmada por sequenciamento dos clones recombinantes. As proteínas foram expressas em *Escherichia coli* BL21 SI e *E. coli* BL21 (DE3), e purificadas por cromatografia de afinidade ao metal. Camundongos foram imunizados e produziram anticorpos contra as proteínas recombinantes. Adicionalmente a proteína rLIC11084 induziu a secreção de IFN e a proliferação de esplenócitos em um de dois experimentos independentes. Esta proteína induziu imunidade protetora em 58% dos hamster imunizados frente desafio letal, porém esta sobrevivência não foi estatisticamente significativa. As proteínas rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 foram reconhecidas por anticorpos no soro de pacientes na fase convalescente da doença. A proteína rLIC11087 foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de hamsters experimentalmente infectados. Estes resultados podem indicar a expressão destas proteínas durante a infecção. As proteínas rLIC11087 e rLIC11228 se ligam a laminina e a fibronectina plasmática. Estas interações podem ser importantes para a adesão da bactéria a componentes de matriz extracelular durante a colonização dos tecidos. rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 são ligantes de plasminogênio, componente que pode ser convertido a plasmina enzimaticamente ativa. Isto pode ter implicações nos mecanismos de degradação da matriz extracelular pela bactéria e na capacidade da mesma em evadir o sistema imune. A proteína rLIC11087 também interage com C4bp e fibronogênio e pode participar da evasão do sistema imune e inibição do coágulo de fibrina.

Palavras-chave: Leptospirose. *Leptospira*. Imunogenicidade. Adesinas. Proteína recombinante.

ABSTRACT

SOUZA, N. M. **Evaluation of immunogenic activity of three proteins of *Leptospira interrogans* expressed in *Escherichia coli***. 2013. 140 p. Masters thesis (Biotechnology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leptospirosis is a zoonosis with great impact in public health of developing countries. The disease is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, and is transmitted by urine of infected animals. In the world, 500,000 cases are reported each year with a mortality rate of 10%. However, these data are possibly underestimated due to the difficulties of diagnosis. The symptoms are unspecific, ranging from flu-like symptoms to severe clinical cases with pulmonary, renal and hepatic failure (Weil syndrome). The control of leptospirosis is difficult to implement. Vaccines against leptospirosis are composed by killed whole cells and have many drawbacks, such as low efficacy, the requirement for annual booster immunizations, and the failure to confer cross-protective immunity against different serovars. In the genome sequencing of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, putative outer membrane proteins that might be involved in pathogenicity were identified. After genome analysis, based on cellular localization prediction, the genes LIC11121, LIC11087, LIC11228 and LIC11084 were chosen and the immunogenicity of the corresponding proteins was evaluated. Proteins coded by the genes LIC11087, LIC11228 and LIC11084 were probably located in outer membrane of *L. interrogans*, as assessed by immunofluorescence microscopy. These genes were amplified by specific primers and cloned in the expression vector pAE. The correct cloning was checked by DNA sequencing. The proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 SI and *E. coli* BL21 (DE3), and were further purified by metal chelating chromatography. Mice were immunized and produced antibodies against recombinant proteins. Moreover, the protein rLIC11084 induced the secretion of IFN and promoted lymphoproliferation in one of two independent experiments. This protein induced a protective response in 58% of immunized hamsters against lethal challenge. However, this protection was not statistically significant. The proteins rLIC11087, rLIC11228 and rLIC11084 were recognized by antibodies in confirmed serum samples of patients at the convalescent phase of the disease. In addition, the protein rLIC11087 was detected by antibodies in serum of hamsters experimentally infected. The results may suggest expression of these proteins during infection. The proteins rLIC11087 and rLIC11228 bind laminin and plasma fibronectin. These interactions may be important for adhesion of the bacteria to extracellular matrix components during tissue colonization. rLIC11087, rLIC11228 and rLIC11084 interact with plasminogen and could be converted to the enzymatically active plasmin. This may have implications in mechanism of degradation of extracellular matrix and capacity of evasion of immune system. The protein rLIC11087 also interacts with C4bp and fibrinogen and may have a role in immune evasion and inhibition of fibrin clot formation.

Keywords: Leptospirosis. *Leptospira*. Immunogenicity. Adhesins. Recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Vetores empregados no processo de clonagem dos genes.....	42
Figura 2-	Amplificação dos genes em estudo de espécies do gênero <i>Leptospira</i>	58
Figura 3-	Avaliação da clonagem dos genes no vetor pAE por análise de restrição e sequenciamento.....	61
Figura 4-	Análise da expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em SDS-PAGE.....	63
Figura 5-	Identificação das proteínas recombinantes por imunoblotting com o anticorpo monoclonal anti-6X histidina.....	64
Figura 6-	Análise da purificação de rLIC11084 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.....	66
Figura 7-	Análise da purificação de rLIC11087 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.....	67
Figura 8-	Análise da purificação de rLIC11228 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.....	68
Figura 9-	SDS-PAGE para análise da purificação de rLIC11121 (37 KDa)..	69
Figura 10-	Produção de anticorpos por camundongos imunizados após segundo reforço.....	70
Figura 11-	Proliferação de esplenócitos de animais imunizados <i>in vitro</i>	71
Figura 12-	Secreção de IFN por esplenócitos de animais imunizados.....	72
Figura 13-	Curva de sobrevivência de animais imunizados com rLIC11084.....	74
Figura 14-	Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de hamsters infectados.....	76
Figura 15-	Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de paciente diagnosticados com leptospirose.....	77

Figura 16-	Adesão das proteínas recombinantes á componentes de matriz extracelular.....	78
Figura 17-	Curva dose-resposta para análise da ligação das proteínas recombinantes aos seus respectivos ligantes.....	80
Figura 18-	Efeito da estrutura das proteínas recombinantes na adesão a componentes de matriz extracelular.....	81
Figura 19-	Análise da interação das proteínas recombinantes com proteínas do soro humano.....	82
Figura 20-	Curvas dose resposta para análise da interação entre as proteínas recombinantes e componentes do soro.....	83
Figura 21-	Análise da interação das proteínas desnaturadas ás proteínas do soro.....	84
Figura 22-	Interferência de ácido aminocapróico na ligação das proteínas ao plasminogênio.....	85
Figura 23-	Detecção da atividade enzimática da plasmina a partir de plasminogênio ligado as proteínas recombinantes.....	86
Figura 24-	Identificação das proteínas nativas na membrana de <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni por imunofluorescência.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características dos oligonucleotídeos iniciadores empregados no processo de clonagem.....	37
Tabela 2-	Dados obtidos por análises de bioinformática.....	56
Tabela 3-	Massa molecular e ponto isoelétrico (pI) das proteínas codificadas pelos genes selecionados.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT	meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,6% de peptona e 0,5% de NaCl
2YT-ON	meio de cultura contendo 1% de extrato de levedura, 1,6% de peptona e 0,5% de NaCl
Amp	ampicilina 100 µg/mL
BSA	albumina de soro bovino
CD	Dicroísmo circular
CDS	Região codificante de proteína (Protein coding sequence)
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
Da	Dalton
ddNTP	2', 3' dideoxirribonucleotídeo
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-β-galatosídeo
Kb	kilobase
KDa	kilo Dalton
LB	meio de cultura Luria Bertani, contendo 0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl
LPS	lipopolissacarídeo
MAT	teste de microaglutinação
Mb	megabase
MS	Ministério da Saúde
OPD	o-fenilenodiamina
PAGE/SDS	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
pb	pares de base
PBS	solução fosfato salina, pH 7,4
PBS1s	tampão PBS contendo menor concentração de sal, 50mM de NaCl, e acrescido de 5mM de MgCl ₂
PBS-T	tampão PBS acrescido de Tween-20 na concentração de 0,005%
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pI	ponto isoelétrico
pK	Proteinase K
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TA	temperatura de anelamento
TAE	tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM
TLR	receptores do tipo Toll
uPA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase

X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 Definição	17
1.2 Epidemiologia	17
1.3 Classificação	19
1.4 Morfologia e biologia de leptospira.....	20
1.5 Condições de cultivo	22
1.6 Espécies com genoma sequenciado	23
1.7 Patogênese e fatores de virulência.....	24
1.8 Sintomatologia e tratamento da doença	28
1.9 Testes diagnósticos.....	29
1.10 Desenvolvimento de vacinas	31
2 OBJETIVO	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Análise por bioinformática	35
3.2 Linhagens de <i>Leptospira</i> e condições de cultivo	35
3.3 Isolamento de DNA genômico	36
3.4 Amplificação dos genes	37
3.5 Extração de RNA	37
3.6 Síntese de DNA complementar á transcritos de leptospira	38
3.7 Preparo de extrato proteico total de leptospiros e <i>E. coli</i>	39
3.8 Extrato de <i>E. coli</i>	39
3.9 Western-blotting para análise da expressão de proteínas	39
3.10 Clonagem.....	40
3.11 Expressão das proteínas recombinantes.....	43
3.12 Purificação.....	44
3.13 Espectroscopia circular (CD) das proteínas recombinantes	45
3.14 Imunização de camundongos.....	46
3.15 Detecção de anticorpos IgG por ELISA	46
3.16 Avaliação da resposta celular	47
3.17 Interação das proteínas trecombinantes com ECM e componentes do soro ..	48
3.18 Inibição da formação do coágulo de fibrina por rLIC11087.....	50

3.19 Interferência da interação entre as proteínas recombinantes e plasminogênio pelo ácido aminocapróico.....	50
3.20 Atividade enzimática de plasmina gerada a partir de plasminogênio ligado às proteínas recombinante.....	50
3.21 Imunofluorescência para análise da localização celular das proteínas	51
3.22 Condições de infecção de hamster	52
3.23 Teste de microaglutinação	52
3.24 Detecção de anticorpos no soro de pacientes e animais infectados	52
3.25 Imunização de hamsters e avaliação do perfil protetor de rLIC11084	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Características preditas das proteínas que levaram a seleção dos genes	55
4.2 Presença dos genes, seus transcritos e proteínas em espécies do gênero <i>Leptospira</i>.....	57
4.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes.....	59
4.4 Purificação das proteínas recombinantes e análise da estrutura secundária ...	65
4.5 Caracterização da resposta imunológica promovida pelas proteínas recombinantes em camundongos	69
4.6 Avaliação do perfil protetor de hamsters imunizados com rLIC11084 frente desafio letal.....	73
4.7 Reatividade das proteínas recombinantes com soro de hamsters infectados e de pacientes diagnosticados com leptospirose.....	74
4.8 Interação das proteínas recombinantes com componentes de matriz extracelular.....	77
4.9 Interação das proteínas recombinantes com componentes do soro	81
4.10 Detecção das proteínas nas leptospiros por imunofluorescencia	86
5 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	106
APÊNDICE A- Alinhamento dos aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes em espécies patogênicas de <i>Leptospira ssp.</i>.....	106
APÊNDICE B- Artigo publicado no período de desenvolvimento do mestrado	113
APÊNDICE C- Artigo publicado no período de desenvolvimento do mestrado.....	125

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Definição

Leptospirose é uma zoonose com impacto na saúde pública e acarreta prejuízos econômicos na agropecuária. Esta doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, e é transmitida ao homem principalmente através do contato com a urina de animais infectados. A ocorrência da leptospirose nos centros urbanos está relacionada a inundações que propiciam a disseminação e a persistência do agente causal no ambiente. As manifestações desta doença variam de sintomas semelhantes ao de uma gripe a sintomas com maior gravidade, com taxa de mortalidade variando de 5 a 10% (McBRIDE et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

A doença foi primeiramente reportada por Adolf Weil em 1886, mas manifestações similares foram observadas anteriormente na China em trabalhadores de plantações de arroz. Em 1907 uma publicação demonstrou a presença de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente cuja morte foi reportada como febre amarela e a informação negligenciada por anos. A relação entre leptospirose e o isolamento de espiroquetas ocorreu em 1915 por grupos de pesquisa independentes no Japão e na Alemanha (LEVETT et al., 2001). Atualmente a leptospirose é reconhecida uma zoonose emergente (EVANGELISTA; COBURN, 2010), com alta incidência em países tropicais e em desenvolvimento (PAPPAS et al., 2008).

1.2 Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose que afeta humanos em todos os continentes, em regiões urbanas e rurais, em países de clima tropical e de clima temperado (VINETZ, 2001). Possui maior incidência em países de clima tropical e em desenvolvimento, onde sua ocorrência está relacionada principalmente à ocorrência de chuvas sazonais, problemas higiênico-sanitários e a alta população de roedores (BHARTI et al., 2003). Nos países desenvolvidos a incidência da leptospirose está relacionada a esportes aquáticos, eventos recreativos em ambientes contaminados, e mudanças climáticas (MEITES et al., 2004; MORGAN et al., 2002; NARITA et al., 2005; STARK et al., 2009; STERN et al., 2010).

Leptospirose foi formalmente considerada a primeira doença ocupacional em estudos que reconheceram a propensão de mineiros em contraírem a doença. Atualmente tem sido atribuído risco ocupacional a profissões que requerem o contato dos profissionais com

animais, dentre estas fazendeiros, e profissões que expõe trabalhadores a ambientes contaminados, como agricultores (LEVETT et al., 2001).

No mundo em torno de 500.000 casos são relatados por ano, e a taxa de mortalidade chega a 10% (WHO, 1999). No entanto, estes dados podem estar subestimados devido á dificuldades na confirmação do diagnóstico da doença, ao fato dos sintomas serem comuns a outras doenças e o difícil diagnóstico de formas menos severas (HARTSKEERL, 2005). Apesar da ausência de dados absolutos, surtos têm sido registrados em países como Nicarágua, Brasil, Índia, Sudeste Asiático, Malásia e Estados Unidos da América, enquanto que pouco é conhecido sobre a incidência de leptospirose no continente africano (PAPPAS et al., 2008).

No Brasil são reportados em média 3.500 casos por ano (BRASIL, 2012). Nos últimos 10 anos a região sudeste é a região que possui maior numero de casos reportados, e São Paulo é o estado com maior incidência da doença desde 1996 (BRASIL, 2012). A incidência de leptospirose em favelas tem sido reconhecida como um fator de risco no Brasil (KO et al., 1999). A doença acarreta custos com hospitalizações e prejuízos econômicos. Em 2007, custos com hospitalizações chegaram á 831,5 mil reais e o prejuízo com salários perdidos foi de 22,9 milhões de reais (SOUZA et al., 2011).

A leptospirose pode acarretar prejuízos para a agropecuária uma vez que o tratamento de animais infectados possui custo elevado e a vacinação destes animais pode ser ineficaz (ALT; ZUERNER; BOLIN, 2001). Animais infectados podem apresentar mastite, infertilidade, abortos, nascimentos prematuros, nascimento de crias debilitadas, nascimento de fetos mortos, perda de peso, menor produção de leite, anemia e síndromes hemorrágicas (FAINE et al., 1999).

Leptospiras colonizam os túbulos renais de animais carreadores. Muitos destes hospedeiros são assintomáticos e contaminam o meio ambiente através da urina. O homem é hospedeiro terminal da doença, e pode se contaminar pelo contato direto com animais infectados ou pelo contato com ambiente contaminado com a urina de animais carreadores (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999).

Nos centros urbanos o principal reservatório da bactéria são roedores sinantrópicos (domésticos) das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*. Porém outros animais, como caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos, caprinos e vertebrados pecilotérmicos podem ser transmissores (FAINE et al., 1999; KO et al., 2009; LEVETT, 2001).

Medidas de controle da doença compreende principalmente o controle de roedores e medidas higiênico sanitárias como a desinfecção de domicílios após as enchentes, a proteção individual durante exposição á áreas alagadas ou enlameadas e o descarte de alimentos que entraram em contato com água de enchentes (BRASIL, 2005). Estas medidas são de difícil implementação e são ineficazes (KO et al., 1999). Alguns países como China e Cuba adotaram a vacinação de humanos para prevenção da doença (GONZÁLES et al., 2005; MARTINEZ et al., 2004; YAN et al., 2003). Porém estas vacinas são baseadas em células mortas e confere proteção de curta duração, não indução de imunidade cruzada com outros sorovares não incluídos na preparação e possivelmente induzem uma resposta autoimune (KOIZUMI; WATANABE, 2005; RATHINAM et al., 1997).

1.3 Classificação

O gênero *Leptospira* pertence á família *Leptospiraceae* e a ordem *Spirochaetales* (PASTER et al., 1991). Nesta ordem estão inclusas outras famílias de importância médica como *Spirochaetaceae* e *Brachyspiraceae*. Na família *Spirochaetaceae* estão inclusas espécies causadoras da doença de lyme (*Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, e *B. afzelii*), febre recorrente (*B. recurrentis* e *B. hermsii*), sífilis (*Treponema pallidum*) e peridontite (*T. denticola*) (LEBECH et al., 2002; SCHRÖDER et al., 2008). Na família *Brachyspiraceae* estão inclusas as espécies *Brachyspira pilosicoli* e *B. aalborgi*, causadoras de espiroquetoses intestinais (TSIGANOU; GEBBERS, 2010).

Tradicionalmente o gênero *Leptospira* é dividido em espécies saprofíticas, *L. biflexa*, e patogênicas, *L. interrogans* (PLANK; DEAN, 2000). As espécies do gênero *Leptospira* podem ser classificadas em mais de 250 sorovares que são agrupados em 24 sorogrupos (FAINE et al., 1999). A espécie *L. biflexa* possui mais de 60 sorovars enquanto que a espécie *L. interrogans* pode ser dividida em mais de 200 sorovares (LEVETT, 2001). Esta classificação é baseada na detecção de anticorpos aglutinantes, antígeno específico, pelo teste de aglutinação microscópica (MAT). Esta variação antigênica é atribuída principalmente a variações na estrutura do carboidrato que compõe o lipopolissacarídeo (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Apesar de a classificação sorológica ser importante para fins clínicos e epidemiológicos, a taxonomia da família *Leptospiraceae* passou a ser baseada na classificação genotípica após demonstrações da heterogeneidade genética de espécies agrupadas num

mesmo sorovar (BRENNER *et al.*, 1999). Atualmente espécies patogênicas e saprofíticas são categorizadas nas genomospecies 1,3,4 e 5 (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Assim a família *Leptospiraceae* passou a compreender 13 espécies patogênicas *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffii*; e as espécies saprofíticas *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomospecies 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomospecies 4) e *L. wolbachii* (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

SMYTHE e colaboradores 2012 sugere ainda a classificação das genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 e genomospecies 5 respectivamente como *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov.

Análise filogenética dos genes que codificam para a subunidade 16S demonstra que as espécies do gênero *Leptospira* podem ser agrupadas em três clados, patogênico, saprofítico e intermediário (LEVETT *et al.*, 2006; PEROLAT *et al.*, 1998). Assim, foram categorizados no subgrupo das espécies saprofíticas as espécies *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*; no subgrupo patogênico as espécies *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* e *L. alstoni*; e no subgrupo intermediário as espécies *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae* (KO *et al.*, 2009).

1.4 Morfologia e biologia de leptospira

Leptospiras são finas, com tamanho de aproximadamente 0,25 µm por 6–25 µm, e helicoidais. Possuem caracteristicamente as extremidades terminadas em gancho e por isso, quando primeiramente visualizadas, foram nomeadas *Spirochaeta interrogans* (LEVETT, 2001). Apesar de classificadas como bactérias gram-negativas a parede celular desta bactéria possui características atípicas e comuns a de bactérias gram-positivas. A parede celular é composta por uma membrana interna, peptídeoglicano, dois flagelos periplasmáticos e membrana externa. O fato de o peptídeoglicano estar ancorado na membrana interna é comum á bactérias gram-positivas, enquanto que a presença de duas membranas na parede celular e a presença de lipopolissacarídeo (LPS) na membrana externa são características comuns a bactérias gram-negativas (HOLT, 1978).

Diferente de *B.burgdorferi* e similarmente á *T. pallidum* a morfologia heliáltica de leptospiiras está relacionada ao peptídeo glicano. A composição química do peptídeo glicano é similar a de bactérias gram-negativas apesar dos constituintes desta macromolécula ser peculiares (SLAMTI et al., 2011).

Os dois endoflagelos periplasmáticos conferem motilidade ás células. Em espiroquetas as proteínas FlaA e FlaB constituem respectivamente a bainha e o core flagelar. Mutações no gene *flaB*, que codifica para uma proteína flagelar, na espécie saprófita *L. biflexa* resulta na ausência do endoflagelo e na perda da movimentação bacteriana (PICARDEAU et al., 2001; WOLGEMUTH et al., 2006). Apesar disso mutações no gene *flaA* demonstraram que as proteínas codificadas por estes genes não afetam a formação da bainha e geração do flagelo mas afetam o movimento transaccional, morfologia celular e virulência da bactéria (LAMBERT et al., 2012).

Há três tipos de movimentação possíveis: rotação sobre um eixo central, movimento progressivo (reto) e movimentação circular (BHARTI et al., 2003). O movimento rotacional pode estar relacionado á patogênese. Mutações no gene *fliY* em *L. interrogans* sv. Lai resulta na perda do movimento rotacional e no aumento da taxa de sobrevivência do hospedeiro suscetível porquinho da índia, *guinea pigs* (LIAO et al., 2009).

Leptospiiras apresentam LPS diferente de outras espiroquetas como *T. pallidum* e *B. burgdorferi*. O LPS destas bactérias possui composição similar á de outras bactérias gram-negativas e é menos tóxico (LEVETT, 2001). O lipídeo A é um ácido graxo incomum e possui um resíduo fosfatado e metilado (QUE-GEWIRTH et al., 2004). Possivelmente devido a isso macrófagos humanos são incapazes de reconhecer o lipídeo A de leptospira (NAHORI et al., 2005).

Essa composição atípica do lipídeo A pode ser o fator determinante na susceptibilidade de humanos a infecção. Células do sistema imune inato de humanos reconhecem LPS via TLR-2 ao invés de TLR-4, situação comum á outras bactérias (WERTS et al., 2001). Camundongos são animais resistentes á infecção e desencadeiam fraca resposta inflamatória após longos períodos de colonização renal por leptospiiras. Esses animais são capazes de reconhecer o LPS de leptospira tanto pelo por TLR-2 quanto por TLR-4. Foi constatado que mutantes nestes dois receptores tornam camundongos suscetíveis á infecção (CHASSIN et al., 2009).

O antígeno O de leptospiiras é composto principalmente por raminose, cuja síntese é coordenada pelos genes do *locus rfb*. A posição 3' deste *locus* é conservada enquanto que a

posição 5' é diferente entre sorovares distintos (DE LA PENA-MOCTEZUMA et al., 1999). O LPS é importante para estabilidade da membrana de enterobactérias e pode ser essencial tanto para a viabilidade de leptospiras e como para a letalidade delas. Isto pode ser experimentalmente visualizado em mutações de genes presentes no *locus rfb* (MURRAY et al., 2009, 2010).

O LPS é o determinante antigênico de leptospiras. Numa infecção por leptospiras o sistema imune direciona a produção de anticorpos principalmente contra o LPS (DE LA PENA-MOCTEZUMA et al., 1999; FAINE et al., 1999). A imunização passiva com anticorpos monoclonais contra o LPS pode conferir proteção no modelo de infecção porquinho da índia (JOST et al., 1986).

Além do LPS proteínas de membrana externa são importantes para compreensão da biologia de leptospiras. Estas proteínas podem mediar o transporte de substâncias e cumprir papéis funcionais importantes na atuação de mecanismos de patogênese, papéis enzimáticos e facilitar a colonização renal. Adicionalmente estas proteínas podem ter papel na imunogenicidade durante a infecção (CULLEN et al., 2005). As proteínas com maior abundancia na superfície de *L. interrogans* são LipL32 (ou Hap1), OmpL1, LipL21 e Lip41 (CULLEN et al., 2005; HAAKE et al., 2000). A proteína com maior número de cópias por célula é a LipL32, com mais de 38.000 cópias por célula (MALMSTRÖM et al., 2009).

As proteínas de membrana externa de espiroquetas possuem peptídeo sinal na porção N terminal. Essa sequencia é clivada e então a proteínas é translocada através da membrana. A região carboxiterminal do peptídeo sinal (lipobox) difere das demais bactérias (SETUBAL et al., 2006). Proteínas de membrana de espiroquetas podem ser exportadas por uma via própria, ainda não caracterizada (CULLEN et al., 2005).

Essas proteínas podem se associar a membrana externa de três diferentes maneiras, através de uma porção lipídica (lipoproteínas), através de porções proteicas transmembrana e por porções que não transpassam a membrana (proteínas de membrana externa periférica) (CULLEN et al., 2005).

1.5 Condições de cultivo

Leptospiras são aeróbicas obrigatórias e possuem crescimento ótimo entre 28 e 30°C. São catalase e oxidase positiva e crescem em meio simples enriquecido com vitaminas B2 e B12, fatores de crescimento, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônia. Ácidos graxos

de cadeia longa são as fontes de carbono e são metabolizados por -oxidação. O crescimento de leptospiras é vagaroso e o tempo de geração é de aproximadamente 20 h (LEVETT, 2001). O meio comumente empregado para o cultivo destas espiroquetas é o EMJH (Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris). Este meio é composto principalmente por ácido oleico, albumina de soro bovino e polisorbato (ELLINGHAUSEN; McCULLOUGH, 1965; JOHNSON; HARRIS, 1967).

Algumas espécies patogênicas, como *L. interrogans* podem sobreviver em ambientes carentes de nutrientes, com concentrações salinas, pH e viscosidade críticas, como solo e água por longos períodos (TRUEBA et al., 2004). A espécie *L. borgpetersenii* não possui genes que permite a sobrevivência no ambiente. Assim a transmissão desta bactéria ocorre pelo contato com hospedeiro contaminado (BULACH et al., 2006). A formação de biofilme é um mecanismo propostamente empregado para sobrevivência da leptospira em diferentes nichos ambientais (RISTOW et al., 2008).

1.6 Espécies com genoma sequenciado

A disponibilidade de sequencias genômicas tem facilitado a identificação de antígenos vacinais promissores, a compreensão da biologia de microrganismos e a identificação de proteínas associadas a virulência de leptospiras.

Atualmente estão disponíveis as sequencias genômicas de três espécies patogênicas, uma espécie saprófita e uma espécie intermediária. As espécies patogênicas com genoma sequenciado são *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. santarosai*. Os dois sorovares sequenciados de *L. interrogans* são sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 e sorovar Lai linhagens 56601 e IPAV (NASCIMENTO et al., 2004a, b; REN et al., 2003; ZHONG et al., 2011). As linhagens de *L. borgpetersenii* sorovar Hadjo-bovis sequenciadas são L550 e JB197 (BULACH et al., 2006). A sequencia genômica das linhagens Ames e Paris da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc 1 estão também disponíveis (PICARDEAU et al., 2008).

Em 2012, foram disponibilizadas as sequencias da espécie patogênica *L. santarosai* sorovar Shermani e da espécie intermediária *L. licerasiae* linhagens VAR010 e MMD0835 (CHOU et al., 2012; RICALDI et al., 2012). A análise do genoma de *L. licerasiae* linhagens VAR010 e MMD0835 mostrou que esta espécie intermediária está mais relacionada a espécies patogênicas do que a espécies saprófitas.

A análise comparativa das sequências de genomas disponíveis indica que há 2052 genes comuns entre espécies patogênicas e não patogênicas e 900 genes encontrados apenas em espécies patogênicas, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (CHOU et al., 2012).

O genoma total de leptospiros varia entre 4,7 Mbp e 3,9 Mbp. Leptospiros patogênicos apresentam dois cromossomos circulares enquanto que a espécie *L. biflexa* que possui ainda um terceiro replicon circular, p74 (PICARDEAU et al., 2008). Algumas espécies apresentam prófagos. *L. biflexa* possui um prófago (LE1) e *L. licerasiae* possui dois prófagos, um que possui homologia com LE1 e outro homólogo a uma região encontrada no genoma dos sorovares sequenciados de *L. interrogans* (RICALDI et al., 2012).

1.7 Patogênese e fatores de virulência

Os mecanismos de infecção, invasão e persistência da colonização, relacionados a interações entre leptospiros e hospedeiros, ainda não são elucidados. A análise das sequências genômicas disponíveis sugere que muitas proteínas podem estar envolvidas nestas interações. Há 452 genes comuns entre espécies patogênicas e intermediárias e 315 genes exclusivos das espécies patogênicas (RICALDI et al., 2012).

O sequenciamento genômico de *L. interrogans* sv. Copenhageni possibilitou a identificação de mais de 263 genes que codificam para prováveis proteínas expostas na superfície. Muitas destas proteínas, a saber 250, são proteínas hipotéticas de membrana e podem estar envolvidas em mecanismos de patogenicidade (NASCIMENTO et al., 2004a).

No sequenciamento do genoma também foram identificados genes que participam de mecanismos de patogenicidade elucidados em outras bactérias como adesinas afimbriais, esfingomielinase, fosfolipase D, colagenases, metaloprotease e termolisinas (NASCIMENTO et al., 2004a).

Algumas estratégias de mutagenese tem possibilitado a investigação de genes envolvidos na patogênese. Por meio da caracterização fenotípica de mutantes alguns fatores de virulência foram descobertos. Nas espécies patogênicas, mutantes têm sido gerados por mutagenese específica, através de recombinação homóloga, e pela inserção do elemento transponível *HimarI mariner* (CRODA et al., 2008; LAMBERT et al., 2012; LIAO et al., 2009; MURRAY et al., 2009d; RISTOW et al., 2007).

A motilidade pode ser um fator essencial para virulência bacteriana. Como descrito anteriormente a inativação de genes que codificam para proteínas FliY e FlaA afetam a

motilidade e podem atenuar a virulência de leptospiras (LAMBERT et al., 2010; LIAO et al., 2009). Outros fatores de virulência descritos até o presente momento compreendem o LPS e as proteínas Loa22, HemO, ClpB e InvA também identificados pela geração de mutantes (LOURDAULT et al., 2011; LUO et al., 2011; MURRAY et al., 2008, 2009b; 2010; RISTOW et al., 2007).

O processo de adesão é provavelmente o primeiro passo necessário a patogênese e infecção. Semelhante a outros patógenos microbianos, leptospiras interagem com matriz extracelular e com linhagens celulares, células endoteliais e células epiteliais cultivadas *in vitro* (BREINER et al., 2009; CHIRATHAWORN et al., 2007; ITO; YANAGAWA, 1987). Foi demonstrado que leptospiras podem interagir com componentes de matriz extracelular, á saber com, laminina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina celular e fibronectina plasmática (BARBOSA et al., 2006).

Diferentes proteínas de superfície de leptospiras podem estar envolvidas no processo de adesão. Estas proteínas podem interagir diretamente com os componentes, e ou indiretamente, induzindo a expressão dos receptores de células eucarióticas ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais (ATZINGEN et al., 2009; GOMEZ et al., 2008; VIEIRA et al., 2007).

Duas famílias de adesinas afimbriais de *L. interrogans* foram identificadas no genoma, a saber, a família Lig e a família de proteínas semelhantes a integrina, codificadas pelos genes LIC12259, LIC10021 e LIC13101 (NASCIMENTO et al., 2004a).

As proteínas da família Lig possuem domínios Big (do inglês “*bacterial immunoglobulin-like*”). Esse domínio é encontrado em adesinas de outras bactérias como intimina de *E. coli* e invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (HAMBURGER et al., 1999; LUO et al., 2000).

Foi constatado que estas proteínas podem interagir com componentes de matriz extracelular. Essas proteínas interagem com elastina, tropoelastina, colágeno tipo I e tipo IV, laminina e fibronectina (CHOY et al., 2007; LIN et al., 2008, 2009a, b; LIN; CHANG, 2007, 2008). Adicionalmente a expressão delas pela espécie saprófita, *L. biflexa*, conferiu a capacidade de adesão a células em cultura e a fibronectina (FIGUEIRA et al., 2011).

A adesão a componentes de matriz extracelular foi constatado experimentalmente em muitas proteínas. A caracterização de proteínas com localização predita na membrana externa levou a identificação de muitas proteínas com função de adesina, entre elas uma proteína de 36 KDa que interage com fibronectina, OmpL37, proteínas da família Len, Lsa63

(LIC10314), Lsa21 (LIC10368), Lsa27 (LIC12895), LipL32 /Hap-1 (LIC11352), Lsa24 (LIC12906), LipL53 (LIC12099), Lp95 (LIC12690), Lp30 (LIC12880), Lsa66 (LIC10258), rLIC12238, Lsa20 (LIC11469), Lsa33 (LIC11834), Lsa25 (LIC12253), OmpL1 (LIC10973), Lsa23 (LIC11360), Lsa36 (LIC11975) e Lsa26 (LIC11009) (ATZINGEN et al., 2008, 2009; BARBOSA et al., 2006; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; HAUKE et al., 2008; HOKE et al., 2008; LONGHI et al., 2009; MENDES et al., 2011; MERIEN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; PINNE et al., 2010; SIQUEIRA et al., em fase de submissão; STEVENSON et al., 2007; VIEIRA et al., 2010a). Inclusive a proteína TlyC, uma predita esfingomielinase bem caracterizada em outras bactérias, foi possível atribuir capacidade de interação com laminina, colágeno tipo IV e fibronectina (CARVALHO et al., 2009).

Esta redundância funcional pode ser uma explicação para a virulência de mutantes com inativação dos genes *lipL32* e *ligB*, que expressam proteínas abundantes de superfície e com função de adesina (CRODA et al., 2008; MURRAY et al., 2009c).

A atividade proteolítica é importante na penetração de micro-organismos patogênicos durante a infecção (LÄHTEENMÄKI et al., 2001). Leptospiras podem adquirir atividade proteolítica pela interação com plasminogênio e posterior conversão deste em plasmina ativa. Essa interação pode auxiliar na degradação de componentes de matriz extracelular, possibilitando assim a penetração no tecido do hospedeiro (VIEIRA et al., 2009).

A captação de plasminogênio na superfície de leptospiras ocorre pela ligação deste a proteínas de membrana externa. Resíduos de lisina das proteínas interagem com domínios Kringle do plasminogênio (LÄHTEENMÄKI et al., 2001). Diferentes receptores de plasminogênio tem sido identificados, a saber LenA/LfhA/Lsa24, LipL32, rLIC12730, rLIC10494, Lp29, Lp49, LipL40, MPL36, rLIC12238, Lp30, rLIC10258, Lsa20, Lsa33 e OmpL1 (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; VERMA et al., 2010b; VIEIRA et al., 2010b).

A atividade proteolítica de leptospiras pela interação com plasminogênio pode contribuir na evasão do sistema imune. Isso foi evidenciado pela diminuição de IgG e de C3b na superfície de leptospiras após tratamento com plasminogênio e seu ativador, uPA (VIEIRA et al., 2011).

Fibrinogênio é uma proteína plasmática envolvida na cascata de coagulação sanguínea e na agregação de plaquetas. Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem interagir com o fibrinogênio através das proteínas ClfA, de *S. aureus*, e SdrG, de *S. epidermidis*. Por meio

desta interação, essas proteínas podem inibir a formação do coágulo de fibrina e a agregação plaquetária (DAVIS et al., 2001; HAWIGER et al., 1982). As proteínas de leptospira LigA e LigB interagem com fibrinogênio (CHOY et al., 2007). A proteína LigB inibir a formação do coágulo de fibrina interagindo com o fibrinogênio. Este mecanismo pode auxiliar na disseminação da bactéria via corrente sanguínea (CHOY et al., 2011).

Além da evasão do sistema imune pela interação com plasminogênio leptospiras podem interagir com proteínas reguladoras do sistema complemento, como fator H e C4bp, e escapar de células de defesa tendo uma fase intracelular (VIEIRA et al., 2011). A persistência da infecção de leptospira em mamíferos pode estar relacionada a capacidade delas de resistir as ações do sistema complemento (CHARON et al., 1975). O primeiro mecanismo da resistência ao soro foi dado com a constatação da interação delas com o fator H e a FHR-1 e FHR-1 (MERI et al., 2005). Proteínas de leptospira que se interagem com C4bp e fator H têm sido identificadas (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012, CHOY, 2012; DOMINGOS et al., 2012; STEVENSON et al., 2007; VERMA et al., 2006). Essas interações podem explicar a resistência de leptospiras ao soro e ao sistema complemento.

Para atingir os tecidos, leptospiras podem atravessar junções intercelulares e a capacidade destas bactérias em entrar nas células do hospedeiro também tem sido constatada (HAAKE; LOVETT, 1994; LIU et al., 2007; MERIEN et al., 1997). O processo como leptospiras entram nas células do hospedeiro ainda não foi esclarecido. Leptospiras têm sido observadas no citoplasma e em compartimentos fagossomais de diferentes tipos celulares (BAROCCHI et al., 2002; LI et al., 2010; LIU et al., 2007; THOMAS; HIGBIE, 1990). Esta fase intracelular pode ser um mecanismo de translocação para tecidos alvo e um mecanismo de evasão sistema imune.

A persistência da colonização renal pode ser atribuída a diferentes fatores, como a regulação da expressão de proteínas e a formação de biofilme (MONAHAN et al., 2009; RISTOW et al., 2008).

A infecção por leptospiras induzir de processos patológicos por mecanismos autoimunes, como a indução de apoptose, a secreção de anticorpos auto-reativos, e a indução da secreção de citocinas pró- inflamatórias (DE FOST et al., 2003; DIAMENT et al., 2002; KLIMPEL et al., 2003; TAJIKI; SALOMÃO, 1996).

O envolvimento entre apoptose e patogênese da doença é desconhecido. Porém evidências demonstram que leptospiras podem induzir a apoptose em macrófagos e hepatocitos (ISOGAI et al., 1998; MERIEN et al., 1997, 1998).

Leptospiras podem induzir a secreção de auto-anticorpos, direcionados contra fosfolípidos e conhecidos como anti-cardiolipina (aCL) e contra proteínas oculares (RUGMAN et al., 1991; VERMA et al., 2010a). Outros processos patológicos relacionados a secreção de anticorpos são a uveíte e a síndrome hemorrágica pulmonar (NALLY et al., 2004; VERMA et al., 2008).

1.8 Sintomatologia e tratamento da doença

A infecção por leptospiras pode desencadear diferentes manifestações clínicas. Humanos apresentam desde quadros subclínicos até quadros com elevada gravidade. As manifestações clínicas e a severidade da doença dependem de fatores como a linhagem ou sorovar infectante, forma da infecção (como por exemplo, tamanho de feridas na pele e tempo de exposição a ambientes contaminados) e susceptibilidade do indivíduo, como por exemplo, a idade, estado imune e características genéticas, como humanos portadores do antígeno leucocitário humano HLA-DQ6 (EVANGELISTA; COBURN, 2010; KO et al., 2009; LINGAPPA et al., 2004).

Os sintomas aparecem após um período de incubação que varia entre 5 e 14 dias. O curso da doença pode ser dividido em duas fases distintas. A fase aguda ou septicêmica ocorre na primeira semana da doença, e a fase imune é caracterizada pela excreção de leptospiras na urina e pela produção de anticorpos (LEVETT, 2001).

Cerca de 90% dos pacientes apresentam sintomas de baixa gravidade que podem ser classificados como leptospirose anictérica (PLANK; DEAN, 2000). Trabalhos reportam que a maioria dos pacientes apresentam febre, dor de cabeça, mialgia, vômito e náuseas, sintomas comuns a muitas doenças febris e tropicais como influenza, malária, vírus da imunodeficiência humana, dengue e febre tifoide. Isto inviabiliza o diagnóstico baseado na sintomatologia da doença e dificulta o tratamento adequado, o que leva ao agravamento dos sintomas (LEVETT, 2001).

Leptospirose ictérica é a forma mais severa da doença e é caracterizada pelos altos níveis de bilirrubina no soro. Esta forma acomete de 5% á 10% dos pacientes com leptospirose e pode ser resultado do curso da doença (LEVETT, 2001). Pacientes podem

apresentar falência renal aguda (16 á 40% dos casos com leptospirose), trombocitopenia e problemas pulmonares como a síndrome hemorrágica pulmonar, que leva 50% dos casos á óbito (KOBAYASHI, 2005). A síndrome de Weil é uma das formas mais severas da doença e é caracterizada por um quadro icterico, falência renal e sangramentos (KO et al., 2009).

Outras complicações relacionadas á doença incluem aborto, uveíte, miocardite e sintomas raros como, acidentes cerebrovasculares, rbdomiólise, púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), colecistite aguda acalculosa (CAA), eritema nodoso, estenose aórtica, síndrome de Kawasaki, artrite reativa, epididimite, paralisia de nervos, hipogonadismo masculino e a síndrome de Guillain-Barré (LEVETT, 2001).

O uso de antibióticos é eficiente no tratamento da leptospirose. A recomendação do antibiótico, assim como a dosagem apropriada, é baseada na severidade da doença. Nas formas mais brandas da doença é recomendado o tratamento com doxiciclina, amoxicilina e ampicilina ao passo que para as formas mais severas é recomendado o tratamento com penicilina G (BHARTI et al., 2003). Nos casos mais severos é necessário o apoio hospitalar. A realização de diálise e tratamento de pacientes na unidade de terapia intensiva pode ser necessário, o que acarreta em custos elevados para o sistema de saúde pública (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; SOUZA et al., 2011).

1.9 Testes diagnósticos

O diagnóstico da leptospirose nos estágios iniciais é essencial para o inicio do tratamento adequado, podendo evitar o agravamento dos sintomas. No entanto, os métodos comumente empregados são ineficientes no diagnóstico da doença na fase aguda e compreendem principalmente a análise sorológica e o isolamento de leptospiras em cultura (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011). Além disso, a inespecificidade dos sintomas dificulta o diagnóstico baseado na investigação dos sintomas. Assim mesmo em regiões onde é comum a ocorrência de leptospirose poucos casos são identificados desde a análise clinica inicial (SASAKI et al., 1993).

Algumas alterações bioquímicas nos pacientes com leptospirose podem sugerir o diagnostico. Porém a confirmação do diagnóstico é realizada por sorologia. Os testes sorológicos empregados compreendem o teste de aglutinação microscópica (MAT), o teste de aglutinação cruzada (“cross agglutinin absorption test” CAAT), ELISA com a imobilização de um antígeno não caracterizado de 35 KDa e um teste rápido para detecção de anticorpos contra a proteína LigA (NABITY et al., 2012; TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

O método mais recomendado para o diagnóstico de leptospirose é o MAT. Neste teste amostras de soro de pacientes são misturadas a leptospiras. As amostras são incubadas de 2 a 4 horas à temperatura ambiente e então examinadas quanto a aglutinação por microscopia de campo escuro. A amostra é considerada positiva quando há aglutinação maior que 50% em relação à reação controle (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

Este teste tem por desvantagem a baixa sensibilidade na fase aguda da doença e a necessidade da manutenção de espécies em cultivo. A organização mundial da saúde recomenda o emprego de 19 sorovares de 16 sorogrupos o que requer a manutenção de culturas em laboratórios de referência (WHO, 2003). Adicionalmente em regiões endêmicas o MAT pode ter baixa acurácia devido a existência de anticorpos contra leptospira de infecções prévias (IgM) e pela reação cruzada com outros agentes infecciosos (BLACKSELL et al., 2006; MYINT et al., 2007).

Anticorpos contra antígenos proteicos podem ser detectados em amostras de soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. Assim o emprego de proteínas conservadas entre diferentes sorovares pode ser promissor em aplicações diagnósticas. Estes antígenos podem conferir alta sensibilidade e especificidade ao teste devido a alta concentração de antígenos utilizado e a ausência de motivos inespecíficos, presentes com o emprego da célula total (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

Um teste rápido para o diagnóstico com a proteína LigA foi desenvolvido, DPP (Dual Path Platform) (Chembio Diagnostic Systems, Medford, New York, USA). Entretanto este teste apresenta baixa sensibilidade para o diagnóstico de pacientes com a forma branda da leptospirose na fase aguda da doença, 64% de sensibilidade (NABITY et al., 2012).

O método diagnóstico mais eficiente para a fase aguda da doença é o PCR. Entretanto o custo e a tecnologia necessária para realização do PCR inviabiliza sua aplicação em laboratórios de países em desenvolvimento. Iniciadores específicos para os genes *secY*, *rrs*, *flaB*, *rrl* e LA3521 tem sido empregados para a detecção de DNA em amostras de sangue, urina, LCR, humor aquoso e de diferentes tecidos (BROWN et al., 1995; FONSECA et al., 2006 a,b; KOIZUMI et al., 2003; KOSITANONT et al., 2007; MERIEN et al., 1995). A WHO recomenda o emprego de iniciadores para os genes *secY* (G1 e G2) e *flaB* (B64I e B64II) em aplicações diagnósticas (WHO, 2003). Adicionalmente a detecção de DNA por PCR, o PCR em tempo real tem aumentado a confiabilidade dos resultados pela discriminação entre a amplificação de um gene específico e gene oriundo de contaminação (AHMED et al., 2009; LEVETT et al., 2005; LOURDAULT et al., 2009; MERIEN et al., 2005;

PALANIAPPAN et al., 2005; SLACK et al., 2006, 2007; SMYTHE et al., 2002; STODDARD et al., 2009).

