

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Construção e avaliação de vacinas contra a
leptospirose a partir de abordagem de vacinologia
reversa e estrutural**

Everton Burlamarque Bettin

Pelotas, 2018

Everton Burlamarque Bettin

**Construção e avaliação de vacinas contra a leptospirose a partir de abordagem
de vacinologia reversa e estrutural**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Biotecnologia).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Coorientadores: Alan John Alexander McBride;

André Alex Grassmann

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B565c Bettin, Everton Burlamarque

Construção e avaliação de vacinas contra a leptospirose a partir de abordagem de vacinologia reversa e estrutural / Everton Burlamarque Bettin ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Alan John Alexander McBride, André Alex Grassmann, coorientadores. — Pelotas, 2018.

95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Leptospira. 2. Vacinologia estrutural. 3. Barril-beta transmembrana. 4. Quimera. 5. Epítomos. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. McBride, Alan John Alexander, coorient. III. Grassmann, André Alex, coorient. IV. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Jorge (CDTec, UFPel)

Prof.^a Dr.^a Daiane Drawanz Hartwig (Instituto de Biologia, UFPel)

Dr. Marco Alberto Medeiros (Biomanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Suplente – CDTec, UFPel)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador – CDTec, UFPel)

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por permitirem a minha formação e construírem a base moral para a minha jornada, por me acompanharem na busca dos meus sonhos, depositando sincera confiança em mim;

À minha namorada, Letícia, por estar ao meu lado durante todos os momentos, por dividir comigo os entusiasmos e as preocupações deste processo, por todo amor, carinho e incentivo dado, por ser sempre a minha maior companheira;

À Universidade Federal de Pelotas e, em especial, ao Centro de Biotecnologia do CD Tec, por possuírem um programa de qualidade, capaz de construir toda a minha admiração e entusiasmo pela biotecnologia, através de professores altamente qualificados;

Ao meu orientador, Odir Antônio Dellagostin, por todos os ensinamentos que me foram transmitidos, como pesquisador e como pessoa, tornando-se um exemplo a ser seguido;

Ao coorientador Alan John Alexander McBride, por estar sempre disponível a solucionar minhas dúvidas, me auxiliando em cada tomada de decisão;

Ao coorientador André Alex Grassmann por toda a dedicação e êxito na realização de suas funções, por contribuir diretamente para a execução de cada experimento;

Aos pesquisadores do Laboratório de Vacinologia, por tornarem prazeroso o meu ambiente de trabalho, por todos os ensinamentos, por sempre me auxiliarem. Em especial aos colegas: Michele, Amanda, Mara, Guilherme e Carlos Eduardo, que tiveram participação direta na realização dos meus projetos de pesquisa;

Aos órgãos de fomento, principalmente a CAPES, agradeço pela bolsa de mestrado e pelo financiamento do trabalho realizado.

Obrigado!

*“Ac ne forte roges quo me duce, quo lare tuter,
nullius addictus iurare in verba magistri,
quo me cumque rapit tempestas, deferor hospes.”*

Horácio, Epíst. I, 1, 13-15.

Resumo

BETTIN, Everton B. **Construção e avaliação de vacinas contra a leptospirose a partir de abordagem de vacinologia reversa e estrutural**. 2018. 95f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo, estimando-se atualmente mais de um milhão de casos de leptospirose por ano, levando a aproximadamente 60.000 mortes. Já foram descritas 15 *Leptospira* spp. causadoras da doença, classificadas sorologicamente em mais de 300 diferentes sorovares. As formulações vacinais atualmente disponíveis são bacterinas. Estas bacterinas promovem uma resposta imune de curta duração e protegem apenas contra os sorovares que compõem a preparação. Uma nova e efetiva vacina universal contra a leptospirose deve possuir epítomos expostos e altamente conservados entre as espécies patogênicas. Este trabalho teve por objetivo identificar epítomos expostos, através de uma abordagem reversa e estrutural, permitindo a construção de moléculas quiméricas a partir da união destes segmentos de interesse, assim como, avaliar o potencial destas moléculas como antígenos vacinais. Foram selecionadas 17 proteínas Barril- β transmembrana (β b-OMPs), previamente identificadas, para comporem este trabalho. As estruturas tridimensionais (3D) das proteínas selecionadas foram preditas pela ferramenta I-TASSER. As proteínas foram analisadas utilizando NetMHCII 2.2 para a predição de epítomos imunogênicos de células T. A existência de epítomos lineares de células B foi verificada através do programa BepiPred 1.0. Os epítomos identificados foram manualmente mapeados nas estruturas 3D de cada proteína, afim de identificar os epítomos expostos na superfície bacteriana. Essas regiões foram submetidas a um alinhamento múltiplo, afim de avaliar sua conservação em outras espécies patogênicas. A partir das regiões de interesse identificadas, foram construídas 5 quimeras recombinantes. Cada quimera foi construída utilizando segmentos de 3 a 4 β b-OMPs, e contendo de 6 a 11 regiões imunogênicas e expostas. As sequências codificadoras para cada proteína quimérica foram sintetizadas com otimização de códons para *Escherichia coli* e clonadas em vetor de expressão pAE. As proteínas recombinantes foram expressas, purificadas e caracterizadas através de *Western blot*. Quatro das cinco construções foram reconhecidas por soro humano convalescente. A capacidade imunoprotetora destes antígenos, adsorvidos em hidróxido de alumínio, foi avaliada através de desafio letal em modelo animal hamster. Uma proteção parcial, porém não estatisticamente significativa, foi observada, com as quimeras 1 e 3 promovendo 44% e 33% de proteção após desafio homólogo. Este trabalho utilizou de forma inédita a abordagem estrutural para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*, vacinologia estrutural, barril-beta transmembrana, quimera, epítomos.

Abstract

BETTIN, Everton B. **Construction and evaluation of vaccines against leptospirosis using a reverse and structural vaccinology approach.** 2018. 95f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is among the leading zoonotic causes of morbidity worldwide, with a global incidence over one million cases every year, resulting in ~60.000 deaths. There are 15 *Leptospira* spp. that cause leptospirosis, serologically classified in more than 300 serovars. The current leptospiral vaccines are bacterins. Bacterins confer a short-term immune response that only protects against the serovars included in the vaccine and cause adverse reactions. A new, effective universal vaccine against leptospirosis will likely include surface-exposed epitopes that are conserved among the pathogenic leptospires and able of generating neutralizing immune responses. This study aims to identify exposed and conserved epitopes using a reverse and structural vaccinology approach, constructing synthetic molecules composed by those segments, and to evaluate the vaccine potential of these proteins. Seventeen beta-barrel transmembrane proteins were selected to compose this study. The three-dimensional (3D) structures of the 17 β b-OMPs were predicted by I-TASSER and quality assessed. The amino-acid sequences from these proteins were analyzed using NetMHCII 2.2 to predict immunogenic T cell epitopes. The presence of linear B cell epitopes was identified by BepiPred 1.0. The epitopes were manually mapped onto the 3D models of each β b-OMP in order to found which were exposed in bacterial surface. These regions were analyzed by multiple sequence alignment to confirm their presence in the orthologues in the remaining pathogenic *Leptospira* spp. Five chimeric proteins were constructed using those epitopes. Each chimera was designed to contain surface-related epitopes from 3-4 β b-OMPs, comprising six to eleven different surface-related immunogenic regions. The DNA coding sequences for each of the chimeras were codon optimized for *Escherichia coli* expression, synthesized and cloned into the expression vector pAE. Human convalescent sera recognized four of the five recombinant proteins. The protective capacity of these antigens, adsorbed in aluminium hydroxide adjuvant, was evaluated by lethal challenge in hamster model. A partial, but not-significant, protection was observed after immunizations. Chimera 1 and Chimera 3 induced a 44% and 33% protection following homologous challenge. This study is the first report using structural approaches towards the development of a leptospirosis vaccine.

Keywords: *Leptospira*, structural vaccinology, beta-barrel transmembrane protein, chimera, epitope-based vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1. Predição estrutural por homologia de 17 proteínas integrais de membrana externa de <i>Leptospira</i> spp.	36
Figura 2. <i>Western blot</i> utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHIS demonstrando a expressão de proteínas integrais de membrana externa de <i>Leptospira</i> spp.	37
Figura 3. <i>Western blot</i> demonstrando o reconhecimento por soro humano convalescente das proteínas rLIC11086 e rLIC10881.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Leptospira</i> spp. e sua distribuição de acordo com a patogenicidade.	13
--	----

Lista de Abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígenos
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C4BP	Proteína ligante de C4
CAAT	Teste de aglutinação cruzada
CD	Grupamento de diferenciação
DO	Densidade Óptica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
EMJH	Ellinghausen - McCullough – Johnson – Harris
FH	Fator H
HLA	Antígeno leucocitário humano
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
Lig	Leptospiral Immunoglobulin-like
LPS	Lipopolissacarídeo
Lsa	Leptospiral surface adhesin
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos
OMP	Proteína de membrana externa
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TBDR	Receptores dependentes de TonB
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	<i>Leptospira</i> spp.....	13
2.1.1	Taxonomia.....	13
2.1.2	Morfologia.....	14
2.1.3	Genômica	15
2.1.4	Metabolismo e Crescimento.....	15
2.1.5	Mecanismos de patogênese	16
2.2	Leptospirose.....	18
2.2.1	Epidemiologia e Transmissão	18
2.2.2	Manifestações clínicas	19
2.2.3	Imunidade e vacinação	21
2.3	Novas abordagens em vacinologia.....	22
2.3.1	Vacinas recombinantes contra a leptospirose	22
2.3.2	Vacinologia reversa e estrutural empregada à leptospirose	24
2.3.3	Vacinas multi-epítomos.....	26
2.4	Predição de epítomos imunogênicos.....	26
2.4.1	Epítomos de células T.....	27
2.4.2	Epítomos de células B	28
2.5	Proteínas Barril- β Transmembrana.....	29
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	31
4	CAPÍTULOS.....	32
4.1	Clonagem, expressão e avaliação de proteínas barril- β transmembrana de <i>Leptospira</i> spp.....	32
4.2	Manuscrito - Construction and evaluation of recombinant chimeric proteins using <i>Leptospira</i> spp. fragments identified by reverse and structural vaccinology.....	38
5	DISCUSSÃO GERAL.....	65
6	CONCLUSÃO GERAL.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma das principais zoonoses em termos de morbidade e mortalidade no mundo. Estima-se atualmente a ocorrência de mais de um milhão de casos da doença por ano e aproximadamente 60.000 mortes (Costa et al., 2015). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas a aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (Ministério da Saúde, 2017).

A vacinação atual contra a leptospirose é realizada através de preparações da bactéria inativada, denominadas bacterinas. A resposta imune promovida por estas formulações é basicamente anti-LPS, o que confere a elas uma capacidade protetora de curta duração e apenas contra os sorovares que compõem a vacina (Adler, 2015c). A existência de um alto número de sorovares de leptospirosas patogênicas e a variabilidade dos sorovares, de acordo com a localidade, dificultam a existência de uma vacina de utilização mundial (Grassmann et al., 2017b). Apesar destas formulações serem amplamente utilizadas na área veterinária, em humanos as vacinas contra a leptospirose são licenciadas para uso em poucos países, devido principalmente aos efeitos adversos apresentados (Koizumi and Watanabe, 2005)

Considerando essas limitações, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a doença (Dellagostin et al., 2011, Adler, 2015c). Apesar dos avanços nos últimos anos, nenhum antígeno investigado até o momento foi capaz de conferir proteção confiável de amplo espectro, demonstrando a necessidade da utilização de novas abordagens para a identificação e construção de antígenos vacinais. A vacinologia reversa é um método caracterizado por possuir uma abordagem computacional, com o intuito de identificar possíveis antígenos vacinais na sequência genômica de organismos patogênicos. Esta abordagem promove a redução *in silico* do número de alvos vacinais permitindo avaliações *in vitro* e *in vivo* de cada um destes alvos, aumentando assim, as chances de se identificar um antígeno protetor (Heinson et al., 2015). Outra recente abordagem para o desenvolvimento de vacinas é a chamada vacinologia estrutural. Esta abordagem leva em conta a estrutura tridimensional das proteínas, permitindo a

identificação de epítomos e a construção de moléculas com maior potencial vacinal, buscando a indução de uma resposta imune mais eficiente (Cozzi et al., 2013).

Entende-se que um novo e efetivo antígeno contra a leptospirose deva conter epítomos conservados e expostos na superfície da bactéria, permitindo o reconhecimento por componentes do sistema imune e a geração de uma resposta neutralizante (Grassmann et al., 2017b). Dentre as moléculas presentes na superfície bacteriana, as proteínas integrais de membrana externa destacam-se ao assumir conformação de barril- β transmembrana, estrutura exclusiva desta localização, possuindo ainda diversas funções essenciais para o patógeno, e sendo assim, interessantes alvos vacinais. Além disto, proteínas integrais de membrana são conservadas, o que permite a realização de análises estruturais por ferramentas de bioinformática a partir de suas sequências proteicas (Almeida et al., 2017).

Os experimentos descritos aqui visaram o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose através da utilização de uma abordagem reversa e estrutural, que permitiu a identificação de fragmentos expostos, conservados e contendo epítomos potencialmente imunogênicos, presentes na superfície de *Leptospira* spp. A identificação destas sequências permitiu a construção de moléculas quiméricas e a avaliação das suas propriedades imunogênicas em modelo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leptospira* spp.

2.1.1 Taxonomia

As leptospiros são bactérias pertencentes à Ordem Spirochaetales, juntamente com outras espiroquetas Gram-negativas de importância na saúde pública, como *Borrelia* spp., agente etiológico da doença de Lyme, e *Treponema pallidum*, causador da sífilis (Levett, 2015). Com a identificação da espécie patogênica *L. mayottensis*, feita por Bourhy et al. (2014), 22 espécies do gênero *Leptospira* já foram descritas (Tabela 1).

Tabela 1. *Leptospira* spp. e sua distribuição de acordo com a patogenicidade.