Diante da inviabilidade do diagnóstico por PCR em países em desenvolvimento, o método de amplificação mediada por ciclo isotérmico (*loop-mediated isothermal amplification* -LAMP) foi desenvolvido (MORI; NOTOMI, 2009). Esta técnica tem possibilitado a amplificação de genes específicos de leptospiros patogênicas em amostras clínicas (KOIZUMI et al., 2012; LIN et al., 2009c; SUWANCHAROEN et al., 2012). No entanto, a baixa sensibilidade e especificidade do método mostra que ele ainda é inapropriado para o diagnóstico de leptospirose (SONTHAYANON et al., 2011).

1.10 Desenvolvimento de vacinas

Como anteriormente abordado as vacinas disponíveis contra leptospirose são ineficazes. Essas vacinas são capazes de conferir resposta protetora através da indução da secreção de anticorpos contra lipopolissacarídeos (LPS) de leptospira (DE LA PENA-MOCTEZUMA et al., 1999). Atualmente os principais alvos de pesquisa para compor uma vacina são proteínas da membrana externa conservadas entre cepas patogênicas e com capacidade de induzir longa resposta protetora (KOIZUMI; WATANABE, 2005).

As primeiras proteínas recombinantes testadas quanto seu perfil protetor foram OmpL1 e LipL41. Nesta abordagem estas proteínas foram expressas associadas a membrana externa de *E. coli* e coadministradas. Neste experimento foi possível proteção significativa em um de três experimentos independentes, e a taxa de sobrevivência foi de 100% em hamsters (HAAKE et al., 1999).

Outra estratégia para especulação da imunogenicidade de OmpL1 ocorreu pela sua expressão em células de mamíferos, infectadas por adenovírus recombinante. Porém esta estratégia falhou em conferir proteção no modelo de infecção gerbil (BRANGER et al., 2001).

A proteína mais abundante da superfície de leptospira, LipL32, é incapaz de conferir imunidade protetiva (BRANGER et al., 2001; LUCAS et al., 2011). Diferentes estratégias visando o aumento da imunoproteção têm sido desenvolvidas, entretanto os resultados não são promissores para um candidato vacinal em potencial (KO et al., 2009).

A administração de adenovírus recombinante, capaz de expressar LipL32 em células eucarióticas, possibilitou proteção estatisticamente significativa em gerbils, 87% (BRANGER et al., 2001). Adicionalmente vacinas de DNA compostas pelo gene *lipL32* associado ao vetor

pcDNA3.1, vetor para expressão de proteínas em células eucarióticas, possibilitou a taxa sobrevida de 60% neste mesmo modelo de infecção (BRTANGER et al., 2005).

Vacinas com bacilo Calmette-Guerin (BCG) recombinante, capazes de expressar a proteína LipL32, resultaram na proteção parcial de hamsters em meio desafio letal. Esta estratégia foi eficaz em proteger sobreviventes de manifestações clínicas e histopatológicas da doença e induziu imunidade esterilizante. Porém esta estratégia conferiu baixa taxa de proteção, até 56% em um de três experimentos (SEIXAS et al., 2007).

A imunogenicidade de LipL32 aumentou quando esta proteína foi fusionada a subunidade B da toxina colérica (HABARTA et al., 2010). Esta estratégia chegou a conferir 80% de proteção, porém outros experimentos seriam necessários para comprovação da eficácia protetora conferida por esta estratégia vacinal (HAUK et al., 2009). A fusão de LipL32 fusionada com a subunidade B de LT, toxina termolábil de *E. coli*, possibilitou taxa de sobrevivência de 100% dos animais em dois experimentos independentes. Mas os resultados obtidos no grupo controle colocam em dúvida a confiabilidade dos experimentos. A administração de apenas LT no grupo controle possibilitou a sobrevivência de 40% dos animais (GRASSMANN et al., 2012).

O potencial protetor de proteínas da família Lig foi avaliado em diferentes estratégias vacinais, que mostraram que estas proteínas são candidatos vacinais em potencial. As proteínas LigA e LigB induziram imunidade protetiva em camundongos suscetíveis C3H/HeJ, camundongos suscetíveis á leptospirose por serem deficientes no receptor toll-4. Neste trabalho foi reportado taxa de proteção variando de 90 á 100%. No entanto, esta estratégia vacinal empregou adjuvante de Freund, adjuvante não licenciado para uso em humanos (KOIZUMI et al., 2004).

Trabalhos reportam que a imunidade protetiva conferida pela proteína LigA pode ser dada pela região carboxiterminal. Esta porção da proteína conferiu de 100% á 66% de proteção em hamsters desafiados (SILVA et al., 2007). Outro trabalho atribuiu o perfil protetor de LigA aos domínios sete á treze (COUTINHO et al., 2011). Porém em todos estes trabalhos adjuvante de Freund foi utilizado.

A eficácia protetora de LigA com o emprego do adjuvante hidróxido de alumínio também foi avaliada. A taxa de sobrevivência com esta estratégia foi de 100% em três experimentos independentes. Porém a baixa virulência da bactéria tornou possível a sobrevivência dos animais do grupo controle, taxa de sobrevivência variando entre 57 á 88% (PALANIAPPAN et al., 2006).

Outras estratégias vacinais empregando proteínas LigA e LigB, como vacinas DNA, que induziram a expressão de LigA, e lipossomos contendo LigA e LigB aumentaram a sobrevivência de hamsters em meio desafio letal (FAISAL et al., 2008, 2009a; YAN et al., 2009).

Adicionalmente foi observado o aumento na sobrevivência no desafio de hamsters imunizados com porções conservadas de LigB fusionadas ao domínio 12 (porção variável de LigB) e porção C-terminal de LipL32. No entanto a baixa taxa de sobrevivência, 50%, não torna esta estratégia interessante em aplicações vacinais (CAO et al., 2011).

A eficácia protetora de proteínas com o domínio OmpA, á saber Lp0607 (rMceII), Lp1118, e Lp1454 foi testada. A administração destas proteínas com o adjuvante hidróxido de alumínio possibilitou sobrevivência de 70-100% em hamsters desafiados, porém houve taxa de sobrevivência de 43% no grupo controle (CHANG et al., 2007). Outros experimentos visando o aumento do perfil protetor destes candidatos compreenderam a administração destas proteínas em vesículas compostas por lipídeos de *Mycobacterium smegmatis* (esmegmossomos), *L. biflexa* sv. Patoc (leptossomos), *E. coli* (escleriossomos) e de fosfadilcolina (lipossomos) (FAISAL et al., 2009b, c).

A taxa de sobrevivência dos animais imunizados com esmegmossomos, leptossomos e escleriossomos contendo as proteínas foi de 75%. Lipossomos contendo as proteínas conferiram apenas 37,5% de sobrevivência. Adicionalmente animais imunizados apresentaram menos lesões histopatológicas e os controles negativos, vesículas vazias, não conferiram proteção. No entanto, nestes experimentos, os animais foram sacrificados assim que apresentaram sinais clínicos. Esse critério de sobrevivência pode não reproduzir dados reais sobre a taxa de sobrevivência dos animais desafiados (FAISAL et al., 2009b, c).

Outras proteínas com domínio OmpA que induziram imunidade protetora, porém baixa taxa de sobrevivência, são rLp3685 e rLp4337. A taxa de proteção variou entre 50-67%. O reconhecido fator de virulência Loa22 induziu proteção estatisticamente insignificante, 33 á 50% (YAN et al., 2010).

Trabalhos caracterizando o potencial de proteção de proteínas hipotéticas com localização predita na membrana estão sendo realizados. rLIC12730, rLIC10494, Lsa21, Lsa66 e rLIC11030 são proteínas que induziram proteção parcial em hamster (ATZINGEN et al., 2010, 2012). As proteínas recombinante rLIC10325 e rLIC13059 aumentaram de forma estatisticamente significativa a sobrevivência de animais imunizados (FÉLIX et al., 2011).

2 OBJETIVO

Clonar, expressar, purificar e caracterizar proteínas de *Leptospira* codificadas pelos genes LIC11087, LIC11228 e LIC11084

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise por bioinformática

Com base nas sequências genômicas obtidas pelo servidor público <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Generunner® (Hastings Software, Inc - <http://www.generunner.net/>) (NASCIMENTO et al., 2004b). Os genes LIC11087 (NCBI: YP_001057.1), LIC11121 (NCBI: YP_001091.1), LIC11228 (NCBI: YP_001197.1) e LIC11084 (NCBI: YP_001054.1) foram analisados por predição computacional quanto sua localização, presença de domínios conservados, e similaridade com sequências depositadas no NCBI.

A predição da localização foi analisada submetendo as sequências aos programas Psort - <http://psort.nibb.ac.jp/> (NAKAI; KANEHISA, 1991) e Cello- <http://cello.life.nctu.edu.tw/> (YU et al., 2004, 2006). O sítio de lipidação e o sítio de clivagem de cada gene foram identificados pelos programas LipoP- <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> (JUNCKER et al., 2003) e SignalP 4 (PETERSEN et al., 2011).

A presença de domínios com função conhecida foi avaliada com o empregando dos programas SMART- http://smart.embl-heidelberg.de/help/smart_about.html (LETUNIC et al., 2012; SCHULTZ et al., 1998) e PFAM - <http://pfam.sanger.ac.uk/> (FINN et al., 2006; SONNHAMMER et al., 1997)

A similaridade destes genes com sequências depositadas no banco de dados do NCBI foi avaliada por Blast (ALTSCHUL et al., 1990, 1997). O alinhamento destes genes com outros genes similares foi realizado pelo programa ClustalW2- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>(LARKIN et al., 2007).

3.2 Linhagens de *Leptospira* e condições de cultivo

Nos experimentos foram empregadas linhagens de leptospiras atenuadas em cultura. As seguintes espécies foram estudadas: *L. interrogans* (sorovars Copenhageni linhagem M-20, Canicola linhagem Hound Utrecht IV, Icterohaemorrhagiae linhagem RGA e Pomona linhagem Pomona), *L. borgpetersenii* (sorovars Castellonis linhagem Castellon 3 e Whitcombi linhagem Whitcomb), *L. kirschneri* (sorovars Cynoptery linhagem 3522C e

Grippothyphosa linhagem Moskva V), *L. santarosai* sorovar Shermani linhagem 1342 K, *L. noguchii* sorovar Panama linhagem CZ 214), *L. biflexa* sorovar Patoc linhagem Patoc 1.

Leptospiras foram cultivadas por 7 dias na temperatura de 30 °C em meio EMJH, Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (Difco™, Le Pont de Claix, França). O meio foi suplementado com soro de coelho (10%), L-asparagina (0.015%), piruvato de sódio (0.001%), cloreto de cálcio (0.001%), cloreto de magnésio (0.001%), peptona (0.03%) e extrato de carne (0.02%) (ELLINGHAUSEN; MC CULLOUGH, 1965; JOHNSON; HARRIS, 1967).

Nos procedimentos de clonagem foi empregada *E. coli* DH5 (HANAHAN, 1983). Para obtenção da proteína recombinante foram utilizadas as cepas de expressão *E. coli* BL21 SI (“Salt Induced”), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS (BHANDARI et al., 1997; STUDIER et al., 1990, 1991).

O cultivo da cepa *E. coli* DH5 foi realizado em meio LB (Luria Bertani), meio composto por 0,5% de extrato de levedura, 1% de triptona e 1% de NaCl. O cultivo foi mantido á 37 °C, por 24 h, em meio rotação de 200 rpm. A pressão de seleção na cultura foi realizada pela adição de ampicilina (100 µg/mL).

O cultivo de *E. coli* BL21 SI foi similar ao *E. coli* DH5 diferindo apenas no meio empregado. Esta cepa foi cultivada em meio 2YTON. Este meio é composto por 1% de extrato de levedura e 1,6% de triptona.

As cepas *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS foram cultivadas da meio LB a 30 °C. A pressão de seleção nas culturas de *E. coli* BL21 (DE3) foi realizada pela adição de ampicilina (100 µg/mL) e adicionalmente pela adição de cloranfenicol (100 µg/mL) nas culturas de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS.

3.3 Isolamento de DNA genômico

A cultura bacteriana foi centrifugada por 20 min á 4 °C em 3.200 rad. As células foram lisadas em tampão T.E. (Tris 10mM e EDTA 1M), SDS 10% e Proteinase K (20 mg/ml), 1 h á 37 °C. Após isso, foi realizada a precipitação das proteínas com adição de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção 25:24:1. As amostras foram lavadas respectivamente com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), acetato de sódio (décima parte do volume obtido), isopropanol (60%) e etanol 70%. No final dos procedimentos o material foi ressuspenso em H2O miliQ e mantido em -20 °C (SAMBROOK et al., 1989).

3.4 Amplificação dos genes

Os genes foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores descritos na tabela 1. Na reação polimerase em cadeia foi empregado como molde 100 ng do DNA genômico de *Leptospira* ssp; 1 U da enzima Taq polimerase; 300 ng de oligonucleotídeos iniciadores (F e R); 0,2 mM de deoxiribonucleotídeos (dNTP); 2 mM de MgCl₂; e 1x Tampão (Invitrogen Corporation, Califórnia, C.A., E.U.A.). O ciclo de amplificação empregado para amplificação dos genes foi desnaturação á 94 °C por 30 s, anelamento por 30 s (temperaturas empregadas Tabela 1) e extensão á 72 °C 1 min.

Tabela 1- Características dos oligonucleotídeos iniciadores empregados no processo de clonagem

Gene ID	Tamanho do produto de PCR	Temperatura de Anelamento	Oligonucleotídeo sintético
LIC11087	889 pb	54 °C	F:5'CTCGAGGGAGATTCCAGAAAGGAAAAC <i>XhoI</i> R:5'AAGCTTACCTGTGTGATGCGCTTCT <i>HindIII</i>
LIC11121	1052 pb	54 °C	F:5'CTCGAGAACGTTCAATATAATCAAGGT <i>XhoI</i> R:5'AAGCTTAAGGTTTTTCGAAGTAGTAGT <i>HindIII</i>
LIC11228	1403 pb	48 °C	F:GGATCCGAACAAATCGTATC <i>BamHI</i> R:GGGGTACCTTAGAATTCTATTGT <i>KpnI</i>
LIC11084	1126 pb	60 °C	F:GGATCCGTACAAAATGGAAGTGAAGGT <i>BamHI</i> R:5'AAGCTTTCCTTCTCTCACTATCGGA <i>HindIII</i>

Nota 1. Abreviaturas: ID, Identificação dos genes no projeto genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (sequencias disponíveis em <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>; F, “forward”; R, “reverse”; pb, pares de base. Os sítios de restrição inseridos pelos iniciadores estão sublinhados nas sequencias descritas na tabela.

3.5 Extração de RNA

RNA de leptospira foi extraído com o emprego do reagente TRIZOL®, segundo orientações do fabricante (Invitrogen). 20 mL de cultura foram centrifugados por 30 min á

4600 rad (4 °C). As células foram lavadas com PBSs e centrifugadas conforme anteriormente descrito.

A amostra foi ressuspensa em 2 mL de TRIZOL® e então centrifugada á 15.500 rad por 10 min á (4 °C). O sobrenadante foi transferido para microtubos novos, e foi adicionado 0,4 mL de clorofórmio a cada amostra. A amostra foi agitada manualmente por 15 s e então centrifugada por 15.500 rad , 10 min á 4 °C. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e tratada com 1 mL de isopropanol. A amostra foi homogeneizada e incubada por 10 min á 4 °C. A amostra foi centrifugada por 15.500 rad , 10 min á 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi tratadas com 1 mL de etanol 75% e então centrifugada por 15.500 rad , 10 min á 4 °C. O tratamento com etanol foi realizado duas vezes. O sedimento foi mantido á temperatura ambiente, para evaporação do etanol, e então ressuspenso em água tratada com DEPC® (invitrogen). O RNA obtido foi analisado por espectrometria quanto sua pureza (razão 260/230) e concentração (razão 260/280).

3.6 Síntese de DNA complementar á transcritos de leptospira

RNA extraído de culturas de leptospira foi utilizado como molde para síntese de DNA complementar (cDNA) por reagentes do Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Primeiramente degradação de DNA contaminante foi feita pelo tratado das amostras com a enzima DNase I Amplification Grade (Invitrogen). 1 µg de RNA foi tratado com 1 U de DNase I á temperatura ambiente, posteriormente a enzima foi inativada com 2,5 mM de EDTA por 10 min á 65 °C.

Para síntese de cDNA as amostras foram tratadas com reagentes do kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Cada amostra foi incubada por 5 min á 65 °C com 25 ng de iniciadores aleatórios (“*random hexamers*”) e 10 mM dNTP Mix. As amostras foram mantidas por 1 min em gelo. Então foram adicionados os demais reagentes necessários á reação, tampão fornecido pelo fabricante (“RT Buffer”, 1 X), MgCl₂ (5 mM), DTT(10 mM), RNase OUT(40 U) e enzima superscript III (200 U). A reação foi realizada em termociclador com o seguinte ciclo: 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min, 85 °C por 5 min e 4 °C por 5 min. RNA contaminante foi degradado com RNase H (1 U) por 20 min á 37 °C. O cDNA foi armazenado em -20 °C e empregadas em reações de PCR para a análise da expressão dos genes em estudo. Como controle negativo dos experimentos realizamos foram realizadas reações com as amostras sem adição da enzima superscript.

3.7 Preparo de extrato proteico total de leptospiros e *E. coli*

Culturas de leptospiros foram centrifugadas por 30 min á 4.600 rad (4 °C), condições para manter a integridade celular. As células foram lavadas com PBSIs e centrifugadas, procedimento realizado três vezes. As células foram ressuspensas em tampão para eletroforese de proteínas de maneira a ficarem 100 x mais concentradas. As amostras foram aquecidas á 100 °C por 10 min e mantidas em -20 °C.

3.8 Extrato de *E. coli*

A supressão de anticorpos contra proteínas contaminantes ocorreu pela adsorção do soro em extrato de *E. coli*. O extrato de *E. coli* foi produzido com células das cepas empregadas na expressão das proteínas. Células não transformadas foram cultivadas por 24 h. Estas células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas no tampão de lise (40 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100). A lise das células ocorreu pelo processo de sonicação das amostras em banho de gelo (GRUBER; ZINGALES, 1995).

3.9 Western-blotting para análise da expressão de proteínas

A detecção de proteínas nativas em culturas de leptospiros e proteínas recombinantes em células de *E. coli* foi realizada por *immunoblotting*. Amostras proteicas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS 12,5% e posteriormente foram transferidas á uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Bucks, Reino Unido) em sistema semi-úmido (GE).

O processo de transferência foi realizado por 1 h sob amperagem de 0,8 mA por cm². O tampão empregado durante o procedimento foi Tris-Glicina, acrescido de 1,85% de SDS. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração das proteínas imobilizadas na membrana com *Ponceau S* (Sigma, Missouri, M.O., E.U.A.). A membrana foi descorada com PBS/Tween 0,05% e bloqueada com PBS contendo 10% de leite desnatado por 18 h a temperatura de 4 °C.

A membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05%, por 10 min cada lavagem. Para detecção das proteínas nativas em leptospiros a membrana foi tratada com

anticorpos policlonais homólogos as respectivas proteínas. Nestes experimentos a membrana foi incubada com PBS contendo os anticorpos policlonais, na diluição 1:100, por 2 h á temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05%, por 10 min cada lavagem. E então foi incubada com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000, por 1 h á temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05%, por 10 min cada lavagem.

A detecção da proteína recombinante foi realizada por anticorpos monoclonais anti 6x histidina conjugados com peroxidase (Sigma). As proteínas imobilizadas na membrana foram detectadas com o tratamento da membrana com PBS contendo estes anticorpos na diluição 1:5.000.

A imunodeteccção foi evidenciada com o emprego do kit ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). A quimiluminescência foi detectada pela exposição da membrana a filmes de raio-X (Kodak) ou por foto-documentador (gel logic pro 2200, Carestream).

3.10 Clonagem

Os genes amplificados foram ligados no vetor de clonagem pGEM-T easy (PROMEGA, Madison, Wisconsin, EUA) e subclonados no vetor de expressão pAE. Os produtos de PCR resultante da amplificação do gene foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) corado com Gel Red™ (Biotium, Inc, California, C.A., EUA). Os clones recombinantes foram sequenciados para confirmação da clonagem.

Para ligação dos produtos de PCR no vetor pGEM-T easy (PROMEGA), os amplicons foram separados por eletroforese e excisados do gel pelo emprego do kit “GFxPCR DNA and gel band purification” (GE Healthcare, , Buckinghamshire, Reino Unido). Os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm.

Os insertos foram ligados ao vetor pGEM-T easy (PROMEGA), segundo orientações do fabricante (Figura 1). A reação foi empregada para transformação de *E. coli* DH5 competente (HANAHAN, 1983). Todo volume da reação de ligação ao vetor pGEM-T easy (PROMEGA) foi adicionado á microtubo contendo *E. coli* DH5 competente. As células foram incubadas por 30 min em banho de gelo. Para a internalização de DNA exógeno, ás células foram submetidas a choque térmico, e assim as amostras foram mantidas por 30 s á 42

°C e por 2 min á 0 °C. Para regeneração as células transformadas foram cultivadas sob agitação em meio LB, á 37 °C por 1 hora. As amostras foram plaqueada em LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 100 mM de IPTG e 50 mg/mL de X-gal.

Os clones recombinantes foram pré-selecionados a partir da coloração que apresentaram. As colônias positivas apresentavam coloração branca devido a inativação do gene codificante para galactose. Essas colônias foram cultivadas em meio LB (contendo 100 µg/mL de ampicilina) por 18 h á 37 °C, sob agitação. As células foram centrifugadas e a confirmação da clonagem ocorreu pela amplificação dos genes de interesse com iniciadores específicos.

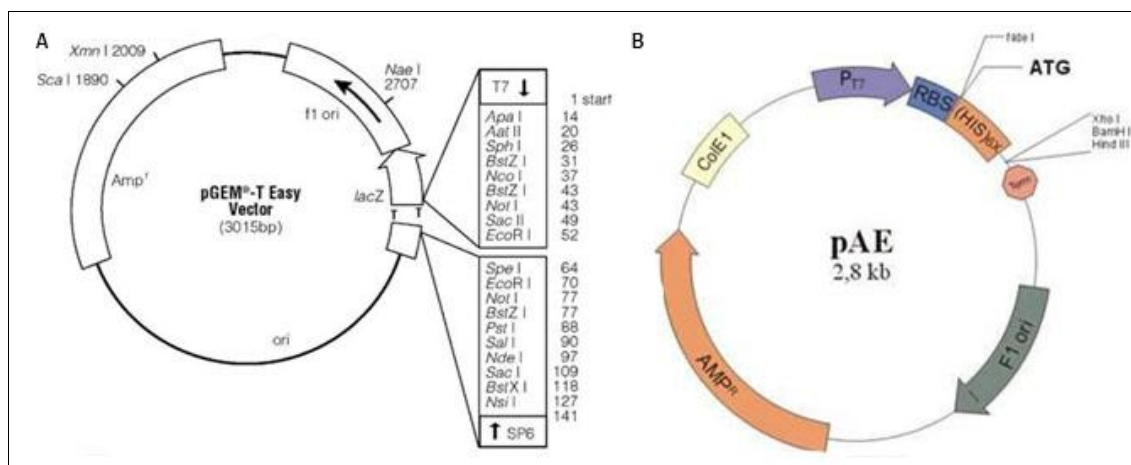
O DNA plasmidial (pGEM-T Easy/inserto) do material positivo foi extraído com a utilização do kit “Plasmid prepmini spin” (GE Healthcare). A extração foi realizada segundo orientações do fabricante. Os insertos foram liberados do vetor por digestão com as enzimas de restrição apropriadas, sítio de restrição empregado para as clonagens dos genes estão descritos na tabela 1.

Após digestão, a liberação dos insertos foi avaliada por eletroforese em gel. As bandas com tamanho esperado foram purificadas do gel pelo kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare). Os insertos foram ligados ao vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) pela ação da enzima T4 ligase (GE Healthcare).

O vetor pAE foi previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem e foi desfosforilado com 1 U da enzima CIAP, *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* (Invitrogen).

A proporção entre inserto e vetor empregada na reação de ligação foi de 3:1. A reação foi realizada á 25 °C por 4 h. Células de *E. coli* DH5 competentes foram transformadas com a mistura de ligação e cultivadas em LB/ Amp á 37 °C por 18 h.

Figura 1- Vetores empregados no processo de clonagem dos genes



Vetores empregados no processo de clonagem dos genes. (A) Mapa do vetor pGEM-T easy. f1ori: origem de replicação. Ampr: gene de resistência a ampicilina. lacZ: gene para metabolismo de lactose (-galactosidase). (B) Mapa do vetor de expressão pAE . P_{T7}: promotor do fago T7, (His)_{6x}: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição (T7). F1ori: origem de replicação. Amp^r: gene de resistência à ampicilina.

A confirmação da presença do inserto nos clones recombinantes foi dada com a amplificação dos genes de interesse. Outra avaliação das colônias positivas foi dada pela análise de restrição de plasmídeos extraídos dos clones positivos.

Os clones positivos foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' ou reverse 5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3', que se anelam ao vetor pAE na região do gene T7 (RAMOS et al., 2004). Foi utilizado o sequenciador automático ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, Califórnia, C.A., E.U.A.) e o método da terminação da cadeia para sequenciamento das amostras (SANGER et al., 1977). A reação foi montada conforme orientações do fabricante num volume final de 20 µl contendo DNA molde 150 ng, 1,6 pmoles de oligonucleotídeo e 2 µl do tampão BigDye® (Life Technologies) que contém: ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, dNTPs e Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador seguindo a rotina de 40 ciclos de a) 94 °C por 10 s; b) 52 °C por 20 s; c) 60 °C por 4 min. A seguir, a mistura foi precipitada com isopropanol 75% e centrifugada 50 min a 11.500 rad a temperatura ambiente. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, seco a vácuo em centrifuga e ressuspensão para aplicação em 15 µl de formamida HiDi (Life Technologies). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio dos programas

públicos: Chromas (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>) e Blast 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990, 1997).

3.11 Expressão das proteínas recombinantes

A indução da expressão das proteínas recombinantes ocorreu nas cepas de expressão *E. coli* BL21 SI (Salt Induced), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS (BHANDARI et al., 1997; STUDIER et al., 1991, 1990).

A cepa de *E. coli* BL21 (SI) possui o gene T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob o controle do promotor proU, induzível por NaCl (BHANDARI et al., 1997). As diferentes cepas de *E. coli* DE3 também possuem o gene da T7 RNA polimerase, sob controle do promotor lac UV5, o qual é induzido por IPTG (STUDIER et al., 1990). A cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS, por sua vez, carrega o plasmídeo pLys que produz pequenas quantidades de T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A redução da expressão basal da T7 RNA polimerase e permite a expressão de proteínas recombinantes mais estáveis, particularmente para proteínas tóxicas (STUDIER et al., 1991).

Bactérias competentes *E. coli* BL21 SI foram transformadas com o plasmídeo recombinante e cultivadas em meio 2YT/ON contendo 100 µg/mL de ampicilina por 18 h. As culturas saturadas foram diluídas 1:20 e incubadas até atingir uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda 600 nm. A indução do promotor proU foi realizada com a adição de NaCl na concentração 300 mM, 150 mM e 75 mM. As culturas foram incubadas por 4 h.

O processo de indução em *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS ocorreu por IPTG foi semelhante, porém o meio utilizado foi o LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para *E. coli* BL21 (DE3) ou 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de cloranfenicol para seleção de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS. A temperatura de incubação foi de 37 °C e a indução do promotor lac UV5 foi realizada adicionando-se 0,25 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG. Após indução as culturas foram incubadas sob a mesma temperatura por um período de 4 h.

A seguir as bactérias foram centrifugadas (3.200 rad/15 min/4 °C) e os sedimentos ressuspensos em tampão de lise (40 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF e 1% Triton X-100). As bactérias foram então lisadas em banho de gelo por sonicação (50 Hz por 5 min, ciclo contínuo) e centrifugadas por 15 min, 4 °C á 6.400 rad.

Após procedimento de sonicação o sobrenadante do lisado celular foi separado de corpúsculos de inclusão por centrifugação, 15 min á 6.400 rad. Os sedimentos formados foram ressuspensos em tampão de desnaturação (40 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM de mercaptoetanol e 8 M uréia). Alíquotas do sobrenadante e ou do sedimento do lisado celular foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS 12,5%.

3.12 Purificação

A proteína codificada pelo gene LIC11087 foi purificada a partir de 400 mL de cultura induzida. A proteína foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) e purificada por cromatografia de afinidade ao metal.

As células foram coletadas por centrifugação lisadas como anteriormente descrito. A proteína foi solubilizada no tampão (8 M ureia; 20 mM Tris-HCl pH12; 0,5 M NaCl e 5 mM imidazol) por 18 h. A amostra foi centrifugada por 15 min, á 6.400 rad, e o sobrenadante foi empregado na purificação da proteína pelo aparelho ÄKTAPrime plus (GE Healthcare). O procedimento de purificação foi realizado com coluna HiTrap™ contendo resina “Chelating HP” (GE Healthcare).

O processo de purificação se iniciou com a adsorção da proteína na coluna carregada com níquel. Antes do inicio da purificação a coluna foi previamente tratada com tampão empregado para a solubilização da proteína. A seguir a renaturação da proteína foi realizada com o tratamento da coluna com tampões com concentrações decrescentes de ureia (de 8 a 0 M), e a exclusão de proteínas contaminantes, foi realizada tratando a coluna com tampões contendo baixa concentração de imidazol. Ao final a proteína rLIC11087 foi eluída no tampão 20 mM Tris-HCl pH12; 200 mM NaCl e 0,5 M Imidazol.

A proteína codificada pelo gene LIC11228, expressa na forma insolúvel pela bactéria *E. coli* BL21 (SI) e foi purificada a partir de 400 mL de cultura. Após a lise celular, corpúsculos de inclusão, coletados por centrifugação, foram solubilizados no tampão 8 M ureia; 20 mM Tris-HCl (pH12); 0,15 M NaCl. A amostra foi renaturada por gotejamento em 2 L do tampão de renaturação (20 mM tris pH12 e 0,15 M NaCl). O procedimento de purificação foi realizado com a adsorção da proteína na resina “Chelating Sepharose” (GE Healthcare) previamente carregada com níquel e com o tampão 20 mM Tris-HCl (pH12); 0,15 M NaCl. A retirada de proteínas contaminantes foi realizada tratando a coluna com tampão 20 mM Tris-HCl (pH12); 0,15 M NaCl contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 40

e 60 mM). A proteína de interesse foi eluída em 15 mL do tampão 20 mM Tris-HCl (pH12); 0,15 M NaCl acrescido de 1 M imidazol.

A proteína codificada por LIC11084 foi expressa pela bactéria *E. coli* BL21 (SI) e purificada a partir da fração solúvel. No processo de purificação foram empregados 200 mL de cultura induzida. As células foram coletadas por centrifugação e lisadas. O sobrenadante do lisado celular foi diluído no tampão 20 mM Tris-HCl pH12; 0,5 M NaCl e 5 mM imidazol e empregado no processo de purificação. A purificação desta proteína foi realizada pelo aparelho ÄKTAPrime plus (GE Healthcare) e a coluna empregada no procedimento foi HiTrap™ contendo resina “Chelating HP” (GE Healthcare). A proteína foi adsorvida na coluna, previamente carregada com níquel e equilibrada com o tampão de diluição da amostra. Proteínas contaminantes foram retiradas com lavagens da coluna com tampões com concentrações crescentes de imidazol, e a eluição de rLIC11084 foi feita com tampão contendo 0,5 M de Imidazol.

Após o procedimento de purificação, as frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida/SDS 12,5% (SDS-PAGE). As frações contendo as proteínas rLIC11087 e rLIC11084 foram dialisadas em 2 L de tampão 20 mM Tris-HCl pH12; 500 mM NaCl e 0,01% glicina. A proteína rLIC11228 foi dialisada em 2 L de tampão 20 mM Tris-HCl pH12; 150 mM NaCl e 0,01% glicina. O processo de diálise foi realizado á 4 °C por 2 h. Foram realizadas duas trocas. A concentração das proteínas recombinantes foi estimada por densitometria. Após eletroforese, bandas referentes as proteínas purificadas foram comparadas a bandas geradas com concentrações pré-estabelecidas de albumina (*BSA – Bovine Serum Albumin*). As bandas foram avaliadas pelo programa Gel-Quant (AMPL SOFTWARE PTY LTD, Turramurra, Australia).

3.13 Espectroscopia circular (CD) das proteínas recombinantes

A proteína rLIC11087 (10 µM) foi dialisada em tampão fosfato de sódio, pH 7.4, 10 mM (Sambrook *et al.*, 1989), três trocas á 4 °C. As proteínas rLIC11228 e rLIC11084 foram dialisadas com duas trocas em tampão 10 mM tris pH12 e 20 mM NaCl. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipcidade molar residual:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100}{C \times l \times n} \times M$$

é elipicidade, M é a massa molecular da proteína (Daltons), C é a concentração da proteína (mg/mL), I é o caminho ótico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína (KELLY et al., 2005).

A obtenção dos espectros ocorreu após leitura das amostras no aparelho Espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japão). A leitura foi realizada á temperatura de 20 °C. Os resultados foram avaliados apartir da média de 5 leituras. Os valores obtidos foram comparados á estruturas depositadas no programa K₂D₂ (PEREZ-IRATXETA; ANDRADE NAVARRO, 2007).

3.14 Imunização de camundongos

Camundongos BalbC, fêmeas, de 6 semanas foram imunizados no dorso e subcutaneamente com 10 µg das proteínas recombinantes. O adjuvante empregado foi Alhydrogel (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca). Os grupos experimentais foram compostos de cinco animais. No grupo controle foi administrado PBS e adjuvante. Após o experimento os animais foram sacrificados com CO₂. Os animais foram imunizados com uma dose e dois reforços no intervalo de 15 dias.

As amostras de sangue coletadas foram mantidas á 4 °C por 18 h. O coágulo foi separado do soro por centrifugação (10 min á 6.400 rad). O soro coletado foi mantido em -20 °C.

3.15 Detecção de anticorpos IgG por ELISA

A detecção de anticorpos policlonais no soro de animais imunizados foi realizada por ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Foram empregadas nos experimentos placas Costar® *High binding* de 96 poços, (Corning, Virgínia, V.A., E.U.A.). Cada poço recebeu 250 ng de proteína recombinante diluída em 50 µl de tampão carbonato 0,05 M pH9,6. A placa foi incubada 18 h á temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes com PBS-tween 0,05%. Os poços foram bloqueados com 200 µl de uma solução contendo PBS e 10% de leite desnatado, por duas horas á 37%.

Em placas de microdiluição, os soros foram diluídos de 1:200 á 1:409.600 em PBS 1x contendo 10% de extrato de *E.coli*. As placas foram incubadas por 1 h á 37 °C. Após descarte da solução de bloqueio foi adicionado 50 µl dos soros. A placa foi incubada por 1 h á 37 °C.

Após lavagens foi adicionado 50 µl de PBS contendo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:5.000. A reação enzimática foi revelada pela adição de 1mg/mL de OPD (-phenylenediamina, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH5,0 contendo 0,03% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (100 µL por poço). Após 15 min de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 4 N.

A densidade ótica (DO) da reação foi avaliada no comprimento de onda de 492 nm, em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific, Massachusetts, MA, EUA). A densidade ótica obtida com a leitura das amostras de soro foi subtraída da densidade ótica de poços que foram incubados com antígeno e não tratadas com anticorpos. O título individual foi determinado como sendo a maior diluição com valor de DO acima de 0,1.

3.16 Avaliação da resposta celular

A proliferação de esplenócitos e a secreção de citocinas a partir de células de animais imunizados com as proteínas recombinantes foram avaliadas *in vitro*. O baço de animais imunizados foi coletado assepticamente e, mantido á 0 °C em meio RPMI contendo penicilina (100 IU/ml) e estreptomina (10 µg/ml). As células foram obtidas após maceração do órgão e coletadas por centrifugação (4 °C, 6.400 rad, 10 min, “no break”). Após lavagem em PBS estéril as hemácias foram lisadas com água em agitação por 10 s e meio RPMI foi adicionado.

As células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas para cultura celular com 2,5 µg de proteína ou 5 µg de concanavalina A (Sigma). Para avaliação da proliferação de esplenócitos, 10⁵ células foram cultivadas em meio RPMI completo em placas para cultura celular de 96 poços (Corning). Para avaliação da secreção de citocinas 10⁶ foram cultivadas em placas de 24 poços (BD Falcon™, New Jersey, N.J., E.U.A.). As células foram incubadas por dois dias á 37 °C e 5% CO₂.

A proliferação dos esplenócitos foi analisada com emprego do kit colorimétrico BrdU (Roche applied science, Bavaria, Alemanha) . BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) é um análogo de timidina que pode ser incorporado pelas células em proliferação. Quando incorporado BrdU pode se detectado por anticorpos específicos. O ensaio foi realizado conforme

orientações do fabricante. Foi adicionado 20 μ L de BrdU as células em cultura. As amostras foram incubadas por 2 h á 37 °C (5% CO₂). A placa foi centrifugada á 4°C, 6400 rad, 10 min, “*no break*”. Após aspiração do meio, o DNA foi desnaturado com a adição de Fixdenat, e as amostras foram incubadas 30 min á temperatura ambiente. Foi adicionado anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase, na diluição 1:100, e as amostras foram incubadas por 90 min á temperatura ambiente. Após lavagens foi adicionado 100 μ L da solução substrato. As amostras foram incubadas entre 5 á 30 min. Reação foi parada com adição de 1 M de H₂SO₄. Os valores de absorbância foram obtidos no comprimento de onda 450 nm e fator de correção em 690 nm.

As citocinas presentes no sobrenadante da cultura celular foram detectadas por ELISA de captura. Placas de cultura foram centrifugadas á 4 °C, 6400 rad, 10 min, “*no break*”. O sobrenadante foi transferido para microtubo e armazenado á -20 °C. Nestas amostras avaliamos a presença de IL-4, IL12 e IFN . Os reagentes foram comercialmente obtidos e os experimentos foram realizados conforme orientações do fabricante (Peprotech, Cidade do México, México).

Placas de 96 poços (Costar® High binding, Corning) foram tratadas com 100 ng de anticopos de captura (Peprotech), por 16 h á temperatura ambiente. Após lavagens com PBS-tween 0,05% os poços foram bloqueados com 300 μ L de solução de bloqueio (1 h á temperatura ambiente). Após lavagens 100 μ L das amostras ou da solução padrão foram adicionadas em cada poço. As placas foram incubadas 2 h á temperatura ambiente. Após lavagens foi adicionado anticorpo de detecção, na concentração recomendada pelo fabricante. As placas foram incubadas 2 h á temperatura ambiente. Após lavagens foi adicionado anticorpo secundário conjugado com avidina (1:2.000). As placas foram incubadas por 30 min á temperatura ambiente, e lavadas com PBS-tween 0,05%. Foram adicionados 100 μ L da solução substrato, ABTS (Sigma). As placas foram incubadas até o desenvolvimento de cor. A leitura da densidade ótica foi realizada no comprimento de onda 405 nm com fator de correção á 650 nm.

3.17 Interação das proteínas trecombinantes com ECM e componentes do soro

A avaliação da interação das proteínas recombinantes com componentes de matriz extracelular e componentes foi realizada por ELISA (BARBOSA et al., 2006). Foram

empregadas diferentes proteínas de matriz extracelular e proteínas séricas obtidas comercialmente. Como controle foi utilizado BSA, fetuína e gelatina.

Laminina, colágeno tipo IV, colágeno tipo I, fibronectina celular, elastina, componentes do sistema complemento, vitronectina, componentes de matriz extracelular, BSA (controle negativo) e gelatina (controle negativo) foram comercialmente obtidos do fabricante Sigma. Fibrinogênio foi comercialmente obtido do fabricante Invitrogen. Fibronectina plasmática e plasminogênio foram comercialmente obtidos de Merk (New Jersey, N.J., E.U.A.). Os componentes fator H e C4bp foram respectivamente obtidos dos fabricantes Calbiochem (Darmstadt, Alemanha) e Complement Technology, INC (Texas, T.X., E.U.A.).

Placas de ELISA (Costar® High binding, Corning) de 96 poços foram tratadas com 1 µg de cada componente diluído em PBS 1 x. As placas foram incubadas por três horas á 37 °C. Os poços foram bloqueados com PBS contendo 10% de leite desnatado por 18 h. A solução de bloqueio foi descartada e foi adicionado 1 µg de proteína á cada poço. As placas foram mantidas por 2 h á 37 °C e lavadas 3 vezes com PBS-tween 0,05%. Para detecção de proteínas ligantes, foi adicionado anticorpos policlonais homólogos ou anticorpos contra resíduos de histidina (sigma). A diluição de anticorpos policlonais homólogos variou de acordo com a proteína. Foi empregada a diluição cuja densidade ótica foi 1 em experimentos de titulação. Os anticorpos homólogos foram diluídos 1:2.000 para detecção de rLIC11087 e 1:50.000 para detecção de rLIC11228 e rLIC11084.

Quando a detecção da proteína foi realizada por anticorpos policlonais homólogos, foi adicionado, após lavagens, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:5.000. Os procedimentos de revelação e leitura da densidade ótica estão descritos no final da seção detecção de anticorpos IgG por ELISA. Para análises estatísticas, a densidade ótica da ligação das proteínas recombinantes aos componentes foi comparada com os controles negativos por *Student's t test* (bicaudal).

A interferência da estrutura da proteína na ligação á proteínas de matriz e proteínas séricas também foi investigada. As proteínas recombinantes foram fervidas á 100 °C por 10 min antes de serem adicionadas aos poços.

A afinidade das proteínas aos seus respectivos componentes ligantes foi avaliada variando a concentração de proteína. A densidade ótica obtida foi usada para calcular a constante de dissociação (K_D) (LIN et al., 2009a; PATHIRANA et al., 2006). A equação empregada foi $K_D = (A_{máx} [proteína]/A) - [proteína]$. A é a absorbância numa dada concentração

de proteína, $A_{m\acute{a}x}$ é a absorbância máxima (equilíbrio), [proteína] é a concentração da proteína e K_D é a constante de dissociação para uma dada absorbância numa dada concentração de proteína.

3.18 Inibição da formação do coágulo de fibrina por rLIC11087

Foi avaliado a inibição da formação do coágulo de fibrina pela interação de rLIC11087 com fibrinogênio (LIN et al., 2011). 1 μ g de proteína foi incubado com 1 mg/mL de fibrinogênio (Invitrogen) 2 h á 37 °C. 1 U de trombina (Sigma) foi adicionado ás amostras. As placas foram lidas a cada 5 min em espectrofotômetro (Multiskan FC) no comprimento de onda 600 nm. Como controle negativo foi avaliado a formação do coágulo sem adição de trombina e como controle positivo foi avaliado a formação do coágulo sem a adição de rLIC11087.

3.19 Interferência da interação entre as proteínas recombinantes e plasminogênio pelo ácido aminocapróico

Para avaliarmos se a ligação de rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 ocorre por resíduos de lisina adicionamos o análogo de lisina ácido 6-aminocapróico (Sigma). Placas de 96 poços foram incubadas com 1 μ g de proteína recombinante. As placas foram incubadas por 18 h. Os poços foram bloqueados com PBS contendo 10% de leite desnatado por 2 h. Foi adicionado 1 μ g de plasminogênio com 2 mM de ácido 6-aminocapróico, e as placas foram incubadas por 2 h á 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween 0,05% e o plasminogênio ligado foi detectado por anticorpos específicos e conjugados com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000. Os procedimentos de revelação e leitura da densidade ótica estão descritos no final da seção detecção de anticorpos IgG por ELISA.