Grupo Taxonômico	Espécie	Referência
Patogênicas	<i>L. alexanderi</i>	Brenner et al. (1999)
	<i>L. alstonii</i>	Smythe et al. (2013)
	<i>L. borgpetersenii</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. interrogans</i>	Faine e Stallman (1982)
	<i>L. kirschneri</i>	Ramadass et al. (1992)
	<i>L. kmetyi</i>	Slack et al. (2009)
	<i>L. mayottensis</i>	Bourhy et al. (2014)
	<i>L. noguchii</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. santarosai</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. weilii</i>	Yasuda et al. (1987)
Intermediárias	<i>L. broomii</i>	Levett et al. (2006)
	<i>L. fainei</i>	Perolat et al. (1998)
	<i>L. inadai</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. licerasiae</i>	Matthias et al. (2008)
	<i>L. wolffii</i>	Slack et al. (2008)
Saprófitas	<i>L. biflexa</i>	Faine e Stallman (1982)
	<i>L. idonii</i>	Saito et al. (2013)
	<i>L. meyeri</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. terpstrae</i>	Smythe et al. (2013)
	<i>L. vanthielii</i>	Smythe et al. (2013)
	<i>L. wolbachii</i>	Yasuda et al. (1987)
	<i>L. yanagawae</i>	Smythe et al. (2013)

Apesar da classificação inicial dividi-las apenas em patogênicas e saprófitas, análises filogenéticas do rRNA 16S, e mais recentemente análises moleculares, dividiram o gênero em três grupos (Picardeau, 2017). Assim, dez leptospiros são atualmente classificadas como patogênicas; cinco outras classificadas como intermediárias, sendo isoladas de humanos ou animais, mas sem promover

manifestações graves da doença; e ainda outras sete espécies sendo consideradas saprófitas, não possuindo a capacidade de estabelecer infecção.

As espécies são classificadas também em mais de 300 diferentes sorovares, definidos de acordo com a variação do perfil antigênico do antígeno O de seus lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa, acarretando em uma grande variabilidade sorológica (Cameron, 2015). Sorovares que possuem relação antigênica são ainda agrupados, formando assim 24 sorogrupos. Embora a classificação sorológica existente até o momento baseie-se em testes de aglutinação cruzada (CAAT), novas abordagens para essa classificação, baseadas em técnicas moleculares, vêm sendo propostas (Cerqueira and Picardeau, 2009, Mende et al., 2013, Jung et al., 2015).

2.1.2 Morfologia

Apesar da variabilidade de espécies e sorovares, assim como, de suas características de patogenicidade, as *Leptospira* spp. mantêm entre si uma estrutura comum em tamanho, forma e motilidade. Possuem forma helicoidal típica da Ordem a que pertencem, tendo como característica diferencial de outras espiroquetas as suas extremidades em forma de gancho. Medem de 6-20 µm de comprimento, e 0,1 µm de diâmetro (Adler, 2015b). O aspecto delgado destas espiroquetas dificulta a sua visualização em microscópios ópticos, sendo utilizado rotineiramente para sua visualização a microscopia de campo escuro (Cameron, 2015). Bactérias recém isoladas do hospedeiro possuem forma mais curta e maior motilidade quando comparadas com as células após alta passagem em meios de cultivo, ou ainda mesmo, às saprófitas (Ellis et al., 1983, Cameron, 2015).

A estrutura da parede celular das leptospiplas se assemelham às Gram-negativas, apresentando uma dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede de peptidoglicano estão proximamente associadas, sendo sobrepostas, após o espaço periplasmático, pela membrana externa (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010). A membrana externa é constituída de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e proteínas integrais transmembrana. O LPS é o principal antígeno leptospiral, sendo o principal alvo da resposta humoral do hospedeiro e possuindo papel fundamental na virulência (Murray, 2015, Lessa-Aquino et al., 2017).

2.1.3 Genômica

O conhecimento sobre o genoma das leptospiplas iniciou-se em meados de 2003, com o sequenciamento de dois sorovares da espécie patogênica *L. interrogans* (Ren et al., 2003, Nascimento et al., 2004). Recentemente, Fouts et al. (2016) publicaram uma análise genômica comparativa de 20 espécies do gênero (exceto *L. idonii* e *L. mayottensis*), trazendo uma grande compreensão das características genômicas de *Leptospira* spp. Os resultados apresentados neste trabalho descreveram o genoma de *Leptospira* spp. contendo aproximadamente 4,26 Mpb (3,89 – 4,71 Mpb), sendo constituído de dois cromossomos, com o cromossomo maior possuindo mais de 3,6 Mpb e o menor contando com aproximadamente 300 Kpb. Possuem conteúdo G+C médio de 40,7%, variando de 35,5% em *L. noguchii* a 45,6% em *L. wolffii*. Os genomas demonstram codificar para uma média de 4.197 proteínas. Aproximadamente 1.764 genes mostraram pertencer ao “core-genoma” da bactéria, sendo compartilhado entre as espécies, enquanto que 17.477 genes compõem o “pan-genoma”. Espécies patogênicas demonstram ainda possuir um número maior de genes específicos.

Quanto a regulação gênica em *Leptospira* spp., além da presença de um fator sigma de transcrição “housekeeping” (RpoD), todas as espécies demonstram possuir fatores alternativos envolvidos na regulação da expressão, frente a diferentes situações (Zhukova et al., 2017). Diversos estudos também já destacaram o papel das modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação e metilação, em proteínas leptospirais, principalmente durante a infecção (Cao et al., 2010, Witchell et al., 2014, Stewart et al., 2015, Nally et al., 2017).

2.1.4 Metabolismo e Crescimento

Leptospiplas são bactérias aeróbias de crescimento lento, possuindo tempo de geração *in vitro* em torno de 16 h, quando recém isoladas. O crescimento ideal ocorre à temperatura de 28-30 °C, e em pH ótimo de 7,2-7,6. Para o crescimento *in vitro*, é utilizado rotineiramente o meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), geralmente suplementado com soro de coelho. A suplementação do meio com albumina sérica bovina também é necessária para a redução da toxicidade do detergente Tween 80, fonte dos ácidos graxos (Cameron, 2015). A necessidade

primária de nutrientes para seu crescimento são fontes de carbono, provenientes de ácidos graxos de cadeia longa; nitrogênio, proveniente exclusivamente de íons amônia; além da presença de nutrientes específicos, como fosfatos, cálcio, magnésio e ferro (Herman et al., 2016).

Apesar das leptospiiras não possuírem a capacidade de síntese de ácidos graxos de cadeia longa, necessitando da presença no meio, possuem vias de biossíntese completas para diversos metabólitos. Diferentemente de outras espiroquetas, o genoma de *Leptospira* spp. codifica vias de síntese para diferentes aminoácidos, ácidos nucleicos, e vitaminas, mas demonstram ser auxotróficas para aspartato, histidina, asparagina, assim como para as vitaminas B1 e K2 (Ren et al., 2003, Fouts et al., 2016).

2.1.5 Mecanismos de patogênese

A compreensão dos mecanismos de patogênese de leptospiiras tem avançado nos últimos anos, com diversas proteínas tendo seu papel relacionado com a capacidade de causar doença, assim como, com a virulência de espécies patogênicas. A criação de mutantes para diversas proteínas auxilia na compreensão do papel destas moléculas. Desta forma, várias proteínas tiveram sua relação com a virulência estabelecida, como por exemplo, as lipoproteínas Loa22 e LruA (Ristow et al., 2007, Zhang et al., 2013); as chaperonas ClpB e HtpG (Lourdault et al., 2011, King et al., 2014); genes relacionados a síntese do LPS (Murray et al., 2010, Marcsisin et al., 2013), a proteína de adesão celular Mce (Zhang et al., 2012) e proteínas flagelares (Liao et al., 2009, Lambert et al., 2012a, Wunder et al., 2016). Outras proteínas, apesar de terem papel na virulência da bactéria já descrita, demonstram não ser essenciais para isso, permitindo se observar a patogenicidade da bactéria após a atenuação da proteína, destacando a redundância funcional existente entre proteínas leptospirais (Adler, 2015b).

Essa redundância pode ser perceptível principalmente em moléculas que possuem papel na adesão da bactéria em tecidos do hospedeiro. A adesão de leptospiiras é considerada um pré-requisito para o sucesso da infecção, com diversas proteínas demonstrando a capacidade de se aderirem em diferentes moléculas, como: fibronectina, laminina, elastina, tropoelastina, colágeno e outros (Choy et al., 2007,

Stevenson et al., 2007, Longhi et al., 2009, Pinne et al., 2010, Adler, 2014). O trabalho de Hoke et al. (2008) demonstrou que um mutante atenuado para a proteína *LipL32* não é afetado quanto a sua capacidade de adesão à matriz extracelular, apesar da capacidade desta proteína de se ligar a diferentes componentes. O mesmo foi demonstrado para a lipoproteína de superfície *Leptospiral Immunoglobulin-Like* (Lig) B (Croda et al., 2008). Além destas citadas, diversas outras adesinas vêm sendo identificadas, dando origem, recentemente, a uma diversidade de *Leptospiral surface adhesins* (Lsa), como a Lsa23, Lsa26, Lsa33, Lsa45 e Lsa36, todas estas, presentes em espécies patogênicas e sendo ausentes em espécies saprófitas (Siqueira et al., 2013, Fernandes et al., 2014, Fernandes et al., 2016, Figueredo et al., 2017).

Outro importante mecanismo de patogênese é a capacidade de sobrevivência e multiplicação das espécies infecciosas no organismo do hospedeiro, em contraste à rápida eliminação de leptospiros saprófitas. Parte desta capacidade está relacionada com a habilidade das leptospiros em evadir o sistema imune. Leptospiros patogênicos possuem a capacidade de entrar e sobreviver em macrófagos (Zhang et al., 2012, Toma et al., 2014). Além disto, a presença de um gene codificante para catalase nestas leptospiros confere resistência às espécies reativas ao oxigênio produzidas por células do sistema imune inato (Eshghi et al., 2012). Por fim, a evasão do sistema complemento é crucial para a patogênese da bactéria, visto que espécies saprófitas resistem por poucos minutos no sangue, sendo rapidamente eliminadas (Fraga et al., 2011). Dentre os mecanismos relacionados com esta capacidade, está a captação de fatores de regulação do sistema, como o *fator H* (fH) e *C4b-binding protein* (C4BP), e a secreção de proteases capazes de clivar moléculas do sistema (Fraga et al., 2014, Castiblanco-Valencia et al., 2016, Amamura et al., 2017).

Através de estudos de mutagênese também foi demonstrada a importância da motilidade para a patogênese de *Leptospira* spp. A inativação de genes referentes a componentes do flagelo leptospiral, *FlhY*, *FlaA* e *FcpA*, levam a atenuação da virulência em modelo animal (Liao et al., 2009, Lambert et al., 2012a, Wunder et al., 2016). Apesar dos genes codificantes para o flagelo serem altamente conservados entre todas as espécies de leptospiros, independente de sua patogenicidade, há diferentes padrões de quimiotaxia entre patogênicos e saprófitas, conferindo habilidades específicas para a infecção do hospedeiro (Lambert et al., 2012b, Fouts et al., 2016).

Apesar das necessidades nutricionais de leptospiros serem simples, a aquisição de nutrientes do hospedeiro possui papel direto na patogênese. Ácidos graxos, necessários para a obtenção de carboidratos, podem ser obtidos pela degradação de membranas celulares do hospedeiro através da ação de fosfolipases e esfingomielases presentes na bactéria, acarretando em dano tecidual e hemólise de tecidos (Lee et al., 2000, Narayanavari et al., 2015, Picardeau, 2017). A aquisição de compostos férricos através da lise de eritrócitos também é observada durante a infecção, sendo responsável por mudanças em parâmetros hematológicos dos hospedeiros (Asuthkar et al., 2007, Murray et al., 2008, De Silva et al., 2014).

Através de análises comparativas entre espécies patogênicas e saprófitas também se destacam outros elementos que parecem influenciar na capacidade de patogenicidade da bactéria. A existência de uma via de biossíntese para ácido siálico, encontrada apenas em bactérias patogênicas, pode ser fundamental na modificação pós-traducional de proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro. A produção autotrófica de vitamina B12 parece também ser útil para a sobrevivência *in vivo* durante a infecção (Fouts et al., 2016).

2.2 Leptospirose

2.2.1 Epidemiologia e Transmissão

Todos os fatores descritos anteriormente contribuem para a entrada e disseminação da bactéria no hospedeiro, permitindo o desenvolvimento da leptospirose. A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição na natureza. Sendo humanos os hospedeiros acidentais, a doença acomete diversos animais selvagens e domésticos, com leptospiros patogênicas sendo isoladas de centenas de diferentes espécies de mamíferos (Adler, 2015a). Pequenos mamíferos são os reservatórios mais importantes no ciclo da doença, com roedores, como o rato e o camundongo, sendo hospedeiros não suscetíveis, possuindo assim papel fundamental na disseminação do patógeno (Haake and Levett, 2015).

O ciclo de vida da bactéria envolve a sua liberação na urina de hospedeiros infectados, a capacidade de persistir no meio ambiente, a aquisição de um novo hospedeiro e a capacidade de se disseminar no sangue e atingir os túbulos renais. A infecção pode ocorrer através do contato direto com a urina de animais portadores,

ou ainda de forma indireta, no contato com água, solo ou outros meios contaminados com as espiroquetas. O contato indireto é a forma mais comum de infecção, e está diretamente associado a atividades ocupacionais e recreacionais em países desenvolvidos, assim como, à falta de saneamento básico e a ocorrência de enchentes em países em desenvolvimento (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010).

Em humanos, estima-se a ocorrência de 1 milhão de novos casos da doença a cada ano, acarretando em cerca de 60.000 mortes, o que torna a doença a principal zoonose em termos de morbidade e mortalidade no mundo. Apesar da distribuição global, uma maior incidência da leptospirose ocorre em regiões tropicais e em países pobres, sendo homens adultos o principal grupo de risco da doença (Costa et al., 2015).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos principalmente em áreas com grandes densidades populacionais e baixa renda. No ano de 2017 foram notificados 2.788 casos de leptospirose humana no Brasil. O estado do Rio Grande do Sul apresentou neste período uma alta incidência da doença, contribuindo com 16,57 % dos casos (Ministério da Saúde, 2018). É válido ressaltar que o número real de casos provavelmente seja desconhecido, devido à negligência da doença e a dificuldade do diagnóstico correto.

2.2.2 Manifestações clínicas

Os sintomas clínicos de pacientes com leptospirose são bastante variáveis, com a maioria dos pacientes apresentando uma infecção assintomática ou sintomas brandos semelhantes aos sintomas da gripe. No entanto, a doença pode progredir para formas mais graves, acarretando em disfunções de diversos órgãos e morte (Haake e Levett, 2015)

A leptospirose é uma doença bifásica. A fase inicial aguda é caracterizada por sintomas não específicos, incluindo febre e dores no corpo, o que permite o diagnóstico equivocado de outras doenças. Esta primeira fase é denominada leptospirêmica, caracterizada pela presença e disseminação da bactéria no sangue. Com o surgimento de anticorpos IgM e a concomitante eliminação das leptospiras do sangue, dá-se início à fase imune ou leptospiúrica. Nesta segunda fase, o curso da doença pode ser finalizado, com apenas uma pequena fração dos casos (5-15%)

evoluindo para as formas mais graves da doença (Haake e Levett, 2015, Costa et al., 2015). Nestes casos as leptospirosas se disseminam para diferentes tecidos e órgãos, podendo infectar rins, fígado, pulmão e cérebro, e sendo excretadas na urina. A colonização de órgãos pelas leptospirosas promove uma vasta gama de manifestações clínicas. A doença de Weil é a manifestação grave mais descrita da doença, sendo historicamente usada como sinônimo para tal. Esta manifestação é caracterizada por icterícia, hemorragia e insuficiência renal aguda (Adler, 2015a). Insuficiências renais e pulmonares são descritas em 36 e 17% dos casos de pacientes hospitalizados, respectivamente (WHO, 2011).

Os rins são o principal órgão alvo das leptospirosas após o aumento dos níveis de imunoglobulina no sangue. O envolvimento renal varia de leve proteinúria até a grave falência renal. A nefrite tubulointersticial é a principal alteração renal decorrente da doença, em parte devido, principalmente, ao reconhecimento de proteínas leptospirais por *Toll-like receptors* (TLRs) expresso por células renais, promovendo uma inflamação (Yang et al., 2006). A insuficiência renal aguda (IRA) em leptospirose ocorre geralmente na forma não oligúrica, com os poucos casos oligúricos apresentando altas taxas de letalidade (Seguro e Andrade, 2013).

O envolvimento pulmonar também é uma importante causa de morte na leptospirose. Os sintomas variam de dores no peito, dispneia e hemoptise à síndrome respiratória aguda, com hemorragias (petéquias) interalveolares sendo encontradas na maioria dos casos (Dolhnikoff et al., 2007). Os danos respiratórios ocorrem principalmente devido ao aumento da permeabilidade dos tecidos pulmonares por meio de alterações não inflamatórias, interferindo na passagem do fluido alveolar e implicando em falhas respiratórias e morte (De Brito et al., 2013).

A leptospirose pode acometer ainda outros órgãos como o cérebro, sendo a meningite asséptica a principal manifestação. Pacientes com meningite proveniente da doença comumente apresentam dores de cabeça e uma pleocitose no fluido cérebro-espinhal (Panicker et al., 2001). Encefalites, cerebelites e ataxia são outras formas comuns de manifestação da chamada neuroleptospirose (Panicker et al., 2001, Puca et al., 2017). Miocardites, arritmias e falhas cardíacas com potenciais desfechos letais são também relatados em diferentes estudos (Shah et al., 2010).

Pacientes com a doença apresentam ainda alterações em diversos parâmetros hematológicos. Queda nos níveis de hemoglobinas, devido à captura de

ferro pelas leptospirosas, e trombocitopenia são frequentemente observadas (De Silva et al., 2014). Elevação nos níveis de bilirrubina sérica são encontradas em pacientes com leptospirose icterica, acarretado por um dano físico às junções intercelulares dos hepatócitos causado pela bactéria, com consequente destruição dos canalículos biliares (Miyahara et al., 2014). A desregulação dos transportadores de sódio nos rins pode promover ainda uma perceptível caliurése e hipocalemia (Andrade et al., 2007).

2.2.3 Imunidade e vacinação

Os macrófagos são importantes componentes na resposta imune contra a leptospirose. *Leptospira* spp. estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, incluindo IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF- α (Xue et al., 2013). No entanto, como já comentado, as leptospirosas patogênicas possuem a capacidade de sobreviver nos macrófagos. Leptospirosas são suscetíveis também à ação de neutrófilos e suas armadilhas extracelulares (NETs). Apesar de possuírem mecanismos para sobreviver à ação destas células imunes, trabalhos demonstram que camundongos deficientes de neutrófilos apresentam maior concentração da bactéria nos rins (Scharrig et al., 2015).

Devido à composição atípica do seu lipídeo A, o LPS leptospiral é incapaz de ativar o TLR4 em hospedeiros suscetíveis, ativando apenas o TLR2. A ativação do TLR4 se mostra necessária para uma rápida produção de imunoglobulinas e a remoção das leptospirosas do sangue (Chassin et al., 2009). Um estudo demonstrou que camundongos com TLR4 nocauteados são suscetíveis à doença, apresentando elevados níveis de leptospirosas nos órgãos (Viriyakosol et al., 2006).

A resposta imune do hospedeiro frente à infecção está diretamente relacionada aos desfechos severos da doença. Pacientes hospitalizados geralmente apresentam sintomas de uma descrita “tempestade de citocinas” (*cytokine storm*) (Haake e Levett, 2015). Altos níveis de TNF- α parecem ser preditor de um prognóstico ruim, sendo associado com hemorragia pulmonar e morte (Kyriakidis et al., 2011). A atividade anti-inflamatória da IL-10 também demonstra ser importante no controle da progressão da doença. A correlação entre os níveis de IL-10 e TNF- α tem sido constantemente avaliada e relacionada com o curso da leptospirose (Mikulski et al., 2015).

A resposta humoral contra a infecção tem papel fundamental na proteção e sobrevivência do hospedeiro, com pacientes produzindo altos níveis de anticorpos. Já se demonstrou que camundongos com células B depletadas são suscetíveis à doença (Adler e Faine, 1976). Anticorpos anti-LPS correspondem a maioria dos anticorpos estimulados, sendo produzidos via células T-independentes (Lessa-Aquino et al., 2017). Esta característica da resposta frente a infecção pode ser observada no fato de camundongos deficientes em células T serem capazes de gerarem uma resposta imune humoral protetora (Adler e Faine, 1977, Chassin et al., 2009).

Embora esta rápida resposta humoral seja importante na proteção contra a infecção, ela também é responsável por parte dos problemas enfrentados pela atual estratégia vacinal. A estimulação da resposta imune promovida pela bactéria inativada mantém o padrão da infecção, sendo direcionada majoritariamente contra o LPS leptospiral. Assim, é promovida uma resposta sorovar-específica, visto a diversidade antigênica do LPS, e de curta-duração, visto a ausência de uma memória imunológica. Uma bactéria mutante para o LPS foi desenvolvida e demonstrou ter a capacidade de conferir uma imunidade cruzada contra outros sorovares frente a desafio letal em hamsters, induzido uma resposta imune direcionada contra proteínas da membrana externa (Srikram et al., 2011).

Além destes problemas citados, estas formulações promovem alguns efeitos adversos, locais e sistêmicos, causados provavelmente por contaminantes proteicos no meio de cultura (Koizumi e Watanabe, 2005). Frente a isto, apesar da ampla utilização para fins veterinários, poucos países aprovaram o uso de bacterinas contra a leptospirose humana, sendo estes: China, Cuba, Japão, França e Rússia (Ikoev et al., 1999, Rodriguez-Gonzalez et al., 2004, Yanagihara et al., 2007, Laurichesse et al., 2007, Adler, 2015c). Visto os problemas descritos, é evidente a necessidade de pesquisas buscando desenvolver novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas contra esta doença.

2.3 Novas abordagens em vacinologia

2.3.1 Vacinas recombinantes contra a leptospirose

Visando o desenvolvimento de uma vacina segura e de amplo espectro, diversos estudos têm avaliado antígenos recombinantes contra a leptospirose. Nas

últimas duas décadas, diversas proteínas de membrana externa da bactéria com potencial imunoprotetor foram avaliadas em diferentes abordagens vacinais, seja como vacinas de subunidade, de DNA, ou ainda vetorizadas (Dellagostin et al., 2011, Adler, 2015c).

O primeiro relato demonstrando sucesso no uso de uma vacina recombinante contra a doença data de 1999, com a avaliação das proteínas OmpL1 e LipL41 expressas em membranas de *E. coli*. Hamsters imunizados com estas formulações induziram uma resposta imune protetora e sinérgica contra as proteínas em um terço dos experimentos, alcançando 71% de sobrevivência neste (Haake et al., 1999). Com estas evidências iniciais da capacidade de antígenos recombinantes induzirem uma resposta protetora, diversas outras proteínas vieram a ser testadas, com destaque para a proteína LipL32 e as proteínas Leptospiral Immunoglobulin-likes (Lig).

A proteína LipL32 é a proteína imunodominante na membrana externa de leptospiros patogênicos, sendo altamente conservada e expressa durante a infecção, e, portanto, considerada um bom candidato vacinal (Haake et al., 2000). Estas características promoveram a sua avaliação em diferentes formulações, como vacina de DNA (Branger et al., 2005), de subunidade (Lucas et al., 2011, Habarta et al., 2011, Grassmann et al., 2012), e em vetores virais e de BCG recombinante (Branger et al., 2001, Seixas et al., 2007). Apesar de diversos estudos demonstrarem proteção frente a desafio em modelo animal utilizando formulações contendo este antígeno, quando aplicado controles adequados, como dose de desafio, número de animais e reprodutibilidade dos testes, assim como, análises estatísticas apropriadas, coloca-se em dúvida a real capacidade de proteção da LipL32 (Adler, 2015c).

As proteínas LigA e LigB, pertencentes a família de proteínas das *Leptospiral immunoglobulin-like* (Lig), possuem também diversas características de antígenos vacinais com potencial imunoprotetor. A expressão destas proteínas demonstrou ser aumentada *in vivo*, destacando o papel destas para a infecção, com funções na adesão e evasão do sistema imune já descritas (Matsunaga et al., 2005, Choy et al., 2007, Castiblanco-Valencia et al., 2012, Hsieh et al., 2016). Assim como a LipL32, a virulência do patógeno não é afetada em mutantes para estas proteínas, demonstrando a redundância funcional da bactéria. Porém, a proteína LigB quando expressa na espécie saprófita *L. biflexa*, demonstra conferir uma maior capacidade de sobrevivência ao soro humano (Castiblanco-Valencia et al., 2016). Ambas proteínas

possuem um alto grau de conservação entre espécies. Enquanto a proteína LigB está presente em todas as espécies patogênicas, LigA está presente apenas em três espécies (*L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. alstonii*) (Fouts et al., 2016). Ambas proteínas já demonstraram conferir proteção frente a desafio homólogo, alcançando 100% de proteção em diferentes estudos (Silva et al., 2007, Yan et al., 2009, Coutinho et al., 2011, Hartwig et al., 2014, Conrad et al., 2017), o que as coloca como os antígenos mais promissores para uma vacina recombinante comercial, até o momento. Apesar disto, a capacidade da geração de uma resposta imune esterilizante ainda é um desafio. Recentemente foi descrita a capacidade esterilizante de uma formulação contendo um fragmento da proteína LigB frente a desafio letal em hamsters (Conrad et al., 2017).

Utilizando abordagens clássicas de identificação de antígenos, cerca de 30 outras proteínas já foram avaliadas como antígenos vacinais, sendo reportado níveis de proteção significativos para dez destas (Adler, 2015c, Grassmann et al., 2017b). Porém, até o momento, nenhuma vacina recombinante conseguiu obter resultados confiáveis de proteção cruzada e na geração de uma imunidade esterilizante. Buscando identificar antígenos com as características ideais para a sua utilização em vacinas, e conseqüentemente para alcançar estes objetivos, outras abordagens vêm sendo empregadas (Grassmann et al., 2017b).

2.3.2 Vacinologia reversa e estrutural empregada à leptospirose

Com o aumento no número de ferramentas de bioinformática e na quantidade de genomas de patógenos sequenciados, novas estratégias para a identificação de antígenos com potencial vacinal tornaram-se possíveis. A combinação destas tecnologias *in silico* com os avanços nos conhecimentos de imunologia e patogênese levaram ao surgimento da chamada vacinologia reversa. A abordagem de vacinologia reversa baseia-se na possibilidade de se identificar alvos em potencial a partir de análises *in silico* do genoma do patógeno, permitindo reduzir o número de candidatos vacinais a serem testados, reduzindo esforços e custos, e aumentando as chances de se identificar um antígeno protetor (Heinson et al., 2015).

A vacinologia reversa tem sido aplicada com sucesso para diversas outras doenças infecciosas. Apesar disto, são poucos os relatos do uso desta abordagem

em vacinas contra a leptospirose. Até o momento existem 10 trabalhos descrevendo a identificação de antígenos vacinais a partir do genoma leptospiral (Dellagostin et al., 2017). Destes, destaca-se o trabalho que permitiu a identificação, como candidato vacinal em potencial, da proteína LemA. Quando usada em uma estratégia *prime-boost*, a proteína promoveu proteção de 88% dos animais imunizados ($p < 0,05$, Teste exato de Fisher) (Hartwig et al., 2013). O maior estudo utilizando a vacinologia reversa em leptospirose foi realizado por Murray et al. (2013). Neste estudo os autores identificaram e avaliaram 238 proteínas preditas como proteínas secretadas, localizadas na membrana externa, ou sendo lipoproteínas. As proteínas expressas foram avaliadas em *pools*, sendo a colonização renal por leptospirose o desfecho avaliado. Nenhuma das 48 formulações avaliadas foi capaz de gerar uma imunidade esterilizante.