3.20 Atividade enzimática de plasmina gerada a partir de plasminogênio ligado ás proteínas recombinante

Foi avaliada por ELISA a clivagem de um substrato cromógeno por plasmina gerada a partir de plasminogênio ligado as proteínas recombinantes (VIEIRA et al., 2010b). Placas de 96 poços foram incubadas com 1 μ g de proteína recombinante. As placas foram incubadas por

18 h. Os poços foram bloqueados com PBS contendo 10% de leite desnatado por 2 h. Foi adicionado 1 µg de plasminogênio e as placas foram incubadas por 2 h á 37 °C. As placas foram lavadas para retirada de plasminogênio não ligado e foi adicionado 4 ng do ativador uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase). Foi adicionado a cada poço 0,4 mM do substrato cromógeno D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma) diluído em PBS. A reação foi mantida por 18 h á 37 °C e a densidade ótica das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (Multiskan FC) no comprimento de onda 405 nm. Como controles negativos avaliamos a geração de plasmina com o emprego de como substrato gelatina ou ocultando um dos componentes da reação, substrato, plasminogênio ou ativador.

3.21 Imunofluorescência para análise da localização celular das proteínas

A análise da localização das proteínas na superfície de leptospiros foi realizada por imunofluorescência. 10⁹ Células de leptospiros cultivadas em meio EMJH por sete dias foram coletadas por centrifugação 6.400 rad por 15 min á 4 °C. O sedimento bacteriano foi lavado por 3 vezes com PBSIs e as células foram fixadas com a adição de 0,2 mL de paraformaldeído 2%. As amostras foram mantidas por 40 min a 30 °C e então centrifugadas por 10 min, 6.400 rad, á 4 °C. As amostras foram bloqueadas com PBSIs e BSA 5% por 90 min. As células foram centrifugadas por 10 min, 6400 rad, á 4 °C e incubadas com antissoro contendo anticorpos homólogos a proteínas recombinantes diluídos 1:50 em PBSIs e BSA 1%. As amostras foram mantidas 1 h á 30 °C e então lavadas por 3 vezes com PBSIs. As células incubadas por 45 min a 30 °C com 200 µL de iodeto de propídio (Sigma) diluído 1:5 e anticorpo secundário diluído 1:50 (Sigma). O anticorpo secundário é conjugado com FITC (fluoresceína isocianetada) e específico a detecção de anticorpos de camundongos. As amostras foram lavadas por 3 vezes com PBSIs e ressuspensas em 25 µL de PBSIs e uma gota de antifade ProLong® Gold (Invitrogen). As lâminas foram montadas e incubadas por 16 h. As amostras foram avaliadas em microscópio de imunofluorescência confocal LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha) do departamento de Parasitologia do instituto Butantan (São Paulo, S.P.). Foi empregado aumento de 600 vezes (FITC, excitação em 488 nm, emissão 500-550 nm; Iodeto de propídeo, excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

3.22 Condições de infecção de hamster

Hamsters machos foram infectados via intraperitoneal com 1×10^4 *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm virulenta. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital após o desenvolvimento dos sintomas (5 dias após infecção). Os soros destes animais foram empregados nos experimentos de reatividade de anticorpos e proteínas recombinantes. Os animais foram diagnosticados com leptospirose através de MAT. O protocolo de experimentação foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

3.23 Teste de microaglutinação

O ensaio de MAT foi realizado conforme descrito por Faine et al., 1999. Foi empregado 22 sorovares como antígeno: Andaman, Australis, Autumnalis, Bataviae, Butembo, Canicola, Castellonis, Celledoni, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc Pomona, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi e Wolffi. Todas as linhagens foram mantidas em meio líquido EMJH á 29 °C. Foi considerado o sorovar predominante o que apresentou aglutinação superior á 50%. Foram consideradas positivas amostras em que foi observado soroconversão, e negativas as amostras que não foi observada aglutinação em nenhum dos sorovares.

3.24 Detecção de anticorpos no soro de pacientes e animais infectados

A avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com anticorpos presentes no soro de pacientes ou em soro de animais infectados foi feita por ELISA (OLIVEIRA et al., 2008). As amostras de soro de paciente pertencem a soroteca do Instituto Adolfo Lutz São Paulo e foram cedidas pela Dra. Eliete C. Romero. O diagnóstico destes pacientes foi confirmado por MAT.

250 ng de proteína recombinante foram imobilizadas em placas de 96 poços. As placas foram lavadas e posteriormente bloqueadas com leite 10% em PBS-T. Amostras de soro de pacientes ou soro de animais infectados experimentalmente previamente adsorvidas em extrato de *E.coli* 10% e BSA 3% (na diluição 1:100) foram adicionadas aos poços. As placas foram lavadas e os anticorpos ligados foram detectados com anti-IgG humano conjugado com

peroxidase (Sigma) ou anti-IgG hamster conjugado com peroxidase (Sigma). A diluição empregada foi 1:5.000. A reação foi revelada como anteriormente descrito no procedimento de titulação dos soros imunes. Cada amostra de soro foi avaliada em duplicata.

Os valores de corte para avaliação dos respondedores (cutoff) foram calculados a partir da média da densidade ótica obtida com a reatividade de soro de doadores ou animais não infectados mais três vezes o valor do desvio padrão destes valores. As amostras de soro de doadores saudáveis foram obtidas comercialmente (Sigma) e de oito amostras de hamsters não infectados.

3.25 Imunização de hamsters e avaliação do perfil protetor de rLIC11084

Hamsters são modelos de infecção para leptospirose. Esses animais são altamente suscetíveis e desenvolve infecção similar a infecção severa em humanos (HAAKE, 2006). Para avaliação do perfil protetor de rLIC11084 hamsters macho foram imunizados com rLIC11084 e submetidos a desafio letal com a cepa virulenta *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm. Os animais foram imunizados subcutaneamente no dorso com 50 µg de proteína recombinante adsorvida em 10% (vol/vol) de Alhydrogel [2% Al(OH)₃] (Brenntag Biosector). O grupos experimentais foram compostos por 10 animais, e incluíram controle positivo, animais imunizados com bacterina, e controle negativo, animais imunizados apenas com PBS. Os animais foram imunizados com duas doses no intervalo de duas semanas. Antes de cada imunização os animais foram sangrados via plexo retro-orbital e a avaliação dos soros imunes foi realizada como descrito anteriormente na seção detecção de anticorpos IgG por ELISA.

Brevemente, a proteína recombinante, 250 ng por poço, foi imobilizada em placas de 96 poços Costar® (Corning). Após lavagens foi adicionada a solução de bloqueio, PBS-T com 10% de leite desnatado, e as placas foram mantidas por 2 h á 37 °C. A solução de bloqueio foi descartada e os soros dos animais imunes, diluídos seriadamente na solução de adsorção, foram adicionados. Após incubação de 1 h, as placas foram lavadas e então foi adicionado e anti-IgG hamster conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:5.000. A reação foi revelada como anteriormente descrito no procedimento de titulação dos soros imunes.

A bacterina foi preparada conforme descrito por Silva et al., 2007. 10⁹ células de *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm virulenta foram coletadas por

centrifugação, 20 min á 8.000 rad á temperatura ambiente. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS acrescido de 5 mM de MgCl₂ e então ressuspenseo em PBS. As células foram inativadas por calor, 20 min á 56 °C, e armazenadas á -20 °C.

15 dias após a segunda dose, os animais foram inoculados via intraperitonal com 200 µL de PBS contendo a DL₅₀ de *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm. O cálculo da DL₅₀ foi feito inoculando animais com diluições seriadas, de ordem 10, desta cepa. As doses variaram de 10⁹ á 10⁰ leptospiras por mL. Quatro animais foram infectados para cada dose. Os animais foram observados 2 vezes por dia entre os dias 21 e 28. Foi considerada a DL₅₀ a dose que ocasionou a morte de 50% dos animais. A DL50 para o primeiro experimento foi 2,76x10³ e para o segundo foi 2,5x10³ leptospiras.

Os animais desafiados foram observados por 21 dias. Após este tempo, o sangue dos animais sobreviventes foi coletado via punção cardíaca. Os rins foram coletados, macerados, resuspenso em solução salina (diluição 1:10 e 1:100) e então cultivado em meio EMJH modificado e semi-sólido á 28 °C para avaliação da presença de leptospiras. O crescimento foi monitorado por 6 semanas.

As análises estatísticas de sobrevivência foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 3.00, utilizando o método Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958). O valor P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características preditas das proteínas que levaram a seleção dos genes

O estudo de proteínas de membrana externa é importante para a identificação de novos alvos vacinais, desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e para a elucidação dos mecanismos de patogênese. O sequenciamento genômico de *L. interrogans* levou a identificação de 263 genes que codificam para supostas proteínas de membrana, sendo 250 destas com funções desconhecidas (NASCIMENTO et al., 2004a).

Baseado na análise do genoma por bioinformática, os genes LIC11221, LIC11087, LIC11228 e LIC11084 identificados e escolhidos para serem estudados visto que codificam para preditas proteínas hipotéticas de membrana externa.

Com a análise destes genes pelos programas PSORT e Cello foi constatado que LIC11121, LIC11087 e LIC11228 codificam para proteínas que apresentaram probabilidade de estarem localizadas na membrana externa (NAKAI; KANEHISA, 1991; YU et al., 2004, 2006). A proteína codificada por LIC11084 foi predita como uma proteína de membrana interna pelo programa PSORT e como uma proteína de membrana externa pelo programa Cello.

A probabilidade de lipidação ou exportação destas proteínas para membrana foi avaliada pela predição de peptídeos sinais pelos programas Signal P e LipoP (JUNCKER et al., 2003; PETERSEN et al., 2011). O método LipoP pode prever lipoproteínas de bactérias gram-negativas e seu peptídeo sinal de clivagem baseando-se nos modelos hidden Markov (HMM) ou Neural networks (JUNCKER et al., 2003; SETUBAL et al., 2006). Ele é capaz de classificar a sequência N-terminal de proteínas quanto à presença e a ausência do peptídeo sinal e do ponto de clivagem. O programa possibilita a distinção entre lipoproteínas, que são proteínas com peptídeo sinal e sítio de clivagem para enzima peptidase sinal II (SpII), proteínas com sítio de clivagem para enzima peptidase sinal I (SpI), e proteínas citoplasmáticas ou transmembrana que não possuem peptídeo sinal.

Pontos de clivagem foram identificados em todas as proteínas pelo programa Signal P. A proteína codificada por LIC11084 pode ser uma lipoproteína. Além da predição de aminoácidos que compõe a região do peptídeo sinal foi identificado sítio de clivagem para enzima SpII com a análise da sequência pelo programa LipoP, sugerindo lipidação.

Analisando os genes LIC11121 e LIC11228 por este programa, aminoácidos que compõem a região do peptídeo sinal e o sítio de clivagem da enzima SpI foram identificados. Não foi identificado nenhum sítio de clivagem na proteína codificada pelo gene LIC11087, porém este gene foi mantido no estudo devido resultados obtidos nos programas PSORT e SMART.

O programa SMART prediz domínios transmembrana pelo servidor público THMM (LETUNIC et al., 2012; SCHULTZ et al., 1998). A submissão das CDS neste programa resultou na predição de regiões transmembrana nas proteínas codificadas por LIC11121, LIC11087 e LIC11084. Apesar de não terem sido identificadas preditas regiões transmembrana na CDS LIC11228 a predita localização desta hipotética proteína na membrana foi sustentada pelos outros dados obtidos com a análise de bioinformática. A Tabela 2 sumariza os dados obtidos por análises de bioinformática.

Domínios conservados nas CDS foram investigados pelo programa PFAM (FINN et al., 2006; SONNHAMMER et al., 1997). Nenhum domínio conservado foi predito para LIC11087, LIC11121 e LIC11228. Na proteína codificada por LIC11084 foi identificado um domínio da proteína P22 (proteína capsular de bacteriófagos), porém este resultado foi dado como insignificante pelo programa de predição.

Tabela 2- Dados obtidos por análises de bioinformática

Gene ID	Sinal de clivagem e de Lipidação		Domínios e localização predita	
	LipoP	Signal P	PFAM	SMART
LIC11121	SpI	Sinal de clivagem (aa: 20-21)	ND	Transmembrana (aa:7-29)
LIC11087	ND	Sinal de clivagem (aa: 24-25)	ND	Transmembrana (aa:7-26)
LIC11228	SpI	Sinal de clivagem (aa: 27-28)	ND	ND
LIC11084	SpII	Sinal de clivagem (aa: 27-28)	P22	Transmembrana (aa:13-35)

Notas: Gene ID: Identificação do gene no genoma de *L.interrogans* sorovar Copenhageni; abreviações: aa- aminoácidos; ND- nada identificado.

Uma das características buscada em antígenos contra leptospirose é a sua conservação. Assim as proteínas codificadas pelos genes em estudo foram analisadas quanto a presença e similaridade com sequências depositadas no NCBI pela ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990, 1997).

Todas as proteínas demonstraram similaridade com proteínas hipotéticas de *L. interrogans* sorovar Lai linhagens 56601 e IPAV e *L. noguchii* linhagem 2006001870. As proteínas codificadas por LIC11087 e LIC11228 apresentaram similaridade com outras espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, *L. santarosai* linhagem 2000030832, *L. weilii* linhagem 2006001855, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis linhagens L550 e JB197.

Baixa identidade foi atribuída á espécies saprófitas e intermediárias. As proteínas codificadas por LIC11087, LIC11228 e LIC11121 apresentaram baixa identidade com sequencias de *L. biflexa* sorovar Patoc linhagens Patoc 1 (Ames) e Patoc 1 (Paris) e *L. licerasiae* sorovar Varillal linhagem MMD0835. LIC11084 apresentou baixa similaridade apenas com a espécie intermediária *L. licerasiae* sorovar Varillal linhagem MMD0835. Apenas a proteína hipotética de LIC11228 apresentou baixa similaridade, 22% de identidade, com proteínas de *Leptonema illini* DSM 21528, bactérias não patogênicas pertencentes á família *Leptospiraceae*.

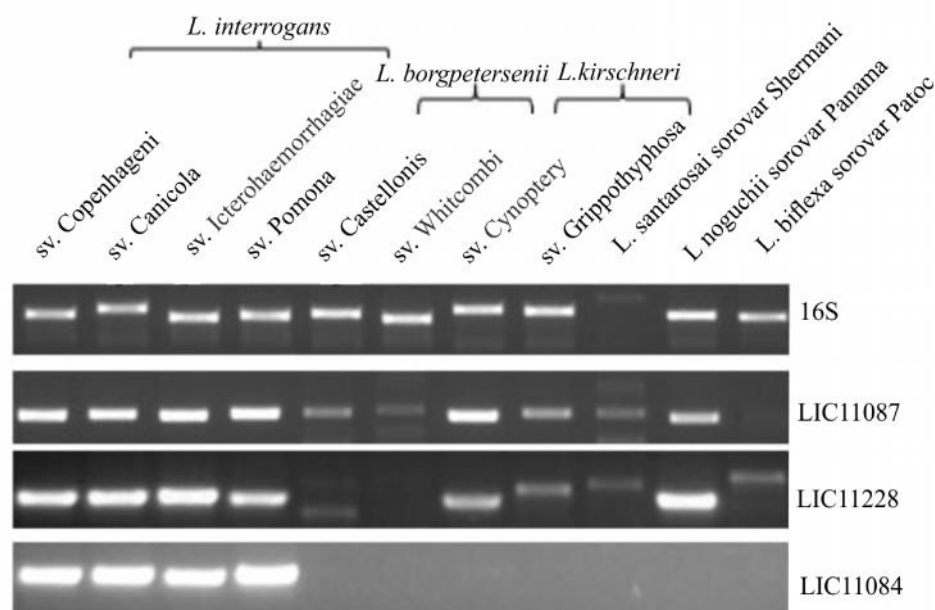
Os alinhamentos realizados com sequencias obtidas no banco de dados do NCBI e montados pelo programa Clustal podem ser visualizados no apêndice A.

4.2 Presença dos genes, seus transcritos e proteínas em espécies do gênero *Leptospira*

Para corroborar a análise *in silico* de conservação, foi avaliada a amplificação dos genes LIC11087, LIC11228 e LIC11084 a partir, do DNA genômico, de diferentes espécies do gênero *Leptospira*.

Os genes LIC11228 e LIC11087 foram amplificados em todas as espécies patogênicas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii*. O gene LIC11084 foi amplificado apenas nos sorovars da espécie *L. interrogans*. Apenas o gene LIC11228 foi amplificado a partir do DNA genômico de *L. biflexa* (Figura 2).

Figura 2- Amplificação dos genes em estudo de espécies do gênero *Leptospira*



Os genes foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores, específicos á LIC11087, LIC11228 e LIC11084, a partir do DNA genômico de espécies patogênicas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii* e da espécie saprófita *L. biflexa*.

Estes resultados corroboram os dados gerados por análise de bioinformática. O gene mais conservado é LIC11228, e a amplificação de LIC11084 e LIC11087 de espécies patogênicas pode sugerir que eles estão relacionados com a patogênese bacteriana. Estudos complementares são necessários para confirmar estas hipóteses.

Um gene de *L. biflexa* sorovar Patoc 1 apresenta baixa similaridade com o gene LIC11087, possivelmente devido a isso não foi possível a amplificação deste gene com os oligonucleotídeos empregados.

Apesar de apresentar alta identidade de LIC11228 com genes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis linhagens JB197 e L550 nenhum gene com tamanho esperado foi amplificado. Isto pode ter ocorrido por este gene ser polimórfico nas espécies de *L. borgpetersenii* sorovar Castellonis linhagem Castellon 3 e sorovar Whitcombi linhagem Whitcombi.

Também foi investigada a presença de transcritos correspondente aos genes em diferentes espécies. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram empregados na tentativa

de amplificação dos genes. Porém foi constatado contaminação das amostras nas reações sem transcriptase reversa. Isto tornou os dados inconclusivos.

Outra abordagem experimental empregada para a avaliação dessas CDS foi a identificação de proteínas por immunoblotting. Nestes experimentos os extratos proteicos de leptospira foram submetidos a eletroforese e transferidos para membrana de nitrocelulose.

Para análise da expressão da proteína nativa, extratos proteicos de diferentes espécies foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e identificadas com anticorpos policlonais contra rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084.

Nenhuma banda correspondente as proteínas em estudo foi identificada. Isto pode ser atribuído ao baixo número de cópias por células das proteínas (MALMSTROM et al., 2009; VIEIRA et al., 2009).

4.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC11121, LIC11087, LIC11228 e LIC11084 foram amplificadas a partir do DNA genômico extraído da cultura de *L. interrogans sorovar Copenhageni* pela técnica de PCR. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e apresentaram o tamanho esperado (Figura 3A).

Os insertos de DNA obtidos através da reação de PCR foram utilizados para clonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega). Esse é um vetor linearizado, com uma timidina 3'-terminal em ambas as extremidades, o que permite a ligação dos produtos de PCR e evita recircularização do vetor. Esse vetor contém ainda promotores T7 e SP6, e o sítio de múltipla clonagem interrompendo a região codificadora da enzima β -galactosidase. Essa inativação permite a identificação dos clones recombinantes por seleção azul/branco em placas contendo LB/Amp, IPTG e X-Gal.

Após transformação em bactérias competentes, os clones recombinantes foram pré-selecionados pela coloração apresentada e a confirmação da clonagem seguiu por amplificação dos genes de interesse com iniciadores específicos. A reação de amplificação foi realizada a partir de 2 μ l de colônias pré selecionadas.

Os insertos foram removidos dos plasmídeos recombinantes (pGEM-T Easy/inserto) através de ensaio de restrição utilizando as enzimas *XhoI/HindIII* para os vetores pGEM

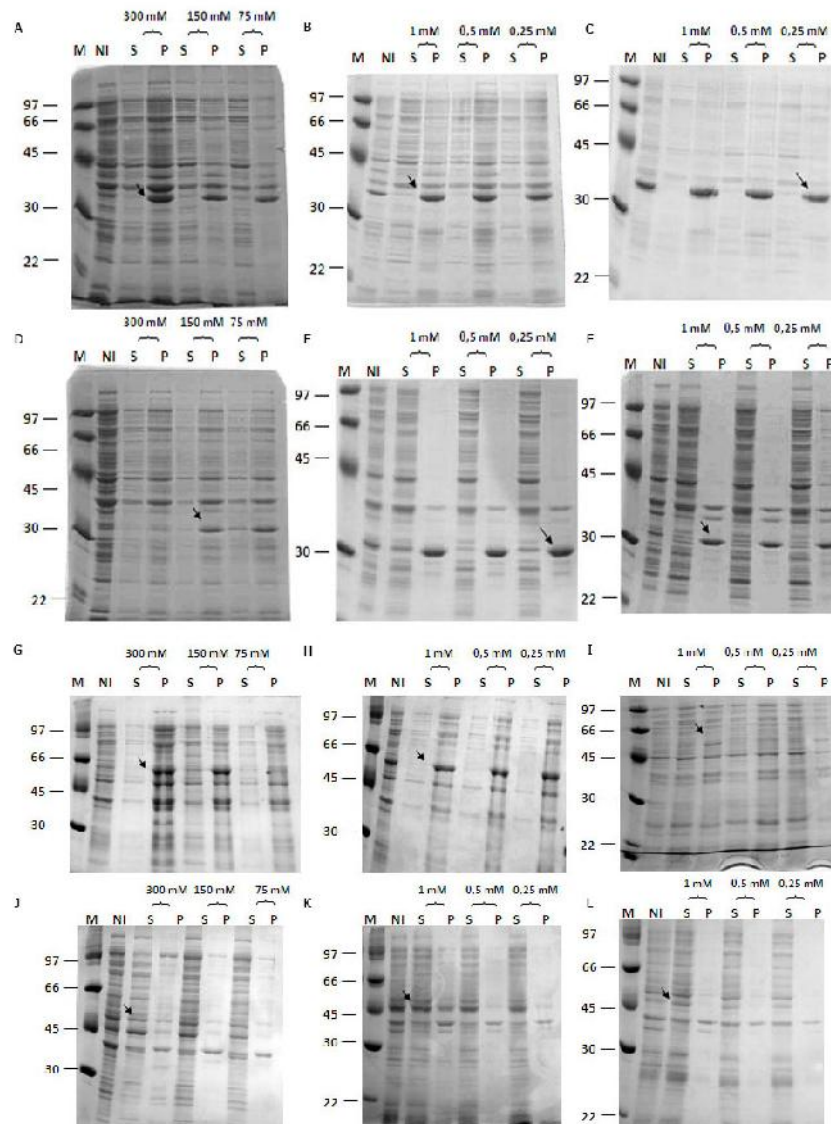
LIC11087 e pGEM LIC11221, *BamHI/ KpnI* para o vetor pGEM LIC11228 e *BamHI/HindIII* para o vetor pGEM LIC11084. Os insertos liberado foram então subclonados no vetor de expressão pAE (RAMOS et al., 2004). A pré-seleção de clones recombinantes ocorreu previamente por amplificação com oligonucleotídeos específicos, como descrito anteriormente. Realizamos um ensaio de restrição utilizando as respectivas enzimas de restrição, para certificação da presença de inserto (Figura 3B). Pode ser evidenciada a liberação do inserto por análise de restrição para todos os clones recombinantes. Nenhuma mutação foi constatada após sequenciamento, teste que também evidenciou que os genes estão em fase de leitura (Figura 3C).

Para expressão das proteínas recombinantes foram empregadas as cepas de expressão *E. coli* BL21 (SI), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS. As bactérias foram transformadas com os vetores contendo os genes de interesse e a indução da expressão das proteínas foi realizada com a adição de NaCl ou IPTG a cultura.

As cepas de expressão foram transformadas e induzidas com diferentes concentrações de indutor. As concentrações utilizadas foram 75, 150 e 300 mM quando o indutor foi NaCl (*E. coli* BL21 SI), e 0,25; 0,5 e 1 mM para as cepas de *E. coli* BL21 (DE3), na qual indutor foi o IPTG . Após indução, as bactérias foram lisadas e as frações proteicas obtidas analisadas por SDS-PAGE 12% (Figura 4).

As proteínas rLIC11121, rLIC11087 e rLIC11228 foram expressas na forma de corpúsculos de inclusão e rLIC11084 foi obtida na forma solúvel. A cepa *E. coli* DE3 foi escolhida para expressão de rLIC11087 e *E. coli* BL21 (SI) para expressão de rLIC11084 e rLIC11228. Devido problemas no processo de purificação empregamos tanto *E. coli* BL21 (SI) como *E. coli* DE3 para expressão de rLIC11121 (Figura4).

Figura 4- Análise da expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em SDS-PAGE.

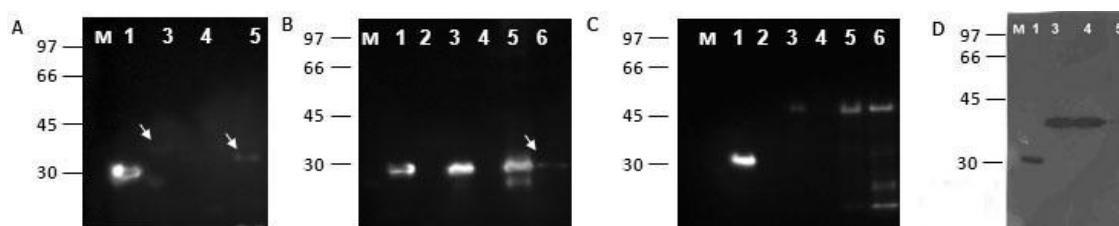


Análise da expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em SDS-PAGE. (A,B,C) rLIC11121 expressa respectivamente por *E. coli* BL21 (SI), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS ; (D,E,F) rLIC11087 expressa respectivamente por *E. coli* BL21 (SI), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS; (G,H,I) rLIC11228 expressa respectivamente por *E. coli* BL21 (SI), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS; (J,K,L) rLIC11084 expressa respectivamente por *E. coli* BL21 (SI), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS. (M) Padrão de massa molecular (KDa). (NI) extrato não induzido. (I) extrato induzido total. (S) fração solúvel. (P) fração insolúvel. As concentrações dos indutores utilizados estão destacadas acima da descrição das frações. Os indutores utilizados foram NaCl para *E. coli* BL21 SI, e IPTG para *E. coli* BL21 DE3 e *E. coli* BL21 Star DE3 pLysS). Setas indicam a possível expressão das proteínas.

Bandas correspondentes às proteínas recombinantes haviam sido encontradas nas frações antecedentes ao processo de indução. A confirmação da expressão das proteínas de interesse foi realizada pela imunodeteção dos resíduos de histidina (Figura 5). Todas as

proteínas recombinantes foram reconhecidas por anticorpos monoclonais contra os seis resíduos de histidina.

Figura 5- Identificação das proteínas recombinantes por imunoblotting com o anticorpo monoclonal anti-6X histidina.



(A)rLIC11221; (B) rLIC11087; (C) rLIC11228;(D) rLIC11084. M, Marcador; 1, Controle positivos, rLipL32; 2 Extrato total da bactéria não transformada; 3, bactéria transformada mas não induzida; 4, fração solúvel da cultura induzida; 5, fração insolúvel da cultura induzida; 6, proteína purificada. Setas brancas auxiliam na identificação de bandas com fraca marcação. A quimiluminescência das figuras A, B e C foi detectada em fotodocumentador (pro 2200, gel logic carestream) e na figura D por sensibilização de filme de raio X.

As sequencias de aminoácido das proteínas recombinantes foram submetidas ao programa ProtParam (disponível em <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) para análise do ponto isoelétrico e da massa molecular (GASTEIGER et al., 2003). Os resultados das análises estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Massa molecular e ponto isoelétrico teórico (pI) das proteínas codificadas pelos genes selecionados

Proteínas	Massa molecular	pI
rLIC11121	37.3 KDa	8.45
rLIC11087	30 KDa	5.77
rLIC11228	52.8 KDa	7.7
rLIC11084	40.7 KDa	7.7

Nota: LIC- abreviação de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Dados obtidos submetendo sequencia de aminoácidos ao servidor Expasy (<http://www.pdg.cnb.uam.es/peptide-mass.html>).

4.4 Purificação das proteínas recombinantes e análise da estrutura secundária

O vetor de expressão pAE adiciona 6 resíduos de histidina na porção N-terminal das proteínas recombinantes. Assim estas proteínas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade ao metal. Diferentes protocolos de purificação por cromatografia de afinidade ao metal foram testados para a purificação das proteínas deste estudo. Após o processo de purificação, as proteínas submetidas a eletroforese em gel, possibilitando assim a análise do material purificado quanto a pureza, concentração e estabilidade ou degradação. A presença de estruturas secundárias foi avaliada submetendo as proteínas purificadas à análise de dicroísmo circular (JOHNSON, 1990).

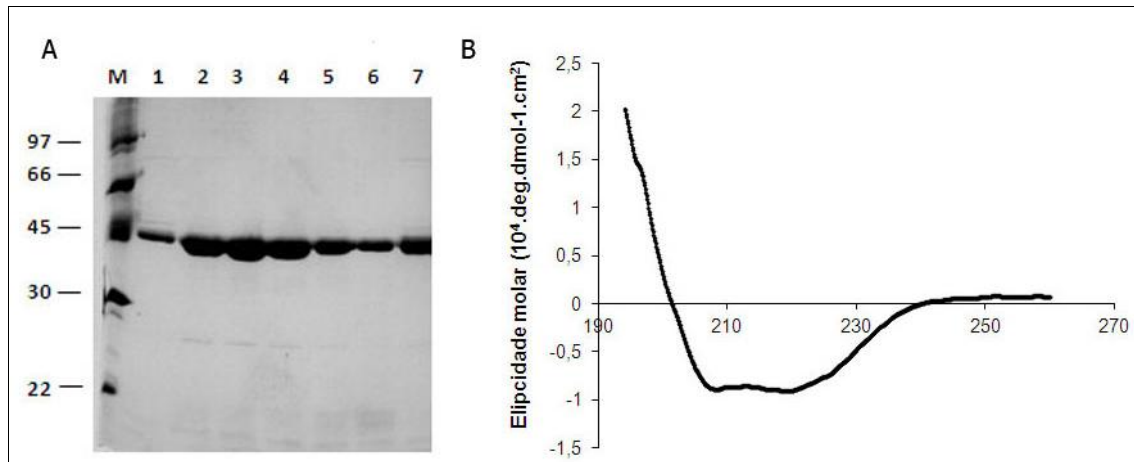
O estudo da estrutura secundária das proteínas por dicroísmo circular é baseado no fato de que moléculas com centros assimétricos absorvem luz circularmente polarizada para a direita, isso provoca um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou para a esquerda. Esse desvio é conhecido como elipticidade e é medido por um polarímetro (KELLY et al., 2005). Estas informações geram um espectro, que é característico de elementos estruturais específicos, como ligações amida, resíduos aromáticos e pontes dissulfeto (GREENFIELD, 2006).

A proteína rLIC11084 foi obtida na forma solúvel e purificada no sistema ÄKTA Prime plus (GE Healthcare) (Figura 6A). Como observado no gel de poliacrilamida, esta proteína teve rendimento de aproximadamente 30 mg por litro de cultura induzida e não foi constatada a presença de proteínas contaminantes ao final do procedimento de purificação (Figura 6A). Ao final do processo de purificação esta proteína foi dialisada em tampão 10 mM tris pH12, 20 mM NaCl e 0,01% de glicina, condições em que a proteína ficou mais estável, e foi estocada a -20 °C.

O espectro resultante da análise desta proteína por dicroísmo circular apresentou elipicidade mínima nos comprimentos de onda 208-220 nm, e elipicidade máxima em 194 nm. A alta voltagem do tampão inviabilizou leituras em comprimentos de ondas inferiores a 194 nm (Figura 6B).

Os valores de elipicidade obtidos no espectro diferiram aos descritos na literatura (KELLY et al., 2005). Isto pode ser um indicio de que esta proteína não está estruturada e que o espectro gerado pode ser ruído provocado pelo tampão durante a leitura das amostras (Figura 6B).

Figura 6- Análise da purificação de rLIC11084 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.

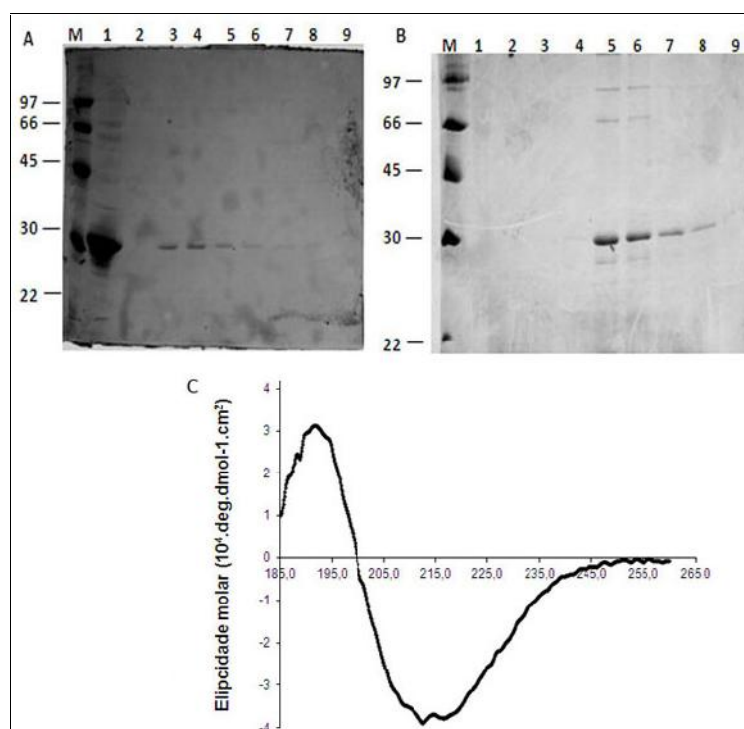


(A) SDS-PAGE de proteína purificada pelo sistema AKTA-Prime. M, padrão de massa molecular (KDa); 1-7 frações eluídas. (B) Espectro gerado com análise de dicroísmo circular de rLIC11084.

rLIC11087 e rLIC11228 foram obtidas com um rendimento aproximado de 6 mg/Litro de cultura induzida essas proteínas ficaram mais estáveis em tampões com pH12.

O rendimento de rLIC11087 foi similar tanto para purificação na bancada quanto na purificação pelo aparelho ÄKTA Prime plus (Figura 7 A e B). Análise de dicroísmo circular evidenciou a presença de estrutura secundária. A proteína demonstrou estrutura predominante de α -hélice com elipcidade mínima entre 210 e 220 nm e elipcidade máxima em 192nm (Figura 7 C). A proteína é composta por 62,6% de estrutura α -hélice e 3,79% de folha beta pregueada segundo predição do programa K₂D₂ (PEREZ-IRATXETA; NAVARRO, 2008).

Figura 7- Análise da purificação de rLIC11087 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.

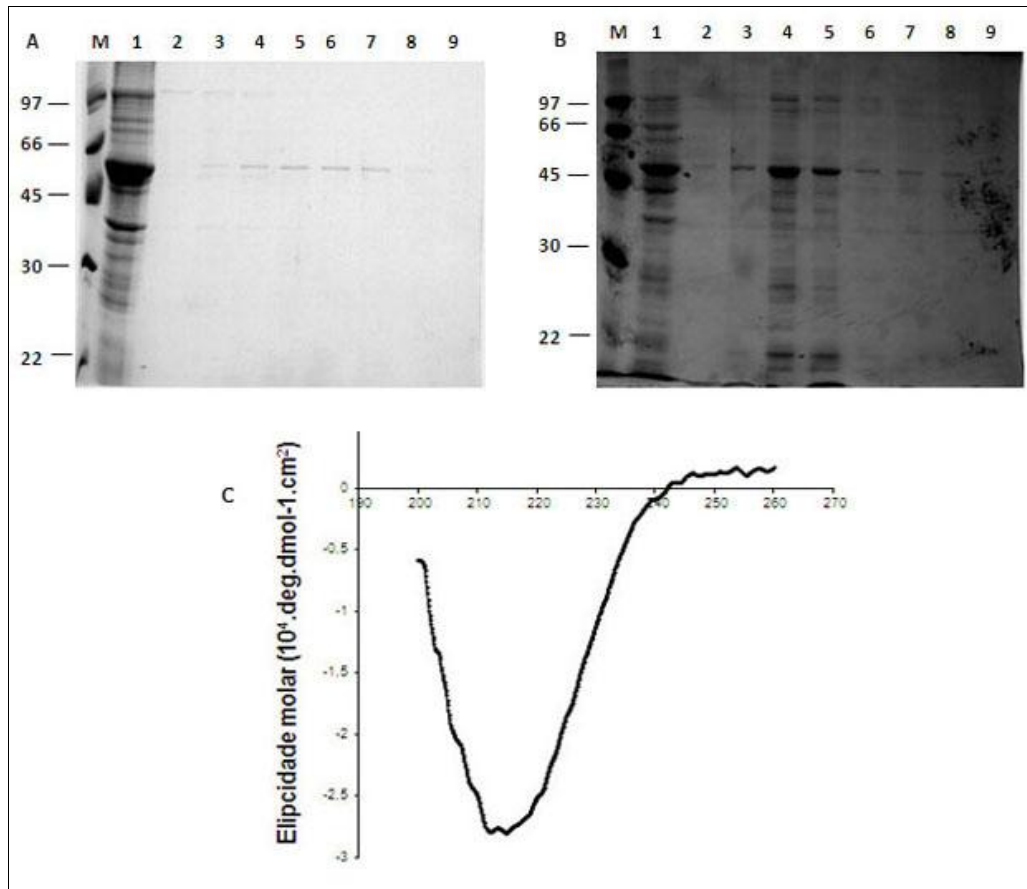


(A) SDS-PAGE de proteína purificada pelo sistema AKTA-Prime. M, padrão de massa molecular (KDa); 1, fração induzida antes da purificação; 2-9, frações eluídas. (B) SDS-PAGE de proteína purificada em bancada pelo método de renaturação em coluna. M, marcador; 1-9, frações eluídas. (C) Espectro gerado pela análise de dicroísmo circular de rLIC11087.

Tentativas de purificação da proteína rLIC11228 pelo sistema ÄKTA Prime plus não foram bem sucedidas. Neste método a proteína foi obtida em baixa concentração e precipitou em etapas posteriores de purificação (Figura 8A). Foi possível a purificação da proteína pelo método de purificação por renaturação em 2L de tampão (Figura 8B).

A análise da estrutura desta proteína por dicroísmo circular resultou num espectro não característico de estruturas descritas (Figura 8C). A elicidade molar mínima foi atingida em 215 nm. Isto pode ser atribuído á problemas metodológicos, visto que a alta voltagem, ocasionada pela osmolaridade do tampão, impossibilitou leituras em comprimentos de onda inferior á 200 nm.

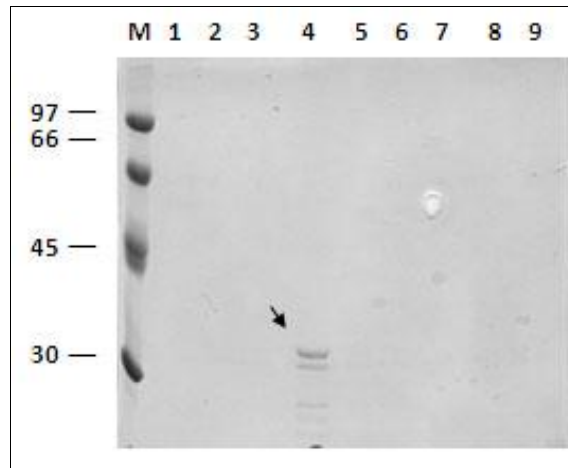
Figura 8- Análise da purificação de rLIC11228 por SDS-PAGE e espectro gerado por análise das proteínas por dicroísmo circular.



(A) SDS-PAGE de proteína purificada pelo sistema AKTA-Prime. M, padrão de massa molecular (KDa); 1, fração induzida antes da purificação; 2-9, frações eluídas. (B) SDS-PAGE de proteína purificada em bancada pelo método de renaturação em coluna. M, marcador; 1, fração induzida antes da purificação; 2-9, frações eluídas. (C) Espectro gerado pela análise de de rLIC11228 por dicroísmo circular.

A proteína rLIC11121 foi obtida em baixa concentração, 1 mL na concentração de 5 μ g/mL, e por isso excluída do estudo (Figura 9). As tentativas de purificação compreenderam purificação em sistema ÄKTAPrime plus e purificação em bancada. Os protocolos de purificação diferiram na forma de renaturação, renaturação em 2 L de tampão ou com gradiente de ureia na coluna, e com a adição de agentes para o aumento da estabilidade da proteína (glicerol 10% e 0,1% triton x100) (Figura 9).

Figura 9- SDS-PAGE para análise da purificação de rLIC11121 (37 KDa).



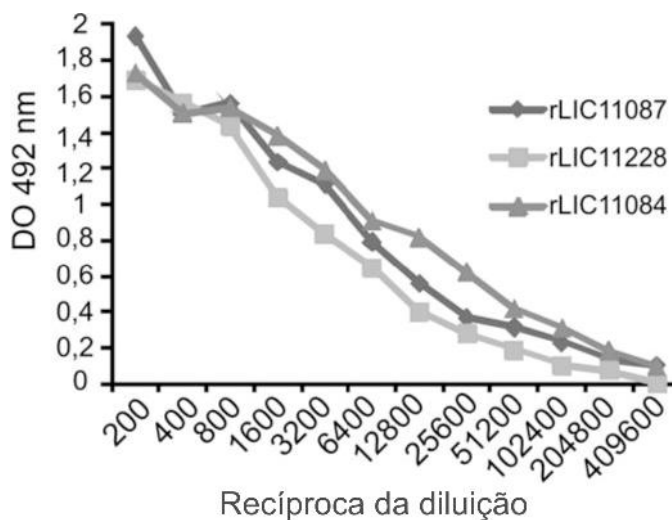
M, padrão de massa molecular (KDa); 1-9, frações. Seta indica a banda correspondente á proteína.

4.5 Caracterização da resposta imunológica promovida pelas proteínas recombinantes em camundongos

A produção de anticorpos e o desencadeamento de uma resposta celular são indicativos da ativação do sistema imune. O potencial imunogênico de rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 foram avaliados com a imunização de camundongos. Os animais foram imunizados com uma dose e dois reforços como descrito anteriormente, e então sacrificados para a avaliação da resposta celular.

Todas as proteínas foram capazes de estimular a produção de anticorpos. O título de IgG total obtido para o grupo imunizado com rLIC11084 e rLIC11087 chegou a 1:400.000 na ultima imunização. A proteína rLIC11228 foi menos imunogênica quanto a produção de anticorpos, o título obtido chegou a 1:100.000 na última imunização (Figura 10).

Figura 10- Produção de anticorpos por camundongos imunizados após segundo reforço



(A) Detecção de anticorpos nos soros de camundongos imunizados com rLIC11087; rLIC11228 e rLIC11084. Os animais foram imunizados subcutaneamente com três doses contendo 10 µg de proteína recombinante em Alhydrogel (Brenntag). O título dos soros obtidos foi determinado a diluição com densidade óptica 0,1.

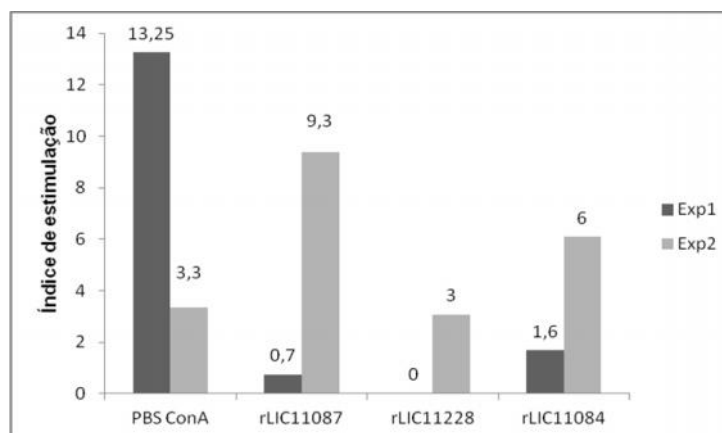
A proliferação de esplenócitos foi avaliada e expressa na forma de índice de estimulação, isto é razão entre a absorbância de células do grupo imunizado e reestimulado *in vitro* (incorporação de BrdU) com a absorbância células do grupo apenas imunizado (não reestimulado). Os dados são considerados significativos caso esta razão seja superior a 1 (FAISAL et al., 2008).

A proteína rLIC11084 foi capaz de estimular a proliferação de esplenócitos em dois experimentos independentes. O índice de estimulação foi respectivamente de 1,6 e 6 para o primeiro e segundo experimento (Figura 12).

As proteínas rLIC11087 e rLIC11228 estimularam a proliferação de esplenócitos em apenas um experimento. O índice de estimulação no segundo experimento foi 9 para rLIC11087, e 3 para rLIC11228 (Figura 11).