A redundância funcional de proteínas de membrana externa das leptospirose dificulta encontrar uma relação entre as características de um antígeno e sua capacidade protetora, tornando mais complicada a aplicação desta abordagem para a doença. Porém, os avanços constantes em bioinformática e dos conhecimentos acerca do patógeno tornam esta abordagem promissora e extremamente necessária para futuras avaliações de antígenos vacinais.

A vacinologia estrutural, por sua vez, está no extremo da aplicação do conhecimento na identificação e avaliação de antígenos vacinais. Esta nova abordagem baseia-se na utilização das informações estruturais proteicas para a seleção de antígenos e suas porções, ou ainda, para a modificação ou combinação destes (Cozzi et al., 2013). Mesmo com a maioria dos trabalhos que utilizam esta abordagem fazerem uso de informações experimentais, como difração de raio-X, as ferramentas *in silico* permitem realizar com maior praticidade a predição de estruturas proteicas, obtendo-se resultados satisfatórios quando comparados à cristalografia (Yang et al., 2015). Deste modo, a bioinformática tem contribuído fortemente para os avanços nesta área.

A identificação de antígenos de *Leptospira* spp. com potencial vacinal utilizando a abordagem estrutural foi recentemente empregada por nosso grupo utilizando abordagens *in silico*. A estratégia empregada permitiu identificar 18 proteínas transmembrana barril- β e 8 lipoproteínas de membrana externa com potencial vacinal (Grassmann et al., 2017a). Porém, até o momento, nenhum trabalho

descreveu a avaliação de antígenos identificados utilizando esta abordagem em vacinas contra a leptospirose. Entende-se que uma nova vacina protetora contra a doença deva conter epítomos expostos na superfície da bactéria, sendo assim capazes de gerar uma resposta imune que neutralize a infecção. Uma grande vantagem do uso desta abordagem seria não só a identificação de epítomos expostos, mas a combinação de múltiplos epítomos para a criação de novos antígenos vacinais.

2.3.3 Vacinas multi-epítomos

A possibilidade de se gerar uma resposta imune direcionada contra epítomos específicos de um patógeno, buscando uma resposta imune neutralizante, pode ser considerada uma abordagem revolucionária (Oscherwitz, 2016). Diversas formulações vacinais, utilizando antígenos formados pela combinação de múltiplos epítomos de células B e T, encontram-se em ensaios clínicos, demonstrando o potencial desta abordagem (Oyarzún e Kobe, 2016).

Poucos trabalhos foram publicados descrevendo a combinação de epítomos na construção de vacinas contra a leptospirose. Fernandes et al. (2017) construiu uma molécula quimérica a partir da combinação de epítomos de células B das proteínas LigA, Mce, Lsa45, OmpL1 e LipL41. A construção gerou proteção em 50% dos animais, não demonstrando ser estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Lin et al. (2016), por sua vez, descreveu a construção de uma molécula contendo quatro repetições de 6 epítomos de células B e T combinados, provenientes das proteínas OmpL1, LipL32 e LipL21, alcançando uma proteção significativa (4/5) quando avaliado em cobaias. Ambos estudos são recentes, demonstrando o foco na utilização desta abordagem para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose. Além disto, diversas ferramentas de bioinformática vêm sendo desenvolvidas, permitindo o mapeamento, cada vez mais preciso, de epítomos de interesse para o desenvolvimento de vacinas.

2.4 Predição de epítomos imunogênicos

Para a indução de uma resposta imune humoral, um imunógeno deve conter determinantes antigênicos capazes de serem reconhecidos por receptores de linfócitos B. Para sua ativação, de forma timo-dependente, os linfócitos B ainda

dependem da ação de seus linfócitos T auxiliares cognatos. Estas células T auxiliares devem ser capazes de reconhecer o mesmo antígeno reconhecido pelo linfócito B, promovendo assim o processo denominado de “reconhecimento ligado” (Murphy, 2014). A identificação de epítomos alvos capazes de gerar uma imunidade protetora é fundamental para o desenvolvimento de vacinas. Embora existam diversos métodos experimentais para a identificação destes epítomos, a bioinformática tem contribuído fortemente nos últimos anos, permitindo análises *in silico* cada vez mais precisas, a partir das sequências de aminoácidos.

2.4.1 Epítomos de células T

Diferentemente dos linfócitos B, o reconhecimento do antígeno por linfócitos T não ocorre de forma direta, sendo necessário a apresentação dos peptídeos por células apresentadoras de antígenos (APC). As células dendríticas possuem o papel principal na captação do antígeno e apresentação destas moléculas em complexos de histocompatibilidade principal (MHC), permitindo o reconhecimento por receptores de células T. Linfócitos T auxiliares expressam em sua superfície a glicoproteína CD4 (Grupamento de diferenciação 4), a qual possui a habilidade de reconhecer complexos MHC de classe II, gerando uma resposta imune específica e direcionada à antígenos exógenos.

Uma diferença fundamental entre as classes de MHC é o fato de que ao contrário do complexo MHC I, o tamanho dos peptídeos apresentados por moléculas do MHC de classe II não é restritivo. A maioria dos ligantes de MHCII possuem cerca de 14-18 aminoácidos, mas alguns podem possuir mais de 30 resíduos (Lin et al., 2008). A maioria dos preditores destes epítomos focam na identificação dos fragmentos centrais de ancoramento (core) formados por 9 aminoácidos (9-mer), porém, a inclusão de resíduos flanqueadores demonstra promover uma melhor acurácia da predição (Nielsen e Lund, 2009, Dhanda et al., 2017).

Outro ponto importante é a ampla variabilidade genética existente quanto as moléculas de MHC. Em humanos, o MHC é denominado também antígeno leucocitário humano (HLA). Os genes codificantes para HLAs são os mais polimórficos do genoma humano, com mais de 4.000 alelos descritos, com cada indivíduo possuindo a capacidade de expressar até seis moléculas de HLA-I e doze moléculas

de HLA-II (Buhler e Sanchez-Mazas, 2011). Essa diversidade gênica aumenta as chances do reconhecimento de um antígeno estranho, mas dificulta a promoção de uma resposta imune contra um antígeno específico por todos os indivíduos vacinados. Ferramentas de bioinformática disponíveis permitem a avaliação do reconhecimento de populações por até 95% das variantes de MHC de classe II (Oyarzun et al., 2013). Neste sentido, diversos estudos têm focado na identificação de “epítomos promíscuos” de MHC, ou seja, aqueles que possuem a capacidade de se ligar a diferentes alelos de MHC. Além disto, analisando o conjunto de peptídeos apresentados, é possível agrupar os alelos em supertipos. Os supertipos de HLA referem-se aos grupos de moléculas capazes de apresentar o mesmo epítomo (Soria-Guerra et al., 2015). A aplicação destes conceitos é fundamental para o desenvolvimento de antígenos vacinais, sendo importante garantir a presença no antígeno, de epítomos reconhecidos por diferentes alelos MHC, buscando assim uma maior cobertura vacinal.

2.4.2 Epítomos de células B

Os linfócitos B são componentes principais na promoção da resposta humoral. O reconhecimento do antígeno por receptores de células B ocorre através da ligação direta na molécula. Dois tipos de epítomos podem ser reconhecidos por estes receptores, os lineares e os conformacionais. Enquanto o antígeno linear é constituído de uma sequência ininterrupta de aminoácidos, epítomos descontínuos ou conformacionais, são constituídos de sequências espaçadas de aminoácidos, sendo influenciados pela conformação proteica. Apesar de mais de 90% dos epítomos serem conformacionais, a maioria destes (70%) são compostos de um a seis epítomos lineares internos (Rubinstein et al., 2008, Jespersen et al., 2017). Epítomos de células B possuem uma alta variabilidade em seu tamanho, podendo variar de 3 a 85 aminoácidos, dificultando a sua identificação *in silico* (Singh et al., 2013). Diversas ferramentas estão disponíveis para a predição de epítomos de células B, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas e diagnósticos. Apesar dos epítomos conformacionais serem maioria, sua predição é dificultada pela necessidade de informações estruturais da molécula, assim, a maioria das ferramentas de predição disponíveis visam a predição dos epítomos lineares, podendo alcançar para estes, especificidades superiores a 90% (Larsen et al., 2006).

2.5 Proteínas Barril- β Transmembrana

Em bactérias com estrutura de dupla membrana, proteína barril- β estão presentes exclusivamente na membrana externa, sendo formadas por 8 a 24 folhas beta, constituindo sua estrutura em forma de barril. Estas proteínas possuem diversas funções essenciais para o metabolismo celular, sendo consideradas portanto, interessantes antígenos vacinais (Ulrich e Rapaport, 2015).

Proteínas receptoras dependentes de TonB (TBDR) são proteínas transmembrana formadas por 22 folhas beta acrescidas de um domínio globular interno funcional. Possuem papel no transporte de substâncias vitais para a célula, como de compostos férricos, pelas proteínas TbpA, FpvA, FecA e phuR; de vitamina B12 realizado pela proteína btuB; ou ainda de zinco pela proteína ZnuD. Devido a esse importante papel no metabolismo de proteínas, diversas TBDR já foram avaliadas em formulações vacinais contra diferentes patógenos (Stork et al., 2010, Hu et al., 2012, Abdelhamed et al., 2017).

Outra classe de proteínas barril- β envolvidas no transporte de compostos é a denominada TolC-like. Proteínas TolC-like formam um canal trimérico composto de doze folhas beta (4 por monômero) associado à longas caudas formadas por alfa-hélices que se fazem presentes no periplasma. Estão envolvidas no efluxo de moléculas do interior da célula, incluindo toxinas e antibacterianos (Koronakis et al., 2004). Proteínas TolC de diferentes patógenos também já foram descritas como antígenos vacinais protetores (Spreng et al., 2003, Yang et al., 2012, Wang et al., 2016).

Proteínas barril- β transmembrana também possuem funções na formação estrutural da bactéria. Proteínas BamA-like são proteínas responsáveis pela alocação de proteínas de membrana externa em bactérias Gram-negativas, consistindo de um barril de folhas beta associado a cinco domínios de translocação estendidos ao periplasma (Browning et al., 2013). As proteínas LptD-like, por sua vez, são moléculas formadoras de complexos responsáveis pela importante função de montagem do LPS bacteriano (Qiao et al., 2014).

Proteínas leptospirais foram recentemente relacionadas com as classes proteicas citadas acima (Grassmann et al., 2017a). A localização exclusiva na membrana externa destas proteínas, permitindo a acessibilidade da resposta imune,

assim como, o papel essencial no metabolismo bacteriano, colocam as proteínas barril- β transmembrana como interessantes alvos vacinais contra a leptospirose.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A utilização de formulações vacinais com antígenos multi-epítomos, contendo segmentos expostos na membrana externa, de diferentes proteínas barril- β transmembrana de *L. interrogans*, é capaz de promover uma proteção contra a leptospirose frente ao desafio em modelo animal.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar, como antígenos vacinais, proteínas quiméricas constituídas por segmentos expostos de proteínas integrais de membrana externa de *L. interrogans* contendo epítomos de células T e B, identificados através de uma abordagem reversa e estrutural.

3.3 Objetivos Específicos

- Identificar e selecionar proteínas de *Leptospira* spp. preditas como proteínas barril- β transmembrana;
- Avaliar as proteínas selecionadas quanto à presença de epítomos de linfócitos T e B, expostos à membrana externa do patógeno, utilizando abordagens *in silico*;
- Construir quimeras recombinantes a partir da união de diferentes segmentos de interesse identificados;
- Analisar as moléculas construídas *in silico* quanto a sua conservação em outras espécies patogênicas;
- Realizar a expressão heteróloga em *E. coli* das proteínas quiméricas construídas, assim como, de proteínas transmembranas de interesse ao estudo;
- Caracterizar as proteínas construídas quanto ao reconhecimento por soro humano convalescente;
- Determinar o potencial imunoprotetor de diferentes formulações vacinais contendo as quimeras recombinantes expressas através de desafio homólogo em hamsters;
- Avaliar a resposta imune humoral gerada pelas formulações contendo as quimeras recombinantes.

4 CAPÍTULOS

4.1 Clonagem, expressão e avaliação de proteínas barril- β transmembrana de *Leptospira* spp.

INTRODUÇÃO

A abordagem mais eficiente para o controle da leptospirose é o uso de vacinas. Uma vacina de amplo espectro contra leptospirose e de proteção duradoura é uma necessidade evidente para o controle desta doença (Adler, 2015c). Entende-se que uma resposta imune direcionada contra proteínas expostas na superfície contribua significativamente para o sucesso de uma estratégia vacinal, principalmente por facilitar o reconhecimento do patógeno pelos componentes do sistema imune (Grassmann et al., 2017b).

Proteínas barril- β são encontradas exclusivamente nas membranas externas de bactérias didérmicas e desempenham uma ampla variedade de funções, como transportadores ativos e passivos, como receptores, enzimas, ou ainda como parte da maquinaria de translocação celular (Wimley, 2003). Estas proteínas são altamente conservadas e capazes de serem preditas estruturalmente por ferramentas de bioinformática (Bigelow et al., 2004). A identificação de proteínas de membrana externa expostas na superfície de leptospiros são particularmente interessantes, uma vez que desempenham funções vitais, muitas vezes relacionadas à patogênese, e permitem o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune.

As atividades descritas aqui buscaram identificar *in silico*, proteínas barril- β transmembrana de *Leptospira* spp. com características interessantes para sua utilização em formulações vacinais, realizando a clonagem e expressão heteróloga, assim como, a avaliação das características antigênicas destas proteínas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem das sequências codificadoras

Dezoito proteínas de *Leptospira* spp. preditas por Santos (2015) como sendo proteínas integrais de membrana externa (OMP) e conservadas em todas as espécies patogênicas do gênero foram selecionadas para compor o trabalho.

As sequências das proteínas foram obtidas do GenBank (NCBI) e a identificação do peptídeo sinal realizada pelas ferramentas SignalP, SignalCF e Predisi. Após a retirada da sequência correspondente ao peptídeo sinal, as sequências foram submetidas à modelagem de sua estrutura tridimensional (3D) por homologia utilizando a ferramenta I-TASSER. As estruturas foram visualizadas através do software UCSF Chimera 1.11. Quando necessário, foram selecionadas para expressão apenas as porções das proteínas que compreendem a região externa à membrana.

Para amplificação das sequências codificadoras de interesse, foram desenhados *primers* (Anexo 1), com o auxílio do software VectorNTI11 (Invitrogen), com base nas sequências das proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, depositadas no GenBank (NCBI), com a adição de sítios para enzimas de restrição visando a clonagem dos genes no vetor pAE.

A amplificação das sequências de interesse foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde, *primers forward* e *reverse* (0,4 µM cada) e utilizando o tampão PCR Master Mix (Promega). A reação foi realizada em termociclador *Eppendorf* (modelo *Mastercycle Gradient*) e padronizada nas seguintes condições: desnaturação inicial (94 °C, 3 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento com temperaturas específicas para cada gene, variando de 50 °C a 56 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 60 s. Ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72 °C, 5 min).

Os genes amplificados foram inseridos no vetor pAE. Para isso foram realizadas etapas de digestão dos fragmentos de PCR e do vetor com enzimas específicas para os sítios existentes em cada oligonucleotídeo. Foram realizados processos de digestão com incubação a 37 °C por 1h. Após a digestão, os fragmentos foram ligados aos vetores utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 16 °C por

16-18 h. Os plasmídeos recombinantes gerados por esse processo foram confirmados através de sequenciamento de DNA.

Expressão heteróloga das proteínas recombinantes

Para expressão dos polipeptídeos, os vetores recombinantes foram inseridos na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) pelo processo de transformação por choque térmico. Foram utilizados 100 µl de CaCl₂, uma colônia isolada de *E. coli* BL21 (DE3) Star e 2 µl de cada plasmídeo (incubação por 30 min a 0 °C, seguido de 30 seg a 42 °C e 2 min a 0 °C), sendo logo após, inoculado à cada reação 1 ml de meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, e 20 mM glicose). Os cultivos foram agitados por 1 h a 37 °C e plaqueados em meio ágar LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% ágar-ágar) contendo 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina.

Posteriormente, para cada proteína de interesse, um clone recombinante foi utilizado para inocular 25 ml de LB contendo 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina e cultivado sob agitação de 200 rpm, por 12 – 18 h a 37 °C. Esta cultura foi utilizada para inocular 500 ml de LB com 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina, que foi incubado a 37 °C e agitação de 200 rpm até a fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão dos polipeptídeos foi induzida com 1 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo), durante 3 h. Após este período, a cultura foi fracionada em tubos de 250 ml e centrifugada a 7.000 × *g* por 15 min a 4 °C. O pellet foi suspenso em um tampão de solubilização (8 M de ureia, 0,1 M de Tris-base, 0,5 M de NaCl e 20 mM de imidazole, pH 8,0) e incubado em agitador orbital a 60 rpm por 18 h, à 4 °C. As células foram então sonificadas (6 pulsos de 60 MHz por 30 s e centrifugadas (11.000 × *g* por 30 min a 4 °C).

Os polipeptídeos foram purificados através de cromatografia de afinidade utilizando colunas Niquel-Sepharose, HisTrap (GE HealthCare). As frações contendo a proteína purificada foram identificadas através de SDS-PAGE 12% e *Western blot* utilizando anticorpo anti-6xHIS (Sigma-Aldrich) como previamente descrito (Silva et al., 2007) As alíquotas foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) *overnight* a 4 °C e armazenadas a – 20 °C.

Avaliação do reconhecimento por soro humano convalescente das proteínas rLIC10881 e rLIC11086

As proteínas rLIC10881 e rLIC11086 foram selecionadas para a identificação da antigenicidade e da manutenção de seus epítomos nativos. Para isto, foi realizado um *Western blot* utilizando soro humano convalescente de pacientes com leptospirose, previamente confirmado pelo teste de microaglutinação (MAT) com título ≥ 800 contra *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Os soros foram diluídos na proporção de 1:100 e o anticorpo secundário, anti-IgG Humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), utilizado na diluição de 1:5000 em PBS-T. O anticorpo primário foi incubado a 4°C *overnight*; todas as outras etapas foram realizadas por uma hora a temperatura ambiente. Os resultados foram visualizados através da técnica de quimioluminescência seguindo o protocolo do kit Amersham ECL Prime Western Blotting detection kit (GE HealthCare).

RESULTADOS

Dezessete das 18 proteínas avaliadas tiveram suas estruturas de barril- β transmembranas confirmadas através da abordagem *in silico* utilizada, indicando sua possível localização na membrana externa do patógeno (Figura 1). A metodologia empregada permitiu a clonagem e expressão de nove das 17 proteínas. A confirmação da clonagem, realizada através de sequenciamento do DNA, identificou que todos os vetores recombinantes possuíam as sequências previstas.

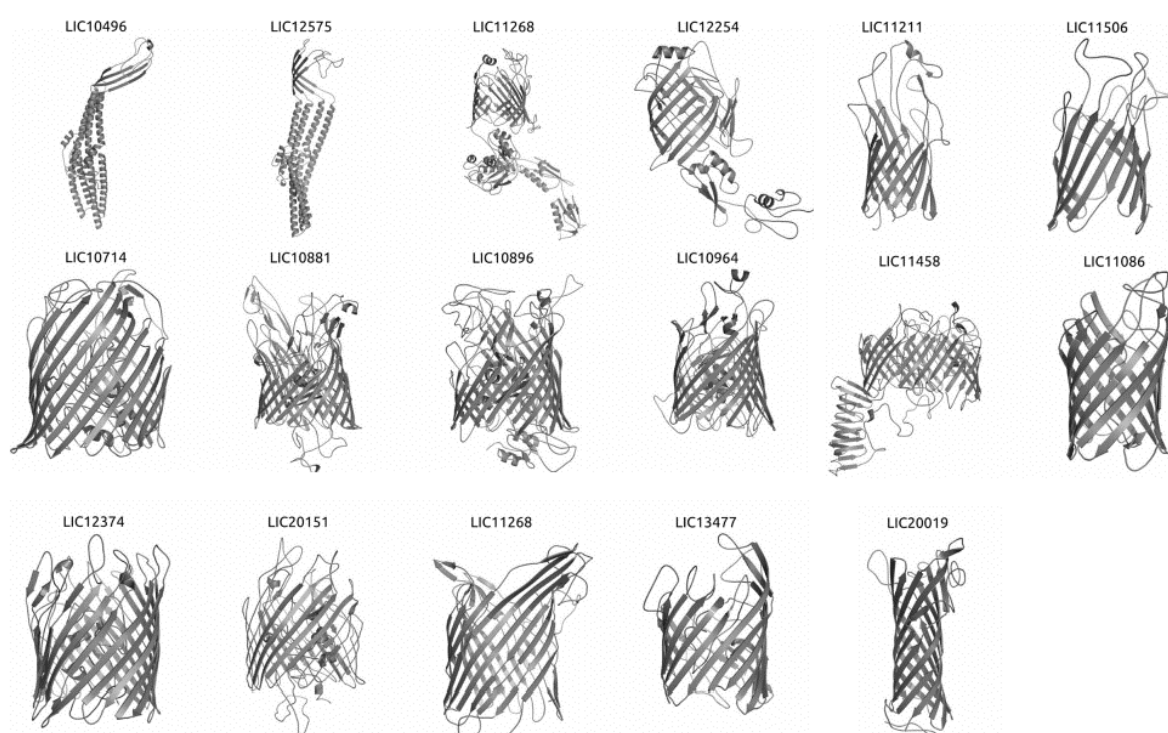


Figura 1. Predição estrutural por homologia de 17 proteínas integrais de membrana externa de *Leptospira* spp.

Foram corretamente expressas as proteínas: rLIC10496, rLIC10881, rLIC10964, rLIC11086, rLIC11268, rLIC11458, rLIC12374, rLIC20019, rLIC20151, como caracterizado através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHIS (Figura 2). Todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel, visto a característica altamente hidrofóbica destas, sendo solubilizadas em ureia.

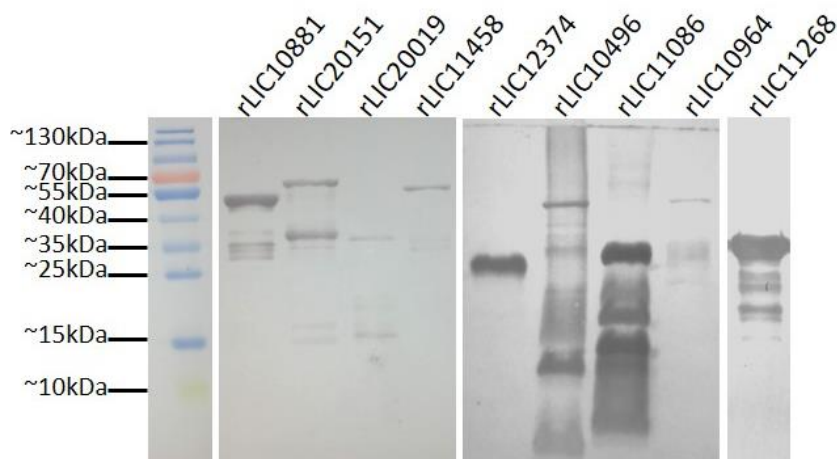


Figura 2. Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHIS demonstrando a expressão de proteínas integrais de membrana externa de *Leptospira* spp.

Testes de antigenicidade foram realizados com as proteínas rLIC10881 e rLIC11086, as quais demonstraram manter os epítomos da proteína nativa, sendo estes reconhecidos por anticorpos IgG de pacientes infectados com o patógeno (Figura 3).

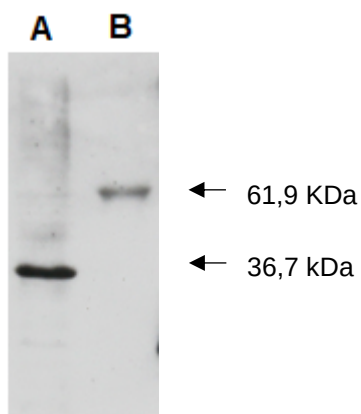


Figura 3. Western blot demonstrando o reconhecimento por soro humano convalescente das proteínas rLIC11086 (A) e rLIC10881 (B).

4.2 Manuscrito - Construction and evaluation of recombinant chimeric proteins using *Leptospira* spp. fragments identified by reverse and structural vaccinology

Este manuscrito foi formatado de acordo com as normas do periódico *Clinical and Vaccine Immunology* (CVI). Para uma melhor leitura, as figuras foram inseridas no texto.

Construction and evaluation of recombinant chimeric proteins using *Leptospira* spp.
antigen fragments identified by reverse and structural vaccinology

Running title: Leptospirosis vaccine development by structural approach

Everton B Bettin,¹ Amanda S Hecktheuer,¹ André A Grassmann,² Alan J A McBride,¹
Odir A Dellagostin^{1#}

Affiliations

¹ Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

² Department of Medicine, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA.

Correspondent Footnote

Odir A. Dellagostin, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. Tel.
+55 53 3275 7350

ABSTRACT

Leptospirosis is among the leading zoonotic causes of morbidity and mortality worldwide. A new and effective vaccine against leptospirosis will likely include surface-exposed epitopes that are conserved among the pathogenic leptospires and can generate a neutralizing immune response. Our group recently employed a bioinformatics approach to identify seventeen leptospiral beta-barrel transmembrane proteins (β b-OMP) with vaccine potential, solving their three-dimensional (3D) structure. This study aimed to identify and evaluate exposed and conserved fragments in those β b-OMPs using a reverse and structural vaccinology approach. T and B cell epitopes were in silico predicted and mapped onto the 3D models for each β b-OMP. Five chimeric proteins were constructed with 43 segments containing immunogenic and conserved epitopes presented on the bacterial surface. Each chimera comprised 6 to 11 different surface-related immunogenic regions. The DNA coding sequences for each of the constructions were chemically synthesized and cloned into the *E. coli* expression vector pAE. Human convalescent sera recognized four of the five recombinant proteins. A partial, not-significant protection was observed after immunizations, with Chimera 1 and Chimera 3 inducing a 44% and 33% protection following homologous challenge. This study represents the first of its kind to report the use of structural approaches to develop vaccines against leptospirosis.

Keywords: Leptospirosis, beta-barrel transmembrane protein, chimera, epitope-based vaccine.

INTRODUCTION

Over the years, scientists have used different approaches to develop vaccines that can induce an ideal immune response. The most commonly employed vaccination strategy uses live or attenuated pathogens. This approach has achieved success against many diseases, making vaccination the most effective medical intervention to reduce the impact of infectious diseases (1). However, for other diseases, traditional approaches have failed to induce long-term protection without presenting side effects.

Leptospirosis is among the main zoonosis in terms of morbidity and mortality rates in the world. The global incidence is estimated to be over one million cases every year, resulting in ~60.000 deaths (2). The current leptospiral vaccines are inactivated whole-cell preparations (bacterins) that have widespread veterinary applications but limited applicability in humans. Bacterins confer a short-term immune response that can only protect against the serovars that are included in the vaccine preparation (3).

The natural response against leptospiral whole cell immunization is primarily directed to lipopolysaccharide (LPS), conferring serovar-specific protection. However, given the fact that there are more than 300 known leptospiral serovars, this approach is inadequate. In addition, the T-cell-independent pattern of LPS immune stimulation does not induce an immunological memory (3). Local and systemic side effects following bacterin vaccination are also commonly reported, and it is likely that these are caused by contaminating proteins being carried from the culture medium (4).