A viabilidade das células empregadas nestes experimentos foi evidenciada com o estímulo de linfoproliferação em resposta a concanavalina A. O segundo experimento não produziu os resultados esperados. O valor do índice de estimulação obtido com células estimuladas com ConA foi inferior ao índice de estimulação obtido com células estimuladas com as proteínas teste. Assim outros experimentos, assim como a padronização da metodologia são necessários para investigar a geração de células de memória após a imunização com estes antígenos.

Figura 11- Proliferação de esplenócitos de animais imunizados *in vitro*.



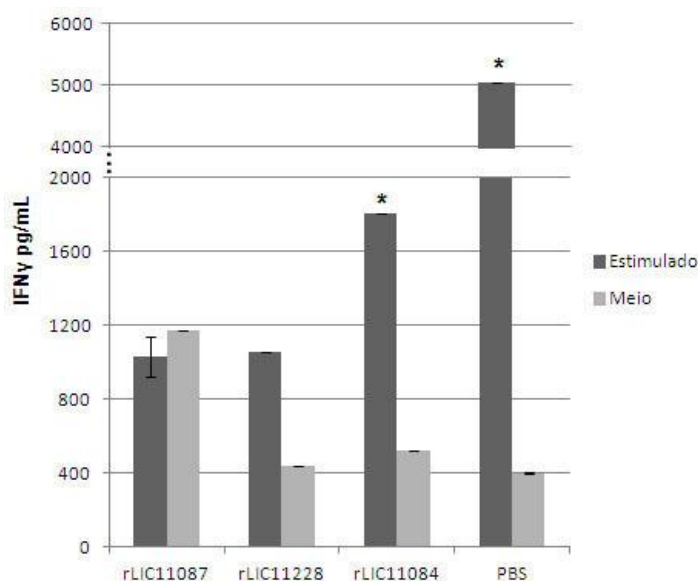
Índice de estimulação foi representado com a razão entre densidade ótica obtida pela incorporação de BrdU por células estimuladas com a densidade ótica obtida pela incorporação de BrdU por células não estimuladas. Dados de dois experimentos independentes.

A secreção de IFN γ , IL-4 e IL-12 foram avaliadas em um experimento. Os dados obtidos para secreção de IL-4 e IL-12 foram inconclusivos. A avaliação da secreção de IFN γ foi validada pelo controle, secreção de IFN γ por células do grupo PBS, não estimuladas e estimuladas com concanavalina A.

A proteína rLIC11084 foi capaz de estimular a secreção de IFN γ por células de animais imunizados em dois experimentos independentes (Figura 12). Contudo outros experimentos são necessários para confirmar a indução da secreção de IFN γ por células de animais imunizados com rLIC11084, assim como a importância deste achado no desencadeamento de uma resposta protetiva.

As proteínas rLIC11087 e rLIC11228 não estimularam de maneira estatisticamente significativa a secreção de IFN γ (figura 12).

Figura 12- Secreção de IFN γ por esplenócitos de animais imunizados.



Grupos de animais (n=5) foram imunizados com 10 μ g da proteína teste ou PBS. As células (10⁸) foram reestimuladas com 1 μ g de cada antígeno. Grupo PBS foi estimulado ou não com concanavalina A (controle positivo e negativo). Asteriscos demonstram significância estatística em relação aos controles, células não reestimuladas (meio). Teste T: (*P<0,05).

IFN γ pode desencadear diferentes mecanismos efetores no sistema imune adaptativo. A secreção de IFN γ por linfócitos TCD8⁺ pode ter papel contra patógenos extracelulares com a ativação de macrófagos e promoção indireta da secreção de IgG2 (GUO et al., 2010). Além disso, a secreção de IFN γ por linfócitos T auxiliares pode promover a diferenciação de células B e linfócitos TCD8⁺ em efetores imunologicamente ativos (GATTONI et al., 2006).

O aumento na secreção de IFN γ por hamsters infectados com *L. interrogans* sv.Icterohaemorrhagiae foi descrito (VERNEL-PAULLAC; GOARANT, 2010). No entanto o envolvimento desta citocina na resistência a doença não foi evidenciado inoculando bactérias virulentas em camundongos *Knockout* C57BL/6 IFN-KO, deficientes na produção de IFN γ (ATHANAZIO et al., 2008).

A secreção de IFN γ por linfócitos TCD4⁺ e linfócitos T_H1 foi relacionada à proteção após a administração de vacinas composta por células inativadas da espécie *L. borgpetersenii* (NAIMAN et al., 2001). A proteção parcial de hamsters foi atribuída a um efeito sinérgico na coadministração das proteínas de superfície OmpL1 e Lip41 (HAAKE et al., 1999). A imunização de epítomos destes imunógenos culminou com uma resposta Th1, atribuído à secreção de IFN γ (LIN et al., 2011). Porém, a administração de antígenos de superfície tem culminado tanto com a secreção de IFN γ como com a secreção de citocinas relacionadas com

resposta Th2 (FAISAL et al., 2009b, c; YAN et al., 2009). A análise do perfil protetor de rLIC11084 bem com a caracterização da resposta imune desencadeada por este imunógeno pode auxiliar no desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra leptospirose.

4.6 Avaliação do perfil protetor de hamsters imunizados com rLIC11084 frente desafio letal

Proteínas de membrana externa são os principais alvos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra leptospirose. Diferentes proteínas de membrana externa tem estimulado imunidade protetora, no entanto não foi descoberto nenhum candidato em potencial para o desenvolvimento de uma vacina.

A proteção conferida pela proteína codificada pelo gene LIC11087 foi avaliada e não resultou na proteção de animais desafiados (FÉLIX et al., 2011). O rendimento da proteína rLIC11228 impossibilitou a realização de experimentos de imunoproteção. Assim o perfil protetor do antígeno rLIC11084 foi avaliado com desafio letal de hamsters.

Os animais foram imunizados como descrito anteriormente descrito e então foram desafiados com 1X a DL50 de *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm. Foram realizados dois experimentos e a secreção de anticorpos foi avaliada com sangria via plexo retro orbital em seis animais imunizados.

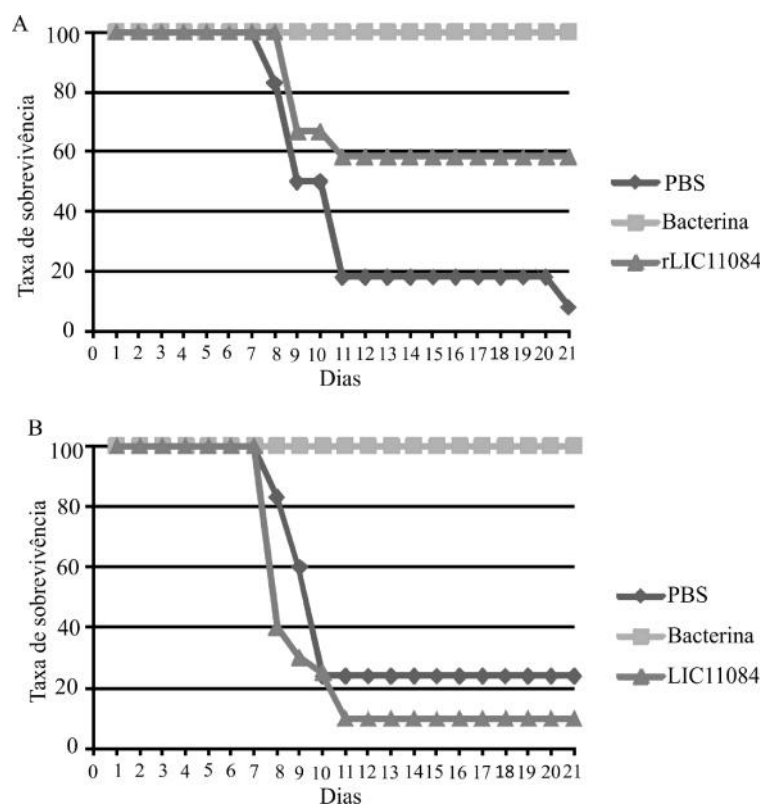
A imunização dos animais induziu produção de anticorpos nos dois experimentos. No primeiro experimento o título dos animais imunizados foi de 12.800 na primeira sangria e na segunda. Esse título se manteve em um dos animais sobreviventes. No segundo experimento a maioria dos animais apresentaram título de 400 na primeira sangria e 6:400 na segunda sangria. No animal sobrevivente o título foi de 1:200.

No primeiro experimento a sobrevida de animais imunizados foi maior que a sobrevida dos animais do grupo controle. Porém este resultado não foi estatisticamente significativo quando avaliado pelo método de Kaplan-Meier (Figura 13A). Em todos os animais sobreviventes deste experimento foi possível isolar leptospiros dos rins.

No segundo experimento apenas um animal imunizado com rLIC11084 sobreviveu, não foi constatado colonização renal nele (Figura 13B).

O grupo imunizado com bacterina teve 100% de sobrevida nos dois experimentos, e nos animais não imunizados, grupo PBS, a taxa de sobrevivência variou entre 8,3% e 25% (Figura 13A e B).

Figura 13- Curva de sobrevivência de animais imunizados com rLIC11084



Os animais foram imunizados como descrito em materiais e métodos e desafiados com *L. interrogans* sv. Kennewicki linhagem Pomona Fromm. A) Curva de sobrevivência do primeiro experimento; B) Curva de sobrevivência do segundo experimento. A análise estatística pelo método Kaplan-Meier resultou no *p value* 0.0491 para o primeiro experimento e *p value* 0.1934 para o segundo experimento (KAPLAN; MEIER, 1958).

A falta de reprodutibilidade de resultados de imunoproteção é relatada com frequência em experimentos que avaliam a imunoproteção de hamsters (ATZINGEN et al., 2012, 2010; BRANGER et al., 2001; YAN et al., 2010). Além disso, taxa de sobrevivência nos animais do grupo controle tornou insignificante o resultado de sobrevivência no primeiro experimento, problema já descrito em outros trabalhos (ATZINGEN et al., 2010, 2012; BRANGER et al., 2001).

4.7 Reatividade das proteínas recombinantes com soro de hamsters infectados e de pacientes diagnosticados com leptospirose

Algumas proteínas têm sido reconhecidas no soro de animais e pacientes infectados. Estes resultados podem ser um indicativo da expressão destas proteínas durante a infecção e

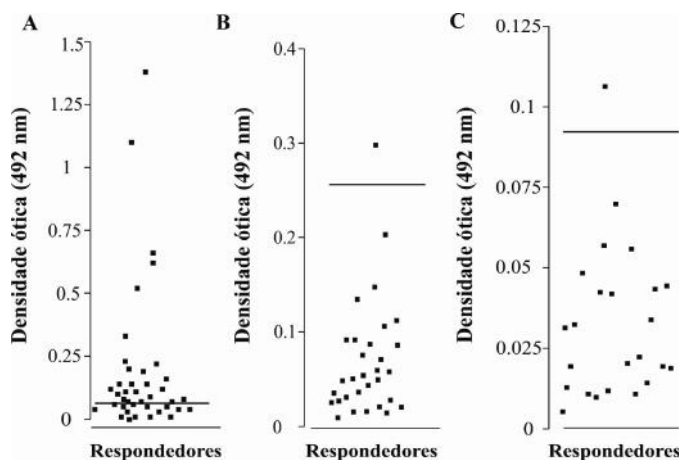
indicar o potencial das mesmas no desenvolvimento de métodos diagnósticos (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; NEVES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; PINNE et al., 2010; PRETRE et al., 2013; VIEIRA et al., 2010a). Testes sorológicos baseados na identificação de anticorpos contra proteínas recombinantes podem conferir alta sensibilidade e especificidade devido á alta concentração de antígenos, a ausência de motivos não específicos e conservação entre diferentes espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. (TOYOKAWA; OHNISHI; KOIZUMI, 2011).

Assim foi investigado a presença de anticorpos IgG específicos a rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 no soro de hamsters infectados e de pacientes com leptospirose. Foram empregadas amostras MAT+ de soro de hamsters experimentalmente infectados. A presença de anticorpos específicos a proteína rLIC11087 foi analisada em 42 amostras e foi identificado 19 respondedores (45,2%) (Figura 14A). Este pode ser um indicativo de que esta proteína é expressa durante a infecção.

A presença de anticorpos específicos as proteínas rLIC11228 e rLIC11084 foi analisada em 32 amostras. As análises resultaram na identificação de 1 respondedor (3,1%) para estas proteínas (Figura 14 B e C).

Para o calculo do cutoff, a reatividade da proteína rLIC11087 foi analisada em 8 amostras de soro de animais não infectados e a reatividade das proteínas rLIC11228 e rLIC11084 foi analisada em 12 amostras de soro de animais não infectados.

Figura 14- Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de hamsters infectados.



(A) Lsa30, (B) rLIC11228 e (C) rLIC11084. Barras indicam cutoff. Os valores de cutoff para Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 são respectivamente 0,09; 0,25 e 0,09.

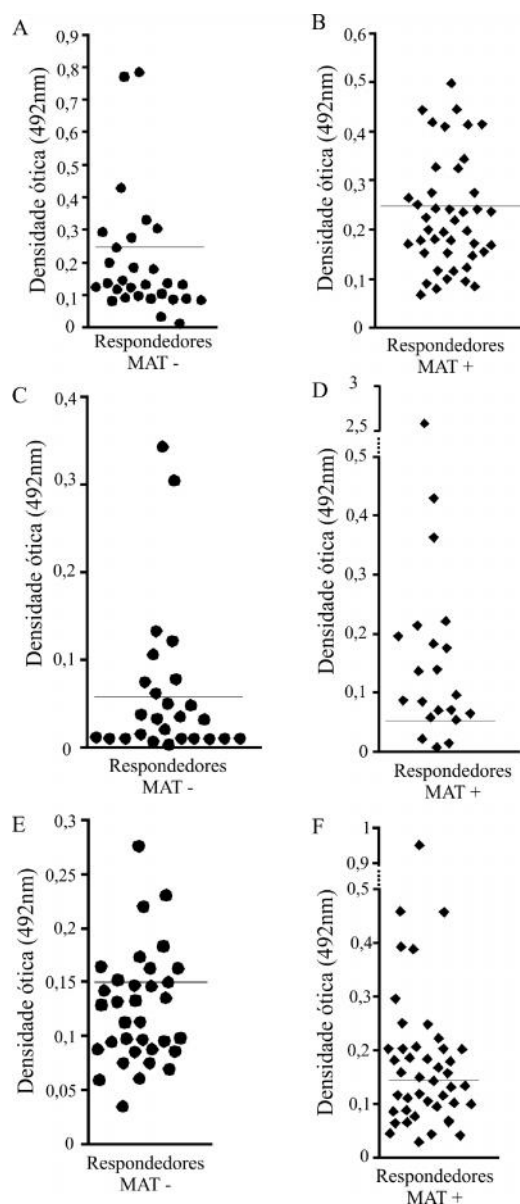
A presença de anticorpos específicos á proteína rLIC11087 foi analisada em 33 amostras de soro MAT- e 43 amostras de soro MAT+. Foi constatado 7 (21%) e 13 (30%) respondedores nos soros MAT- e MAT+, respectivamente (Figura 15A e B).

A detecção da proteína rLIC11228 por anticorpos específicos foi avaliada em 25 amostras de soros pareados (MAT- e MAT+). Foi constatado 7 (28%) e 16 (64%) respondedores nos soros das fases MAT- e MAT+, respectivamente (Figura 15C e D).

A presença de anticorpos contra a proteína rLIC11084 foi analisada em 34 amostras de soros MAT- e 44 amostras de soro MAT+. Foram identificados 8 (23,5%) e 21 (47%) respondedores nos soros das fases MAT- e MAT+, respectivamente (Figura 15 E e F).

Amostras de soros normais obtidos comercialmente foram analisadas em quadruplicata. Foram avaliados apenas os soros pareados das amostras MAT-, isto é soros de um mesmo paciente na fase inicial e convalescente da doença.

Figura 15- Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de paciente diagnosticados com leptospirose



(A e B) rLIC11087, (C e D) rLIC11228 e (E e F) rLIC11084. Barras indicam cutoff. Os valores de cutoff para rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 são respectivamente 0,25; 0,06 e 0,15.

4.8 Interação das proteínas recombinantes com componentes de matriz extracelular

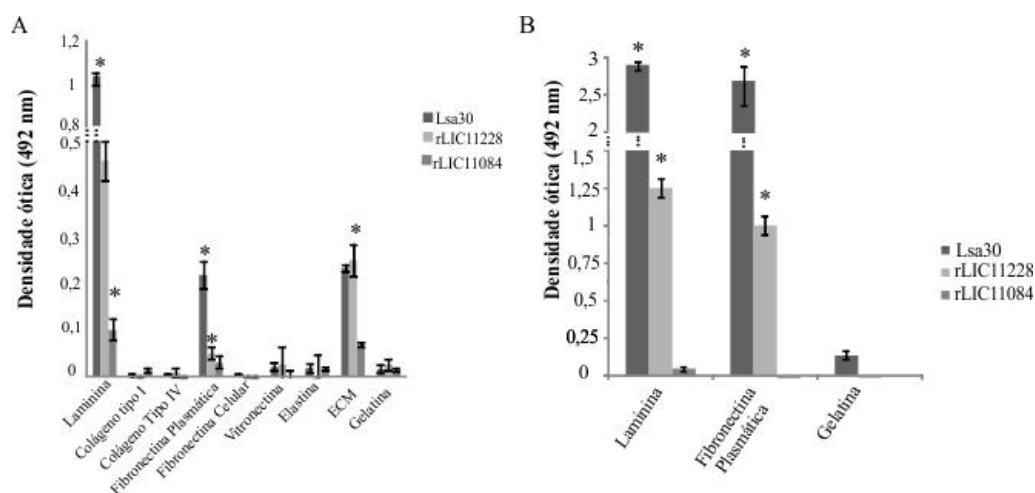
A invasividade de leptospirose está atribuída a sua habilidade de disseminar pelos tecidos do hospedeiro nas fases iniciais da infecção, porém os mecanismos associados a esta invasividade não foram esclarecidos até o presente momento (FAINE et al., 1999). Um estudo pré genômico culminou com a identificação de uma proteína ligante á fibronectina (MERIEN et al., 2000). O sequenciamento genômico possibilitou identificação de adesinas afimbriais

(NASCIMENTO et al., 2004a). Desde então muitas proteínas de superfície com capacidade de ligação á componentes de matriz vem sendo identificadas (ATZINGEN et al., 2008, 2010; BARBOSA et al., 2006; CARVALHO et al., 2009; CHOY et al., 2007; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; HAUK et al., 2009; HOKE et al., 2008; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; STEVENSON et al., 2007). Além disso, algumas proteínas de leptospira provocam o aumento da expressão dos receptores de células eucarióticas ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais (ATZINGEN et al., 2009; GOMEZ et al., 2008; VIEIRA et al., 2007).

As proteínas rLIC11087 e rLIC11228 , semelhante á outras proteínas descritas pelo nosso grupo, podem auxiliar na adesão da bactéria as células do hospedeiro pela interação com ECM. Semelhante a Lsa66 e Lsa20 (MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), as proteínas rLIC11087 e rLIC11228 interagem com laminina e fibronectina plasmática (Figura 16). Essas interações foram analisadas por ELISA com a detecção das proteínas recombinantes por anticorpos policlonais homólogos e anticorpos monoclonais contra resíduos de histidina (Figura 16A e B).

Devido a interação da proteína rLIC11087 com estes componentes ela foi nomeada Lsa30, “*Leptospiral surface adhesin of 30 KDa*” (SOUZA et al., 2012).

Figura 16- Adesão das proteínas recombinantes á componentes de matriz extracelular



1 μ g de cada componente foi imobilizado na placa e a interação com 1 μ g de cada proteína foi avaliada por ELISA. (A) Detecção das proteínas por anticorpos homólogos policlonais (B) confirmação da interação das proteínas recombinantes aos seus ligantes por anticorpos monoclonais contra resíduos de histidina. Asteriscos demonstram significância estatística em relação ao controle gelatina. Teste T: (*) $P < 0,05$.

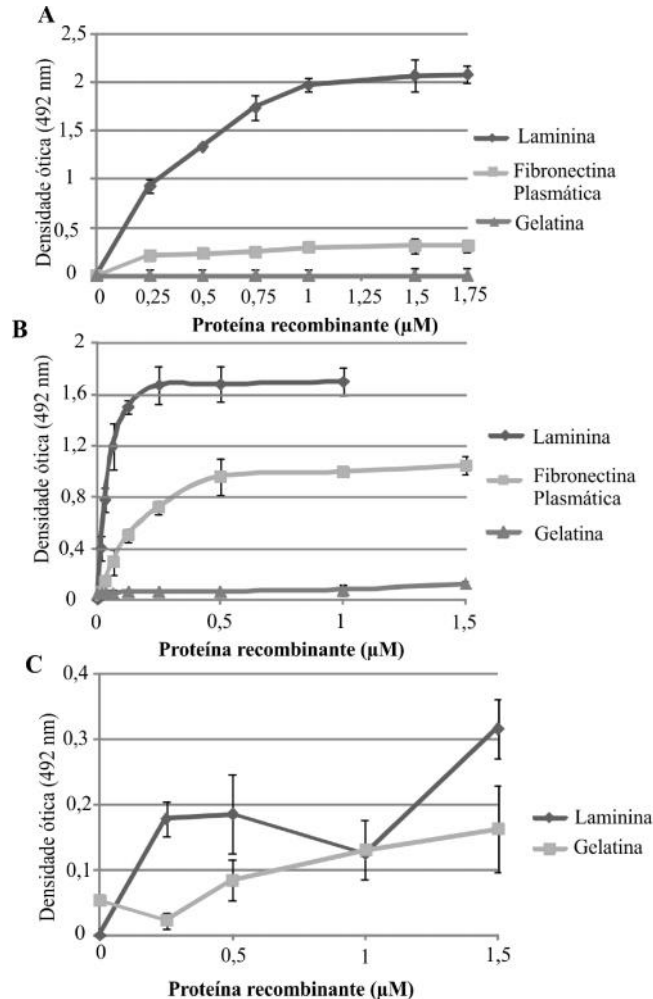
As interações de Lsa30 foram dose dependente, a saturação da reação foi alcançado na concentração de 1,5 μ M para interação com laminina e fibronectina plasmática. A constante

de dissociação calculada foi de 292 ± 24 nM para interação com laminina e 157 ± 35 nM para interação com fibronectina plasmática (Figura 17A).

A proteína rLIC11228 também demonstrou interação com laminina e fibronectina plasmática. Estas ligações foram dose dependente e a saturação foi alcançada na concentração de 250 nM para laminina e 500 nM fibronectina plasmática. A constante de dissociação foi de $36,4 \pm 6$ μ M para interação com laminina e $3,8 \pm 0,43$ μ M para interação com fibronectina plasmática (Figura 17B).

A interação entre a proteína rLIC11084 e laminina, visualizada na Figura 13, não foi dose resposta e então pode ser considerada inespecífica (Figura 17C).

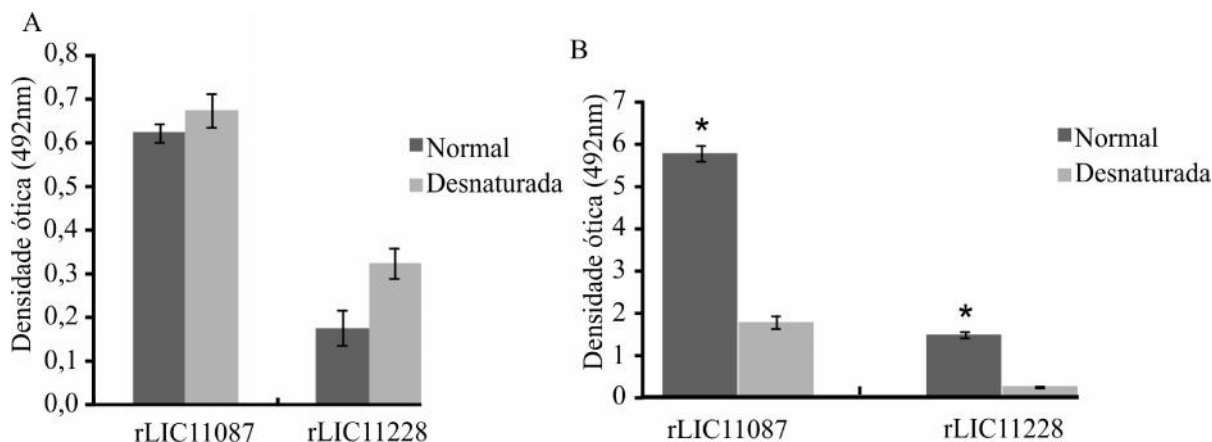
Figura 17- Curva dose-resposta para análise da ligação das proteínas recombinantes aos seus respectivos ligantes.



1μg de cada componente ligante foi imobilizado na placa e concentrações crescentes da proteína foi adicionado para análise da interação. As proteínas foram detectadas com anticorpos homólogos. Gelatina foi empregado como controle negativo dos experimentos. (A) Interação de Lsa30 com laminina e fibronectina plasmática (0-1,75 μM). (B) Interação de rLIC11228 com laminina e fibronectina plasmática (0-1,5 μM). (C) Interação de rLIC11084 com laminina (0-1,5 μM). Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. Constante de dissociação (K_D) foi calculada apartir dos dados de ELISA.

A ligação de Lsa30 e rLIC11228 desnaturadas por fervura á laminina e a fibronectina plasmática foi avaliada. Os resultados mostram que a ligação destas proteínas á laminina não depende da estrutura, mas a interação das mesmas com fibronectina plasmática é depende da estrutura da proteína uma vez que a proteína submetida ao processo de fervura não interagiu com tal componente (Figura 18).

Figura 18- Efeito da estrutura das proteínas recombinantes na adesão a componentes de matriz extracelular.



A) análise da adesão de Lsa30 e rLIC11228 á laminina. B) análise da adesão de Lsa30 e rLIC11228 á fibronectina plasmática, * $P < 0,05$.

4.9 Interação das proteínas recombinantes com componentes do soro

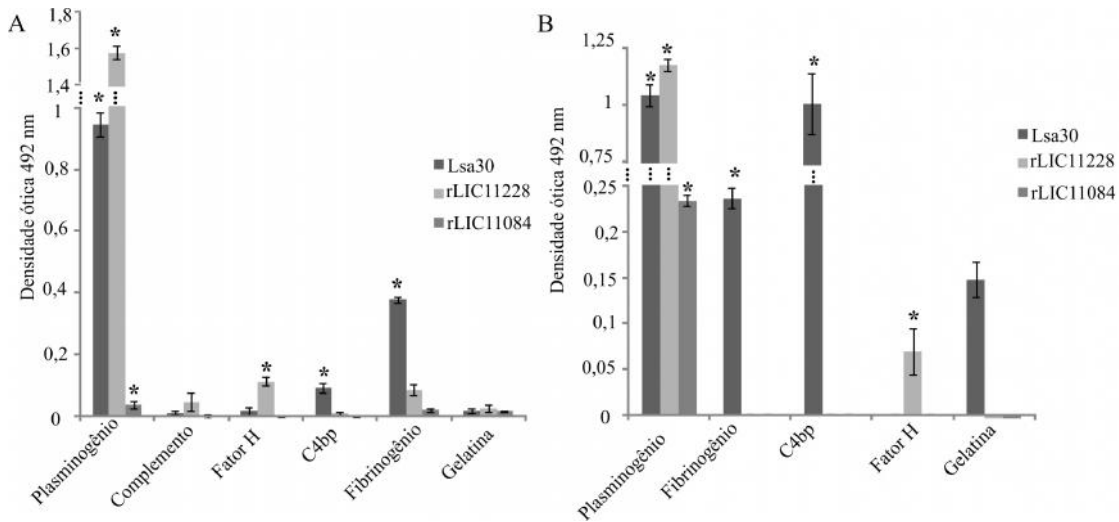
O processo de invasão de leptospiras não se limita a capacidade de adesão. Além de interagir com componentes de matriz extracelular leptospiras podem ter mecanismos de degradação da matriz extracelular e de evasão do sistema imune.

Proteínas de membrana externa podem desencadear estes mecanismos pela interação com proteínas séricas. Assim foi avaliado a interação de Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 com plasminogênio, fibrinogênio, componentes do sistema complemento bem como proteínas que atuam na sua regulação, como Fator H e C4bp.

As proteínas rLIC11228 e rLIC11084 interagiram apenas com o plasminogênio, já a proteína Lsa30, além de interagir com plasminogênio, foi capaz de interagir com o C4bp e fibrinogênio (Figura 19A).

A confirmação destas interações foi feita pela detecção das proteínas recombinantes com anticorpos monoclonais contra resíduos de histidina (Figura 19B). A interação entre a proteína rLIC11228 e fator H foi considerada inespecífica, mesmo que estatisticamente significativa, devido a baixa intensidade da densidade ótica.

Figura 19- Análise da interação das proteínas recombinantes com proteínas do soro humano.

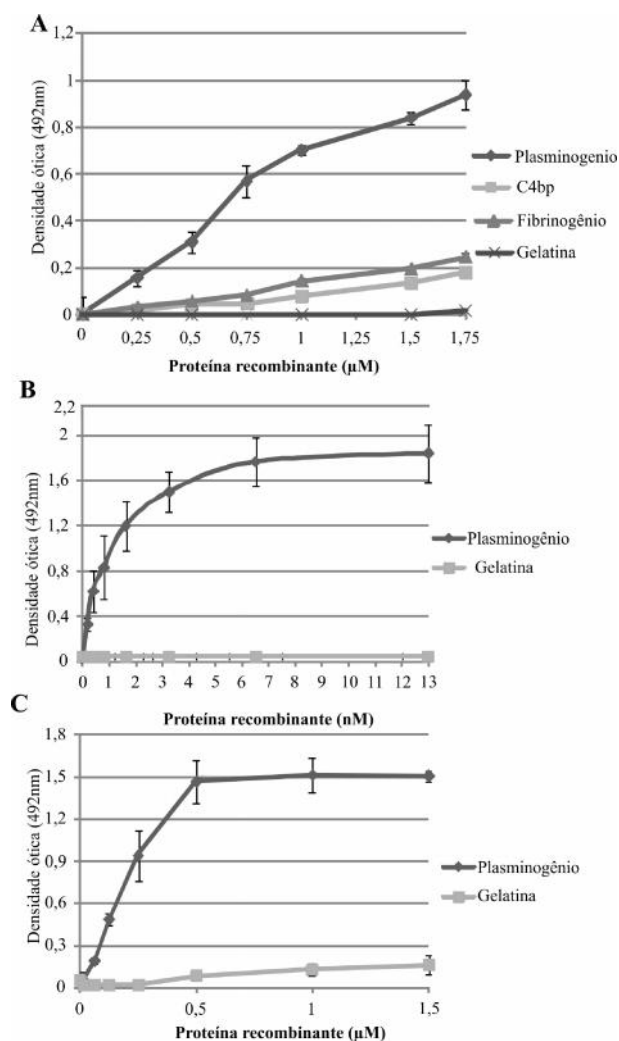


1 μ g de cada componente foi imobilizado na placa e a interação com 1 μ g de cada proteína foi avaliada por ELISA. (A) Detecção das proteínas por anticorpos homólogos policlonais (B) confirmação da interação das proteínas recombinantes aos seus ligantes por anticorpos monoclonais contra resíduos de histidina. Asteriscos demonstram significância estatística em relação ao controle gelatina. Teste T: (*)P<0,05.

A afinidade dessas proteínas aos seus ligantes também foi avaliada variando a concentração de proteína. Foi constatado que todas essas ligações são dose resposta, porém não foi possível atingir o nível de saturação da reação em Lsa30 e seus ligantes com as concentrações de proteína empregada (0 á 1,75 μ M).

A saturação da ligação de rLIC11084 ao plasminogênio foi atingida na concentração 500 nM e a K_D da reação foi $4,8\pm 0,39$ μ M. A saturação da ligação de rLIC11228 ao plasminogênio foi atingida na concentração de 125 nM e a K_D da reação foi $267,2\pm 62,7$ μ M (Figura 20).

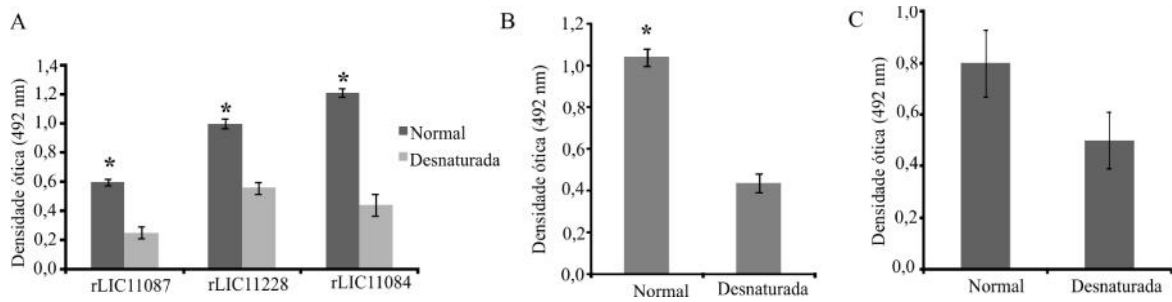
Figura 20- Curvas dose resposta para análise da interação entre as proteínas recombinantes e componentes do soro



1µg de cada componente foi imobilizado na placa e concentrações crescentes da proteína foi adicionado para análise da interação. As proteínas foram detectadas com anticorpos homólogos. Gelatina foi empregado como controle negativo dos experimentos. (A) Interação de Lsa30 com Plasminogênio, C4bp e fibrinogênio (0-1,75 µM). (B) Interação entre plasminogênio e rLIC11228 (1 á 13 nM). (C) Interação entre plasminogênio e rLIC11084 (0-1,5 µM). Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. Constante de dissociação (K_D) foi calculada apartir dos dados de ELISA.

A interação de Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 com plasminogênio é dependente da estrutura das proteínas (Figura 21A). A estrutura de Lsa30 também é importante para sua com o C4bp, mas, pode não interferir na sua interação com o fibrinogênio. Apesar da redução na adesão da proteína desnaturada ao fibrinogênio não houve diferença estatística devido ao desvio padrão das amostras (Figura 21B e C).

Figura 21- Análise da interação das proteínas desnaturadas às proteínas do soro

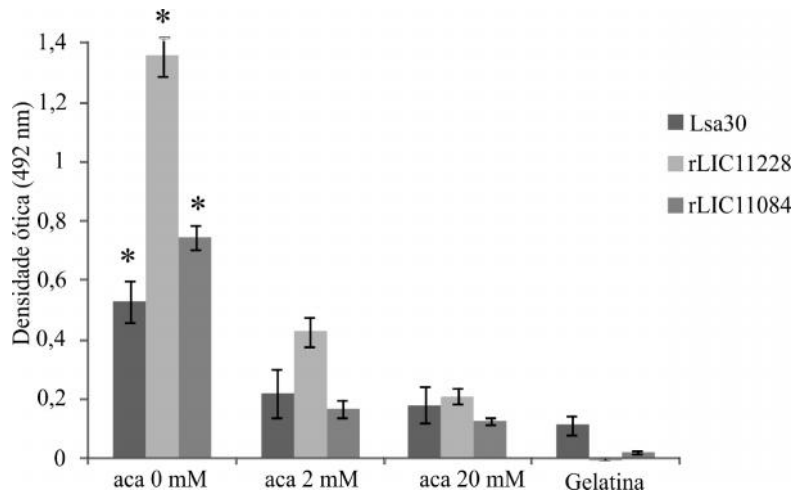


A) análise da adesão de Lsa30 , rLIC11228 e rLIC11084 ao plasminogênio. B) análise da adesão de Lsa30 ao C4bp . C) análise da adesão de Lsa30 ao fibrinogênio, * P<0,05.

A degradação de componentes de matriz extracelular, C3b e IgG por leptospiras pela aquisição de plasminogênio e sua ativação em plasmina foi reportada. Este mecanismo pode estar envolvido na disseminação da bactéria e na evasão do sistema imune (VIEIRA et al., 2011, 2009). Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 podem ser receptores de plasminogênio assim como outras proteínas descritas (DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MENDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; VERMA et al., 2010b; VIEIRA et al., 2010b).

A interação entre proteínas e plasminogênio pode ocorrer entre os resíduos de lisina da proteína e domínios Kringle do plasminogênio. Para avaliarmos se os resíduos de lisina são importantes na interação entre as proteínas Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 e plasminogênio empregamos ácido aminocapróico. A adição deste análogo de lisina interferiu na interação das proteínas recombinantes com o plasminogênio, o que sugere que os resíduos de lisina delas são importantes na interação com o plasminogênio (Figura 22).

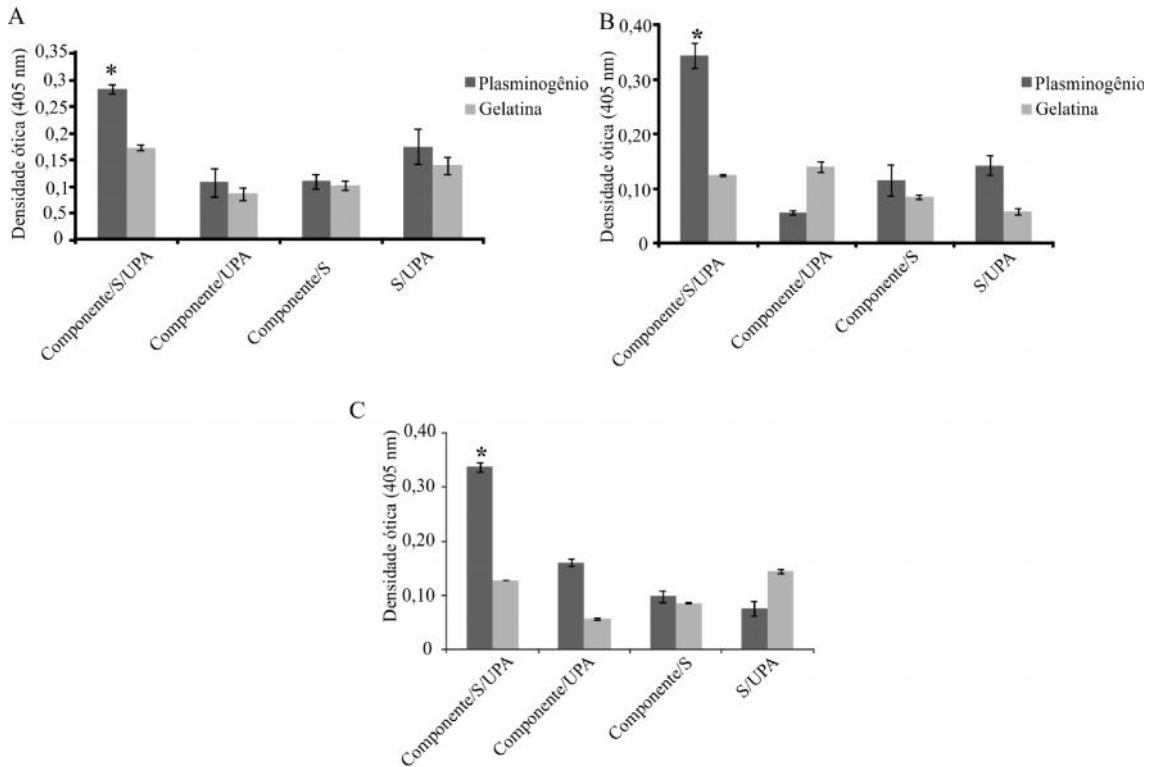
Figura 22- Interferência de ácido aminocapróico na ligação das proteínas ao plasminogênio



Plasminogênio foi imobilizado nas placas de ELISA. As proteínas recombinantes foram adicionadas em adição com o análogo de lisina ácido aminocapróico, que interferiu na interação das proteínas com plasminogênio. Análise estatística foi realizada com os dados do controle gelatina e a concentração máxima do competidor. Houve diferença estatística na interação de rLIC11228 e rLIC11084 com a adição de 2 mM de ácido aminocapróico. (*) $P < 0,05$.

Adicionalmente, o plasminogênio ligado á Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084 pode ser convertido á plasmina pelo ativador uroquinase (SOUZA et al., 2012). O experimento foi validado uma vez que nas reações controle não foi observado a atividade enzimática de plasmina (Figura 23). A atividade enzimática da plasmina foi avaliada indiretamente pela detecção de substrato cromógeno.

Figura 23- Detecção da atividade enzimática da plasmina a partir de plasminogênio ligado as proteínas recombinantes



A proteína recombinante foi imobilizada na placa e os componentes para análise da atividade enzimática da plasmina foram adicionados. A) Imobilização de Lsa30. B) Imobilização de rLIC11228. C) Imobilização de rLIC11084. As análises estatísticas foram feitas com os dados obtidos com o controle negativo gelatina. (*) $P < 0,05$.

A interação de proteínas de patógenos com fibrinogênio pode interferir na cascata de coagulação e na adesão plaquetária (DAVIS et al., 2001; HAWIGER et al., 1982; LIN et al., 2011). Devido ao fato de Lsa30 ser mantida em pH12, condição que interfere na atividade enzimática da trombina, a interferência dela na formação da rede de fibrina não pode ser avaliada.

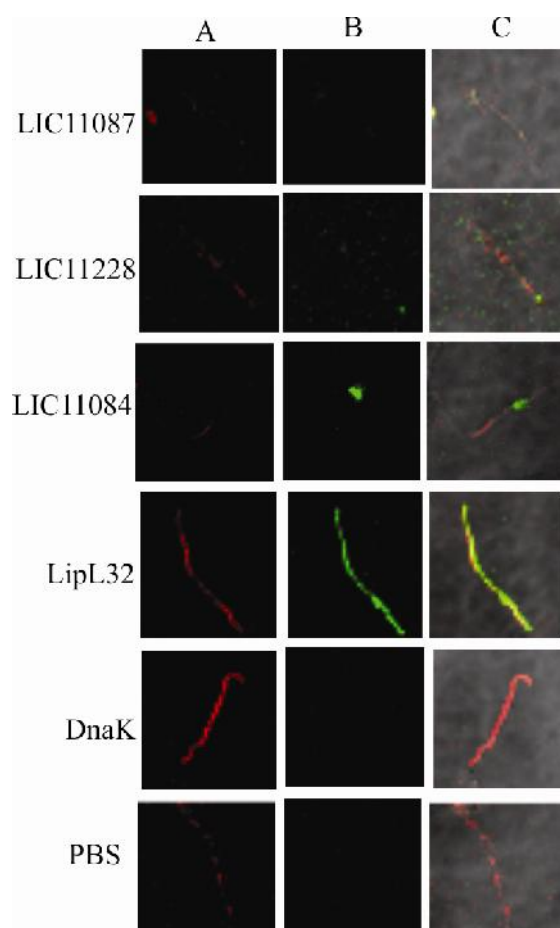
4.10 Detecção das proteínas nas leptospiras por imunofluorescência

As análises de bioinformática das CDS LIC11087 (Lsa30), LIC11228 e LIC11084 sugerem que estas proteínas estão presentes na membrana externa de *L. interrogans*. Para confirmação da localização celular destas proteínas nas leptospiras foi realizada a técnica de imunofluorescência.

Neste experimento as células foram marcadas com iodeto de propídeo, molécula fluorescente que se intercala com o DNA, e com anticorpos conjugados com FITC, isto é em meio a detecção de proteínas na superfície. Para validação do experimento foi empregado os controles negativos PBS e células tratadas com anticorpos policlonais com DnaK, proteína citoplasmática. A detecção da proteína LipL32 foi empregada como controle positivo.

Foi observado co-marcação em verde e vermelho nas células tratadas com anticorpos contra as proteínas LipL32, Lsa30, rLIC11228 e rLIC11084. Isto pode ser um indicio da localização das mesmas na superfície de *L. interrogans* (Figura 24).

Figura 24- Identificação das proteínas nativas na membrana de *L. interrogans* sv. Copenhageni por imunofluorescência.



As células foram tratadas com anticorpos policlonais contra as rLI11087 (Lsa30), rLIC11228 e rLIC11084. Para controle do experimento as células foram tratadas com anticorpos policlonais contra LipL32, controle positivo, e DnaK, controle negativo, ou não foram tratadas. A) marcação das células com iodeto de propídeo; B) marcação das células com FITC; C) comarcação das células.

As células tratadas com anticorpos contra rLIC11087 (Lsa30), rLIC11228 e rLIC11084 foram fracamente marcadas. Isto pode ser atribuído ao baixo número de cópias destas proteínas por células (MALMSTROM et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

A análise das proteínas hipotéticas codificadas pelos genes LIC11121, LIC11087, LIC11228 e LIC11084 por bioinformática demonstrou que as proteínas codificadas por eles são antígenos em potencial devido sua possível localização na membrana externa de *L. interrogans* e a conservação dos mesmos em diferentes espécies de leptospiros. Assim estas proteínas foram escolhidas para serem caracterizadas.