Several recombinant proteins have been evaluated as a means of developing new, improved leptospiral vaccines; however, these have only been moderately successful (3, 5). Despite the reported protection conferred by recombinant vaccines, they have failed to achieve heterologous protection, highlighting the need to evaluate highly conserved leptospiral proteins.

In the last few decades, reverse vaccinology has contributed to the successful development of new vaccines for several infectious diseases. The *in silico* approach facilitates the reduction in the number of targets, allowing to evaluate, *in vitro* or *in vivo*, each potential candidate and enhancing the chances of identifying a protective antigen (6). However, only a few works have applied this approach to identify antigens that can protect against leptospirosis (6-8). Another recent approach to developing next-generation vaccines is the structural vaccinology. This strategy aims to use protein structure information to identify and design epitopes with potential for vaccines development, enhancing the immunogenicity and breadth of protection (9).

A new and effective universal vaccine against leptospirosis will likely include surface-exposed epitopes that are conserved among the pathogenic leptospires and able to generate a neutralizing immune response (10). Our group recently used reverse and structural approaches to identify eighteen leptospiral transmembrane beta-barrel outer membrane proteins (β b-OMP) (11). These proteins are outer-membrane exclusive and appear to play essential functions in bacterial metabolism, therefore being potential vaccine candidates (11, 12).

The presence of antigenic determinants that are recognized by the immune system is required to activate and generate a protective immune response (13). The mapping of T cell and B cell linear epitopes to construct multi-epitope vaccines have already demonstrated success, as previously reported (14). To develop a multi-epitope vaccine that can elicit a humoral immune response against extracellular pathogens is important to identify T CD4⁺ and B cell epitopes. The T cell epitopes that are selected for this vaccine must have the capability to be presented by several class II major histocompatibility complexes (MHCII) to stimulate helper T cells. In addition, the induction of a protective humoral response depends on the direct recognition of

exposed epitopes by B cell receptors (13, 15). Despite the presence of on outer-membrane, only a few portions of β b-OMP are exposed and permit antibody accessibility and, therefore, represent interesting immune targets.

In this work, we aimed to identify exposed and conserved sequences of *Leptospira* spp. transmembrane β b-OMP within T and B cell epitopes. Selected fragments were combined on multi-epitopes chimeric proteins and evaluated for immunogenicity.

RESULTS

Identification of T and B cell epitopes on leptospiral surface

Our group recently identified and predicted the structural model of 17 β b-OMP that are promising vaccine candidates (11). In the present study, we analyzed those proteins by mapping predicted T CD4⁺ and B cell epitopes outside the bacterial surface. All proteins seem to have external loops containing these epitopes. We found 43 of these fragments within all proteins (Figure 1). The numbers of fragments identified on each protein were highly variable. Six fragments were found on LIC10896, while a single fragment was selected for three other proteins (Table 1).

Conservation of selected fragments among *Leptospira* spp.

The selected peptides were analyzed by multiple sequence alignment to determine the conservation on orthologues sequences. All sequences are conserved in other pathogenic species. Thirty-one of 43 segments have $\geq 80\%$ identity with proteins in at least eight pathogenic species. Fragment from LIC10496 shows a complete identity in *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. noguchi*, but the lowest identity

(64.81-20.93%) with other *Leptospira* spp. Only three peptides exhibited less than 70% identity with five or more species (Figure S1).

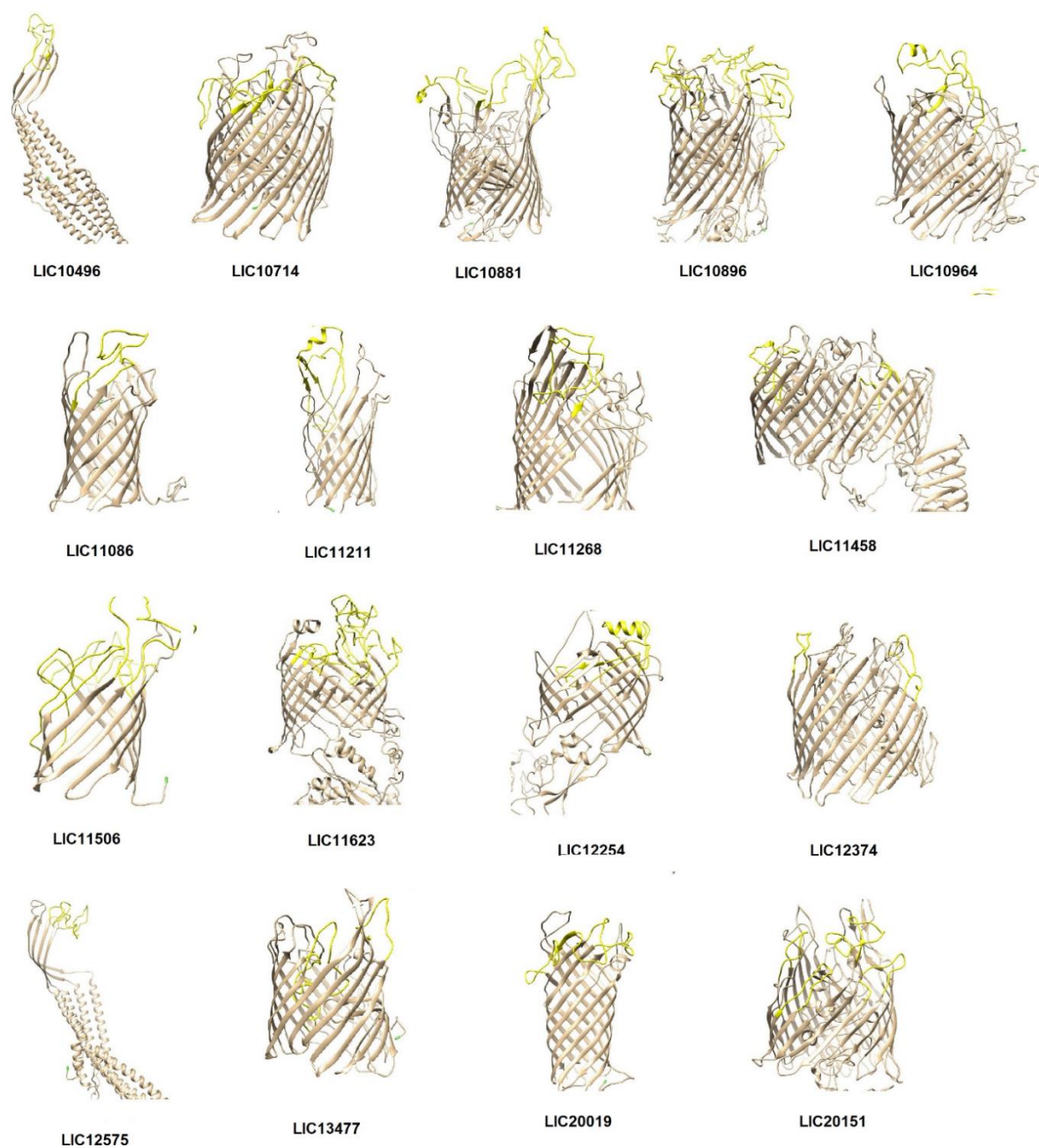


Figure 1. Selected fragments for chimeric proteins composition mapped in three-dimensional (3D) proteins structures. 43 fragments (Yellow) containing B and T cell epitopes were found in all 17 analyzed proteins and selected to compose the chimeras. Structural modelling was performed by I-Tasser and sequences were individually mapped for exposed epitopes.

Table 1. Aminoacids sequences of selected exposed fragments containing B and T cell epitopes. Proteins aminoacids sequences were submitted to BepiPred and NetMHCII to B cell (bold) and T cell (underlined) epitope predictions, respectively.

Protein	Sequence
LIC10496	NNNQETHDSYGVNFNLV MPLLGSSVQSNNGTGVQKDGNGIQTYPGFGNQTVGPGT
LIC10714	PPTPDYAIFGNGFNPPPTGVASSEYSLAKSGNV <u>RTILRQQTIDPVTNQPDNPSQEVDKGSK</u> RADARMNQYSIDTSKITADQSLDFVVTQKDKNGNYVPYVSKDT
LIC10881	<u>RNYFNEVTENGLDMLVLDITKIGYPPSLYKRVOT</u> QIDLDPITYNFIHQQLLNSSDVKSULEGDSVRT PYAMDPFSRNRDLMRSLDPNADLSLVRRSN
LIC10896	TPVVGSKSITSEQFNSQLLPSAAPPSSSSNSSSSLSFSIQPVYS YNRSYNYREEANARFQASNPISYILKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNLNLAYEPK <u>IGQOFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI</u> WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR <u>REIAQRNFTGSDRDVIYPIPGEVIYNPLAYANGNRKIYER</u> SWNGFNSTYGCKTNSEEERLLLVRANICDAT <u>DSKIYGLISTGQVDPLSTYAAYSPTTLNRPLQGQSD</u>
LIC10964	DLLDNPNENPGATVSQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQR <u>IQNEIYAASIAQIDLD SGLPKYEYKQGN</u>
LIC11086	SKSQPSNLQDNDGIVYWL RNPSSSPPEETYLLKKT
LIC11211	FGQETEEQSKFYGPYLKVSTGFPSFDSQLEKKLNTYE <u>TPKRDIYIGDSYTAEDRKTKINGLEYSTSEANELIANGRTL DVI</u>
LIC11268	FDYSHNADFDRKTQDDRNYATQNSQ <u>TANNSVSIKNNTDLREGFVQLKNFADG</u>
LIC11458	VDRGALYSADPNAPLRNIGPDVEPW <u>SYEYLR TSSNLRFGIPLLFFNTTYRKTEIYKPELQDPILGKTRQH</u>
LIC11506	RWETPYDYTSYTERSI LETTIKTDSIKQNQKVLIP <u>EIELANPNTNVIESGTLGYETRKQYFNPM LRS</u> TQGTRFYKQALALE SITVSAGTAGAQGIY <u>NYIYSYFSYYSFHQTDIRLQTSSLDPFISENSSAPILHMFERSGNHDILQ</u>
LIC11623	IYNVGAVSITENNNQSQSIKEQAIYSR <u>IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYND AKYPAEWRDGA</u> LYEEVNRATGVRKDLFETYDQVRREAQMKDPVGYLANNYNL TALRKADYTFEELNNP <u>ANLVLSGNNVALDK</u> <u>FAQKLKYTG VADHPETKFESDNAFOE</u>
LIC12254	NGKTKVTEDAEAGKIIGANGGNVKS <u>AFGLTEGDAPFFEYRNLWSTEGGITGLGGLRTL RGYKQDR</u>
LIC12374	DQNFYSYKNDHGT VVLNTLDDTIDRRKNAS FPSEEPWYRRQDPLSGDIK
LIC12575	<u>ILPFNQANFFTGT KISDDTIKGGIEKVLQTTGT YFKIEAGSRRFDSNAFENPSTTPAGFSS</u> LGIPP
LIC13477	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS TGRPGFDKDGNRANLKGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG
LIC20019	FETGTKYPNLSGLKGG <u>FELGDPTVERGTKISTREFSYDTPYTFIGSRNFADGKG</u>
LIC20151	<u>PGYRLVPNSQATTGN</u> <u>DTRDLSSDRPLEGRALH</u> SSTNNLSAAGQDIYIPSEVKLNENPPVIY <u>DNLLNQYELAYNPTRPRFYY</u>

Design and heterologous expression of recombinant chimeric proteins

All forty-three identified fragments were selected to compose chimeric proteins. Five chimeric proteins were designed to contain surface-related epitopes from 3-4 β -OMPs; each chimera comprised 6 to 11 different surface-related immunogenic regions and molecular weights of 30-41 kDa (Figure 2).

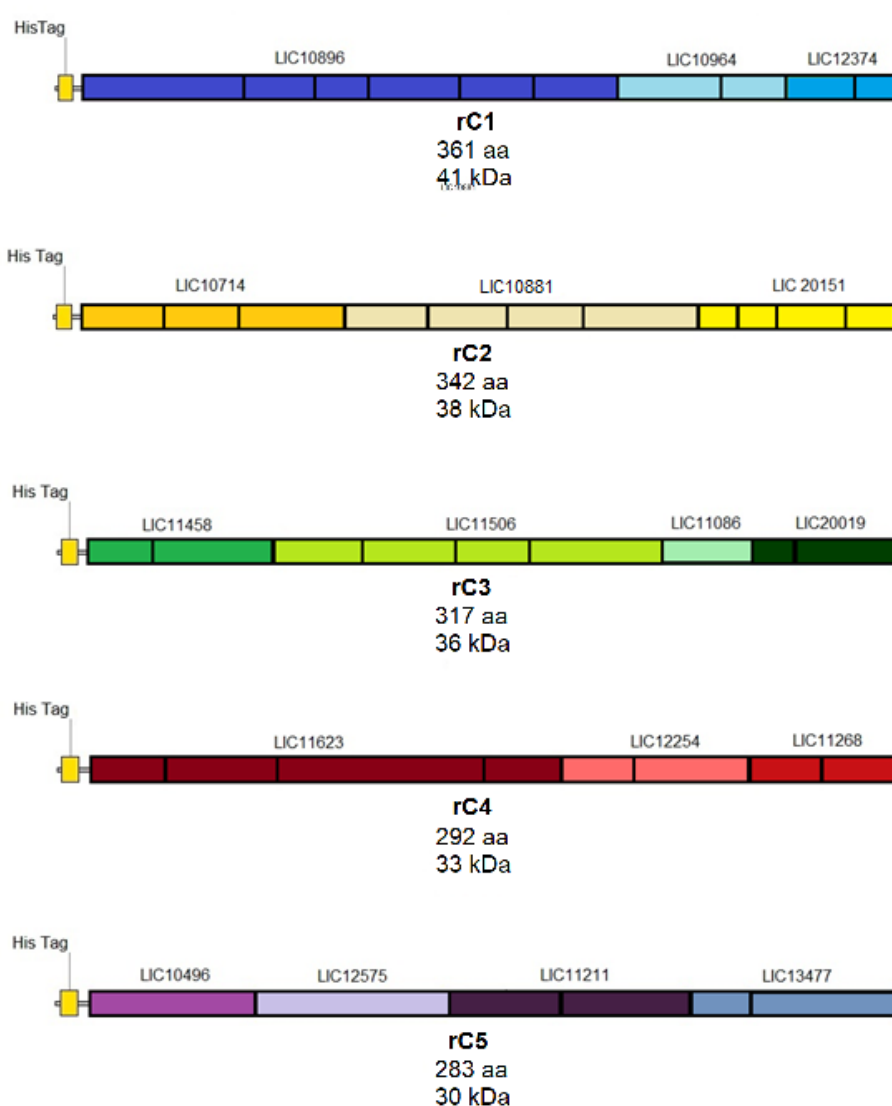


Figure 2. Graphic representation of the five chimeric proteins. Five molecules were constructed with exposed fragments containing immunogenic epitopes. Blocks representing protein fragments; Colors representing each protein.