Os genes foram amplificados e clonados no vetor de expressão pAE. A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento dos plasmídeos recombinantes. As proteínas foram expressas em *E. coli*. A expressão das proteínas de interesse foi confirmada por immunoblotting com o emprego de anticorpos monoclonais contra resíduos de histidina.

As proteínas rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084 foram purificadas por cromatografia de afinidade ao metal em tampões com pH 12, condição na qual as proteínas foram mais estáveis. Não foi possível a purificação de rLIC11121 com os métodos de purificação empregados.

A proteína rLIC11084 foi purificada a partir da fração solúvel e apresentou rendimento próximo a 30 mg/L de cultura induzida. As proteínas rLIC11228 e rLIC11087 foram purificadas a partir da fração insolúvel e tiveram rendimento de aproximadamente 6 mg/L de cultura induzida e 4 mg/L de cultura induzida, respectivamente. Foi constatada por difração circular a presença de estrutura secundária nas proteínas rLIC11087 e rLIC11228 após o processo de purificação. A baixa elipicidade molar do espectro gerado com a análise da proteína rLIC11084 demonstra que o sinal captado pode ser ruído do tampão.

As proteínas recombinantes apresentaram imunogenicidade quando administradas em camundongos BALB/c. Todas foram capazes de estimular a produção de anticorpos. A proteína rLIC11084 foi capaz de estimular a proliferação de esplenócitos e a secreção de IFN . Adicionalmente esta proteína induziu proteção em 58% de hamsters imunizados, em um de dois experimentos independentes.

Outro indicio da imunogenicidade destas proteínas foi dado com a identificação de anticorpos reativos a elas no soro de pacientes infectados. Foram identificados respectivamente 30%, 64% e 47% de respondedores na fase convalescente para as proteínas rLIC11087, rLIC11228 e rLIC11084. Adicionalmente a proteína rLIC11087 também foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de animais experimentalmente infectados (45%). Estes resultados podem indicar ainda a expressão dessas proteínas durante a infecção.

Essas proteínas podem estar envolvidas na patogênese de leptospira. As proteínas rLIC11087 (Lsa30) e rLIC11228 demonstraram interação com laminina e fibronectina plasmática.

As proteínas codificadas pelos genes LIC11087, LIC11228 e LIC11084 são ligantes de plasminogênio, adicionalmente o plasminogênio ligado a estas proteínas pode ser convertido a plasmina enzimaticamente ativa.

A proteína codificada pelo gene LIC11087 interagiu com C4bp, uma proteína reguladora do sistema complemento. Esta proteína também pode se ligar a fibrinogênio.

As interações entre as proteínas recombinantes deste trabalho com fibronectina plasmática, plasminogênio, C4bp dependem da estrutura das proteínas. A desnaturação das proteínas Lsa30 e rLIC11228 pode expor outros sítios dessas proteínas que interagem com laminina. Houve redução na ligação de Lsa30 ao fibrinogênio, porém este resultado não foi estatisticamente significativo.

Estas proteínas foram identificadas na superfície de *L. interrogans* por imunofluorescência, resultado que corrobora a predição realizada por bioinformática e mostra que estas proteínas são expressas pela bactéria.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que estas proteínas são imunogênicas, são expressas durante a infecção, podem estar envolvidas na patogenicidade de *L. interrogans* e estão localizadas na membrana externa da bactéria.

REFERÊNCIAS*

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AHMAD, S. N. et al. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, p. 195-200, 2005.
- AHMED, A. et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, p. e7093, 2009.
- ALT, D. P.; ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, n. 5, p. 636-639, 2001.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ATHANAZIO, D. A. et al. Experimental infection in tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 4 deficient mice by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Trop.**, v. 105, p. 95-98, 2008.
- ATZINGEN, M. V. et al. Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol. J.**, v. 6, p. 79-87, 2012.
- ATZINGEN, M. V. et al. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 1005-1015, 2010.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. **J. Infect.**, v. 59, p. 264-276, 2009.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.**, v. 8, 2008. doi: 10.1186/1471-2180-8-70.
- BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira spp.* that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3207-3216, 2010.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6926-6932, 2002.

BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An *Escherichia coli* host linhagem useful for efficient over production of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4403-4406, 1997.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BLACKSELL, S. D. et al. Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, p.1166-1169, 2006.

BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4062-4069, 2005.

BRANGER, C. et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6831-6838, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **GVE – Guia de Vigilância Epidemiológica**. 2005. Publicações Técnica e Científicas – Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>. Acesso em: 27 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leptospirose, dados epidemiológicos das unidades federadas:** 1997-2012. 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_conf_ser_hist_1997_2012.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2013

BREINER, D. D. et al. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 5528-5536, 2009.

BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, n. 2, p. 839–858, 1999.

BROWN, P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 43, p. 110-114, 1995.

BULACH, D. M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 14560-1465, 2006.

CAO, Y. et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v. 29, p. 7379-7386, 2011.

- CAO, X. J. et al. High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. **Cell. Res.**, v. 20, p. 197-210, 2010.
- CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 1381-1385, 2009.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J. Infect. Dis.**, v. 205, p. 995-1004, 2012.
- COUTINHO, M. L. et al. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1422, 2011.
- CHANG, Y. F. et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, p. 8190-8197, 2007.
- CHARON, N. W. et al. Antileptospiral activity in lower-vertebrate sera. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 1386-1391, 1975.
- CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J. Immunol.**, v. 183, p. 2669-2677, 2009.
- CHIRATHAWORN, C. et al. Binding of *Leptospira* to extracellular matrix proteins. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 90, p. 2136-2142, 2007.
- CHOU, L. F. et al. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v. 511, p. 364-370, 2012.
- CHOY, H. A. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS One**, v. 7, p. e41566, 2012.
- CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 2441-2450, 2007.
- CRODA, J. et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 5826-5833, 2008.
- CULLEN, P. A. et al. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 291-318, 2005.
- DAVIS, S. L. et al. SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the α chain. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 27799-27805, 2001.
- DE FOST, M. et al. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 332-335, 2003.

DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. et al. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 177, p. 319-326, 1999.

DIAMENT, D. et al. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 1677-1683, 2002.

DOMINGOS, R. F. et al. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 50, doi: 10.1186/1471-2180-12-50, 2012.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

ELLINGHAUSEN, H. C. J.; MC CULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **Am. J. Vet. Res.**, v. 26, p. 45-51, 1965.

FAINE, S. et al. **Leptospire and Leptospirosis**. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

FAISAL, S. M. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine**, v. 27, p. 378-387, 2009a

FAISAL, S. M. et al. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 27, p. 6129-6136, 2009b.

FAISAL, S. M. et al. Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. **Vaccine**, v. 27, p. 6537-6545, 2009c.

FAISAL, S. M. et al. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, p. 277-287, 2008.

FLANNERY, B. et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3303-3310, 2001.

FÉLIX, S. R. et al. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 12, p. 2026-2030, 2011.

FERNANDES, L. G. et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 80, p.3679-3692, 2012.

FIGUEIRA, C. P. et al. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiol.**, v. 11, p. 129, 2011.

- FINN, R. D. et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 247-251, 2006.
- FONSECA, C. A. et al. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Infect.**, v. 52, p. 15–22, 2006a.
- FONSECA, C. A. et al. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 11, p. 1699–1707, 2006b.
- GASTEIGER, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.
- GATTONI, A. et al. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). **Clin. Ter.**, v. 157, p. 377-386, 2006.
- GRASSMANN, A. A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, p. 740-745, 2012.
- GÓMEZ, R. M. et al. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 315-322, 2008.
- GONZÁLEZ, A. et al. Immunogenicity and protective capacity of *Leptospira* whole-cell monovalent serogroup Ballum vaccines in hamsters. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 37, p. 169-175, 2005.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.
- GRUBER, A.; ZINGALES, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. **Biotechniques**, v. 19, p. 28-30, 1995.
- GUO, Y. J. et al. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 364-373, 2010.
- HAAKE, D. A. et al. Hamster model of leptospirosis. In:_____. **Current protocols in microbiology**. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons, Inc, 2006. Online .Cap. 12, Unit 12E.2. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259>>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2276-2285, 2000.
- HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6572-6582, 1999.
- HAAKE, D. A.; LOVETT, M. A. Interjunctional invasion of endothelial cell monolayers. **Methods Enzymol.**, v. 236, p. 447-463, 1994.

- HABARTA, A. et al. Increased immunogenicity to LipL32 of *Leptospira interrogans* when expressed as a fusion protein with the cholera toxin B subunit. **Curr. Microbiol.**, v. 62, p. 526-531, 2010.
- HAMBURGUER, Z. A. et al. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. **Science**, v. 286, p. 291-295, 1999.
- HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.
- KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete data. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 53, p. 457-481, 1958.
- HARTSKEERL, R. A. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2005.
- HAUK, P. T. **Caracterizações biológicas das proteínas LipL32 e HlyX de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- HAUK, P. et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2642-2650, 2009.
- HAWIGER, J. et al. Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. **Biochemistry**, v. 21, p. 1407-1413, 1982.
- HOKE, D. E. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2063-2069, 2008.
- HOLT, S. C. Anatomy and chemistry of spirochetes. **Microbiol. Rev.**, v. 42, p. 114-160, 1978.
- ISOGAI, E. et al. Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans*. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 45, p. 529-537, 1998.
- ITO, T.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. **Vet. Microbiol.**, v. 15, p. 89-96, 1987.
- JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. **J. Bacteriol.**, v. 94, p. 27-31. 1967.
- JOHNSON, W. C. J. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. **Proteins**, v. 7, p. 205-214, 1990.
- JOST, B. H. et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 22, p. 269-275, 1986.
- JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein. Sci.**, v. 12, p. 1652-1662, 2003.

- KLIMPEL, G. R. et al. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1447-1455, 2003.
- KELLY, S. M. et al. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.
- KO, A. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.
- KO, A. et al. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.
- KOBAYASHI, Y. Human leptospirosis: Management and prognosis. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, p. 201-204, 2005.
- KOIZUMI, N. et al. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 2072-2074, 2012.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, p. 210-214, 2005.
- KOIZUMI, N; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 1545-1552, 2004.
- KOIZUMI, N. et al. [A case of leptospirosis diagnosed early by flaB-PCR]. **Kansenshogaku Zasshi.**, v. 77, p. 627-630, 2003.
- KOSITANONT, U. et al. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 117-122, 2007.
- LÄHTEENMÄKI, K. et al. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 531-552, 2001.
- LAMBERT, A. et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 2019-2025, 2012.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LEBECH, A. M. et al. Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. **APMIS. Suppl.**, v. 105, p. 1-40, 2002.
- LETUNIC, I. et al. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic. Acids. Research.**, v. 40, p. D302-D305, 2012.
- LEVETT, P. N. et al. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 671-673, 2006.

- LEVETT, P. N. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 45-49, 2005.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev. Apr.**, v. 14, p. 296-326, 2001.
- LI, S. et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun.**, v. 16, p. 80-92. 2010.
- LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 253. doi: 10.1186/1471-2180-9-253, 2009.
- LIN, X. et al. Characterization of Conserved Combined T and B Cell Epitopes in *Leptospira interrogans* Major Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 21, 2011.
- LIN, X. et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, p. 237-242, 2009c.
- LIN, Y. P. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Mol. Microbiol.**, v. 79, p. 1063-1076, 2011.
- LIN, Y. P. et al. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 19380-19391, 2009a.
- LIN, Y. P. et al. Fibronectin binds to and induces conformational change in a disordered region of leptospiral immunoglobulin-like protein B. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 23547-23557, 2009b.
- LIN, Y. P. et al. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 25140-25149, 2008.
- LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. **J. Vet. Sci.**, v. 9, p. 133-144, 2008.
- LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 362, p. 443-448, 2007.
- LINGAPPA, J. et al. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. **Genes Immun.**, v. 5, p. 197-202, 2004.
- LIU, Y. et al. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 196, p. 233-239, 2007.
- LONGHI, M. T. et al. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 1275-1282, 2009.
- LOURDAULT, K. et al. Inactivation of *clpB* in the Pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 3711-3717, 2011.

- LOURDAULT, K. et al. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 648-655, 2009.
- LUCAS, D. L. et al. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, p. 3413-3418, 2011.
- LUO, D. et al. InvA protein is a nudix hydrolase required for infection by pathogenic *Leptospira* in cell lines and animals. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 36852-36863, 2011.
- LUO, Y. et al. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, p. 1073-1077, 2000.
- MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, p. 762-765, 2009.
- MARTÍNEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 15, p. 249-255, 2004.
- MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 929-945, 2003.
- MC BRIDE, A. J. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 376-386, 2005.
- MEITES, E. et al. Reemerging leptospirosis, California. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 406-412, 2004.
- MENDES, R. S. et al. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 4657-4667, 2011.
- MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microb. Pathog.**, v. 39, p. 139-147, 2005.
- MERIEN, F. et al. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 139-147, 2005.
- MERIEN, F. et al. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 185, p. 17-22, 2000.
- MERIEN, F. et al. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 169, p. 95-102, 1998.
- MERIEN, F. et al. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 729-738, 1997.
- MERIEN, F. et al. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 281-285, 1995.

- MONAHAN, A. M. et al. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Vet. Pathol.**, v. 46, p. 792-799, 2009.
- MORGAN, J. et al. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 12, p. 1593- 1599, 1998.
- MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **J. Infect. Chemother.**, v. 15, p. 62-69, 2009.
- MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 78, p. 701-709, 2010.
- MURRAY, G. L. et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 810-816, 2009a.
- MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes Infect.**, v.11, p. 311-314, 2009b.
- MURRAY, G. L. et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 952-958, 2009c.
- MURRAY, G. L. et al. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 810-816, 2009d.
- MYINT, K. S. et al. Leptospirosis in Kamphaeng Phet, Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.76, p. 135–138, 2007.
- NABITY, S. A. et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, p. e1878, 2012.
- NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, p. 6022-6031, 2005.
- NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6147-6157, 2002.
- NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in gram negative bacteria. **Proteins**, v. 11, p. 95-110, 1991.
- NALLY, G. E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 1115-1127, 2004.
- NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2164-2172, 2004a.
- NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 459-477, 2004b.

- NARITA, M. et al. Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama islands, Japan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 4, p. 652-656, 2005.
- NEVES, F. O. et al. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Arch. Microbiol.**, v. 188, p. 523-532, 2007.
- OLIVEIRA, R. et al. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. **PLoS One**, v. 6, p. e21962, 2011.
- OLIVEIRA, T. R. et al. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes Infect.**, v. 12, p. 207-217, 2010.
- OLIVEIRA, T. R. et al. Evaluation of leptospira recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 1715-1722, 2008.
- PALANIAPPAN, R. U. et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1745-1750, 2006.
- PALANIAPPAN, R. U. et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Mol. Cell. Probes.**, v. 19, p. 111-117, 2005.
- PALANIAPPAN, R. U. et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5924-5930, 2002.
- PAPPAS, G. et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 351-357, 2008.
- PATHIRANA, R. D. et al. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 152, p. 2381-2394, 2006.
- PASTER, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 19, p. 6101-6109, 1991.
- PEREZ-IRATXETA, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **BMC Structural Biology**, v. 8, p. 25. 2008.
- PEROLAT, P. et al. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, pt. 3, p. 851-858, 1998.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods.**, v. 8, p. 785-786, 2011.
- PICARDEAU, M. et al. First evidence for gene replacement in *Leptospira spp.* Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 189-199, 2001.
- PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, p. e1607, 2008.

- PINNE, M. et al. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e815, 2010.
- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1265-1276, 2000.
- PRETRE, G. et al. Characterization of LIC11207, a novel leptospiral protein that is recognized by human convalescent sera and prevents apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. **Microb. Pathog.**, v. 56, p. 21-28, 2013.
- QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 25420-25429, 2004.
- RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.
- RATHINAM, S. R. et al. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 124, p. 71-79, 1997.
- REN, S. X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, p. 888-893, 2003.
- RICALDI, J. N. et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, p.e1853, 2012.
- RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p. 1309-1317, 2008.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. e97, 2007.
- RUGMAN, F. P. et al. Anticardiolipin antibodies in leptospirosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 517-519, 1991.
- SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SASAKI, D. M. et al. Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 35-43, 1993.
- SCHRÖDER, N. W. et al. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 329-340, 2008.
- SEIXAS, F. K. et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, p. 88-95, 2007.
- SETUBAL, J. C. et al. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

SLACK, A. et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 361-366, 2007.

SLACK, A. T. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 95, 2006.

SLAMTI, L. et al. Deciphering morphological determinants of the helix-shaped *Leptospira*. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 6266-6275, 2011.

SMYTHE, L. et al. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 and genomospecies 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2012. Epub ahead of print.

SMYTHE, L. et al. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 and genomospecies 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2012. Epub ahead of print.

SMYTHE, L. D. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infect. Dis.**, v. 2, p. 13, 2002.

SONHAMMER, E. L. L. et al. Pfam: a comprehensive database of protein families based on seed alignments. **Proteins**, v. 28, p. 405-420, 1997.

SONTHAYANON, P. et al. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 614-620, 2011.

SOUZA, N. M. et al. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb. Pathog.**, v. 53, p. 125-134, 2012.

SOUZA, V. M. et al. Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. **Rev. Saude Publica**, v. 45, p. 1001-1008, 2011.

STARK, K. et al. [Climate changes and emerging diseases. What new infectious diseases and health problem can be expected?]. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 54, p. 699-714, 2009.

STERN, E. J. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, n. 6, p. 843-849, 2010.

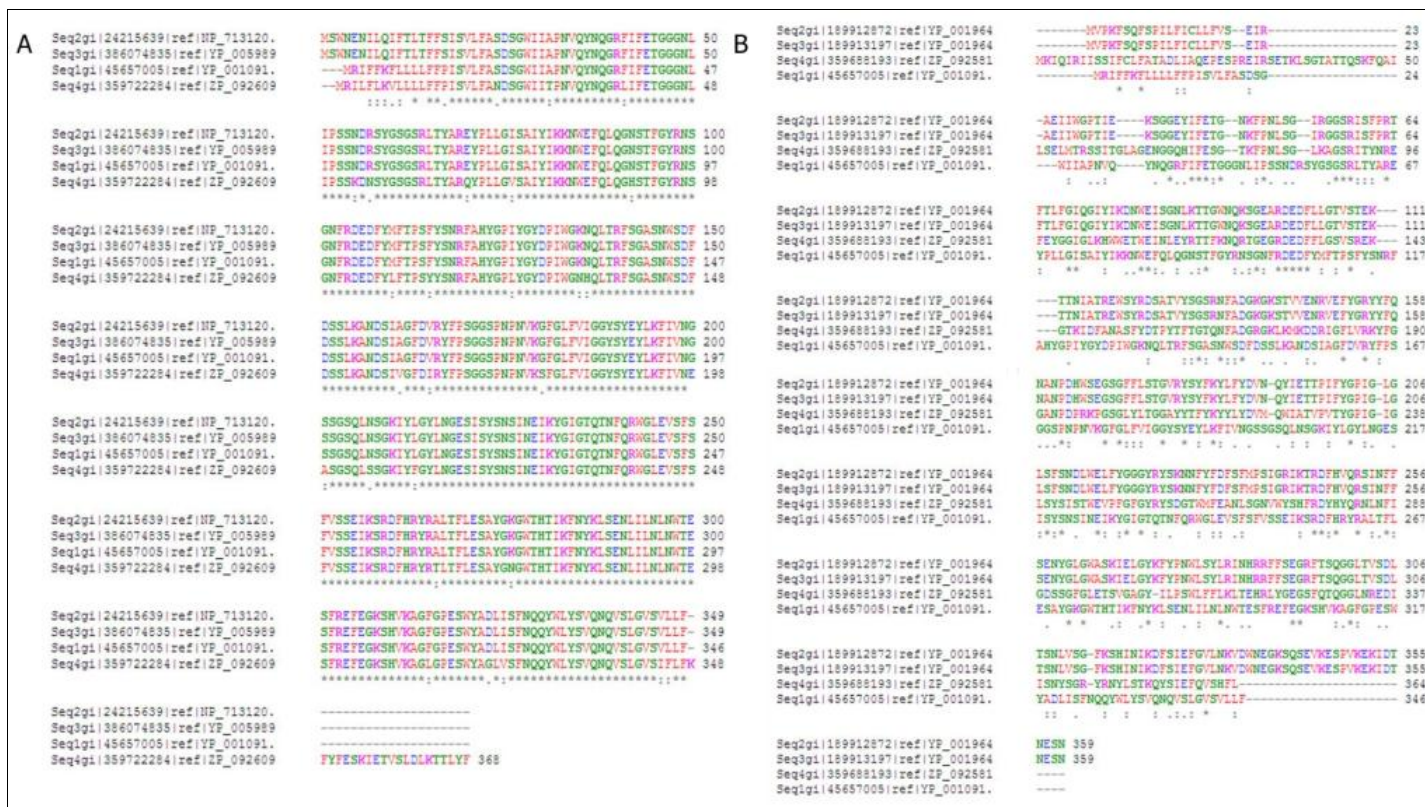
STEVENSON, B. et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One**, v. 2, p. e1188, 2007.

- STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, p. 247-255, 2009.
- STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **J. Mol. Biol.**, v. 219, p. 37-44, 1991.
- STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, v. 185, p. 60-89, 1990.
- SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **PNAS**, v. 95, p. 5857-5864, 1998.
- SUWANCHAROEN, D. et al. Development of a novel primer combination to detect pathogenic *Leptospira* by loop-mediated isothermal amplification. **J. Microbiol. Methods.**, v. 91, p. 171-173, 2012.
- TAJIKI, M. H.; SALOMÃO, R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 1177-1178, 1996.
- TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 9, p. 111-121, 2011.
- THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. In vitro association of leptospire with host cells. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 581-585, 1990.
- TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Int. Microbiol.**, v. 7, p. 35-40, 2004.
- TSINGANOU, E.; GEBBERS, J. O. Human intestinal spirochetosis--a review. **Ger. Med. Sci.**, v. 8, Doc.01, 2010. doi: 10.3205/000090.
- VERMA, A. et al. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e778, 2010a.
- VERMA, A. et al. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 2053-2059, 2010b.
- VERMA, A. et al. LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 1019-1023, 2008.
- VERMA, A. et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2659-2666, 2006.
- VERNEL-PAUILLAC, F.; GOARANT, C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4 p. e582, 2010.
- VIEIRA, M. L. et al. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microb. Pathog.**, v. 51, p. 360-365, 2011.

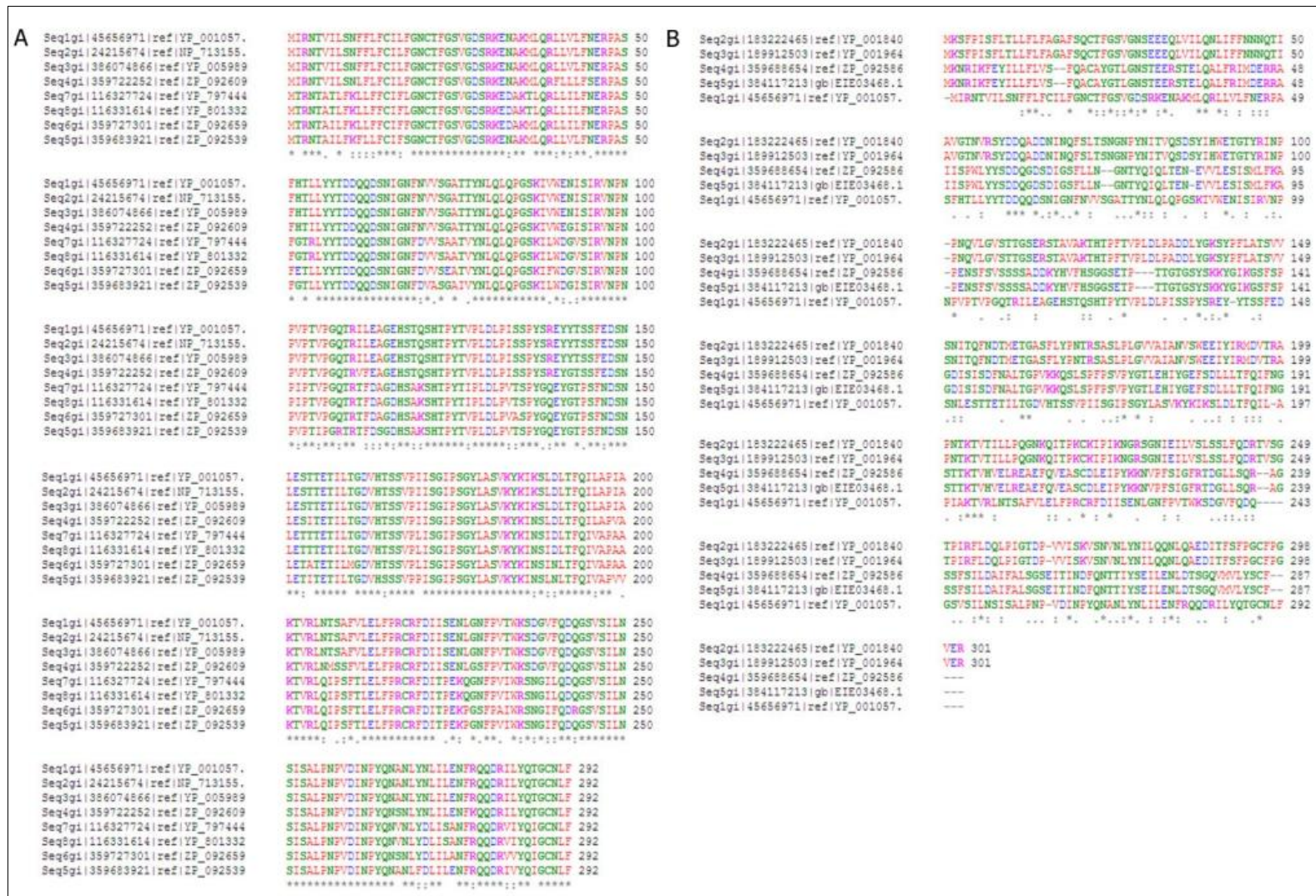
- VIEIRA, M. L. et al. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **J. Infect.**, v. 60, p. 52–64, 2010a.
- VIEIRA, M. L. et al. In vitro identification of novel plasminogen binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 5, p. e11259, 2010b.
- VIEIRA, M. L. et al. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4092–4101, 2009.
- VIEIRA, M. L. et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p. 172e80, 2007.
- VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 527-538. 2001.
- ZHONG, Y. et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell Res.**, v. 21, p. 1210-1229, 2011.
- WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 346-352, 2001.
- WOLGEMUTH, C. W. et al. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 221-227, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance, and control.** World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leptospirosis worldwide, 1999. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 74, p. 237–242, 1999.
- YAN, C. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.**, v. 69, p. 815–822, 2006.
- YAN, W. et al. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. **Vaccine**, v. 28, p. 2277-2283, 2010.
- YAN, W. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect.**, v. 11, p. 230–237, 2009.
- YAN, Y. et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 66, p. 224–230. 2003.
- YU, C. S. et al. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. **Protein Sci.**, v. 13, p. 1402-1406, 2004.
- YU, C. S. et al. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins**, v. 64, p. 643-651, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Alinhamento dos aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes LIC11121, LIC11087, LIC11228 e LIC11084 em espécies patogênicas de *Leptospira ssp.*

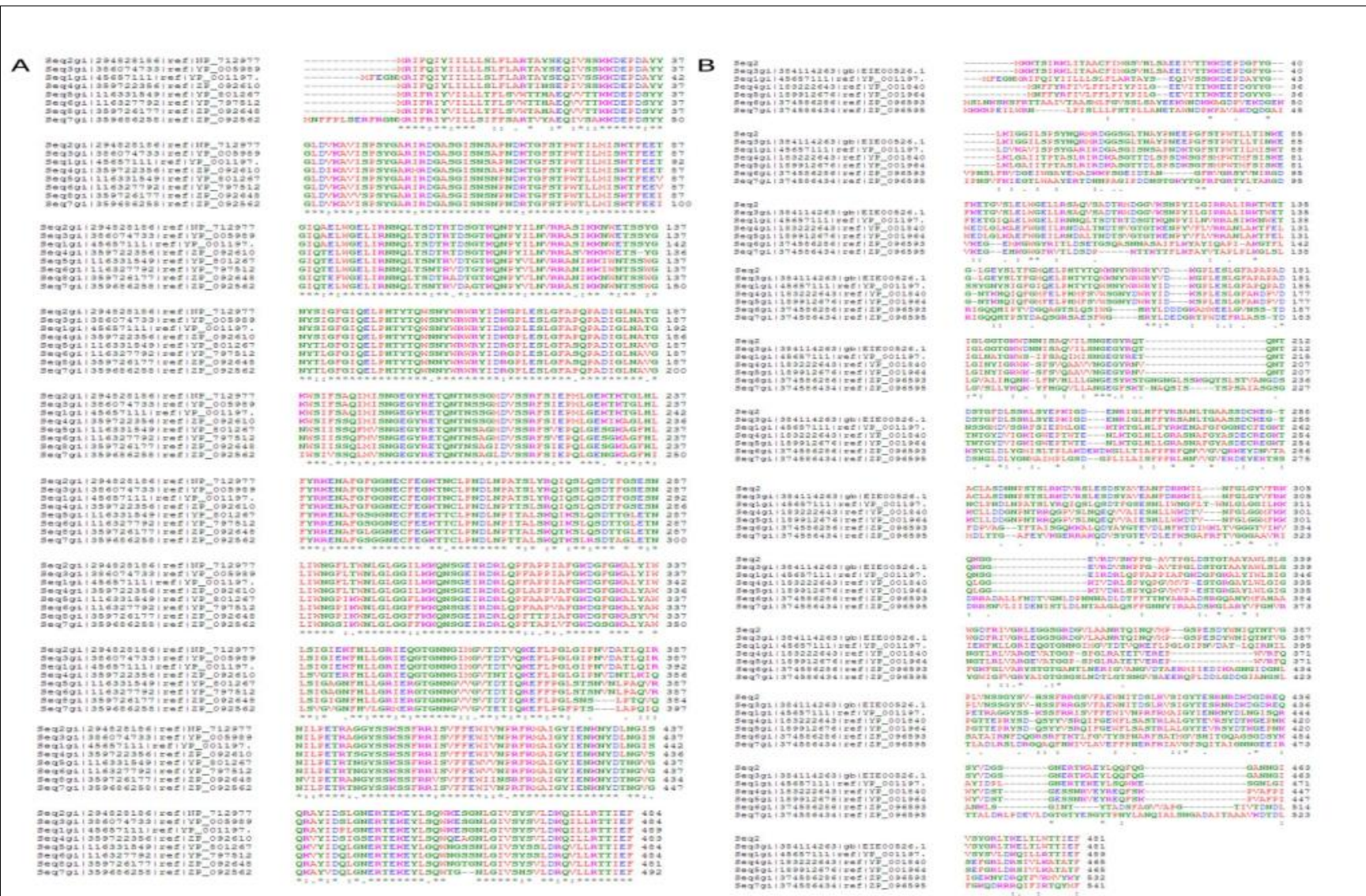


Análise da identidade da proteína hipotética codificada por LIC11121. (A) Alinhamento dos aminoácidos em espécies patogênicas de *Leptospira* ssp. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Seq2 *Leptospira interrogans* sorovar Lai str. 56601 (Identidade 100%); Seq3 *Leptospira interrogans* sorovar Lai str. IPAV (Identidade 100%); Seq4 *Leptospira noguchii* str. 2006001870 (Identidade 94%). (B) Alinhamento dos aminoácidos na espécie saprófita e intermediária. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Seq2 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Ames) (Identidade 30%)'; Seq3 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)' (Identidade 30%); Seq4 *Leptospira licerasiae* sorovar Varillal str. MMD0835 (Identidade 29%). As sequências foram obtidas no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os alinhamentos realizados no programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).



Análise da identidade da proteína hipotética codificada por LIC11087 (A) Alinhamento dos aminoácidos em espécies patogênicas de *Leptospira* ssp. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Seq2 *Leptospira interrogans* sorovar Lai str. 56601 (Identidade 100%); Seq3 *Leptospira interrogans* sorovar Lai str. IPAV (Identidade 100%); Seq4 *Leptospira noguchii* str. 2006001870 (Identidade 94%); Seq5 *Leptospira santarosai* str. 2000030832 (Identidade 81%); Seq6 *Leptospira weilii* str. 2006001855 (Identidade 79%); Seq7 *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis L550 (Identidade 87%); Seq8

Leptospira borgpetersenii sorovar Hardjo-bovis JB197 (Identidade 87%); (B) Alinhamento dos aminoácidos na espécie saprófita e intermediária. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Seq2 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)' (Identidade 30%); Seq3 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Ames)' (Identidade 30%); Seq4 *Leptospira licerasiae* sorovar Varillal str. MMD0835 (Identidade 29%) Seq5 *Leptospira licerasiae* sorovar Varillal str. VAR 010 (Identidade 29%). As sequencias foram obtidas no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os alinhamentos realizados com programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).



Análise da identidade da proteína hipotética codificada por LIC11228 (A) Alinhamento dos aminoácidos em espécies patogênicas de *Leptospira* ssp. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Seq2 *Leptospira interrogans* sorovar Lai str. 56601 (Identidade 99%); Seq3 *Leptospira*

interrogans sorovar Lai str IPAV (Identidade 99%); Seq4 *Leptospira noguchii* str. 2006001870 (Identidade 93%); Seq5 *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis JB197 (Identidade 80%); Seq6 *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis L550 (Identidade 80%); Seq7 *Leptospira santarosai* str. 2000030832 (Identidade 80%); Seq8 *Leptospira weilii* str. 2006001855 (Identidade 79%). (B) Alinhamento dos aminoácidos na espécie saprófita e intermediária. Seq1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130; Seq2 *Leptospira licerasiae* sorovar Varillal str. MMD0835 (Identidade 50%); Seq3 *Leptospira licerasiae* sorovar Varillal str. VAR 010 (Identidade 50%); Seq4 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)' (Identidade 41%); Seq5 *Leptospira biflexa* sorovar Patoc strain 'Patoc 1 (Ames)' (Identidade 41%); Seq6 *Leptonema illini* DSM 21528 (Identidade 22%) proteína Lepil_2466; Seq7 *Leptonema illini* DSM 21528 (Identidade 22%) proteína Lepil_2616. As sequencias foram obtidas no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os alinhamentos realizados com programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

APÊNDICE B- Artigo publicado no período de desenvolvimento do mestrado: SOUZA, N.M. et al. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb Pathog.**, v. 53, p. 125-134, 2012.



Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp

Natalie M. Souza^{a,b}, Monica L. Vieira^{a,b}, Ivy J. Alves^a, Zenaide M. de Moraes^c, Silvio A. Vasconcellos^c, Ana L.T.O. Nascimento^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

^b Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^c Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2012

Received in revised form

13 June 2012

Accepted 14 June 2012

Available online 23 June 2012

Keywords:

Leptospira
Leptospirosis
Adhesion
Plasminogen
C4bp

ABSTRACT

Pathogenic *Leptospira* is the etiological agent of leptospirosis, a life-threatening disease that affects populations worldwide. Surface proteins have the potential to promote several activities, including adhesion. This work aimed to study the leptospiral coding sequence (CDS) LIC11087, genome annotated as hypothetical outer membrane protein. The LIC11087 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain by using the expression vector pAE. The recombinant protein tagged with N-terminal 6XHis was purified by metal-charged chromatography and characterized by circular dichroism (CD) spectroscopy. The recombinant protein has the ability to mediate attachment to the extracellular matrix (ECM) components, laminin and plasma fibronectin, and was named Lsa30 (*Leptospiral* surface adhesin of 30 kDa). Lsa30 binds to laminin and to plasma fibronectin in a dose-dependent and saturable manner, with dissociation equilibrium constants (K_D) of 292 ± 24 nM and 157 ± 35 nM, respectively. Moreover, the Lsa30 is a plasminogen (PLG) receptor, capable of generating plasmin, in the presence of activator. This protein may interfere with the complement cascade by interacting with C4bp regulator. The Lsa30 is probably a new surface protein of *Leptospira* as revealed by immunofluorescence assays with living organisms and the reactivity with antibodies present in serum samples of experimentally infected hamsters. Thus, Lsa30 is a novel versatile protein that may play a role in mediating adhesion and may help pathogenic *Leptospira* to overcome tissue barriers and to escape the immune system.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leptospirosis is a disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira* that affects animals and humans worldwide. The transmission occurs by direct or indirect contact of humans with urine of infected animals [1]. In the urban surroundings, the disease is associated with the growing population and the lack of appropriate sanitation measures. Each year, more than 500,000 cases are reported with mortality rates that fluctuate between 10% and 40% [2]. However, these data are probably underestimated because of the non-specific clinical symptoms of leptospirosis that can vary from flu-like to fatal pulmonary hemorrhage and Weil's syndrome [3]. Effective control strategies are not very efficient since that pathogenesis of the disease is not well understood. Currently

veterinary vaccines against leptospirosis are composed by inactivated whole cells that have drawbacks such as not offering protection against serovars not included in composition. Only China [4] and Cuba [5] have human licensed vaccines with the same limitations as the veterinary ones.

Due to their location, surface proteins are in contact with the host and may be involved in leptospiral infectivity and protective immunity. We have characterized several of these proteins and identified novel leptospiral adhesins that might be involved in the first steps of host–pathogen interaction [6–13] (Fernandes et al., submitted to publication). After the adhesion, leptospires have to surmount tissue barriers in order to reach blood circulation and organs. Accordingly, we have reported the plasmin generation at the bacterial surface through the binding of the host PLG and the presence of an activator [14]. Moreover, our group has identified several leptospiral proteins as PLG – binding receptors [6,7,13,15]. Recently, we have described that plasmin generation on *Leptospira* decreased opsonization, a process that might help the bacteria to evade the immune system and increase survival [16].

* Corresponding author. Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +5511 37220019; fax: +5511 37261505.

E-mail address: tabet@butantan.gov.br (A.L.T.O. Nascimento).

The present work intends to report a novel adhesin of *Leptospira* encoded by LIC11087 gene, named Lsa30, we have identified among the genome sequences of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. The rationale to select this CDS was based on its cellular location by bioinformatics analysis. The gene was cloned into the expression vector pAE and the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* heterologous host system. Purified Lsa30 protein was assayed for its binding capacity to ECM components. We show that Lsa30 mediates the binding to laminin and to plasma fibronectin. Moreover, Lsa30 interacts with PLG and generates plasmin in the presence of activator. Lsa30 also binds C4bp complement regulator and may contribute to the bacterial immune evasion. The recognition of this protein by serum samples of infected hamsters suggested its expression during infection. It is likely that this novel protein could be involved in several steps of leptospiral pathogenesis.

2. Materials and methods

2.1. *Leptospira* strains and culture conditions

Leptospire were cultured at 28 °C under aerobic conditions in liquid Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris medium (EMJH, Difco) with 10% rabbit serum, enriched with L-asparagine (0.015%), sodium pyruvate (0.001%), calcium chloride (0.001%), magnesium chloride (0.001%), peptone (0.03%) and meat extract (0.02%) (all w/v). Low passage, virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm was kept by iterative passages in Golden Syrian hamsters for maintenance. Recently weaned male Golden Syrian hamsters were intraperitoneally infected with 500 µL of approximately 1×10^4 virulent *L. interrogans* serovar Kennewicki strain Pomona Fromm. The animals were bled from the retro-orbital plexus after the appearance of symptoms, such as loss of weight and mobility (approximately 5 days post-infection).

2.2. In silico sequence analysis

Putative coding sequence (CDS) LIC11087 was identified on *L. interrogans* serovar Copenhageni genome sequences and selected based on cellular localization predicted by PSORT, <http://psort.nibb.ac.jp> [17] and CELLO, <http://cello.life.nctu.edu.tw/> [18,19] web servers. For prediction of function and conserved structural domains within the amino acid sequences, SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl [20,21], Pfam <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> [22] and LipoP <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> [23]) web servers were employed. Sequence analysis was performed by BLAST [24]. All sequences available in GeneBank were employed to study conservation and identity of LIC11087 using CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> [25].

2.3. Protein conservation among leptospiral strains

Bacterial cultures of *Leptospira* spp. were harvested by centrifugation, washed three times with PBS containing 5 mM MgCl₂ and resuspended in PBS. The purified recombinant protein, or the protein extracts from leptospire, were loaded into 12% SDS-PAGE, the proteins transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare) in semidry equipment (GE Healthcare) and then analyzed by immunoblotting (see below).

2.4. Gene cloning, protein expression and purification

The gene was amplified from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Copenhageni, without signal peptide sequence tag. The PCR fragment was gel-purified and cloned into expression vector pAE

(Illustra GFX PCR DNA and Gel band purification kit; GE Healthcare). This vector has a 6XHis tag allowing purification of recombinant proteins by metal-chelating chromatography [26]. The cloning process was checked by DNA sequencing on an ABI Prism 3730_L sequencer (Houston, TX, USA) with appropriate T7 promoter-specific primers (Forward 5': TAATACGACTCACTATAGGG and reverse 5': CAGCAGCCAACTCAGTTCCT). Culture of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pAE-LIC11087 was grown in Luria-Bertani (LB) broth with 100 µg ampicillin ml⁻¹ at 37 °C until it reached O.D. 0.6–0.8. The expression of recombinant protein was induced with IPTG 0.25 mM (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) overnight. The cells were harvested by centrifugation and the bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (10 mM Tris–HCl [pH 8.0], 200 mM NaCl, 200 mg/ml lysozyme, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and 1% Triton X-100). The bacterial cell pellets were lysed on ice with the aid of a sonicator (Ultrasonic Processor; GE Healthcare). This protein was expressed in insoluble form, so it was solubilized in buffer containing 20 mM Tris–HCl (pH 12.0), 500 mM NaCl, 8 M urea. Lsa30 was purified through Ni²⁺ charged beads in chelating fast-flow chromatographic column (GE Healthcare). The refolding and washing process was performed on-column by gradually removing urea (6–0 M) and increasing concentrations of imidazole (5–60 mM), respectively. For removal of imidazole, the sample was dialyzed in buffer 20 mM Tris–HCl (pH 12.0), 500 mM NaCl and 0.1% glycine at 4 °C. The expression of recombinant protein was confirmed with detection of His-tag by anti-his tag antibodies (dilution 1:2000).

2.5. Circular dichroism (CD) spectroscopy

Purified recombinant Lsa30 protein was dialyzed against sodium phosphate buffer (pH 7.4). CD spectroscopy measurements were performed at 20 °C using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo) equipped with a Peltier unit for temperature control. Far-UV CD spectra were measured using a 1 mm-path-length cell at 0.5 nm intervals. The spectra were presented as an average of five scans recorded from 185 to 260 nm. The residual molar ellipticity is expressed in degree × centimeter per decimole. Spectra data was submitted to K2D2 software, <http://ogic.ca/projects/k2d2>, using the method that calculated the secondary structure content from the ellipticity experimental data [27].

2.6. Analysis of immunogenic potential of Lsa30 in animals

Female BALB/c mice (4–6 weeks old) were immunized subcutaneously twice with 10 µg of rLIC11087 adsorbed in 10% (vol/vol) of Alhydrogel [2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Denmark]. Negative control mice were injected with PBS. Serum samples were collected before immunizations and 15 days after each immunization. The mice were bled from the retro orbital plexus and the sera of individual animals were analyzed by ELISA for determination of the antibody titers. All animal studies were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

2.7. Immunoblotting assay

The purified Lsa30 was loaded into 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; GE Healthcare) in semi-dry equipment. Membrane was blocked with 5% non-fat dry milk and 2.5% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then incubated with anti-His sequence tag monoclonal antibodies (1:2000) (GE Healthcare) or antibodies against Lsa30 (1:500) for 2 h at room temperature. After washing, the membrane was incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (1:5000; Sigma) in PBS-T for 1 h. The protein's reactivity was

developed by ECL reagent kit chemiluminescence substrate (GE Healthcare) with subsequent exposure to X-Ray film.