All five chimeric proteins were expressed by and purified from *E. coli* as shown by Western blot (Figure 3). *E. coli* BL21 (DE3) Star failed to express Chimera 5, which was successfully expressed using the PlysS strain. Chimeric proteins were expressed in inclusion bodies and solubilized with 8M urea. No precipitation was observed for any protein after dialysis against sodium-phosphate buffer. Four out of five chimeric proteins were recognized by a pool of human convalescent sera, showing that the recombinant proteins maintained some antigenicity of native proteins (Figure 4).

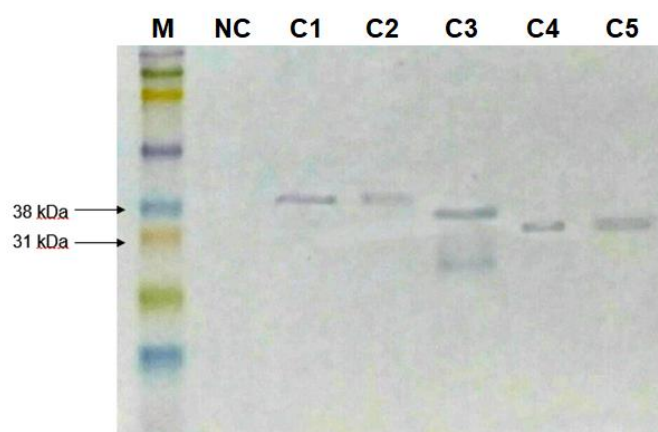


Figure 3. Western blot of recombinant chimeric proteins expression using Anti-6xHIS monoclonal antibody (Sigma-Aldrich). M: Full-Range Rainbow Marker (GE HealthCare); NC: Negative control, *E. coli* BL21 (DE3) Star; C1-C5: Chimera 1-5.

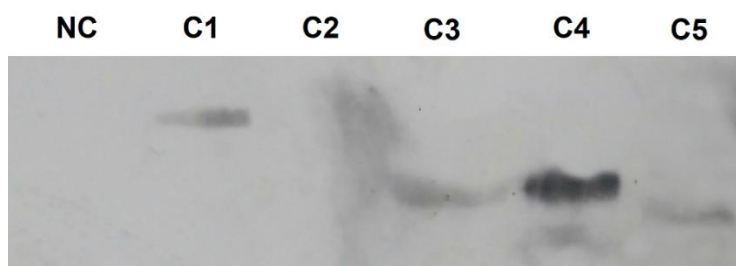


Figure 4. Western blot of recombinant chimeras with convalescent human sera. NC: Negative control, Bovine serum albumin (BSA); C1-C5: Chimera 1-5.

Immunogenicity of chimeric protein formulations

The ability of chimeric proteins to induce a humoral immune response was evaluated in rats and hamsters. The rats produced a high humoral immune response induced against all five molecules, allowing the achievement of hyper-immune sera against all constructions (data not shown). However, in hamsters immunized with Chimeras adsorbed in $\text{Al}(\text{OH})_3$ adjuvant, Chimera 2 and Chimera 4 failed to induce a humoral immune response (Figure 5a). The group immunized with the combination of all proteins (pool) maintained the pattern of the humoral immune response observed in individual protein immunizations (Figure 5b). An ELISA using protein rLIC11086 as the coating antigen was also performed. LIC11086 fragment presented in Chimera 3 was the shortest fragment (35 aa) used in chimeric proteins constructions. Chimera 3 formulation showed to correctly induce antibodies against rLIC11086 (Figure 5c).

Immunization and challenge experiments

The chimeric proteins were evaluated for their potential to induce a protective immune response against lethal challenge. At 30 days post-challenge, a partial non-significant survival was seen in some of the groups vaccinated with chimeric formulations (Table 2). The groups vaccinated with Chimera 1 and Chimera 3 exhibited 44% and 33% of protection respectively, presenting a Log-Rank statistical significance. In the conditions of this study, all the formulations failed to induce a protective immune response (Fisher's test $p < 0,05$). Leptospire were found in the kidneys of the surviving animals, indicating a lack of sterilizing immunity but demonstrating that the infection occurred properly.

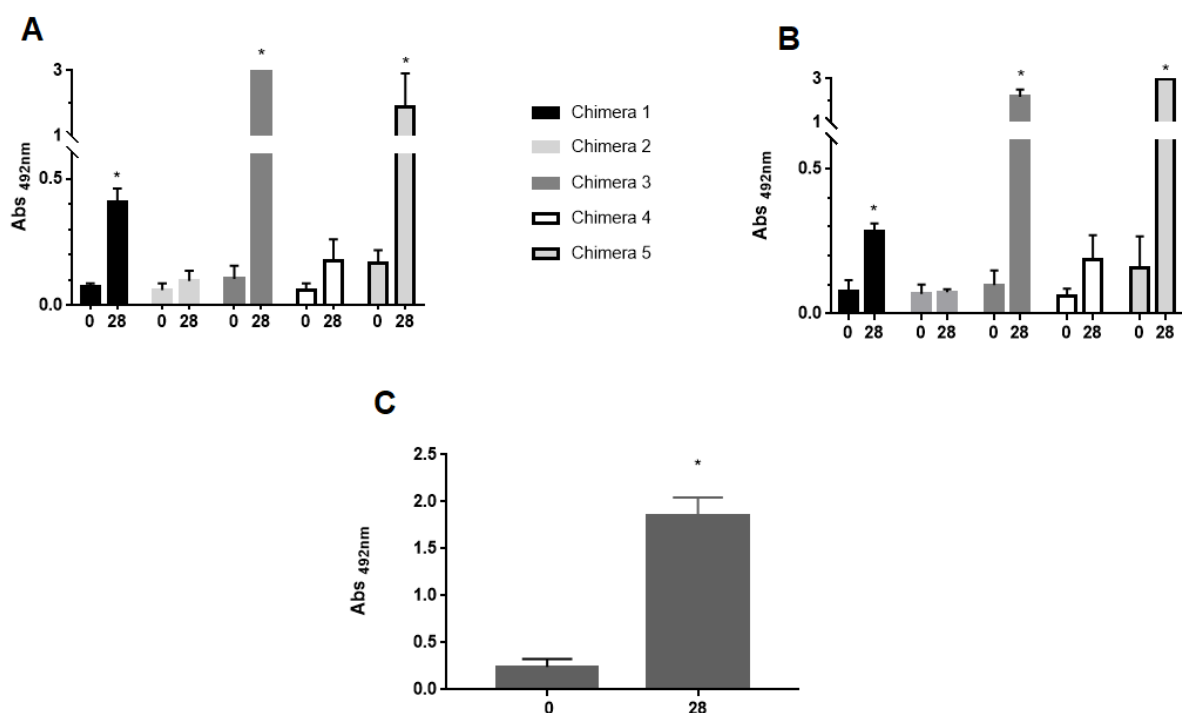


Figure 5. Humoral immune response in hamster inoculated with vaccine formulations measured by ELISA. Antibody levels in pre-immune (Day 0) and immune (Day 28) sera from: (A) animals receiving respective proteins adsorbed in Al(OH)₃; (B) animals receiving a pool containing all 5 proteins adsorbed in Al(OH)₃ tested against the respective chimeric proteins, and (C) Antibody levels against rLIC11086 induced by Chimera 3 formulation. Bars representing means with standard deviation. Significant difference at P value < 0.01 in comparison between days.

Treatment	N° survivors/total (% protection)	Fisher test p	Log Rank p
Chimera 1 + Al (OH) ₃	4/9 (44)	0,08	0,0008
Chimera 2 + Al (OH) ₃	2/9 (22)	0,47	0,3173
Chimera 3 + Al (OH) ₃	3/9 (33)	0,2	0,0116
Chimera 4 + Al (OH) ₃	0/9 (0)	1	0,1701
Chimera 5 + Al (OH) ₃	1/9 (11)	1	0,7762
Pool + Al (OH) ₃	1/9 (11)	1	0,2320
PBS + Al (OH) ₃	0/9 (0)	-	-

Table 2. Efficacy of recombinant chimeric protein vaccines in hamsters. Statistical analyses carried out with GraphPad Prism 7 software (GraphPad)

DISCUSSION

Despite decades of identification and evaluation of leptospiral recombinant proteins as vaccines, bacterins remain the commercial preparations licensed for use in animals and humans. With these whole-cell preparations presenting problems in efficacy and safety, long-term sterilizing immunity and cross-serovar protection are requisites for a new recombinant formulation against the disease (10). Only a few leptospiral antigens have been found to stimulate a protective response with reliable and reproducible results (3, 6). The leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins are the most promising vaccine candidates to date, with high and reproducible protection rates (16). Several studies have found that the non-identical portion of LigA protein (LigAni) offer protection against leptospirosis within different delivery systems; however, they did not achieve a sterilizing immune response (17-21). Our group recently demonstrated that the conserved portion of LigB and LigA (LigBrep) could confer a protective and sterilizing response against leptospirosis but additional experiments are required to confirm the results (22).

New approaches that aim to construct and evaluate the use of multi-epitope molecules to diagnosis and vaccinate against leptospirosis have already been reported. While the identification of leptospiral protein epitopes is common (23-26), only a few rational multi-epitope vaccines against the disease have been developed. Lin et al. (27) evaluated a recombinant protein containing four repeats of six T and B cell conserved epitopes from the leptospiral proteins OmpL1, LipL32, and LipL21. The protein promoted significant protection (4/5) when evaluated in the guinea pig model of leptospirosis. In addition, the chimeric construction induced a cross-reactive antibody response against various *L. interrogans* serogroups, demonstrating the advantages of a rationally multi-epitope design. Fernandes et al. (28) designed a

chimeric protein based on sequences from LigA, Mce, Lsa45, OmpL1, and LipL41 proteins. This construction failed to promote significant protection in hamsters with a 50% mortality rate, despite the presence of a previously reported protective antigen, LigA 11-13 (18). This highlighted how achieving protection against leptospirosis depends on both the composition and construction of the chimera. While both studies used linker sequences between each fragment, here, we opted to maintain only leptospiral protein sequences in the construction. The fragments used to compose the chimeras were β -barrel loops without complex domains to maintain. Methodology used in this work showed to correctly promote antibodies against leptospiral protein sequences. Sera from Chimera 3 immunized-group recognized rLIC11086, due to a 35 aa peptide, the shortest fragment used for chimeric proteins construction. The absence of linkers between the fragments does not prevent the correct induction of antibodies

In this study, we used exposed fragments from 17 previously identified β b-OMP (11). Chimera 1 and 2 are composed of epitopes from proteins predicted to be TonB-dependent receptors. These proteins were predicted to transport essential molecules, such as iron and vitamin B12, playing an important role in bacterial pathogenicity. Protein LIC11458, with epitopes presented in Chimera 3 is a LptD-like export porin that is responsible for assembling LPS in the outer membrane. LPS is an important virulence factor in *Leptospira* spp. β b-OMP also has function in proteins assembly on bacterial membrane. LIC11623 and LIC12254, with fragments presented in Chimera 4, are components of the β b assembly machinery. TolC-like efflux proteins, LIC10496 and LIC12575, which are involved in diverse molecules transport, were used to compose Chimera 5. Rationally designed vaccines that aim to induce antibodies against these proteins could impair their function in essential pathways.

The cross-serovar reactivity could be enhanced using a multi-epitope strategy through a humoral immune response that targets conserved sequences. We selected fragments that were conserved in pathogenic *Leptospira* spp. towards heterologous protection. The identification and use of conserved protein segments exhibited successful cross-protection for other pathogens (14, 29, 30). A broadly protective influenza vaccine composed of B and T cell epitopes, presented by multiple virus strains, that has cross-protective properties, is expected to enter clinical trials in the coming years (14, 29).

Besides the rational use of a multi-epitope approach, this study was a pioneer in the use of protein structure information to construct molecules aiming leptospirosis vaccine development. This approach facilitated the promotion of antibody production specific to exposed fragments, aiming to achieve a humoral immune response and bacterial neutralization. It does not eliminate the necessity to identify which exposed epitopes have a protective potential; however, it helps to eliminate immunogenic epitopes that cannot be useful for a correct humoral response.

The design of chimeric proteins composed exclusively of surface-exposed peptides allows another important advantage in the protein achievement. β b-OMP transmembrane proteins have a high hydrophobic pattern with proteins aggregating in polar, hydrophilic buffers. Precipitated proteins assume tertiary structures different from the native protein, which could limit their use as vaccine antigens. Solubilization of these proteins requires the use of detergents and denaturation agents that most likely cannot be used in vaccine preparations (31). Laborious incorporation of β b-OMP in liposomes is another described strategy (31, 32). The chimeric proteins constructed here, despite being expressed as inclusion bodies, assumed a soluble pattern in

sodium-phosphate buffer after a simple dialysis protocol, representing in an improvement in protein acquisition and allowing a safe immunization.