2.8. Liquid-phase immunofluorescence (L-IFA)

Localization of the protein encoded by LIC11087 on surface of *L. interrogans* was evaluated by Liquid-phase immunofluorescence (L-IFA) as described by Oliveira et al. [28]. The cells were grown and washed as described before. These cells were harvested at 10,000 rpm for 15 min and nuclei were stained with 50 µg/ml propidium iodide, for 1 h at 37 °C in the dark. The cells were washed and incubated for 30 min with polyclonal mouse antiserum against rLIC11087 at a 1:50 dilution. After washing, the samples were incubated for 30 min with secondary antibody at a dilution of 1:50, goat anti-mouse IgG antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma). Finally, the cells were washed twice and resuspended in PBS anti-fading solution (ProLong Gold; Molecular Probes). Immunofluorescence signal of labeled leptospire was detected using a confocal LSM 510 META microscope (Zeiss). The proteins LipL32 and DnaK were employed as outer membrane [29] and cytoplasmic [30,31] control, respectively.

2.9. Binding of Lsa30 to ECM and to serum components

The binding of Lsa30 to extracellular matrix and blood components was assessed by ELISA according to previously

published protocol [8]. Plates of 96 wells were coated with 1 µg of the components: laminin, collagen Type I, collagen Type IV, plasma fibronectin, cellular fibronectin, plasminogen, C4bp, complement, vitronectin, elastin, factor H, fibrinogen and ECM in 100 µL of PBS for 2 h at 37 °C. Gelatin and BSA were employed as negative controls. The wells were washed six times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) and then blocked with 200 µL of 10% (wt/vol) non-fat dry milk in PBS-T (overnight at 4 °C). One microgram of Lsa30 was added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. The plates were washed three times and polyclonal antibody against Lsa30 was added in appropriate dilution for detection of protein binding. After the plates were washed, secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma), was added in dilution 1: 5000 and incubated for 1 h at 37 °C. The wells were washed three times, and o-phenylenediamine (OPD) (1 mg/ml) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1 µL/ml H₂O₂ was added (100 µL per well). The reaction proceeded for 10 min and was interrupted by the addition of 50 µL of 4 N H₂SO₄. The absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader (TP-reader; Thermo). Bindings were also confirmed by using HRP-conjugated anti-his tag monoclonal antibodies, previously titrated against the recombinant protein and used in a dilution that generates an OD492nm value of approximately 1. For statistical analyses, the binding of recombinant protein to components was compared to its binding to negative control by Student's two-tailed *t* test.

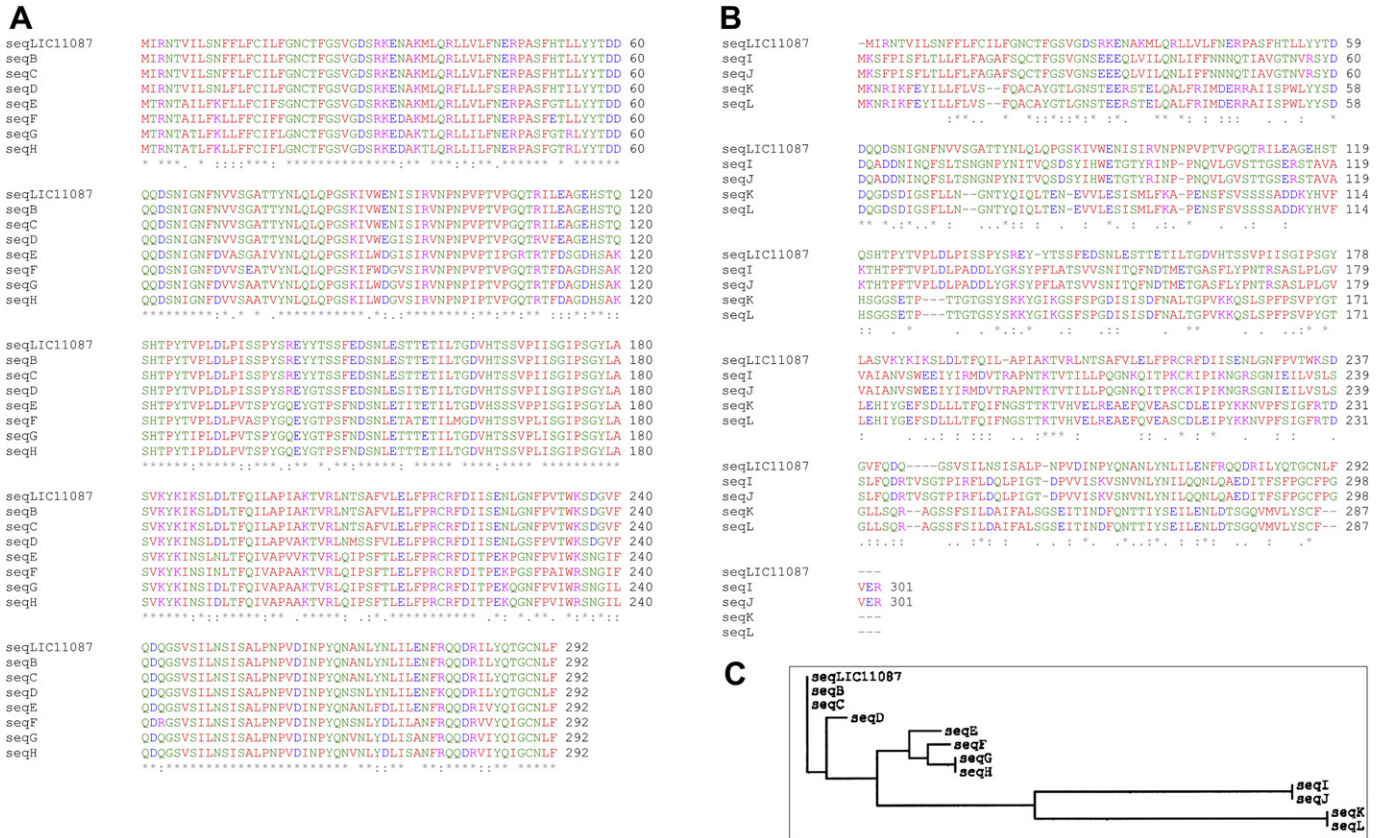


Fig. 1. Analysis of LIC11087 coding sequence conservation among strains of *Leptospira* spp. by Clustal W2 sequence alignments. Blast analysis was performed among a collection of sequences in GeneBank database and leptospiral sequences were employed to perform Clustal W2 sequence alignments. In (A) are the alignments of LIC11087 with sequences identified in pathogenic strains: seqB to seqH are *L. interrogans* serovar Lai strains 56601 and IPAV, *L. noguchii* strain 2006001870, *L. santarosai* strain 2000030832, *L. weilii* strain 2006001855, *L. borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis strains L550 and JB197, respectively. In (B) are the alignments of LIC11087 with sequences identified in saprophytic and intermediate strains: seqI to seqL are *L. biflexa* serovar Patoc Patoc 1 (Paris), *L. biflexa* serovar Patoc Patoc 2 (Ames), *L. licerasiae* serovar Varillal MMD08 (LlicsVM_010100009715) and *L. licerasiae* serovar Varillal VAR 010 (LEPI1GSC185_0037), respectively. (*) at the bottom of each alignment set denotes 100% of sequence identity. In (C) is the resulted phylogram of all sequence alignments showing the proximity of LIC11087 within the pathogenic strains of *Leptospira* while in a distant branches are the intermediate and saprophytic strains.

2.10. Dose-response curves

Microplate of 96-wells were coated overnight in PBS at 4 °C with 100 μ L of 10 μ g/ml PLG, plasma fibronectin, laminin or C4bp. Plates were then blocked and increasing concentrations of Lsa30 (0–1.75 μ M) were added (100 μ L/well in PBS). The assessment of bound proteins was performed by incubation for 1 h at 37 °C with the antiserum raised against each protein at the dilution of 1:1,500, followed by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) (1:5000 in PBS). The reactions were detected with OPD as describe above. The ELISA data were used to calculate the dissociation constant (K_D) according to the method described by Pathirana et al. [32] and Lin et al. [33], based on the equation: $A = A_{max} [\text{protein}] / (K_D + [\text{protein}])$, where A is the absorbance at a given protein concentration, A_{max} is the maximum absorbance for the ELISA plate reader (equilibrium), $[\text{protein}]$ is the protein concentration and K_D is the dissociation equilibrium constant for a given absorbance at a given protein concentration (ELISA data point).

2.11. Plasmin enzymatic activity assay

ELISA microplate was coated overnight with 10 μ g/ml of Lsa30 in PBS at 4 °C. Gelatin was employed as negative control. Plate was washed once with PBS-T and blocked for 2 h at 37 °C with PBS with 10% (wt/vol) non-fat dry milk. The blocking solution was discarded and 100 μ L/well of 10 μ g/ml human PLG was added, followed by incubation for 2 h at 37 °C. Wells were washed three times with PBS-T, and then 4 ng/well of human uPA (Sigma–Aldrich) were added. Subsequently, 100 μ L/well of plasmin-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-*p*-nitroanilide dihydrochloride (Sigma–Aldrich) were added at a final concentration of 0.4 mM in PBS. Plate was incubated overnight at 37 °C and substrate degradation was measured by readings at 405 nm.

2.12. Reactivity of Lsa30 with serum samples from infected hamsters

The recognition of the protein Lsa30 by antibodies of serum samples from 42 infected hamsters was investigated by ELISA. The

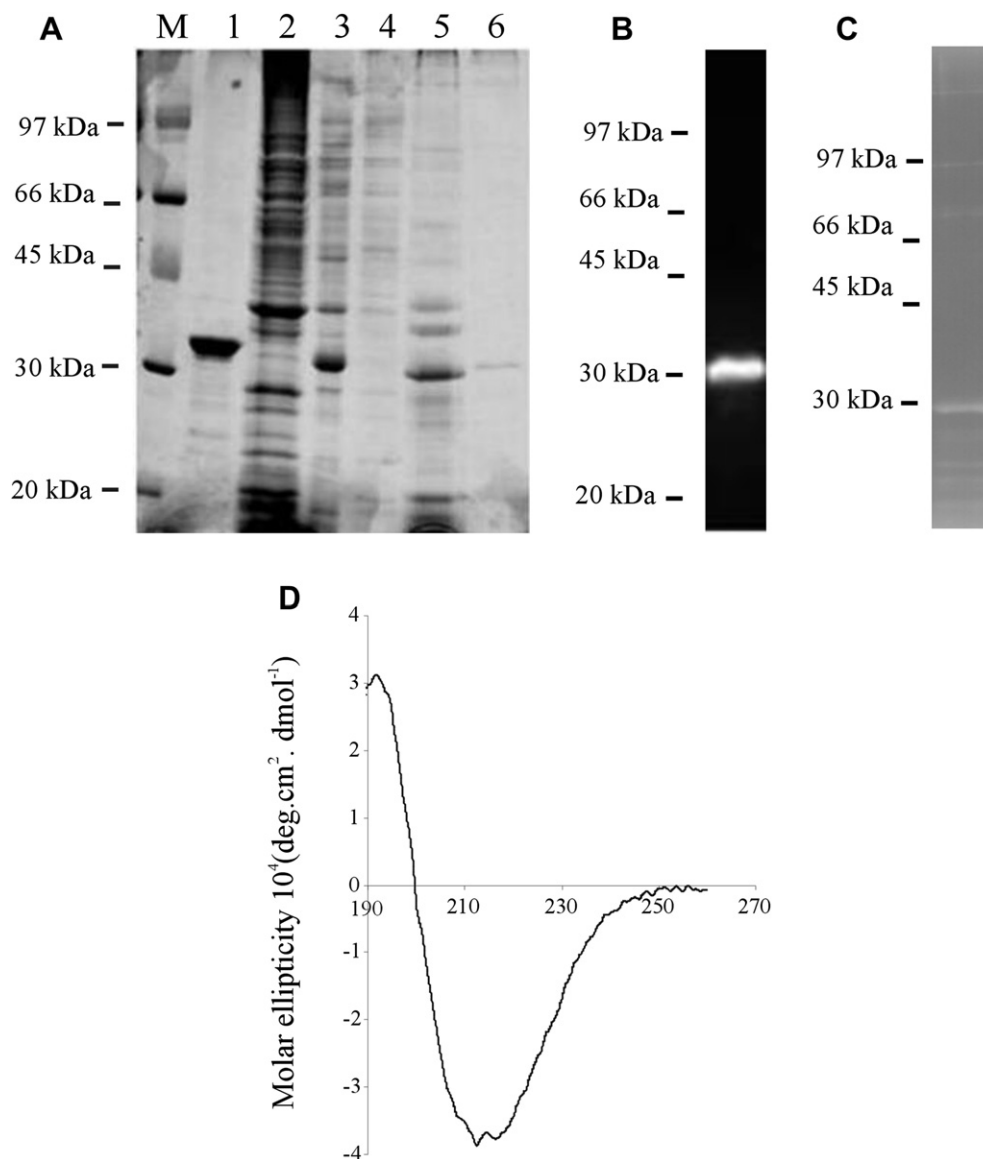


Fig. 2. Analysis of Lsa30 expression by SDS-PAGE. (A) Analysis of Lsa30 protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3), solubility and purification by SDS-PAGE 12%. M. molecular mass marker in kDa 1. LipL32, as protein molecular mass marker; 2. Bacterial cellular extract of untransformed *E. coli* BL21 SI (DE3) 3. Non-induced bacterial culture 4. Soluble fraction of IPTG-induced bacterial culture 5. Insoluble fraction of IPTG-induced culture 6. Purified recombinant protein. (B) Detection of Lsa30 by western blotting using monoclonal anti histag antibodies (1:2000). (C) Detection of Lsa30 by western blotting using homolog polyclonal antibodies (1:500). (D) Structural analysis of recombinant protein Lsa30 by circular dichroism. Lsa30 protein presents a predominant signal of α -helical with minimum ellipticity at 211 and 220 nm and a maximum at 192 nm. Far-UV CD spectra are presented as an average of five scans recorded from 183 to 260 nm.

detection of hamsters IgG against Lsa30 was performed with rabbit anti-hamster (Sigma, USA) at dilution 1:100, followed by secondary antibody goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA) at dilution 1: 2000. The cutoff values were calculated at three standard deviations above the mean OD492_{nm} of sera from 8 healthy animals.

2.13. ECM and biological components

Macromolecules, including the control protein fetuin, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Laminin and collagen Type IV were derived from the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, cellular fibronectin was

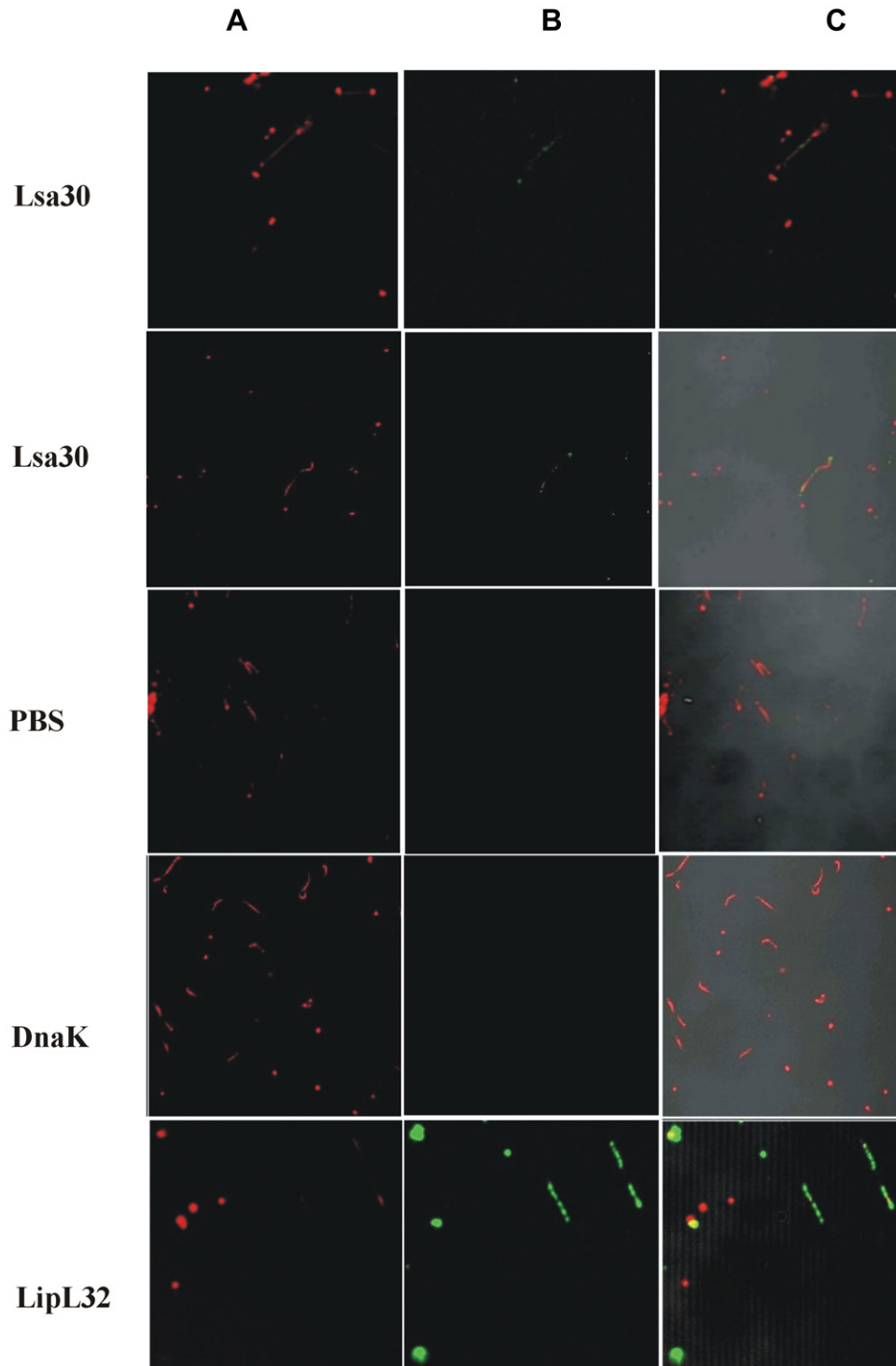


Fig. 3. Localization of Lsa30 in *Leptospira interrogans* by immunofluorescence. (A) DNA of live *Leptospira* stained by propidium iodide. (B) Antigens were recognized on bacteria surface by specific antibodies and secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC). (C) Co-localization showed in the merged images. *Leptospira*s maintained in PBS or treated with antibodies against the cytoplasmic DnaK or against the outer membrane protein LipL32 were employed as negative and positive control, respectively.

derived from human foreskin fibroblasts, plasma fibronectin, human complement serum and fibrinogen were isolated from human plasma and collagen Type I was isolated from rat tail. Plasminogen native, purified from human plasma, was purchased from Merck. Human Factor H was from Calbiochem. C4bp was from Complement Technology, INC.

3. Results

3.1. Bioinformatic analysis of the LIC11087 sequence

The CDS LIC11087 was identified in the chromosome I of *L. interrogans* serovar Copenhageni genome sequences [34,35]. LIC11087 is predicted to be a membrane protein, based on the search for sequence motifs by the servers PSORT [17] and CELLO program [18,19]. No putative conserved domain within this sequence was detected according to SMART, PFAM and BLAST public web servers. BLAST analysis showed that CDS LIC11087 was identified in *L. interrogans* serovar Lai strains 56601 and IPAV (100% identity), *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis JB197 and L550 strains (77% identity). LIC11087 CDS was also identified with high sequence similarity (79–98%) in *Leptospira noguchii* strain 2006001870, *Leptospira santarosai* strain 2000030832 and *Leptospira weilii* strain 2006001855. Sequence with partial similarity (29–30%) was identified in the saprophytic strains of *Leptospira biflexa*, Patoc 1 (Ames) and Patoc 1 (Paris), and in the strains of *Leptospira licerasiae* serovar Varillal MMD08 (LlicsVM_010100009715) and VAR 010 (LEP1GSC185_0037) that belongs to a group intermediate between pathogenic and saprophytic [36]. Multiple sequence alignment was performed with CLUSTAL 2.1 program comparing LIC11087 with the sequences from pathogenic strains (Fig. 1A) and the sequences from saprophytic and intermediated strains (Fig. 1B). The (*) at the bottom of sequences denotes high sequence identity. The phylogram of all sequences is depicted in Fig. 1C that clearly shows the similarity/proximity of LIC11087 with the sequence present in pathogenic strains while sequence present in saprophytic and intermediate strains have low similarity and are organized in a more distant branch.

3.2. Cloning of the LIC11087 gene and expression of Lsa30 recombinant protein

The amplified DNA fragment was cloned into the *E. coli* expression vector pAE. The pAE-LIC11087 positive clone was confirmed by DNA sequencing. The recombinant protein of 30 kDa was expressed as a full-length protein in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni²⁺ charged chromatography. Fig. 2A shows the SDS-PAGE analysis of protein expression and purification steps. The purified Lsa30 was recognized by monoclonal anti-his antibodies in immunoblotting (Fig. 2B) and by mice polyclonal antibodies against Lsa30 (Fig. 2C). The recombinant protein was expressed in insoluble form and was purified under denaturing conditions, followed by refolding process. The structural integrity of the purified protein was then assessed by CD spectroscopy, as depicted in Fig. 2D. The Lsa30 presents a predominant signal of α -helical with minimum ellipticity at near 210 and 220 nm and the maximum at 192 nm. The α -helical predominance was also confirmed by analysis of the spectrum data by K2D2 software, which showed 63% of alpha helix and 3.8% of β -sheets [27]. The results obtained showed that the recombinant protein is suitable for biological assays.

3.3. Detection of the protein corresponding to the LIC11087 CDS in the *Leptospira* by confocal microscopy

We used the liquid-phase immunofluorescence to demonstrate the expression of native LIC11087 protein in *L. interrogans*. The

genomic DNA of living leptospires was labeled by propidium iodide staining (Fig. 3, column A) followed by incubation with the anti-Lsa30 in the presence of anti-mouse IgG antibodies conjugated to FITC (Fig. 3 column B). In control experiments, a green fluorescence could be observed with antisera that recognizes LipL32 antigen (Fig. 3), an outer membrane protein but not with DnaK, a cytoplasmic protein marker (Fig. 3). The localization of the protein-green light on the leptospires was achieved by superimposing both fields and the results obtained are shown in Fig. 3, column C, for each protein, Lsa30, LipL32, DnaK. Lsa30 was weakly immunoreactive to intact spirochetes suggesting surface localization. No protein was detected with the control with PBS only.

3.4. Reactivity of Lsa30 with sera from infected hamsters

We have performed ELISA to analyze whether Lsa30 is recognized by antibodies present in experimentally infected hamsters. We have employed 42 serum samples of hamsters. Our data show that the recombinant protein was able to recognize IgG antibodies in 19 (45.2%) of infected hamster's tested sera (Fig. 4), suggesting that this protein is expressed during animal infection.

3.5. Protein conservation among leptospiral reference strains

Protein expression and conservation among *Leptospira* strains was assessed with total protein extracts from the same strains of *Leptospira* we have employed for DNA conservation analysis. Cell extracts were gel fractionated and western blotting analysis was performed by probing the membranes with polyclonal serum from mice immunized with Lsa30. However, no protein band was detected with the leptospiral strains (data not shown).

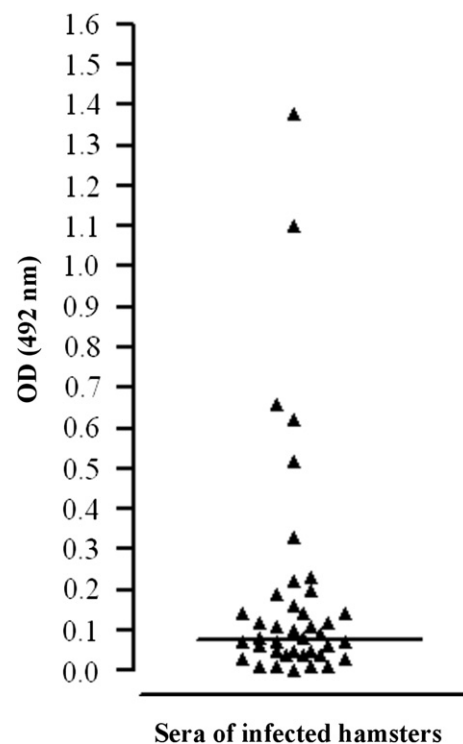


Fig. 4. Recognition of Lsa30 by IgG antibodies present in sera of infected hamsters. Positive sera (responders) were determined by ELISA with the recombinant protein and serum samples from experimentally infected hamsters. The reactivity was evaluated as total IgG antibodies. The cutoff values are defined as the mean plus 3 standard deviations obtained with sera from eight non-infected hamsters (horizontal bars).

3.6. Adhesion of Lsa30 to ECM components

Laminin, collagen Type I, collagen Type IV, cellular fibronectin, plasma fibronectin, vitronectin, elastin and the control proteins, BSA and gelatin, were immobilized on microdilution wells and recombinant protein attachment was assessed by ELISA, using anti-Lsa30 polyclonal antiserum to probe the reactivity. Lsa30 protein exhibited efficient adhesiveness to laminin ($P < 0.001$) and plasma fibronectin ($P < 0.01$) compared to the control protein gelatin (Fig. 5A). The binding was also observed when monoclonal anti-his antibodies were used to probe the bound protein (Fig. 5B). No reaction was observed in the absence of Lsa30 when either anti-Lsa30 or anti-his were employed. No statistically significant adhesiveness was observed with Lsa30 when wells were coated with collagen Type I and IV and cellular fibronectin, vitronectin, elastin or the control proteins. The interaction between Lsa30 with laminin and plasma fibronectin was also assessed on a quantitative basis, as shown in Fig. 5C and D. A dose-dependent and saturable binding were observed when increasing concentrations of the recombinant protein (0–1.75 μM) were allowed to adhere to a fixed concentration of laminin or plasma fibronectin (1 μg each). In the case of laminin, saturation level was reached at a protein concentration of 1.5 μM (Fig. 5C)

and the calculated dissociation equilibrium constant (K_D) for Lsa30 with laminin is $292 \pm 24 \text{ nM}$. Saturation level for plasma fibronectin was also reached at 1.5 μM of Lsa30 (Fig. 5D) with a calculated K_D of $157 \pm 35 \text{ nM}$.

3.7. Interaction of Lsa30 to serum components

The ability of the protein Lsa30 to interact to serum components, human plasminogen, complement, factor H, C4bp *in vitro* was evaluated. The components and the control protein gelatin were individually immobilized onto 96-wells plates followed by incubation with Lsa30. The results obtained using polyclonal antibodies against the recombinant protein to probe the reactions showed that the protein interacts with C4bp and PLG (Fig. 6A). No reaction was observed with factor H, complement and the control proteins (Fig. 6A). Similar data were confirmed when binding was probed using monoclonal anti-his tag antibodies (Fig. 6B). These data were further confirmed when the reaction between Lsa30 with PLG and Lsa30 with C4bp were assessed on a quantitative basis as depicted in Fig. 6C and D, respectively. Dose-dependence was observed when increasing concentrations (0–1.75 μM) of the recombinant protein Lsa30 were allowed to adhere to a fixed amount (1 μg) of PLG or C4bp. In both cases, however, saturation

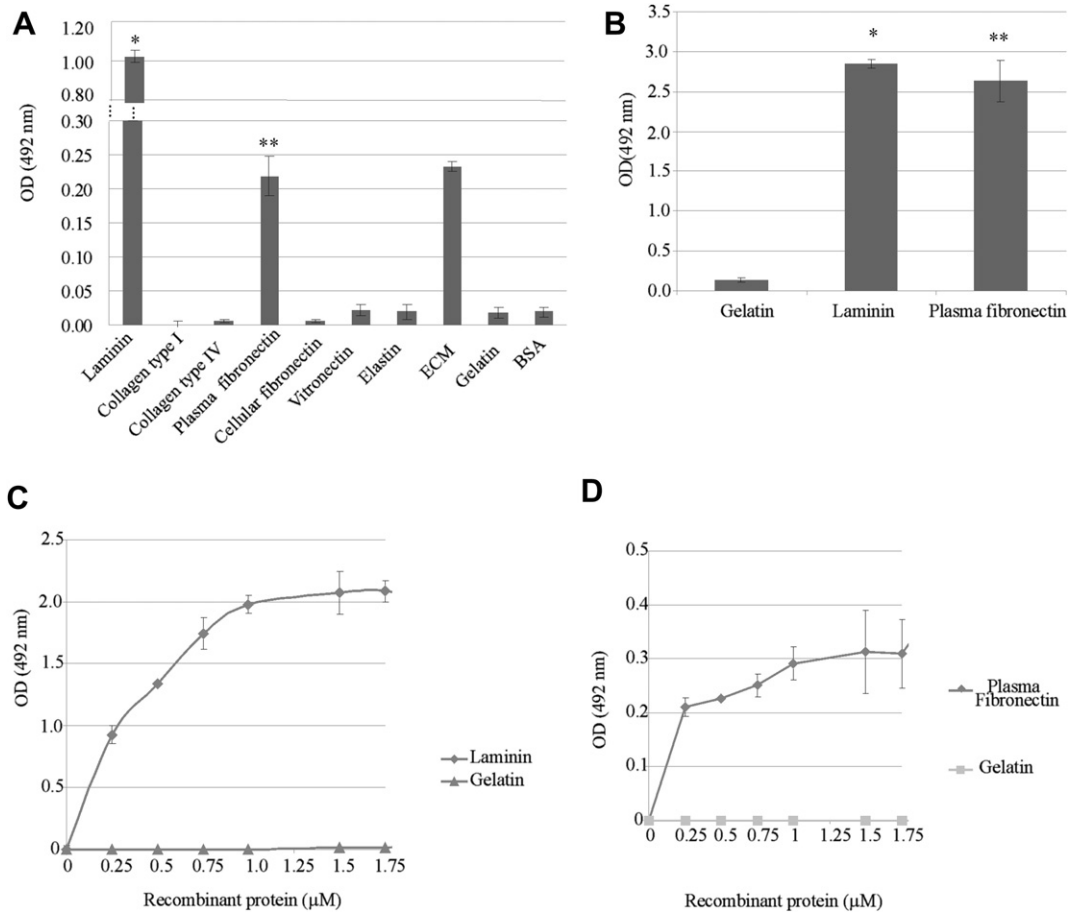


Fig. 5. Binding of Lsa30 to extracellular matrix components. (A) Evaluation of the binding of Lsa30 to laminin, collagen type I, collagen type IV, plasma fibronectin, cellular fibronectin, vitronectin, elastin and ECM gel. Gelatin and BSA were used as negative control. One microgram of each component was coated per well and after washes 1 μg of protein was added. The detection of bound protein was performed with antibodies against Lsa30 in dilution 1:1500. For statistical analyses, the attachment of recombinant protein to ECM components was compared to its binding to gelatin and BSA by two-tailed *t* test (*, $P < 0.00001$; **, $P < 0.001$). (B) Detection of Lsa30 bound to laminin or plasma fibronectin by monoclonal antibody anti-his tag at 1:1000 dilution (*, $P < 0.00001$; **, $P < 0.01$). (C) Dose response of the binding of Lsa30 to laminin (D) and to plasma fibronectin. For both experiments 1 μg of laminin and plasma fibronectin was coated per well and then protein, 0–1.75 μM , was added for ligand-binding characterization. The detection of Lsa30 bound to ECM was performed by using polyclonal antibodies against Lsa30 at 1:1500 dilutions. The equilibrium dissociation constant (K_D) was calculated based on ELISA data when the equilibrium concentration was reached. All experiments data represent the mean absorbance values standard deviation of three replicates for each experimental group.

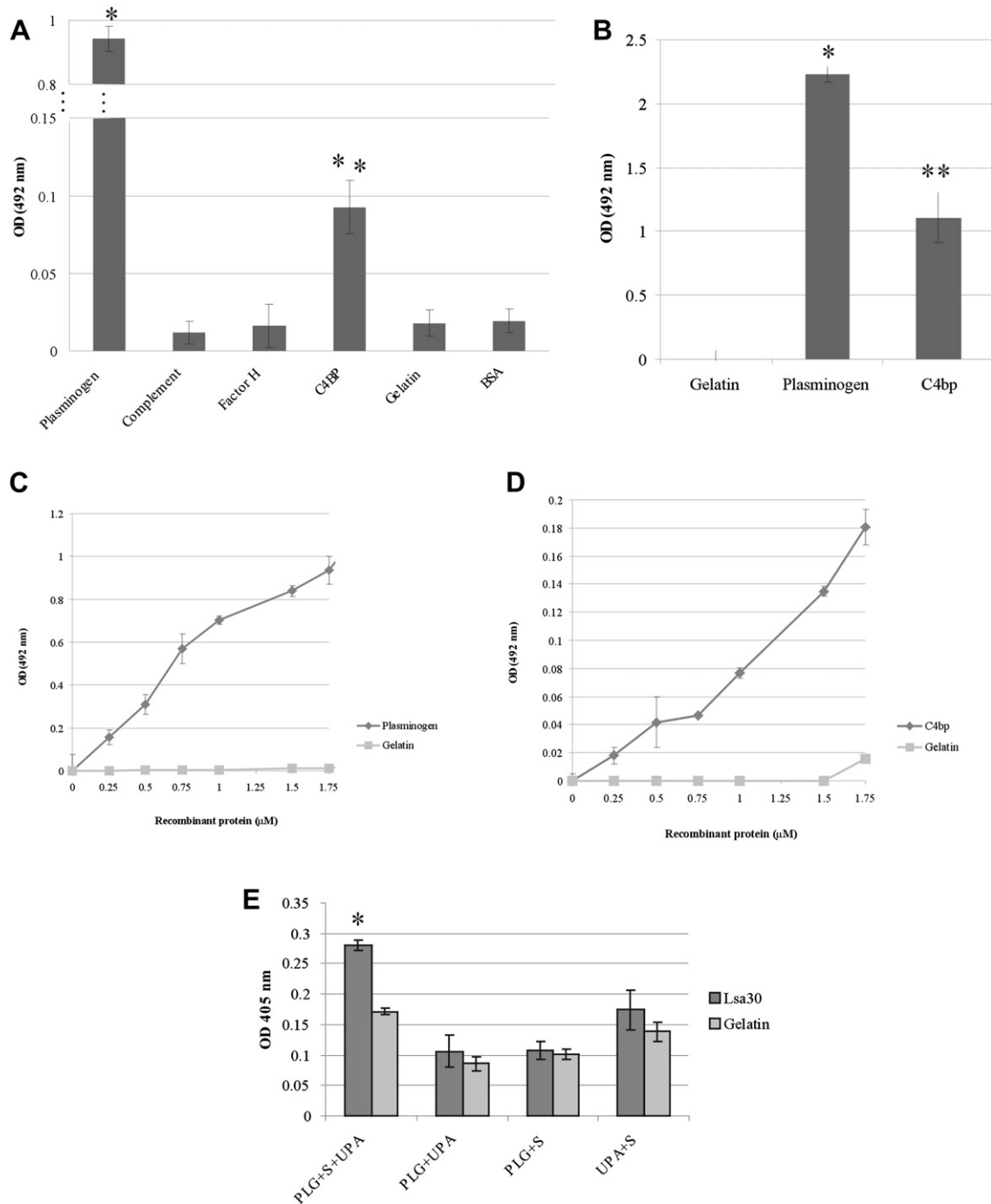


Fig. 6. Interaction of Lsa30 to serum components evaluated by ELISA. (A) Binding of Lsa30 to human PLG, complement, human complement regulators, factor H and C4bp. Wells were coated with 1 µg of each component and 1 µg of protein was added for analysis. Gelatin and BSA were employed as negative controls. Polyclonal antibodies produced in mouse against Lsa30 were used at 1:1500 dilutions to detect the bound protein. For statistical analysis two-tailed *t* test was employed (*, $P < 0.005$; **, $P < 0.05$). (B) Detection of Lsa30 bound to PLG and to C4bp by monoclonal antibodies anti-his tag at 1:1000 dilution (*, $P < 0.05$). (C) Dose response curve of Lsa30 to PLG and (D) and to C4bp. Characterization of ligand-binding interaction was performed by adding 0–1.75 µM of Lsa30 protein to fixed ligand concentration. All experiments data represent the mean absorbance values standard deviation of three replicates for each experimental group. (E) Plasmin generation from PLG bound to Lsa30. Recombinant protein was coated into wells and PLG, plasmin substrate and uPA (PLG + S + uPA) were added. For control of the assay, one of the components was omitted. Gelatin was included as a negative control protein. The standard deviation of four replicates for each condition is shown and is representative of two independent experiments. Statistically significant signal is depicted (*, $P < 0.005$) and was calculated in comparison to the negative control (gelatin).

level was not reached within the protein concentration range used, suggesting low affinity of Lsa30 with the two ligands.

Leptospira and proteins within their surface can bind PLG and acquire proteolytic activity in the presence of an activator, as we have previously shown [7,13–15]. Therefore, we investigated whether Lsa30 bound to PLG could also generate the enzymatically

active plasmin. Microplates were coated with the recombinant protein, blocked, and then incubated with PLG. Unbound PLG was washed away and the urokinase-type PLG activator (uPA) was added together with a plasmin-specific chromogenic substrate. The reaction was carried out overnight and the plasmin activity was evaluated by measuring the cleavage of the substrate (absorbance

at 405 nm). The results show that the PLG captured by the Lsa30 protein could be converted into plasmin, as demonstrated indirectly by specific proteolytic activity (Fig. 6E). The negative control gelatin did not show any proteolytic activity, similar to the controls lacking one of the components, PLG, uPA or the chromogenic substrate.

4. Discussion

Since we have sequenced the whole genome of *L. interrogans* serovar Copenhageni [34,35] our group is committed to identify antigen candidates that would help fight leptospirosis. Bioinformatics have predicted 184 coding sequences that appeared to be exported to the leptospiral surface, and therefore with the potential to participate in the host–pathogen interactions [34]. The majority of these proteins are annotated as hypothetical with no assigned function. By data mining this pool of sequences, we have identified several novel leptospiral adhesins [7–13] and proteins that are capable to promote upregulation of cellular adhesion molecules (CAMs) in endothelial cells [37,38].

After cell adhesion, pathogens must penetrate tissues in order to reach blood circulation and target organs. Plasmin proteolytic activity can help the invasive bacteria to overcome these barriers. We have reported that similar to other pathogens, leptospires can generate plasmin on their surface by binding host PLG in the presence of activators [14]. This proteolytic activity can degrade fibronectin and laminin thus helping the leptospiral invasion [14] (Vieira et al., unpublished results).

We report in this work a novel *L. interrogans* protein encoded by the gene LIC11087, genome annotated as hypothetical. Due to the high degree of antigenic variation among leptospires, we examined the gene/protein conservation among a collection of sequences in GeneBank database. The LIC11087 coding sequence seems to be broadly spread and with high percentage of identity among pathogenic strains of *Leptospira*, while low homology was detected in leptospiral intermediate and saprophytic strains. However, we could not detect the presence of the protein encoded by LIC11087 in all these leptospiral extracts when probed with antibodies raised against the recombinant protein Lsa30. One possible explanation is the fact that this protein although identified by proteomics did not fall in protein abundance scale to have its number of copies calculated [39], indicating very low level of protein expression.

The LIC11087 CDS was expressed in *E. coli* as a 30 kDa full-length recombinant protein, named Lsa30. This protein was expressed in its insoluble from *E. coli* BL21 (DE3) expression host, purified under denaturing conditions followed by protein refolding through extensively dialysis. The secondary structure of the recombinant protein after the purification/refolding processes has been one of our concerns because some denatured proteins may lose their immunogenicity and immunoprotection activities [40]. CD spectroscopy showed a predominant signal of α -helical secondary structure content that makes the Lsa30 suitable for further studies.

The Lsa30 is probably a new surface protein of *Leptospira*, as shown by liquid-phase immunofluorescence assays with living organisms and the reactivity with antibodies present in serum samples of experimentally infected hamsters. The Lsa30 protein has extracellular matrix-binding activity and it is likely that it may have a role in the attachment to host. This protein exhibits a binding profile similar to the previously reported Lsa66 [7] and Lsa20 [13] that are laminin and plasma fibronectin interacting proteins, but distinct of other adhesins like Lsa24 and Lsa27 that are laminin-binding proteins [8]. Several adhesins have been reported to bind to different ECM macromolecules [41]. Indeed, the attachment of *Leptospira* to several ECM macromolecules has been previously shown [8]. The binding affinity dissociation constants estimated for

Lsa30 to laminin ($K_D = 292 \pm 24$ nm) showed similar value of that reported for OmpL37 [42], Lsa66 [7], Lsa33 and Lsa25 [6]. In the case of plasma fibronectin, the calculated K_D (157 ± 35 nm) is in the same order of magnitude when compared to the K_D values obtained with LenB [41], LigA [43], LipL32 [44,45], OmpL37 [42] and Lsa66 [7] and the same ECM component. Thus, it is possible that Lsa30 mediates the leptospiral adhesion process.

The spirochetes *Borrelia* spp. and *Treponema denticola* were shown to have PLG activation system with generation of plasmin on their surface with possible implications on the pathogenesis [46]. We have reported this PLG/PLA acquired proteolytic activity for the first time with *Leptospira* spp. [14]. Plasmin is a versatile serine protease with the ability to digest a broad spectrum of substrates, such as fibrin clots, connective tissue and components of extracellular matrices [47,48]. Verma and colleagues [49] have reported that LenA is a bacterial cell surface receptor for human PLG and that LenA-bound PLG could be converted to plasmin. Thus Lsa30, similarly to LenA [49] and other leptospiral proteins described [6,7,13,15], is a human PLG-binding receptor that generates plasmin in the presence of an activator. Thus, it is likely that Lsa30 may participate in the leptospiral invasion and dissemination.

C4b-binding protein (C4bp) controls the complement classical pathway by interfering with the formation and regeneration of C3 convertase and acting as a cofactor to the serine proteinase factor I in the proteolytic inactivation of C4b [50,51]. Leptospiral binding proteins to C4bp, factor H and factor H-like have been identified [41,52–54]. The interaction of C4bp and of factor H with other pathogens has been described, including the spirochetes *Borrelia* spp. [55,56]. Recently, we have identified two novel leptospiral adhesins, Lsa33 and Lsa25 that have the capacity of binding the human complement regulator C4bp [6]. Lsa30 also has the ability to interact with this complement regulator C4bp and may help the leptospires to evade the immune system.

5. Conclusions

We have identified among the sequences of *L. interrogans* serovar Copenhageni the LIC11087 CDS, genome annotated as hypothetical protein of unknown function. We have characterized this protein, named Lsa30, as a novel leptospiral adhesin. The Lsa30 protein acts as PLG–receptors and could confer proteolytic activity to the bacteria through the generation of plasmin. Moreover, this protein interferes with complement cascade by interacting with the regulator C4bp. Thus, Lsa30 is a multifunctional protein that may play a role on the *Leptospira*–host interactions.

References

- [1] Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14:296–326.
- [2] Leptospirosis worldwide, 1999. Releve epidemiologique hebdomadaire/Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations. 1999;74:237–42.
- [3] Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci; 1999.
- [4] Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, et al. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMS* 2003;66:224–30.
- [5] Martinez R, Perez A, Quinones Mdel C, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health* 2004; 15:249–55.
- [6] Domingos RF, Vieira ML, Romero EC, Goncales AP, Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. Features of two proteins of leptospira interrogans with potential role in host–pathogen interactions. *BMC Microbiology* 2012;12:50.
- [7] Oliveira R, de Morais ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Characterization of novel OmpA-like protein of leptospira interrogans that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS One* 2011;6:e21962.

- [8] Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infection and Immunity* 2006;74:6356–64.
- [9] Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Lima DM, et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiology* 2008;8:70.
- [10] Atzingen MV, Gomez RM, Schattner M, Pretre G, Goncales AP, de Moraes ZM, et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *The Journal of Infection* 2009;59:264–76.
- [11] Longhi MT, Oliveira TR, Romero EC, Goncales AP, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, et al. A newly identified protein of leptospira interrogans mediates binding to laminin. *Journal of Medical Microbiology* 2009;58:1275–82.
- [12] Vieira ML, de Moraes ZM, Goncales AP, Romero EC, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Lsa63, a newly identified surface protein of leptospira interrogans binds laminin and collagen IV. *The Journal of Infection* 2010;60:52–64.
- [13] Mendes RS, Atzingen MV, Moraes ZM, Goncales AP, Serrano SM, Asega AS, et al. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. *Infection and Immunity* 2011;79:4657–67.
- [14] Vieira ML, Vasconcellos SA, Goncales AP, de Moraes ZM, Nascimento AL. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. *Infection and Immunity* 2009;77:4092–101.
- [15] Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, Oliveira R, Andrade DM, Vasconcellos SA, et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 2010;5:e11259.
- [16] Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento AL. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic leptospira interrogans. *Microbial Pathogenesis* 2011;51:360–5.
- [17] Nakai K, Kanehisa M. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 1991;11:95–110.
- [18] Yu CS, Lin CJ, Hwang JK. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 2004;13:1402–6.
- [19] Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 2006;64:643–51.
- [20] Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:5857–64.
- [21] Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Research* 2006;34:D257–60.
- [22] Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, et al. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research* 2006;34:D247–51.
- [23] Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science* 2003;12:1652–62.
- [24] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997;25:3389–402.
- [25] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [26] Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide [et al]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas/Sociedade Brasileira De Biofisica* 2004;37:1103–9.
- [27] Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology* 2008;8:25.
- [28] Oliveira TR, Longhi MT, de Moraes ZM, Romero EC, Blanco RM, Kirchgatter K, et al. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008;15:1715–22.
- [29] Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity* 2000;68:2276–85.
- [30] Stamm LV, Gherardini FC, Parrish EA, Moomaw CR. Heat shock response of spirochetes. *Infection and Immunity* 1991;59:1572–5.
- [31] Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infection and Immunity* 2001;69:4958–68.
- [32] Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Riley PF, Reynolds EC. Characterization of proteinase-adhesion complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology (Reading, England)* 2006;152:2381–94.
- [33] Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284:19380–91.
- [34] Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative genomics of two leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 2004;186:2164–72.
- [35] Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, et al. Genome features of leptospira interrogans serovar Copenhageni [et al]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas/Sociedade Brasileira De Biofisica* 2004;37:459–77.
- [36] Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique leptospira associated with a Rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008;2:e213.
- [37] Gomez RM, Vieira ML, Schattner M, Malaver E, Watanabe MM, Barbosa AS, et al. Putative outer membrane proteins of leptospira interrogans stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. *Microbial Pathogenesis* 2008;45:315–22.
- [38] Vieira ML, D'Atri LP, Schattner M, Habarta AM, Barbosa AS, de Moraes ZM, et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 2007;276:172–80.
- [39] Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* 2009;460:762–5.
- [40] Pertinhez TA, Sforca ML, Alves AC, Ramos CR, Ho PL, Tendler M, et al. 1H, 15N and 13C resonance assignments of the apo Sm14-M20(C62V) protein, a mutant of *Schistosoma mansoni* Sm14. *Journal of Biomolecular NMR* 2004;29:553–4.
- [41] Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, et al. Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2007;2:e1188.
- [42] Pinne M, Choy HA, Haake DA. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010;4:e815.
- [43] Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and Immunity* 2007;75:2441–50.
- [44] Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS, et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infection and Immunity* 2008;76:2642–50.
- [45] Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of leptospira spp. and pseudoalteromonas tunicata. *Infection and Immunity* 2008;76:2063–9.
- [46] Coleman JL, Benach JL. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999;134:567–76.
- [47] Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1992;3:605–14.
- [48] Angles-Cano E, Rouy D, Lijnen HR. Plasminogen binding by alpha 2-anti-plasmin and histidine-rich glycoprotein does not inhibit plasminogen activation at the surface of fibrin. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1992;1156:34–42.
- [49] Verma A, Brissette CA, Bowman AA, Shah ST, Zipfel PF, Stevenson B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infection and Immunity* 2010;78:2053–9.
- [50] Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochemical Society Transactions* 2002;30:978–82.
- [51] Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76:6596–600.
- [52] Barbosa AS, Monaris D, Silva LB, Moraes ZM, Vasconcellos SA, Cianciarullo AM, et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infection and Immunity* 2010;78:3207–16.
- [53] Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *The Journal of Infectious Diseases* 2012;205:995–1004.
- [54] Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczky P, Timoney JF, et al. Lfha, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* 2006;74:2659–66.
- [55] Kraiczky P, Skerka C, Brade V, Zipfel PF. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 2001;69:7800–9.
- [56] Hovis KM, McDowell JV, Griffin L, Marconi RT. Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii*. *Journal of Bacteriology* 2004;186:2612–8.

APÊNDICE C- Artigo publicado no período de desenvolvimento do mestrado: CERQUEIRA, G.M. et al. Development of Transcriptional Fusions to Assess *Leptospira interrogans* Promoter Activity. **PLoS One.**, v. 6, p. e17409, 2011.

Development of Transcriptional Fusions to Assess *Leptospira interrogans* Promoter Activity

Gustavo M. Cerqueira^{1*}‡, Natalie M. Souza¹, Eduardo R. Araújo¹, Aline T. Barros¹, Zenaide M. Morais², Sílvio A. Vasconcellos², Ana L. T. O. Nascimento^{1,3}

1 Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, Brazil, **3** Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Leptospirosis is a zoonotic infectious disease that affects both humans and animals. The existing genetic tools for *Leptospira* spp. have improved our understanding of the biology of this spirochete as well as the interaction of pathogenic leptospires with the mammalian host. However, new tools are necessary to provide novel and useful information to the field.

Methodology and Principal Findings: A series of promoter-probe vectors carrying a reporter gene encoding green fluorescent protein (GFP) were constructed for use in *L. biflexa*. They were tested by constructing transcriptional fusions between the *lipL41*, Leptospiral Immunoglobulin-like A (*ligA*) and Sphingomyelinase 2 (*sph2*) promoters from *L. interrogans* and the reporter gene. *ligA* and *sph2* promoters were the most active, in comparison to the *lipL41* promoter and the non-induced controls. The results obtained are in agreement with *LigA* expression from the *L. interrogans* Fiocruz L1-130 strain.

Conclusions: The novel vectors facilitated the *in vitro* evaluation of *L. interrogans* promoter activity under defined growth conditions which simulate the mammalian host environment. The fluorescence and rt-PCR data obtained closely reflected transcriptional regulation of the promoters, thus demonstrating the suitability of these vectors for assessing promoter activity in *L. biflexa*.

Citation: Cerqueira GM, Souza NM, Araújo ER, Barros AT, Morais ZM, et al. (2011) Development of Transcriptional Fusions to Assess *Leptospira interrogans* Promoter Activity. PLoS ONE 6(3): e17409. doi:10.1371/journal.pone.0017409

Editor: Deepak Kaushal, Tulane University, United States of America

Received: November 2, 2010; **Accepted:** January 31, 2011; **Published:** March 18, 2011

Copyright: © 2011 Cerqueira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Gustavo M. Cerqueira holds a postdoctoral fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Ana L.T.O. Nascimento would like to acknowledge the support from FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Butantan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cerqueiragm@yahoo.com.br

‡ Current address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Nursing and Health Sciences, Monash University, Melbourne, Australia

Introduction

Leptospira interrogans is the main causative agent of leptospirosis, a zoonotic infectious disease with worldwide distribution. Chronically infected reservoir hosts, such as rats, do not exhibit overt disease but are colonized by leptospires in their renal tubules and shed bacteria in the urine. Humans become infected by exposure to contaminated water, soil, or urine [1]. Severe manifestations of the disease, as observed in Weil's disease, are frequent and associated with significant mortality, up to 15% [1,2]. In addition, leptospirosis may evolve to severe pulmonary haemorrhage syndrome (SPHS), for which case fatality is >50% [3,4].

The *Leptospira* genus is composed of 20 recognized species and includes strains that belong to the saprophyte, intermediate or pathogen groups [5]. Currently, almost 300 serovars are recognized, of which more than 200 are considered to be pathogenic [2,5,6,7]. The available genome sequences for pathogenic [8,9,10] and saprophytic [11] *Leptospira* spp. have been employed to search for new diagnostic reagents and vaccine candidates for leptospirosis.

Prompt diagnosis and early treatment of leptospirosis are essential to avoid severe outcomes [12]. The early phase leptospirosis is often

misdiagnosed due to its presentation with nonspecific clinical signs [1], low sensitivity and frequent poor specificity of the results exhibited by the microscopic agglutination test (MAT) and the commercially available assays [7,13,14,15,16,17,18,19].

The use of vaccines as prevention measures appears to be a cost-effective approach to prevent worldwide diseases. Commercially available whole-cell vaccines confer protection in a limited and incomplete manner, limiting their use among humans. E. g. whole-cell preparations produce only short-term immunity, requiring administration semi-annually; present low cross-protection and adverse reactions due to both residual media components and leptospiral lipopolysaccharide [2,6,7,20,21]. Efforts have been made for over a decade towards identifying immunoreactive [22,23,24,25,26,27,28] or protective [29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41] antigens via recombinant DNA technology. Despite these advances, limitations still remain to be overcome. The rational identification of novel candidate antigens is therefore necessary and the development of genetic tools to *Leptospira* spp. may be helpful for this purpose.

The mechanisms of *Leptospira* pathogenesis remain unclear, despite the efforts to identify virulence factors and their role in the

pathogen-host interaction. To this aim, new genetic tools have been developed in the last years [11,42,43]. Functional characterization of outer membrane and cytoplasmic proteins [44,45,46,47,48,49], and more recently the generation and study of knock-out mutants [50,51,52,53,54,55,56] have provided important contribution.

Many efforts have been done to understand the influence of environmental signals on the leptospiral transcriptome and proteome, aiming to identify antigens involved in pathogenesis [44,46,47,48,57,58]. Temperature, physiological osmolarity, iron availability and the growth phase, in addition to the multitude of factors existing in the host serum and during pathogen-host cell contact, are known to affect the expression of several leptospiral proteins [57,58,59,60,61,62]. pH was also found to be responsible for protein regulation, such as LipL36 and P31LipL45 (Qlp42), in the kidney tubules of hamsters [61,63]. However, many leptospiral coding sequences (CDSs) still remain to be characterized [64]. The *L. interrogans* genome carries a considerably large number of genes supposedly involved in response regulation [9]. *L. borgpetersenii*, which possesses a reduced ability to survive outside the host, contains a lower number of regulatory genes [10]. However, the saprophyte *L. biflexa* contains a larger number of putative transcription factors than the other sequenced species. This suggests that *L. biflexa* can be used as a model to study the gene regulation of pathogenic *Leptospira* spp. [11,57]. Despite the sequence diversity between both species, these findings suggest that pathogens and saprophytes might share some similar mechanisms to respond to the environment.

The extent to which the manipulation of *in vitro* conditions can be used to reproduce the full spectrum of mammalian host signals, which trigger differential gene expression in pathogenic *Leptospira* spp. remains uncertain. In this study, we sought to develop a new genetic tool to help elucidating the biology of *Leptospira* spp. We found that our promoter-probe methodology is useful for assessing promoter activity under defined conditions. The comparative analysis of the fluorescence produced by a specific *L. biflexa* reporter strain, PAG (carrying a copy of the *ligA* promoter fused to the *gfp* gene), and LigA expression from *L. interrogans* Fiocruz L1-130 strain, grown *in vitro* under the same systematic conditions, validated the use of *L. biflexa* as a model to assess *L. interrogans* promoter activity. The reporter strain containing a copy of the sphingomyelinase 2 promoter, *Psph2* (P2G) was also strongly induced by the conditions tested, above an established cut-off, whereas the non-virulence factor promoter control, from the *lipL41* lipoprotein gene, was not. We believe this promoter-probe methodology may support the existing methodologies to the identification of novel virulence factors of pathogenic *Leptospira* spp.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and constructs are listed in Table 1. Strains were obtained from the collection of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; Laboratoire de Biologie des Spirochetes, Institut Pasteur, Paris, France and the ATCC. The virulence of the low-passage *L. interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 strain was maintained by passage through Golden Syrian hamsters. Low-passage refers to strains that were sub-cultured in EMJH liquid medium up to 10 times. All strains were cultured at 30°C in liquid EMJH medium supplemented with 1% rabbit serum [65,66]. Chemically competent *E. coli* TOP10F cells were used as host for genetic manipulation of plasmids. *E. coli* transformants were

typically selected on LB agar plates containing spectinomycin (50 µg/ml) or ampicillin (100 µg/ml). Electrocompetent *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1 was prepared as previously described [55], and transformed with replicating shuttle vectors containing the promoter-probe cassettes (Table 1). EMJH plates were prepared using 1% agar and supplemented with spectinomycin at 50 µg/ml.

Liquid EMJH pH 6.7 was prepared by adding concentrated HCl until the pH of choice was reached. Spermine (Sigma) was dissolved according to the manufacturer's instructions and supplemented in cultures at 200 µM. Physiologic osmolarity was induced by supplementation with 120 mM NaCl [44]. Before induction, cultures were grown at 30°C in EMJH until the late-exponential phase was reached (culture density of 10⁸ to 10⁹/ml). Growth was monitored by measuring the OD₄₂₀ using an Ultraspec 2100 pro spectrophotometer (GE Healthcare). Cells were harvested (OD₄₂₀ 0.5) and immediately stored at -20°C.

Bioinformatics analyses

The sequences used for this study were obtained from the complete genome sequence of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 by using the SpiroScope (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>) database [67] and *Leptospira* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br>) database [9]. The Neural Network Promoter Prediction v.2.2 [68], TRES – Transcription Regulatory Element Search, which performs searches within the TRANSFAC database [69] and the PromScan program, that generates an alignment of known sequences and matrix frequency [70], were used to scan DNA sequences for potential binding sites. Repeats were identified by the EMBOSS programs available at <http://bioweb.pasteur.fr/nucleic/intro-en.html#repeat>.

Construction of reporter vectors

The *gfp* gene [43] was amplified by PCR with Gfp5/Gfp3 primers pair, which introduced the SmaI, SacI, XhoI, BamHI, SmaI restriction sites. The resulting fragment was cloned into pGEM-T Easy (Promega) yielding the pGEM-T Easy/*gfp* construct. The *PlipL41*, *PligA* and *Psph2* promoters from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 were amplified by PCR using primers PlipL41300F/PlipL41300R, PligA300F/PligA300R and Psph2600F/Psph2600R, which introduced the XhoI and BamHI restriction sites, and cloned into pGEM-T Easy/*gfp* via the same sites. Promoter-probe vectors containing the *L. interrogans* promoters-*gfp* cassettes were constructed in the *E. coli*-*L. biflexa* pSLe94 shuttle-vector [71]. The cassettes were removed from pGEM-T Easy (Promega) by SmaI digestion and cloned in via PvuII restriction site to give the new vectors, pSLe94/*PlipL41/gfp*, pSLe94/*PligA/gfp* and pSLe94/*Psph2/gfp* (Table 1). Electroporation of leptospire was performed as previously described [55,71]. After 1 to 2 weeks of incubation, spectinomycin resistant transformants were used to inoculate liquid medium.

Reporter gene assays

Cells for spectrofluorometry measurements were resuspended in 300 µl of deionized water and distributed 100 µl per well in a black 96-well OptiPlate-96F microplate (PerkinElmer). GFP fluorescence was measured using a 650-10 spectrofluorometer (PerkinElmer) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 538 nm. The fluorescence intensity from samples was expressed as arbitrary fluorescence units, obtained at a wavelength of maximum emission. The mean specific activity from at least three independent assays is indicated in the results.

Table 1. Primers, plasmids and strains employed in this study.

Designation	Sequence (5'-3')/genotype
PRIMERS	
Plipl41300F	CCGCTCGAGAGATAAGATCCAACCCAAAAGTTG
Plipl41300R	GGCGGATCCATGAAAAGTAACACCAATCCTGTTGA
PligA300F	CCGCTCGAGTTGGTTTTATAGAAATCAGCAATGATCC
PligA300R	GGCGGATCCATAAACACTCACTCTAATTGTTTTATTGAA
Psph2600F	CCGCTCGAGAAACAAAGAATACATACTATAACGTGAATTC
Psph2600R	GGCGGATCCATCGTTCTCTATCTCCATTCTGTATGTTG
Gfp5	GTCGACGAGCTCGAGGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAA
Gfp3	TCAGATCTATTTGTGATGGTGATGGTATAGTTCATCC
fD1	AGAGTTTGATCYTGGYTYAG
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
NligA5	GCGGATCCTCCGTTACCGCAGCGGAACCTACTGAGAT
NligA3	CCCAAGCTTTACCAGGCTCGATTACTTTT
PLASMIDS	
pGem-T easy	TA cloning vector; Amp ^r
pGem-T easy/gfp	pGem-T easy carrying a copy of the <i>gfp</i> gene
pGem-T easy/Plipl41/gfp	pGem-T easy/gfp carrying a copy of the <i>Plipl41</i> promoter upstream <i>gfp</i>
pGem-T easy/PligA/gfp	pGem-T easy/gfp carrying a copy of the <i>PligA</i> promoter upstream <i>gfp</i>
pGem-T easy/Psph2/gfp	pGem-T easy/gfp carrying a copy of the <i>Psph2</i> promoter upstream <i>gfp</i>
pSLe94	<i>E. coli/L. biflexa</i> shuttle vector; Spc ^r
pSLe94/Plipl41/gfp	<i>E. coli/L. biflexa</i> shuttle vector carrying the cassette <i>Plipl41</i> promoter- <i>gfp</i>
pSLe94/PligA/gfp	<i>E. coli/L. biflexa</i> shuttle vector carrying the cassette <i>PligA</i> promoter- <i>gfp</i>
pSLe94/Psph2/gfp	<i>E. coli/L. biflexa</i> shuttle vector carrying the cassette <i>Psph2</i> promoter- <i>gfp</i>
STRAINS	
<i>Escherichia coli</i> Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ <i>139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
<i>L. biflexa</i> sv. Patoc str. Patoc1	Wild-type saprophytic strain
<i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	Wild-type pathogenic strain
P41G	Str. Patoc1 carrying the pSLe94/ <i>Plipl41</i> / <i>gfp</i> shuttle vector
PAG	Str. Patoc1 carrying the pSLe94/ <i>PligA</i> / <i>gfp</i> shuttle vector
P2G	Str. Patoc1 carrying the pSLe94/ <i>Psph2</i> / <i>gfp</i> shuttle vector

Bacterial cultures of the indicated strains (wt and knock-in mutants) were grown in LB medium overnight at 37°C with vigorous shaking (*E. coli*) or in EMJH medium at 30°C with moderate agitation (*Leptospira* spp).
doi:10.1371/journal.pone.0017409.t001

Fluorescence microscopy

Qualitative expression of GFP was examined under UV light for detection of fluorescence. The cultures were induced and samples were collected at representative time-points, spun down and the resulting pellets were washed twice with 1× PBS to remove the culture medium. The pellets were then resuspended in 1× PBS, 20% Glycerol. Aliquots of 20 μl of the bacterial suspensions were applied to slides and sealed with a concentrated formaldehyde resin. Images of leptospire on cover slips were acquired using an IX81 inverted microscope (Olympus) equipped with 20× and 40× objectives and the CellR software (version 3.1). The UV filter sets used were DAPI (excitation: 350 nm – range is 330 to 380 nm, Emission: 460 nm) and DIC (transmitted light).

RNA isolation and rt-PCR

Cells were harvested (OD₄₂₀ 0.25) and RNA was isolated from bacteria with TRIzol reagent (Invitrogen), as described by the manufacturer. Then, isolated RNA (2 μg) was treated with

DNaseI (Invitrogen), following manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using SuperScript III First-strand (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Samples were quantified and checked for purity using an Ultraspec 2100 pro spectrophotometer (GE healthcare) and agarose gel electrophoresis. The cDNA (representing 100 ng of RNA per reaction) was amplified with Taq DNA polymerase (Invitrogen) using primers pairs fD1/rP2 (control) [72], Gfp5/Gfp3 for reporter strains [43], or NligA5/NligA3, for *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130.

Whole-cell ELISA

Whole-cell ELISA experiments were performed using a modification of previously described methods [45,73]. Flat-bottom polystyrene high-binding microtitre plates (Corning) were coated overnight at 4°C with 100 μl per well of 10⁸ ml⁻¹ whole *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, which were previously centrifuged at 4,000×g and resuspended in 0.05 M

sodium carbonate buffer (pH 9.6). Plates were blocked overnight at 4°C, and washed three times with 150 µl *Leptospira* Enrichment EMJH (Difco). Wells were incubated for 1 h at room temperature with 100 µl per well of a 1:2,000 dilution of rabbit anti-LigA polyclonal serum (Kindly provided by Dr. Albert I. Ko and Dr. Paula Ristow, Gonçalo Moniz Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil) in *Leptospira* Enrichment EMJH, and washed three times with 200 µl PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Wells were incubated with 100 µl per well of a 1:5,000 dilution of horseradish-peroxidase-linked donkey whole-antibody anti-rabbit IgG (Sigma) for 1 h at room temperature, followed by two washes with 200 ml PBS-T, and three washes with PBS. The reactions were developed by adding 50 µl per well of o-phenylenediamine (OPD) (1 mg/ml) in citrate phosphate buffer (pH 5.0) plus 1 µl/ml H₂O₂ was added (100 µl per well) for 10 min in the dark, at room temperature. The reaction was stopped by adding a 50 µl volume of 4 M H₂SO₄, and the absorbance was measured at 492 nm. Each ELISA experiment was repeated three times.

Statistical analysis

Differences between average values were tested for significance by performing an unpaired, two-sided Student's t-test [74]. Differences were considered statistically significant when the resulting *p* values were ≤0.05.

Results

In vitro induction of virulent *Leptospira interrogans*

Many efforts have been made to identify and quantify the leptospiral transcriptome and proteome during growth under different conditions. But, so far, little is known about the influence that mammalian host conditions exert over promoter activity. Therefore, we initiated our investigation by studying *ligA* gene transcription and protein expression profiles using *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 grown, for up to 24 h, under a combination of conditions that include the mammalian physiological osmolarity (~300 mosmol–120 mM), temperature (37°C), urine pH (6.7) and the supplementation with spermine, a component belonging to the intracellular environment. We focused our study on the first 24 h of induction, to observe the changes that *L. interrogans* promoters undergo during the early stages of host invasion.

Initially, we evaluated the influence of the different conditions by rt-PCR analysis (Figure 1). It was performed on RNA extracted from both non-induced and induced cultures of the virulent, low-

passage, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130. Low level transcription (*ligA*-based) was detected before induction of the virulent strain, while a clear difference in the abundance of *ligA* transcript could be seen after induction, and between the time intervals. Three time-points were evaluated (1, 12 and 24 h post induction – p.i.) and, interestingly, *ligA* transcription was not constant after induction (Figure 1). Under most conditions, the level of *ligA* transcript was higher than the non-induced control immediately one hour p.i. However, only spermine was able to up-regulate *ligA* for an extended period, up to 12 h p.i., while the other treatments exhibited down-regulation (Figure 1). At 24 h p.i., only the temperature upshift and physiological osmolarity conditions stimulated up-regulation in comparison to the previous time-point (Figure 1).

To examine the effect of the conditions over the expression patterns of native LigA, we cultivated *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 until late-exponential phase before induction. The combination of both temperature upshift and physiological osmolarity promoted induction of protein synthesis (Figure 2A). An up-regulation 4.98-fold higher than the non-induced control was observed at one hour p.i. (*p*<0.01). The influence of spermine was also evaluated in the kinetics assay and stimulated LigA expression above the control levels immediately after induction, one hour p.i. (5.95-fold, *p*<0.01), (Figure 2B). The urine pH condition was simulated by reducing the pH from 7.2 to 6.7 and the highest up-regulation was obtained by this treatment, one hour p.i. (5.92-fold, *p*<0.01), (Figure 2C). But it was the only condition to be followed by decreasing expression levels. The analysis of native LigA expression complemented the results obtained by rt-PCR, although correlation was not always observed between RNA and protein profiles (Figure 1 versus 2).

Prediction of regulatory sequences by Bioinformatics

Previous studies demonstrated that upon induction by physiological osmolarity and temperature shift from 20°C to 37°C and 30°C to 37°C the *lipL41*, *ligA* and *sph2* genes are differentially expressed in *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa strain RM52 and *L. interrogans* serovar Lai strain 56601 [44,46,47,48]. The rationale to select the *PlipL41*, *PligA* and *Psph2* promoters to compose and standardize our study was based on previous studies that characterized them extensively at the RNA and protein levels.

The *PlipL41*, *PligA* and *Psph2* promoters were predicted by bioinformatics based on the analysis of the *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 genome sequence

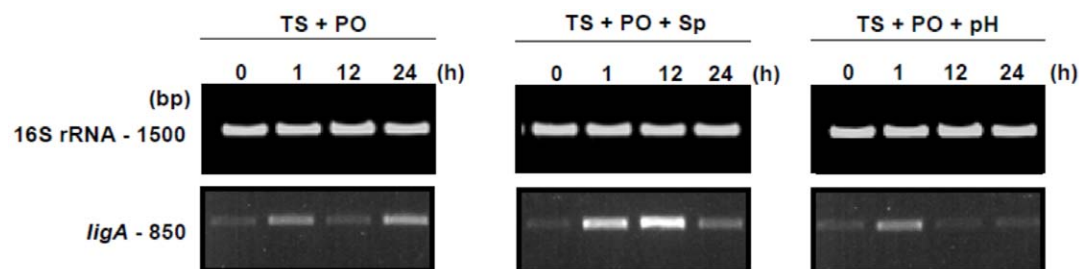


Figure 1. Influence of the *in vitro* conditions on native LigA expression by *L. interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130. The effect of the various combinations of conditions (see Results section) on LigA expression was assessed by rt-PCR. Columns depict the systematic treatments: TS – Temperature upshift from 30°C to 37°C, PO – Physiological osmolarity, Sp – Spermine induction, pH – Urine pH induction. Within each gel the upper and lower bands correspond to the internal PCR control (16S rRNA) and *ligA* cDNA, respectively (domains 10–12). The lanes contain the amplified cDNA per sample time-point, both pre-treatment (0 h) and post induction (1, 12 and 24 h). Agarose gels were stained with GelRed (Invitrogen). No bands were observed in control samples run without template (data not shown). Samples were standardized according to an OD₄₂₀ 0.25. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g001

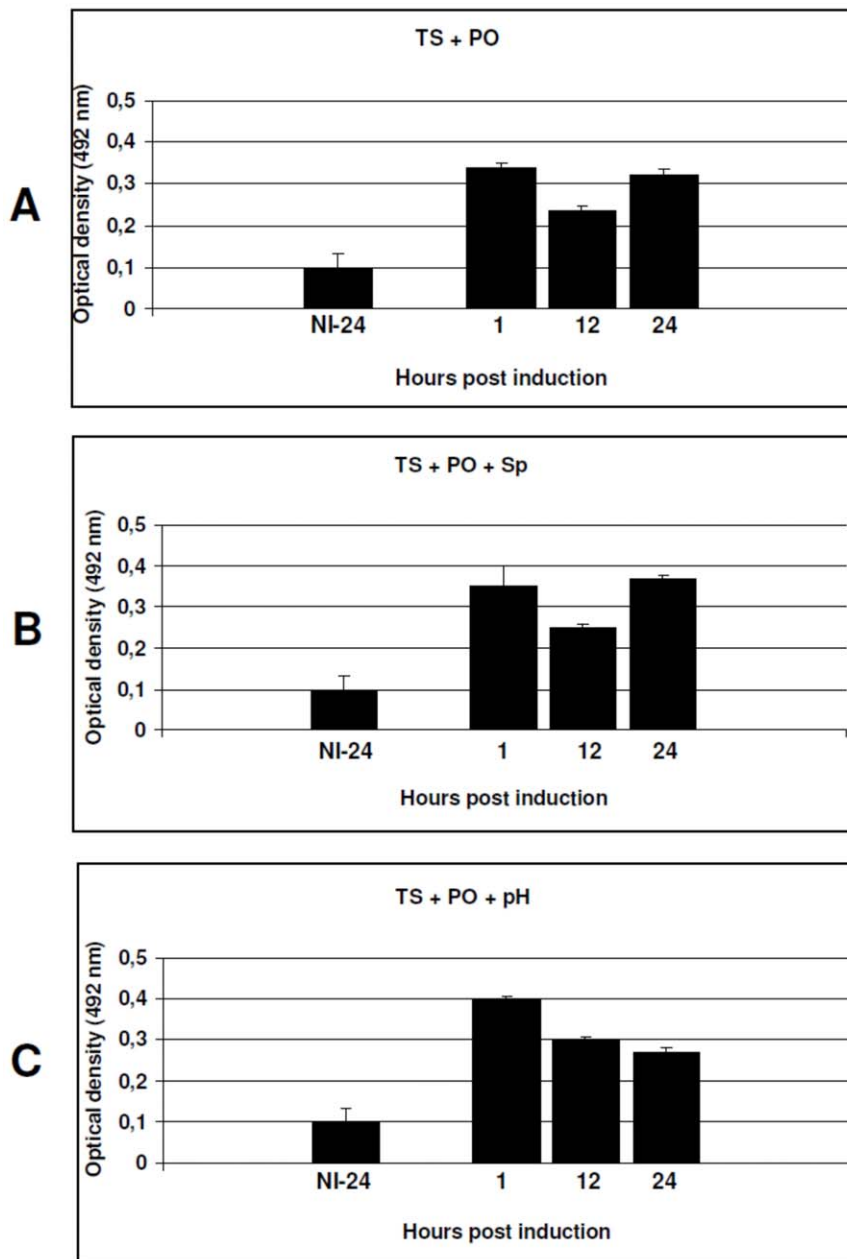


Figure 2. Native protein expression stimulated by the *in vitro* conditions mimicking those of the mammalian host. The expression levels of LigA were evaluated by ELISA, following exposure to the various conditions and combinations: TS – Temperature upshift from 30°C to 37°C, PO – Physiological osmolarity, Sp – Spermine induction, pH – Urine pH induction. (A) Temperature upshift and physiological osmolarity. (B) Temperature upshift, physiological osmolarity and spermine (intracellular level). (C) Temperature upshift, physiological osmolarity and pH reduction from 7.2 to 6.7. A non-induced *L. interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130 (NI-24) was cultivated *in vitro* for 24 h under standard conditions as a control. Protein expression was measured at one, 12 and 24 h post-induction and the results are expressed as mean optical density \pm standard error (bars). The assay was standardized according to an OD₄₂₀ of 0.25. Data from two independent and significant experiments are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g002

(AE016823). Different regions were identified, which are composed of direct and inverted repeats (data not shown).

To examine whether the computationally determined sequences comprise leptospiral regulatory elements, we fused the DNA segments to a promoterless *gfp* reporter. Both elements were subsequently cloned into an *E. coli*-*L. biflexa* shuttle vector depicted in Table 1, yielding the plasmids pSLe94/*PlipL41/gfp*, pSLe94/*PligA/gfp* and pSLe94/*PspH2/gfp* (Table 1). To ensure the accurate inclusion of the DNA sequences containing the regulatory elements in the study, we designed primers to amplify 300 bp

upstream of the first ATG of *lipL41* and *ligA*, and 600 bp upstream of *sph2*. The larger length of the amplified fragment upstream of *sph2* was adopted to include possible distal elements that may play a role in the activity of the *PspH2* promoter, since the intergenic space to the next ORF, LIC12630 (hypothetical protein), is 650 bp. In the case of the *lipL41* and *ligA* genes the intergenic spaces are 114 bp and 456 bp, respectively. The plasmid constructs were used to transform *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc I and generated the reporter strains P41G (*lipL41* promoter), PAG (*ligA* promoter) and P2G (*sph2* promoter), which were

induced for production of fluorescence by the green fluorescent protein (GFP).

Application of promoter-probe vectors in *L. biflexa*

A series of replicating promoter-probe vectors utilizing *gfp* were constructed to examine changes in promoter activity in response to a set of defined conditions (Table 1). The constructs were based on the low-copy number shuttle-vector pSLe94 (Table 1), which contains the LE1 origin of replication that is capable of replication within saprophytic *Leptospira* spp. To validate the usefulness of these vectors as genetic tools to investigate promoter regulation, transcriptional fusions were constructed including the promoters from the well-characterized genes *lipL41*, *ligA* and *sph2* of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1-130. GFP reporter strains were established by electroporation of the promoter-specific reporter vectors into *L. biflexa*. The effectiveness of the reporter strains for assaying transcriptional activity was assessed quantitatively.

All three reporter strains of *L. biflexa* were initially cultivated on EMJH agar plates, at 30°C, and then transferred to liquid EMJH, both containing low-salt concentration (70 mosmol per liter NaCl – 28 mM). When cultures reached the late-exponential phase they were aliquoted and either adjusted to 120 mM NaCl or temperature-upshifted from 30°C to 37°C. Quantitative assessment of fluorescence showed that, under physiological osmolarity conditions, the highest promoter activity was detected in the PAG reporter strain, compared to the control, $p < 0.01$ (Figure 3). The *PligA* promoter was induced in the presence of 120 mM NaCl and the fluorescence reached the highest level 3 hours p.i. The average intensity at this time-point was 1.48-fold higher than the non-induced control (Figure 3B). Neither the *PlipL41* nor *Psph2* promoters were significantly induced (Figure 3A and 3C). Of note, there were no obvious differences between the growth curves of the wild-type and the reporter strains of *L. biflexa*, suggesting that the GFP expression did not cause any disadvantage to the host strain (data not shown).

The influence of the temperature upshift, from 30°C to 37°C, on promoter activity was also assessed. The levels of fluorescence produced by the P41G, PAG and P2G reporter strains were significantly higher than the non-induced controls ($p < 0.01$). The *PlipL41* and *Psph2* promoters reached their maximum activity 3 hours p.i. (Figure 4A and 4C). At this time point there was significant ($p < 0.01$) up-regulation of 1.46-fold and 1.26-fold, respectively. The P41G reporter strain exhibited the highest promoter activity, under this condition, followed by P2G. *PligA* promoter activity was most influenced, with expression 1.50-fold higher than the non-induced control, $p < 0.01$. Interestingly, *PligA* and *Psph2* activities remained constant during the assay conditions (Figure 4B and 4C). The induction of *PlipL41* and *Psph2* by the temperature upshift led to production of fluorescence levels significantly higher than those induced under conditions of physiological osmolarity, $p < 0.05$ (Figure 3A versus 4A and 3C versus 4C), while the *PligA* activity induced by the temperature upshift did not differ from that observed by salt supplementation, at most of the time-points investigated (Figure 3B versus 4B).

Effect of the combination of environmental signals on *L. interrogans* promoter activity

To identify promoters that are differentially induced in response to a combination of conditions, we performed systematic experiments with different, overlapping, stimuli. Subcultures were initially induced under conditions of physiological osmolarity and normal human body core temperature (37°C). The average fluorescence intensity produced by the reporter strains was highly

significant when compared to the non-induced controls, $p < 0.01$. For P41G, the highest promoter activity was observed 3 hours p.i. (1.54-fold), and remained constant throughout the assay (Figure 5A). Both *PligA* and *Psph2* were induced to the highest levels 1 hour p.i., 2.59-fold and 1.62, respectively ($p < 0.01$). However, they did not maintain a constant activity during the assay (Figure 5B and 5C). Additionally, *PlipL41* was induced to a similar extent by the temperature upshift and the combination of physiological osmolarity and temperature (Figure 4A versus 5A). *PligA* and *Psph2* were significantly induced, 1.74-fold and 1.57-fold, respectively (Figure 3B versus 5B and 3C versus 5C), and 1.73-fold and 1.28-fold, respectively (Figure 4B versus 5B and 4C versus 5C), compared to the single-condition treatments (physiological osmolarity or temperature upshift versus their combination).

The results indicate these promoters were preferentially active, *in vitro*, when *L. biflexa* was cultured under conditions emulating the mammalian host environment. Thus, we decided to evaluate another combination of conditions, the effect of the urine pH plus the physiological osmolarity and the temperature upshift. The reporter strains were sub-cultured into EMJH medium supplemented with 120 mM NaCl, pH 6.7, and shifted from 30°C to 37°C. This resulted in the activation of all promoters as seen by increasing levels of fluorescence. The results from three independent experiments are shown in Figure 6. The *PligA* promoter was the most affected, reaching an activity 2.08-fold higher than the non-induced control (3 hours p.i.), followed by *Psph2* (1.96-fold) and *PLipL41* (1.58-fold), both at 24 hours p.i., $p < 0.01$ (Figure 6). Curiously, we observed that both *PligA* and *PlipL41* were slightly less stimulated by the combination that included pH 6.7 than that including salt and temperature only ($p < 0.05$) (Figure 5A versus 6A and 5B versus 6B).

Previous studies have demonstrated that several bacteria undergo translational regulation in response to spermine [75]. This polyamine is only produced by eukaryotic cells, it can reach millimolar levels within them [76], and it has significant effects on various cellular processes in liver, kidney and brain cells and in lymphocytes [76,77,78,79,80,81,82]. Here, we investigated whether spermine contributed to *L. interrogans* promoter regulation. The *L. biflexa* reporter strains were grown at 30°C until late-exponential phase and then supplemented with 200 μ M spermine, 120 mM NaCl and upshifted to 37°C. The *ligA* promoter was the most affected, the PAG reporter strain produced a fluorescence level 2.74-fold higher than the non-induced control (3 hours p.i.), followed by P2G (2.12-fold) and P41G (1.58-fold), both 24 hours p.i., $p < 0.01$ (Figure 7). However, *ligA* promoter activity was not maintained, the average fluorescence decreased to 1.72-fold (24 hours p.i.), demonstrating that *PligA* is transiently induced by spermine (Figure 7B). The spermine-induced activity of both *PligA* and *Psph2* promoters was the highest observed in this study (Figure 7B and 7C).

In agreement with the native LigA expression pattern, the fluorescence produced by the PAG reporter strain reached the highest (4.98-fold versus 2.59-fold) and lowest (2.19-fold versus 2.13-fold) levels at one and 12 hours p.i., respectively, when induced by the combination of physiological osmolarity and temperature upshift (Figure 2A versus 5B and Table 2), while the LigA expression pattern induced by spermine was different from the fluorescence intensity produced by the PAG reporter strain (Figure 2B versus 7B). Finally, induction by pH 6.7 led to LigA expression that was consistent with the fluorescence levels produced by the PAG reporter strain (Figure 2C versus 6B and Table 2). Protein and fluorescence levels were highest one hour p.i., but the amount of native LigA decreased significantly (from 5.95-fold to 4.04-fold), while the fluorescence level produced by

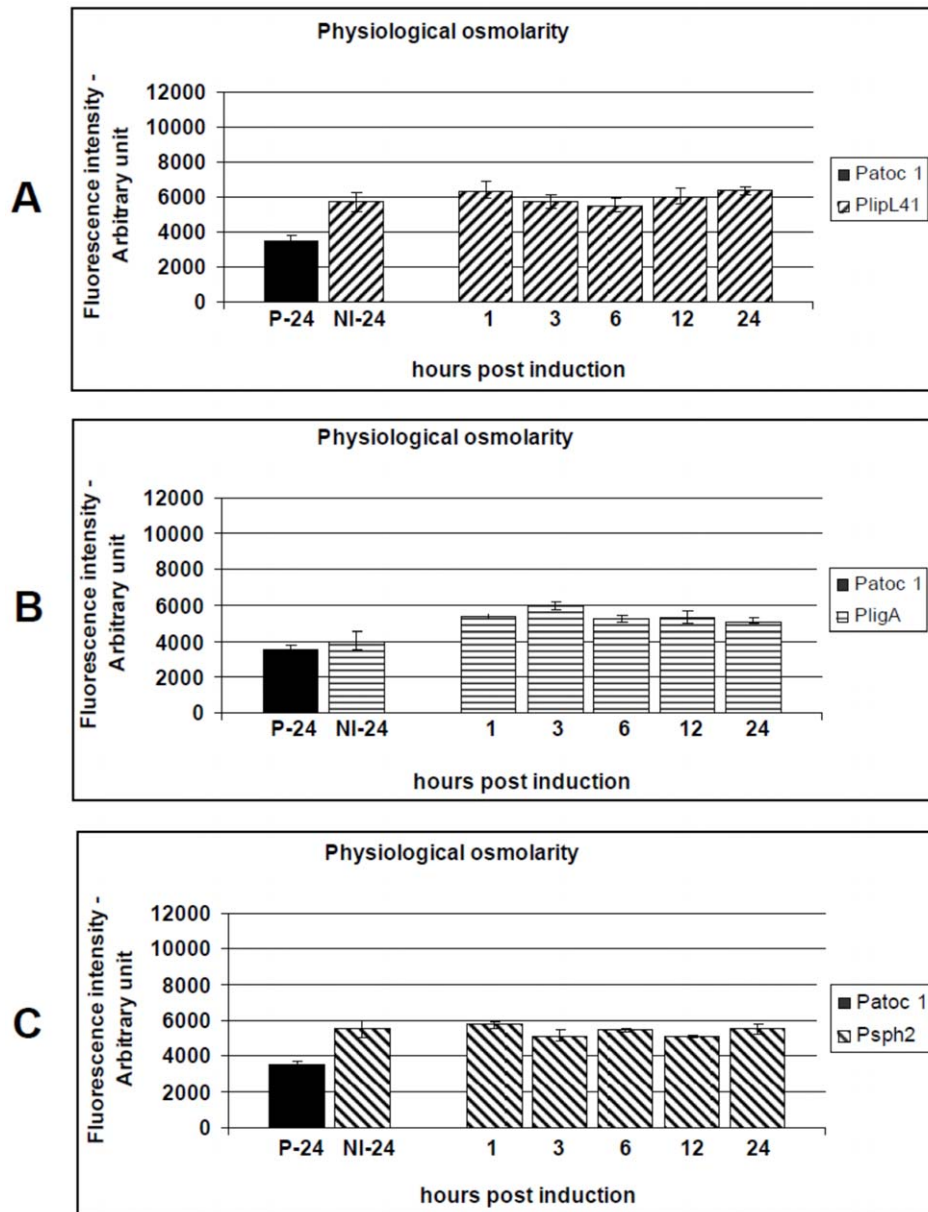


Figure 3. Kinetics of GFP production by the *L. biflexa* reporter strains (P41G, PAG and P2G) following induction by NaCl to a physiological level. Cultures of the reporter strains containing a single-copy transcriptional reporter and either the wild-type *lipL41* (A), *ligA* (B) or *spH2* (C) promoter regions were induced with ~300 mosmol NaCl (physiological level). An induced non-transformed *L. biflexa* serovar Patoc str. Patoc 1 (P-24) was induced for 24 h as a control. The uninduced reporter strains (NI-24) were included as additional controls. Transcriptional activity was presented as the mean \pm standard error (bars). Fluorescence levels from triplicate samples of each culture were standardized according to an OD₄₂₀ 0.5 and are expressed as arbitrary fluorescence units. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g003

the PAG reporter strain remained constant (from 2.07-fold to 2.03-fold). The results obtained in this study, by the use of the promoter-probe methodology described, allowed us to establish a cut-off based on the determined fluorescence levels (Table 2). This information will be useful to support the future prediction of virulence factors as we are currently developing a follow-up study employing several other promoter sequences to construct a library of knock-in mutants.

The ability of the promoter-probe system to allow for the differentiation between both non-induced and induced reporter strains suggests that the *gfp* regulation can be employed to accurately mimic the behaviour of the native genes. This is

corroborated by similarities observed between the expression patterns of native LigA and the fluorescence levels produced by the PAG reporter strain, in comparison to the non-induced controls (Table 2). Qualitative assessment of these reporter strains clearly demonstrated the presence of fluorescent leptospires upon induction *in vitro* (Figure 8).

To further substantiate the data obtained by the use of the promoter-probe vectors, rt-PCR analysis was performed on RNA extracted from non-induced and induced cultures of the *L. biflexa* reporter strains (Figure 9). As expected, low level of transcripts (*gfp*-based) were detected before induction of the reporter strains. Three time-points were evaluated, 1, 3 or 6 and 24 h p.i., but only

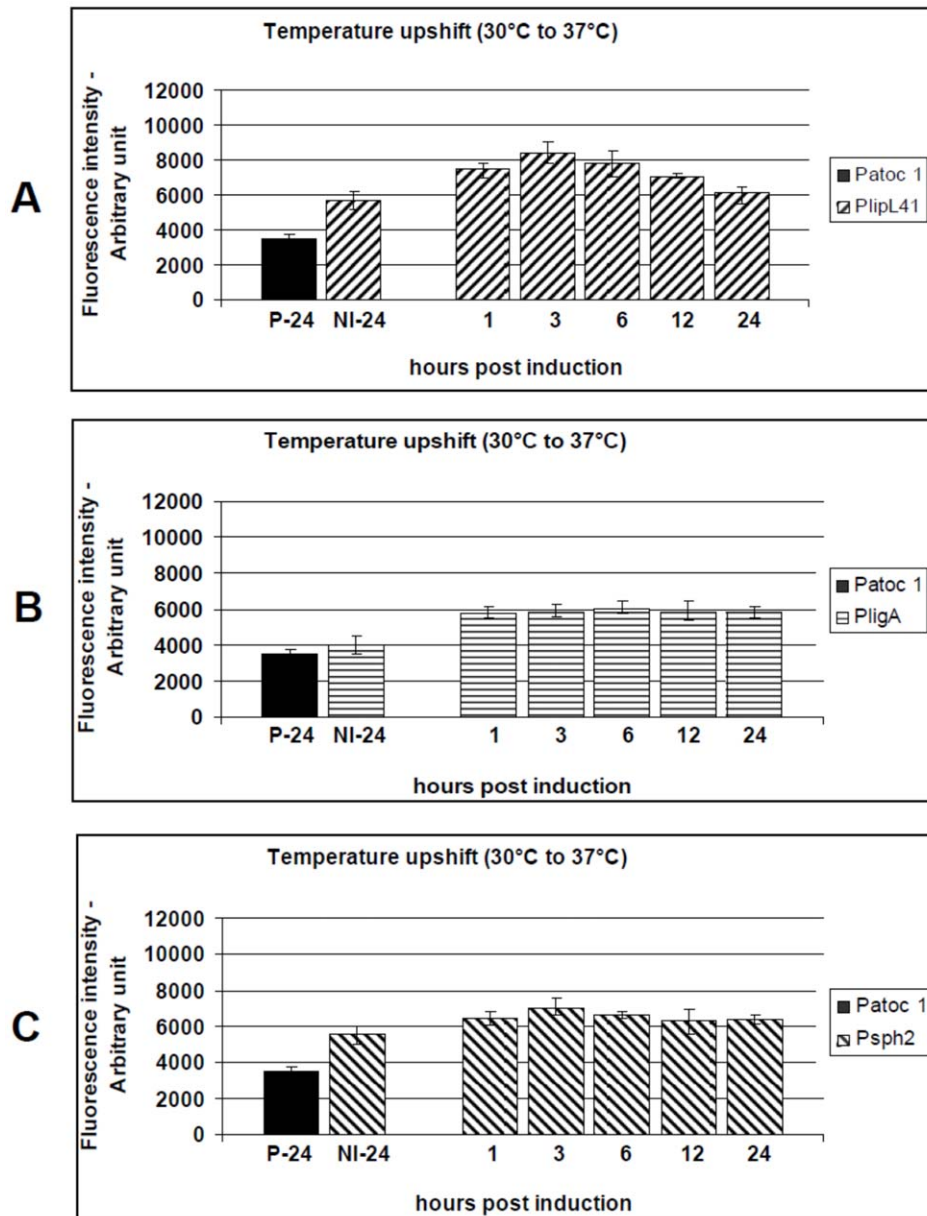


Figure 4. Kinetics of GFP production by the *L. biflexa* reporter strains (P41G, PAG and P2G) after a temperature upshift to 37°C. Cultures of the reporter strains P41G (A), PAG (B) or P2G (C) were induced by temperature upshift from 30°C to 37°C (physiological temperature). *L. biflexa* serovar Patoc str. Patoc 1 (P-24) induced for 24 h and uninduced reporter strains grown (NI-24) were included as controls. Transcriptional activity was measured for 24 h and presented as the mean \pm standard error (bars). Fluorescence from triplicate samples of each culture were standardized according to an OD₄₂₀ 0.5 and are expressed as arbitrary fluorescence units. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g004

a slight difference was observed between the time-points for any given *in vitro* treatment, per reporter strain (Figure 9). Despite this, the amount of *gfp* mRNA varied considerably per treatment. Correlation between the fluorescence and transcription levels was not always evident, similarly to the lack of correlation observed during the analysis of the native strain (see Results). In both cases (native and reporter strains) the discrepancy observed between the mRNA and protein levels probably resulted from intrinsic regulatory mechanisms. Although we have no information on the signalling pathways involved, the *L. interrogans* promoters evaluated appear to behave similarly in both species, suggesting conservation of the regulatory mechanisms higher than expected.

The transcription data complement those obtained by fluorescence measurement from the reporter strains, reinforcing the utility of the promoter-probe vectors as a genetic tool to test promoter activity in *L. biflexa*.

Validation of the *L. biflexa* promoter-probe constructs was performed by comparison against the *in vitro*-induced pathogenic strain. In addition to the protein content, we compared the mRNA profiles produced by the wild-type virulent *L. interrogans* and the PAG reporter strain. Side-by-side analysis of two time-points (1 and 24 h p.i.) showed that all treatments produced similar patterns of both LigA and GFP expression, the latter being controlled by the native *L. interrogans* *PligA* promoter (Figure 1 versus 9).

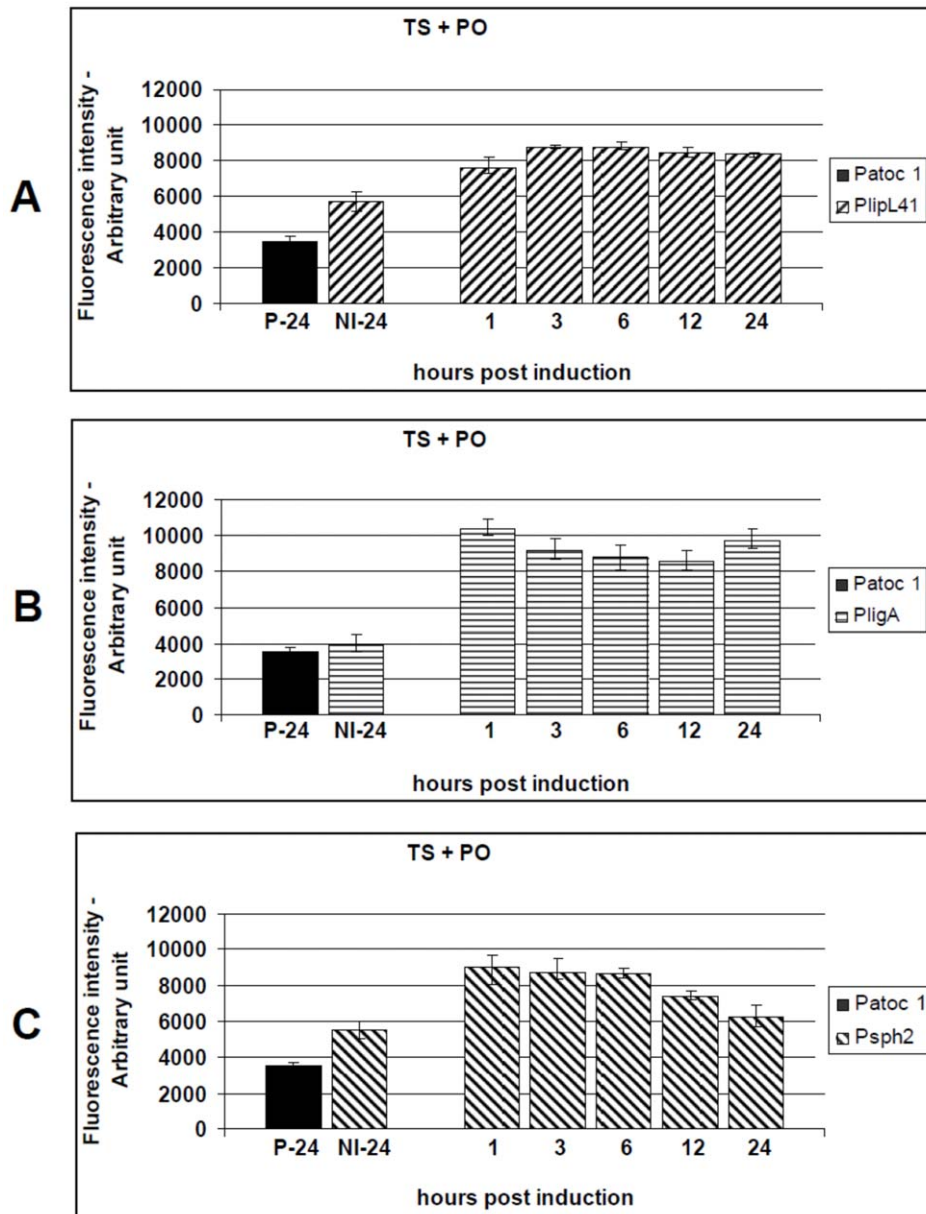


Figure 5. Kinetics of GFP production by the *L. biflexa* reporter strains (P41G, PAG and P2G) after exposure to a combination of physiological salt levels and temperature upshift to 37°C. Cultures of the reporter strains P41G (A), PAG (B) or P2G (C) were stimulated by a combination of physiological osmolarity (PO) and temperature upshift (TS). The induced wild-type strain (P-24) and the uninduced reporter strains (NI-24) were included as controls. Transcriptional activity was measured for 24 h and presented as the mean \pm standard error (bars). Fluorescence from triplicate samples of each culture were standardized according to an OD₄₂₀ 0.5 and are expressed as arbitrary fluorescent units. Data from a representative significant study are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0017409.g005

However, a noticeable difference was observed with respect to the transcript levels produced by the native *ligA* and the *PligA*-controlled *gfp* (Figure 1 versus 9). Of note, up-regulation of the *PligA* was noted despite the treatment (Table 2), therefore validating the use of this promoter-probe methodology as a genetic tool to assess the ability of pathogens promoters to respond host stimuli.

Discussion

In this study we developed and characterized in detail a *L. biflexa* promoter-probe methodology for the analysis of *L. interrogans*

promoters. The three promoters regions used in this study resemble regulatory regions of other bacterial species, based on bioinformatics characterization only (data not shown). Although we did not support *in silico* findings with *in vitro* data we observed that *PlipL41* promoter sequence is similar to the *E. coli* σ 70 promoter, while *PligA* and *PspH2* organization is more distant to it. The identification of different repeats into the promoter regions studied may be suggestive of specific response regulator binding sites. It is possible that the elements through which each promoter senses the changes on environmental cues may be different.

The *lipL41*, *ligA* and *spH2* genes are known to be regulated *in vitro* by physiological conditions [44,46,47,48]. In addition, the *L. interrogans*

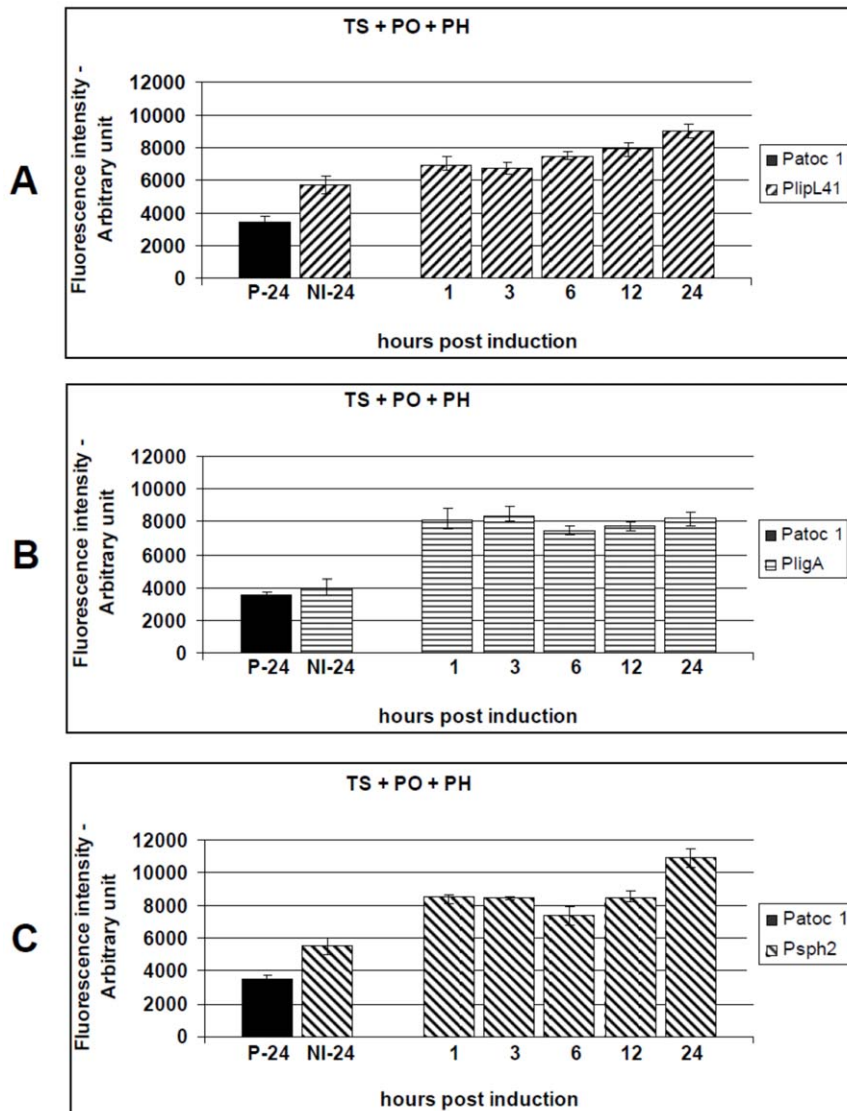


Figure 6. Kinetics of GFP production by the *L. biflexa* reporter strains (P41G, PAG and P2G), after exposure to a combination of physiological salt levels, temperature upshift to 37°C and urine pH 6.7. Cultures of the reporter strains P41G (A), PAG (B) or P2G (C) were induced by a combination of physiological osmolarity (PO), temperature upshift (TS) and pH reduction from 7.2 to 6.7 (PH). The induced wild-type control (P-24) and the uninduced reporter strains (NI-24) were included as controls. Transcriptional activity was measured for 24 h and presented as the mean \pm standard error (bars). Fluorescence from triplicate samples of each culture were standardized according to an OD₄₂₀ 0.5 and are expressed as arbitrary fluorescent units. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g006

transcriptome was evaluated in response to multifactorial conditions, upon exposure to serum [58]. To further substantiate the knowledge of *Leptospira* genetics, P41G, PAG and P2G reporter strains were constructed to contain *gfp* under the conditional control of the aforementioned *L. interrogans* promoters. Analysis of cell extracts harvested from exponentially growing cultures revealed low GFP activity under routine growth conditions, while variable activity was observed post-induction. In agreement to previous findings obtained by transcriptomics, our data demonstrate the sensitivity of leptospiral promoters under the various conditions evaluated.

ligA is a paralog of *ligB*, and originated by duplication events of the first ten immunoglobulin-like domains [83], consequently both are expected to respond to host stimuli through similar mechanisms. Both proteins seem to contribute to the pathogenesis of *Leptospira* spp. as important adhesins [84,85,86]. In addition,

spectral counts of both proteins by a mass-spectrometry-based strategy revealed that both LigA and LigB are present in 553 and 914 copies per cell, respectively [87]. Recently, Lo and colleagues were not able to detect LigB among *L. interrogans* serovar Lai samples shifted from environmental to human body temperature (37°C), demonstrating that temperature upshift alone may be insufficient for induction of expression of Lig proteins [88]. Likewise, in our study, the *PligA* promoter activity was only weakly detected during non-induced and single-condition induced PAG cells. However, fluorescence was more than doubled after induction by combinations of stimuli (Figure 5B–7B). The same was observed for the expression of native LigA by *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (Figure 2).

Sph2 is expressed under routine *in vitro* conditions and temperature upshift to 37°C [87,88,89]. At the mRNA level, it

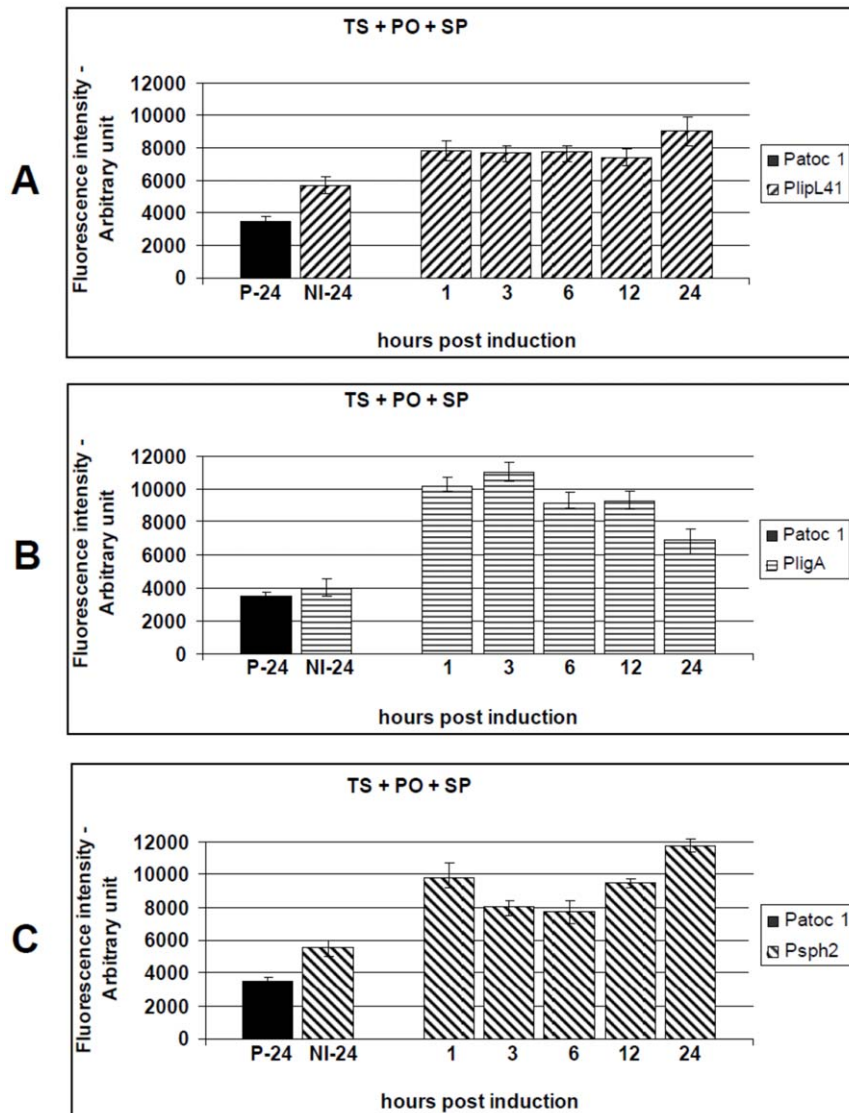


Figure 7. Kinetics of GFP production by the *L. biflexa* reporter strains (P41G, PAG and P2G), after exposure to a combination of physiological salt levels, temperature upshift to 37°C and supplementation with spermine. Cultures of the reporter strains P41G (A), PAG (B) or P2G (C) were induced by a combination of physiological osmolarity (PO), temperature upshift (TS) and 200 μ M spermine (intracellular level) (SP). The induced wild-type control (P-24) and the uninduced reporter strains (NI-24) were included as controls. Transcriptional activity was measured for 24 h and presented as the mean \pm standard error (bars). Fluorescence from triplicate samples of each culture were standardized according to an OD₄₂₀ 0.5 and are expressed as arbitrary fluorescent units. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g007

is up-regulated by physiological osmolarity [47] and temperature [46]. In our study, we corroborated these findings with the observation of low levels of fluorescence in the non-induced P2G reporter strain and elevated levels of *Psph2* promoter activity after induction by the combination of different mammalian host conditions (Figures 5C, 6, 7C). These findings suggest the mammalian host conditions may have contributed to this effect and reinforces the hypothesis that the *spH2* gene is likely to be regulated at post-transcriptional level.

Interestingly, we observed LigA down-regulation when *L. interrogans* serovar Copenhageni was cultivated at pH 6.7 (Figure 2C). This is in agreement with previous findings that leptospiral antigens are down-regulated when leptospirae are excreted in the urine [90]. Of note, this was not observed during fluorescence analysis (Figure 6). This suggests that specific response

regulators may be triggered in the parental pathogenic strain, during renal colonization and/or urine shedding. In general, the activity of the *PlipL41* promoter was not, or only weakly, influenced under the various conditions studied (Figure 3A–7A), and this is consistent with previous observations [59,88,91,92]. In contrast to the study of Nally and colleagues [93] that observed LipL41 downregulation upon experimental infection, *PlipL41* promoter activity was not reduced when the P41G reporter strain was cultivated under the majority of the conditions analysed (Figure 3A–7A). This suggests that the reduction of LipL41 expression in guinea pig-recovered *L. interrogans* may be due to post translational regulation, and may involve complex regulation systems such as host cell contact, protein degradation, and energy metabolism.

Of note, the *PlipL41* promoter was initially selected as a constitutive promoter. However, we noted that this promoter was

Table 2. Comparison among top fluorescence intensities and protein expression levels reached by the strains in study.

Treatments	Reporter strain		
	P41G	PAG	P2G
Physiological osmolarity	1.11	1.48	1.03
Temperature upshift to 37°C	1.46	1.50	1.26
Physiological osmolarity/Temperature upshift	1.54	2.59*	1.62
Physiological osmolarity/Temperature upshift/pH 6.7	1.58	2.08*	1.96†
Physiological osmolarity/Temperature upshift/Spermine	1.58	2.74*	2.12*
	Native protein		
		LigA	
Native protein - Physiological osmolarity/Temperature upshift	NA	4.98*‡	NA
Native protein - Physiological osmolarity/Temperature upshift/pH 6.7	NA	5.92*‡	NA
Native protein - Physiological osmolarity/Temperature upshift/Spermine	NA	5.95*‡	NA

*Corresponds to signal intensity at least 2-fold higher than that observed for the non-induced control.

†Corresponds to the border line of 2-fold higher signal intensity, compared to the non-induced control.

NA - Not applicable.

‡Relative to the parental virulent strain, *L. interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130 strain.

doi:10.1371/journal.pone.0017409.t002

also up-regulated at some of the selected time-points. An ideal constitutive gene should exhibit constant activity independently to the cell state or environmental conditions. However, constitutive expression may not be related to constant promoter activity. Moreover, expression levels of constitutive genes such as the flagellin or the ribosomal RNA synthesis genes, have been shown to be altered by temperature-shift or ciprofloxacin supplementation [87,88]. *PlpL41* promoter activity was not always induced under the *in vitro* conditions. In addition, its activity was below the cut-off level (2-fold) established in this work for virulence factor promoters (Table 2). This lead us to believe that the P41G reporter strain may serve as a negative control in the identification of novel virulence factors.

Although *L. interrogans* is a pathogen known to infect the mammalian host through active penetration, there is uncertainty over the existence of an intracellular phase during this process. In this study, we demonstrated that spermine, a polyamine found in abundance in eukaryotic cells [76] alters *L. interrogans* promoters activity. Previous studies showed leptospiral survival and replication within human macrophages, a spermine-rich eukaryotic cell [94]. We observed that supplementation of reporter strain cultures with spermine was able to stimulate promoter activity. In addition, we present evidence that similar transcriptional and translational changes occurred during induction of the native proteins, supporting the hypothesis that pathogenic *Leptospira* spp. can recognize polyamines as a signal of the intracellular environment. Polyamine recognition is likely a component of a sophisticated system that integrates multiple environmental signals and regulates gene expression in intracellular bacteria, i.e. *Francisella* [95,96,97], and biofilm formation in *Vibrio* spp. and *Yersinia* spp. [77,78]. As polyamines in the intracellular environment are likely to reach elevated levels, our findings on promoter regulation by spermine may be relevant bacterial pathogenesis in general.

It is not known what controls *ligA* or *sph2* transcription initiation. However, previous studies have shown that both genes are up-regulated by physiological osmolarity [44,47,48] and temperature [46]. Also, recent work presented evidence of a functional redundancy between LigA and LigB [52]. The finding that the *PligA* promoter is active under different *in vitro* conditions, which

simulate the mammalian host environment, raises the hypothesis that *ligA* absence from several pathogenic serovars is likely to be due to spontaneous deleterious events that may have occurred inside or outside the mammalian host environment [83,98], without any influence on virulence or pathogenicity. Since most of the conditions studied induced constant activity of *PligA in vitro* (Figure 3B–6B), it is possible that LigA may contribute to the early stages in the course of leptospirosis. The kinetics of native LigA expression also supports this hypothesis, although protein levels did vary (Figure 2).

We found that native LigA was up-regulated upon induction by the combined conditions of physiological osmolarity, temperature upshift to 37°C and spermine, with a 5.95-fold increase. The corresponding reporter strain, PAG, was up-regulated by the same treatment (2.74-fold), demonstrating a good correlation between the promoter-probe methodology and native protein expression in *L. interrogans*, suggesting that LigA is post-transcriptionally regulated (Table 2). This also suggests that *L. interrogans* protein expression may involve particular mechanisms or pathways to respond to specific host stimuli. The overall up-regulation of native LigA observed in comparison to the non-induced control was in agreement with the induction of the *L. biflexa* PAG reporter strain. Our results are in concordance with previous studies whereby the *lig* genes were expressed *in vitro* at both transcript and proteins levels [99], although a previous study using an *L. interrogans* serovar Pomona type Kennewicki strain was only able to detect the *lig* genes at the transcript level, [100]. We believe that these differences may be due to the different strains used. Moreover, *ligB* a paralogous gene to *ligA*, was up-regulated by an overnight temperature upshift from 30°C to 37°C (1.7-fold). Yet, physiological osmolarity stimulated *ligA* and *ligB* up-regulation (4.41 to 5.27-fold – based on the transcriptional signals employing oligonucleotides to both the *ligA/ligB* identical region and the *ligB* unique region, respectively) [46,48]. Additionally, a recent study evaluated the influence of serum on *ligB* up-regulation (1.89-fold) [58]. Although we did not quantify the transcription of the *ligA* gene, a clear variation was observed in comparison to the non-induced controls, which is in agreement with previous findings (Figure 1). This reinforces the applicability of the promoter-probe vectors to

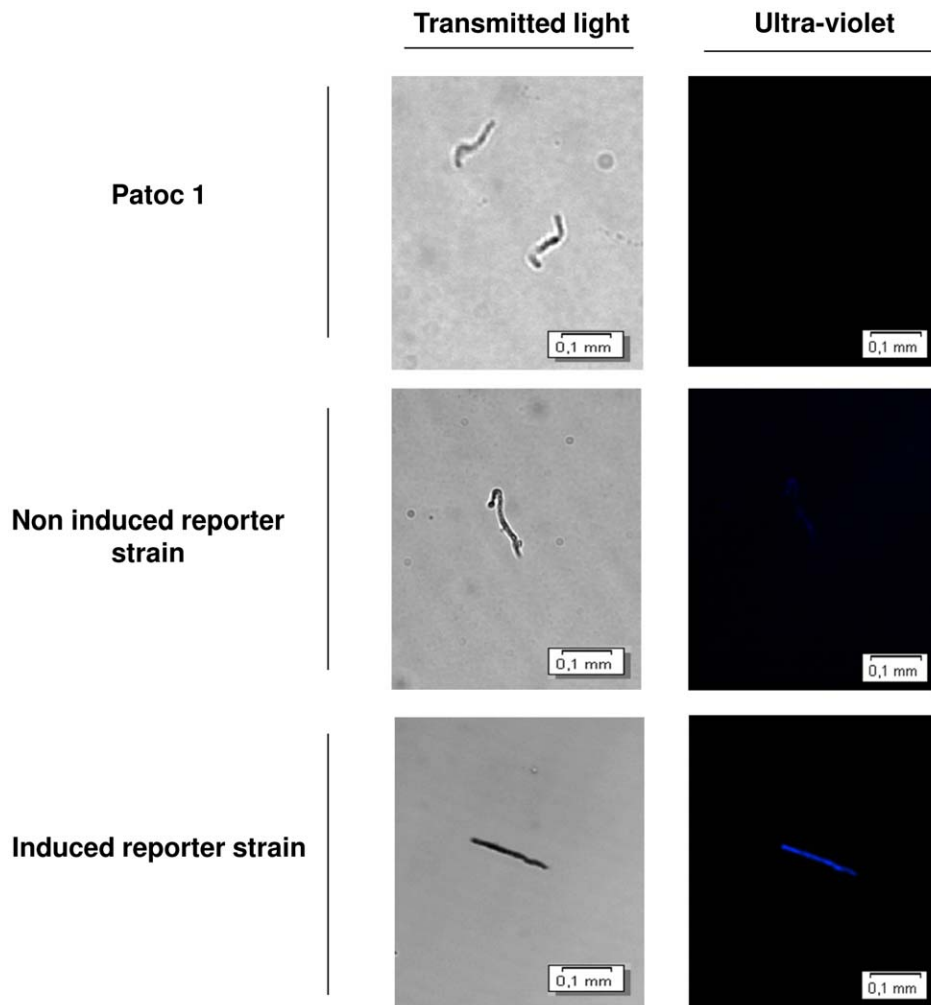


Figure 8. Inducible expression of GFP in the *L. biflexa* promoter-probe constructs. Microscope images of the *in vitro* induced and uninduced P2G reporter strain transformed with pSLe94-*sph2* promoter-*gfp* vector. Uninduced and physiological osmolarity/temperature upshift/spermine exposed leptospires were fixed and visualized by phase contrast and by GFP fluorescence. Wild-type *L. biflexa* str. Patoc 1 was used as the negative control.

doi:10.1371/journal.pone.0017409.g008

assess promoter activity in *L. biflexa*. Based on these results, we conclude that (i) the combination of the *in vitro* conditions reliably simulated the host environment, (ii) *L. biflexa* can be used as a model to characterize *L. interrogans* promoters and (iii) this promoter-probe methodology may be helpful in the prediction of potential virulence factors of pathogenic *Leptospira* spp. Furthermore, previous studies showed *ligA* gene up-regulation shortly after temperature upshift [46,88], thus reinforcing the hypothesis that LigA may contribute to the early stages of infection and host adaptation. In addition, the *Psph2* promoter was up-regulated in the presence of spermine (2.12-fold).

We observed some conflicting evidence in the correlation between native *ligA* mRNA and LigA abundance levels (Figure 1 versus 2), similar to previous studies [88,101,102,103,104]. As previously suggested by Lo and colleagues [88], it is possible that the lack of correlation might be due to the longer half-life, greater stability or post transcriptional regulation of the mRNA transcript, i.e. as a result of the activity of small non-coding RNAs. Native LigA was detected at very low levels in the non-induced *L. interrogans* cells, while a significant up-regulation, at similar rates to recent studies [48], was observed when leptospires were grown

under mammalian host conditions. In light of this information, we may conclude that the expression of both LigA and Sph2 is likely to be regulated at the post-transcriptional level.

Despite advances in the development of genetic tools for *Leptospira* spp. some basic questions remain unanswered. It is still unclear what regulators and pathways are associated with the expression of virulence factors. The level at which members of a given regulatory cascade exert induction/repression of transcription of LigA, Sph2 and other virulence factors is unknown. In this study we demonstrate that *L. biflexa* can serve as a model to study the genetics of *L. interrogans*. The pathogen-derived promoters exhibited activity in the *L. biflexa*, suggesting the existence of shared regulatory mechanisms among the saprophytes and pathogenic *Leptospira* spp. In addition, the establishment of a cut-off based on the promoter activity of virulence and non-virulence factors (Table 2), and the different fluorescence levels expressed by the reporter strains upon induction eliminated the possibility that the effects were simply due to stress responses. Furthermore, the suite of promoter-probe vectors developed in this study can be modified to make diverse translational fusions to investigate protein expression patterns

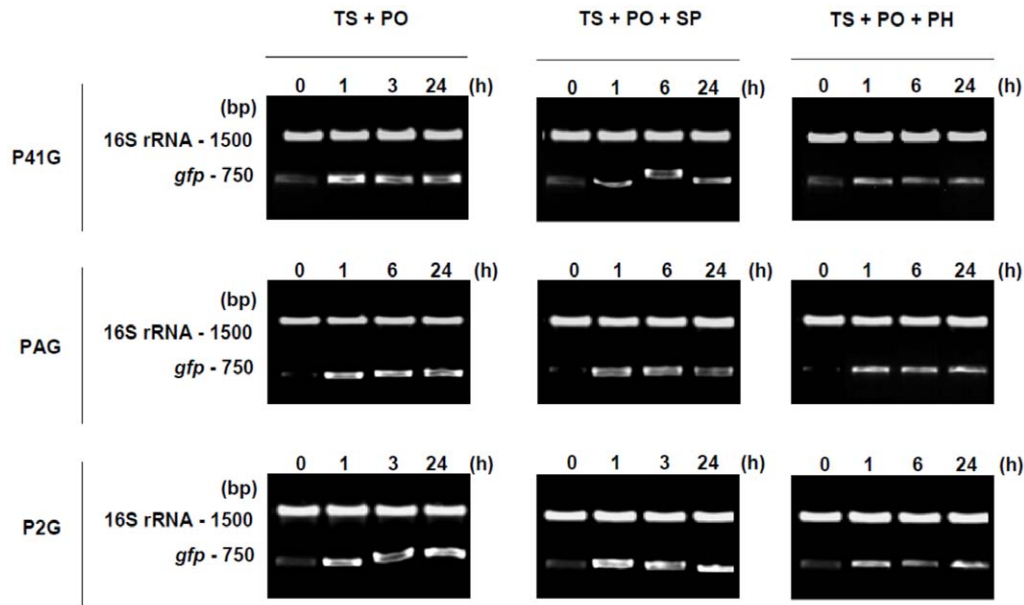


Figure 9. Influence of the *in vitro* conditions on *gfp* expression of the reporter strains. The effect of each of the combinations of conditions on promoter activity was assessed by the level of *gfp* mRNA produced. Rows depict the reporter strains in this study, while columns show the various conditions used: TS – Temperature upshift from 30°C to 37°C; PO – Physiological osmolarity; SP – Spermine induction; PH – Urine pH induction. Within each lane, the upper band represents the internal PCR control (16S rRNA) and the lower band corresponds to the *gfp* cDNA amplified by rt-PCR. The lanes in each gel contain the amplified cDNA per time-point, both pretreatment (0 h) and post induction (1, 3 or 6 and 24 h). Agarose gels were stained with GelRed (Invitrogen). No bands were observed in control samples run without template (data not shown). Samples were standardized according to an OD₄₂₀ 0.25. Data from a representative significant study are shown. doi:10.1371/journal.pone.0017409.g009

and complex regulatory networks involved in leptospiral protein regulation.

In conclusion, this study demonstrates the potential of a novel genetic tool for the identification and characterization of virulence factors of *Leptospira* spp. Our transcription and expression findings suggest that a combination of *in vitro* signals may be important to accurately simulate the host environment. We expect to provide further information towards understanding *Leptospira* spp. genetics and that will eventually serve as a basis for further studies. The understanding of the extent to which leptospiral promoters are regulated by mammalian host conditions, as well as the expression kinetics, may reveal useful information about the biology of *Leptospira* spp. A knock-in mutant library of different promoters is currently under construction with this in mind.

References

- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, et al. (2005) Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 40: 343–351.
- Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, et al. (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 505–508.
- Cerqueira GM, Picardeau M (2009) A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9: 760–768.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne: MedScience.
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, et al. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422: 888–893.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, et al. (2004) Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 186: 2164–2172.
- Bulach DM, Zuermer RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, et al. (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14560–14565.
- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuermer RL, Zidane N, et al. (2008) Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 3: e1607.
- World Health Organization (2003) Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Malta.
- Levett PN (2003) Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36: 447–452.
- Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, et al. (2003) Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 41: 803–809.
- Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, et al. (2002) Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 40: 1464–1469.
- Smits HL, Ananyina YV, Chereshsky A, Dancel L, Lai AFRF, et al. (1999) International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol* 37: 2904–2909.

Acknowledgments

We thank Dr. Marilene Demasi, Dr. Hugo A. Armelin and Dr. Toshie Kawano for their support with fluorescence and microscopy facilities, and Alexander Seixas de Souza, Ivan N. Avino and Bogar O. A. Montoya for technical assistance with the experiments. We are also grateful to Dr. Mathieu Picardeau, Dr. Justin D. Radolf and Dr. Alan J. A. McBride for helpful comments and critical reviews of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GMC ALTON. Performed the experiments: GMC NMS ERA ATB ZMM. Analyzed the data: GMC ALTON. Contributed reagents/materials/analysis tools: GMC SAV ALTON. Wrote the paper: GMC SAV ALTON.

17. Smits HL, Hartskeerl RA, Terpstra WJ (2000) International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. *Trop Med Int Health* 5: 124–128.
18. Smits HL, Chee HD, Eapen CK, Kuriakose M, Sugathan S, et al. (2001) Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Trop Med Int Health* 6: 114–118.
19. Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gaseem MH, et al. (2001) Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 166–169.
20. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, et al. (2000) Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 19: 86–94.
21. Bolin CA, Thiermann AB, Handsaker AL, Foley JW (1989) Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. *Am J Vet Res* 50: 161–165.
22. Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, et al. (2007) *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 45: 1528–1534.
23. Oliveira TR, Longhi MT, de Moraes ZM, Romero EC, Blanco RM, et al. (2008) Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1715–1722.
24. Dong H, Hu Y, Xue F, Sun D, Ojcius DM, et al. (2008) Characterization of the *ompL1* gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the *OmpL1* protein. *BMC Microbiol* 8: 223.
25. Lin X, Chen Y, Yan J (2008) Recombinant multi-epitope protein for diagnosis of leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1711–1714.
26. Srimanote P, Wongdechhai N, Jieanampunkul P, Samonkiert S, Lcepiyasakulchai C, et al. (2008) Recombinant ligA for leptospirosis diagnosis and *ligA* among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods* 72: 73–81.
27. Bomfim MR, Ko A, Koury MC (2005) Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* 109: 89–94.
28. Dey S, Mohan CM, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, et al. (2004) Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol* 103: 99–106.
29. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, et al. (1999) Leptospiral outer membrane proteins *OmpL1* and *LipL41* exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 67: 6572–6582.
30. Koizumi N, Watanabe H (2004) Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22: 1545–1552.
31. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, et al. (2005) Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* 73: 4062–4069.
32. Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, et al. (2006) Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun* 74: 1745–1750.
33. Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, et al. (2007) The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 25: 6277–6286.
34. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, Pan MJ, Chang CF, et al. (2009) Leptosome-associated leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those associated with PC-liposomes in a hamster model. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.041>
35. Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Divers TJ, Barr SC, et al. (2009) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect* 11: 230–237.
36. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, Chang YF (2009) *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine* 27: 378–387.
37. Faisal SM, Yan W, Chen CS, Palaniappan RU, McDonough SP, et al. (2008) Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine* 26: 277–287.
38. Chang YF, Chen CS, Palaniappan RU, He H, McDonough SP, et al. (2007) Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine* 25: 8190–8197.
39. Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Chang CF, Pan MJ, et al. Identification and characterization of *OmpA*-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine* 28: 2277–2283.
40. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, Chang CF, Pan MJ, et al. (2009) Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. *Vaccine* 27: 6537–6545.
41. Faisal SM, Yan W, McDonough SP, Mohammed HO, Divers TJ, et al. (2009) Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 27: 6129–6136.
42. Bourhy P, Louvel H, Saint GI, Picardeau M (2005) Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *Journal of Bacteriology* 187: 3255–3258.
43. Aviat F, Slamti L, Cerqueira GM, Lourdault K, Picardeau M (2010) Expanding the Genetic Toolbox for *Leptospira* Species by Generation of Fluorescent Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 76: 8135–8142.
44. Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA (2005) Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun* 73: 70–78.
45. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, et al. (2006) A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* 74: 6356–6364.
46. Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, et al. (2006) Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun* 74: 5848–5859.
47. Matsunaga J, Medeiros MA, Sanchez Y, Werneck KF, Ko AI (2007) Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. *Microbiology* 153: 3390–3398.
48. Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, et al. (2007) Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect Immun* 75: 2864–2874.
49. Atzingen MV, Barbosa AS, De Brito T, Vasconcelos SA, de Moraes ZM, et al. (2008) Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol* 8: 70.
50. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, et al. (2007) The *OmpA*-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* 3: e97.
51. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, et al. (2007) *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2: e1188.
52. Croda J, Figueira CP, Wunder EA, Jr., Santos CS, Reis MG, et al. (2008) Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 76: 5826–5833.
53. Murray GL, Srikram A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan RW, et al. (2009) *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect* 11: 311–314.
54. Murray GL, Srikram A, Hoke DE, Wunder EA, Jr., Henry R, et al. (2009) Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 77: 952–958.
55. Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikram A, et al. (2009) Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 77: 810–816.
56. Murray GL, Ellis KM, Lo M, Adler B (2008) *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect* 10: 791–797.
57. Xue F, Dong H, Wu J, Wu Z, Hu W, et al. (2010) Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e857.
58. Patarakul K, Lo M, Adler B (2010) Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiol* 10.
59. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B (2002) Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 70: 2311–2318.
60. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, et al. (1998) Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 66: 1579–1587.
61. Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, et al. (2002) Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 70: 323–334.
62. Nally JE, Artiushin S, Timoney JF (2001) Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 69: 7616–7624.
63. Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Waggar EA, et al. (1999) Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 67: 853–861.
64. Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 736–747.
65. Ellinghausen HC, Jr., McCullough WG (1965) Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res* 26: 45–51.
66. Johnson RC, Harris VG (1967) Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 94: 27–31.
67. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, et al. (2006) MaGe—a microbial genome annotation system supported by synteny result. *Nucleic Acids Research* 34: 13.
68. Reese MG (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computational Chemistry* 26: 6.
69. Matys V, Fricke E, Geffers R, Gossling E, Haubrock M, et al. (2003) TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucl Acids Res* 31: 5.

70. Studholme DJ, Dixon R (2003) Domain architectures of sigma 54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* 185: 11.
71. Girons IS, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, et al. (2000) The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* 182: 5700–5705.
72. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 7.
73. Matsunaga J, Wernick K, Zuerner RL, Frank A, Haake DA (2006) LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. *Microbiology* 152: 3777–3786.
74. GraphPad Software. Available: <http://www.graphpad.com>.
75. Carlson JPE, Horzempa J, O'Dec DM, Robinson CM, Neophytou P, et al. (2009) Global transcriptional response to spermine, a component of the intramacrophage environment, reveals regulation of *Francisella* gene expression through insertion sequence elements. *J Bacteriol* 191: 10.
76. Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 6.
77. Karatan E, Duncan TR, Watnick PI (2005) NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by nor spermidine. *J Bacteriol* 187: 10.
78. Patel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, et al. (2006) Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol* 188: 9.
79. Ware D, Jiang Y, Lin W, Swiatlo E (2006) Involvement of potD in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. *Infect Immun* 74: 10.
80. Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, et al. (2004) A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J Biol Chem* 279: 6.
81. Segal GM, Stueve T, Adamson JW (1987) Spermine and spermidine are non-specific inhibitors of in vitro Hematopoiesis. *Kidney Int* 31: 5.
82. Zahedi K, Bissler JJ, Wang Z, Josyula A, Lu L, et al. (2007) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase overexpression in kidney epithelial cells disrupts polyamine homeostasis, leads to DNA damage, and causes G2 arrest. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 12.
83. McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, et al. (2009) Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol* 9: 196–205.
84. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, et al. (2003) Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49: 929–945.
85. Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW (2002) Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun* 70: 6926–6932.
86. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, et al. (2007) Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 75: 2441–2450.
87. Malmstrom J, Beck M, Schimidt A, Lange V, Deutch EW, et al. (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* 460: 4.
88. Lo M, Cordwell SJ, Bulach DM, Adler B (2009) Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e560.
89. Artiushin S, Timoney JF, Nally J, Verma A (2004) Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 72: 742–749.
90. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2008) Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect Immun* 76: 4952–4958.
91. Nally JE, Timoney JF, Stevenson B (2001) Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 69: 400–404.
92. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, et al. (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276–2285.
93. Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA (2007) Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun* 75: 766–773.
94. Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, et al. (2009) Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun*.
95. Deng K, Blick RJ, Liu W, Hansen EJ (2006) Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun* 74: 13.
96. Horzempa J, Carlson JPE, O'Dec DM, Shanks RM, Nau GJ (2008) Global transcriptional response to mammalian temperature provides new insight into *Francisella tularensis* pathogenesis. *BMC Microbiol* 8.
97. Horzempa J, Tarwacki DM, Carlson JPE, Robinson CM, Nau GJ (2008) Characterization and application of a glucose-repressible promoter in *Francisella tularensis*. *Appl Environ Microbiol* 74: 10.
98. Cerqueira GM, McBride AJ, Picardeau M, Ribeiro SG, Moreira AN, et al. (2009) Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (*lig*) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of *ligB* to typing leptospiral isolates. *J Med Microbiol* 58: 1173–1181.
99. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, et al. (2003) Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology* 49: 929–945.
100. Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, et al. (2004) Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol* 53: 975–984.
101. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, et al. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 16.
102. Nie L, Wu G, Zgang W (2006) Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. *Genetics* 174: 15.
103. Suzuki I, Simon WJ, Slabas AR (2006) The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *J Exp Bot* 57: 6.
104. Chong PK, Burja AM, Radianingtyas H, Fazeli A, Wright PC (2007) Translational and transcriptional analysis of *Sulfolobus solfataricus* P2 to provide insights into alcohol and ketone utilisation. *Proteomics* 7: 12.