Four out of five recombinant chimeric proteins, maintained epitopes presented on native proteins, as seen on the Western blot using human convalescent sera. The construction of molecules that contained exposed and conserved segments also seemed to represent an interesting approach to the diagnosis of leptospirosis. The potential of these proteins as diagnostic antigens needs to be further evaluated.

Despite the advantages provided by the approaches assessed, the chimeric proteins formulations failed to protect against homologous challenge. The proteins were found to be immunogenic in rat's immunization; however, this result was not replicated in hamster sera. The adjuvant was the major difference between the vaccine formulations. Freund's adjuvant is a potent oil-in-water emulsion that induces a robust cellular and humoral response (33). Although the use of Freund's adjuvant as vaccine adjuvant has been found to be successful in previous works (16, 20, 34), it is well known that the use of this adjuvant can lead to serious side effects that are not accepted in human vaccine formulations and, as such, it is substituted with alternative emulsion compounds (33). In leptospirosis challenge experiments, vaccine formulations were prepared by adsorbing antigens in an aluminum hydroxide suspension, a widely used vaccine adjuvant; however, it failed to induce a humoral response for two out of five of the proteins, highlighting the need to evaluate chimeric proteins in other safe adjuvants. A protective immune response against leptospirosis is not completely understood, and immune modulation by adjuvants may be crucial to achieving full protection (10).

The accessibility of the antibodies to β b-OMP in Gram-negative bacteria has been widely discussed, with authors reporting a shielding effect of the

lipopolysaccharides (LPS) (35-37). Antibody accessibility to outer membrane proteins used in this work needs to be evaluated. Another limitation of this study was the prediction and use of human MHCII epitopes. Immunogenic T cell epitopes were predicted to have a high affinity to 14 HLA-DR alleles of the human major histocompatibility complex class II (MHCII). This prediction method is trained on more than 14,000 quantitative peptides binding values (38). There is no platform available through which it is possible to predict hamsters MHCII epitopes; therefore, we could not evaluate the existence of the T cell epitopes recognized during hamster immunizations.

This work reports, for the first time, the use of structural approaches to rationally design molecules towards leptospirosis vaccine development. As a proof-of-concept, we used bioinformatics tools to construct chimeric proteins that were designed to induce a targeted humoral immune response against exposed and conserved leptospiral peptides. All the approaches used to construct the molecules were based on in silico tools. Despite the advantages achieved in terms of cost and time consumed, confirmation of protein localization and epitope prediction through experimental works is required. The methodology used represents an advancement in the field and can be applied to other proteins and pathogens to identify protective epitopes. New chimeric proteins are already being designed using these approaches.

MATERIALS AND METHODS

Identification of T and B cells epitopes on the leptospiral surface

Seventeen β b-OMP leptospiral proteins that have been previously identified and structurally predicted by our group (11) were employed in this work. The sequences of

T cell epitopes with high affinity to fourteen human major histocompatibility complex class II (MHCII) HLA-DBR alleles were predicted using NetMHCII 2.2. For linear B cell epitope prediction, amino acid sequences were submitted to BepiPred 1.0.

T cell epitopes with strong binding affinity ($IC_{50} < 50nM$) and amino acid residues with a score higher than 0.35 in B epitope analysis were selected. Epitopes were manually mapped onto the 3D models of each βb -OMP, and those presented on the leptospiral surface were used for further analysis. The conservation of selected fragments in other pathogenic leptospiras was analyzed by multiple alignments on MUSCLE (EMBL-EBI) against pathogenic orthologous sequences identified by BlastP.

The construction and heterologous expression of recombinant chimeric proteins

All the loops located outside the outer-membrane containing T and B cell epitopes were selected to compose the chimeric proteins. Sequences were constructed aiming to assemble different MHCII alleles recognized epitopes and maintaining a proper molecular weight for heterologous expression. Proteins with same function, as identified in our previous work (11), had their fragments composing the same chimera. Codifying sequences for each chimeric construction were chemically synthesized and cloned into the expression vector pAE using a codon optimization for *E. coli*. Codifying sequence for rLIC11086 protein was also amplified by PCR using the primers: LIC11086For (5'-CTAGATCTCACATCACACAGGTATGGG) and LIC11086Rev (5'-CGCAAGCTTTTACTTTGTCTCTTGAG), and cloned in vector pAE.

For protein expression, *E. coli* BL21 (DE3) Star and *E. coli* BL21 (DE3) PlysS strains were used. Cells were grown in Luria-Bertani (LB) medium and proteins were

expressed according to the approach previously described (20) and purified by nickel affinity chromatography using the AKTA Start automated system (GE). Purified proteins were dialyzed against phosphate saline buffer (PBS) to remove the urea and imidazole. The expression and purification of proteins were determined by SDS-PAGE and Western blot using anti-6xHIS monoclonal antibody as previously described (20) (Sigma-Aldrich).

Immunoblotting assay

Purified recombinant proteins were transferred to a nitrocellulose membrane in a Western blot assay and tested against a pool of convalescent human sera (diluted 1:100) collected from leptospirosis patients as previously confirmed by microagglutination test (MAT) with title ≥ 800 . An anti-human IgG peroxidase conjugate (diluted 1:5000) was used as a secondary antibody. The primary antibody dilution was probed overnight at 4° C; all other steps were performed within an hour at room temperature. The blot was revealed by chemoluminescence method following the Amersham ECL Prime Western Blotting detection kit (GE HealthCare) protocol.

Animal immunization

Two in vivo experiments were conducted in this work. Four-week-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used to obtain polyclonal hyper-immune sera against the chimeric constructions. Three 50- μ g doses of each purified recombinant protein were administrated. Proteins were emulsified in complete Freund adjuvant for the first dose, and in incomplete Freund adjuvant for the remaining two doses. Doses were administrated by intraperitoneal injection at days 0, 21, and 35. Two weeks after

the third dose, animals were euthanized, and blood samples were collected by cardiac puncture.

To determine the vaccine-induced protection, four to five-week-old Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were distributed into seven different treatment groups. Each treatment was composed of nine animals. Animals were inoculated twice by the intramuscular route at days 0 and 14 with 50 µg of each chimera adsorbed in 20% Alhydrogel adjuvant (Invivogen) (Groups 1 to 5), with a pool containing all chimeras (50 µg of each) adsorbed in the same adjuvant (Group 6), or a PBS-Alhydrogel formulation (Group 7). Pre-immune (Day 0) and immune (Day 28) sera samples were collected. Animals were challenged with 10^2 cells of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (20x LD₅₀). Survivors were euthanized at 30 days post-challenge, and their kidneys were collected for bacterial re-isolation. Animals were treated in accordance with the Federal University of Pelotas Ethics Committee in Animal Experimentation guidelines and all methodology was applied per the pre-approved protocols.

Humoral immune response evaluation by ELISA

Rats and hamsters inoculated with chimera formulations had their sera tested by ELISA to assess if the proteins prompted an IgG antibody response. A preliminary checkerboard analysis was performed to determine antigen and primary antibody concentrations. ELISA polystyrene plates were then coated with 50ng/well of chimeras 3 and 5; with 100ng/well of chimeras 1, 2, and 4; or with 200ng/well of rLIC11086, diluted in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) at 4°C overnight. Animal sera were used at a 1:100 dilution in triplicate within 1 hour at 37°C. Monoclonal anti-hamster and anti-rat IgG peroxidase conjugate were used as secondary antibodies. Three washes

between each step were performed using phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% Tween 20 (PBS-T). After the final five washes with PBS-T, the reactions were revealed with O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich). The reaction occurred for 15 minutes and was stopped following the addition of 25 µl of 4N H₂SO₄. Optical densities were measured at 492 nm.

Statistical analysis

Significant differences in animal mortality and survival rates among the experimental groups were determined by Fisher exact test and log-rank test. ELISA results were analyzed by one-way ANOVA and student t test. Statistical significance was assumed when p-value <0.05. All analyses were carried out using GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the financial support of Brazilian funding agencies CAPES, CNPq, and FAPERGS.

REFERENCES

1. Anderson RM. 2016. Chapter 1 - The Impact of Vaccination on the Epidemiology of Infectious Diseases A2 - Bloom, Barry R, p 3-31. In Lambert P-H (ed), The Vaccine Book (Second Edition)

2. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*.
3. Adler B. 2015. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 387:251-72.
4. Shenberg E, Torten M. 1973. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown on a chemically defined medium. *J Infect Dis* 128:642-6.
5. Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Felix SR, da Silva EF, McBride AJ. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin* 7:1215-24.
6. Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, McBride AJ, Hartwig DD. 2017. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci* 18.
7. Murray GL, Lo M, Bulach DM, Srikrum A, Seemann T, Quinsey NS, Sermswan RW, Allen A, Adler B. 2013. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine* 31:495-9.
8. Hartwig DD, Forster KM, Oliveira TL, Amaral M, McBride AJ, Dellagostin OA. 2013. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 20:747-52.

9. Cozzi R, Scarselli M, Ilaria Ferlenghi IF. 2013. Structural Vaccinology: A Three-dimensional View for Vaccine Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13:2629-2637.
10. Grassmann AA, Souza JD, McBride AJ. 2017. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol* 8:256.
11. Grassmann, Kremer FS, dos Santos JC, Souza JD, Pinto LdS, McBride AJA. 2017. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front Immunol* 8:463.
12. Ulrich T, Rapaport D. 2015. Biogenesis of beta-barrel proteins in evolutionary context. *International Journal of Medical Microbiology* 305:259-264.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From Vaccines to Memory and Back. *Immunity* 33:451-463.
14. Oyarzún P, Kobe B. 2016. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12:763-767.
15. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics* 53:405-414.
16. Evangelista KV, Lourdault K, Matsunaga J, Haake DA. 2017. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLOS ONE* 12.

17. Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, Bacelo KL, Amaral M, Hartleben CP, Dellagostin OA. 2013. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 20:725-31.
18. Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, Aleixo JA, Haake DA. 2011. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis* 5.
19. Hartwig DD, Bacelo KL, Oliveira PD, Oliveira TL, Seixas FK, Amaral MG, Hartleben CP, McBride AJ, Dellagostin OA. 2014. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. *Curr Microbiol* 68:524-30.
20. Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA, Haake DA, Reis MG, Ko AI. 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 25:6277-86.
21. Lourdault K, Wang LC, Vieira A, Matsunaga J, Melo R, Lewis MS, Haake DA, Gomes-Solecki M. 2014. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun* 82:893-902.
22. Conrad NL, Cruz McBride FW, Souza JD, Silveira MM, Felix S, Mendonca KS, Santos CS, Athanazio DA, Medeiros MA, Reis MG, Dellagostin OA, McBride

- AJ. 2017. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*.
23. Maneewatch S, Adisakwattana P, Chaisri U, Saengjaruk P, Srimanote P, Thanongsaksrikul J, Sakolvaree Y, Pongpan P, Chaicumpa W. 2014. Therapeutic epitopes of *Leptospira* LipL32 protein and their characteristics. *Protein Eng Des Sel* 27:135-44.
 24. Lin X, Zhao J, Qian J, Mao Y, Pan J, Li L, Peng H, Luo Y, Yan J. 2010. Identification of immunodominant B- and T-cell combined epitopes in outer membrane lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clin Vaccine Immunol* 17:778-83.
 25. Jiang JK, Lin XA, Yan J. 2008. Prediction and immunologic identification of antigenic epitopes in genus-specific outer membrane protein LipL41 of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:585-91.
 26. Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. 2009. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol* 49:641-5.
 27. Lin X, Xiao G, Luo D, Kong L, Chen X, Sun D, Yan J. 2016. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol* 16:241.
 28. Fernandes LG, Teixeira AF, Filho AF, Souza GO, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Romero EC, Nascimento AL. 2017. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *Int J Infect Dis* 57:61-69.

29. Gottlieb T, Ben-Yedidia T. 2014. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *J Autoimmun* 54:15-20.
30. Alves-Silva MV, Nico D, Morrot A, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. 2017. A Chimera Containing CD4+ and CD8+ T-Cell Epitopes of the *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) Optimizes Cross-Protection against *Leishmania amazonensis* Infection. *Frontiers in Immunology* 8:100.
31. Otzen DE, Andersen KK. 2013. Folding of outer membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531:34-43.
32. Schwendener RA. 2014. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2:159-82.
33. McKee AS, Marrack P. 2017. Old and new adjuvants. *Current Opinion in Immunology* 47:44-51.
34. Koizumi N, Watanabe H. 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22:1545-52.
35. Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge E, Rosenqvist E. 2001. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine* 19:1526-1533.
36. van der Ley P, Kuipers O, Tommassen J, Lugtenberg B. 1986. O-antigenic chains of lipopolysaccharide prevent binding of antibody molecules to an outer membrane pore protein in *Enterobacteriaceae*. *Microb Pathog* 1:43-9.
37. Patel Dhilon S, Re S, Wu Emilia L, Qi Y, Klebba Phillip E, Widmalm G, Yeom Min S, Sugita Y, Im W. 2016. Dynamics and Interactions of OmpF and LPS:

Influence on Pore Accessibility and Ion Permeability. *Biophysical Journal* 110:930-938.

38. Nielsen M, Lund O. 2009. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* 10:296.

5 DISCUSSÃO GERAL

A identificação e avaliação de novos antígenos contra a leptospirose é uma necessidade evidente. Diversos estudos vêm empregando técnicas do DNA recombinante para o desenvolvimento de vacinas de subunidade. Apesar disso, poucos trabalhos demonstraram, de forma confiável e reprodutível, estimular uma resposta imunoprotetora contra desafio letal em modelo animal, evidenciando a necessidade da utilização de novas abordagens (Adler, 2015c, Grassmann et al., 2017b). As proteínas *Leptospiral Immunoglobulin-like* (Lig), LigA e LigB são até o momento os antígenos mais promissores, demonstrando capacidade de proteção em diferentes estudos (Silva et al., 2007, Coutinho et al., 2011, Lourdault et al., 2014, Evangelista et al., 2017, Conrad et al., 2017). Porém, uma proteção heteróloga, necessária para o controle desta zoonose, ainda não foi descrita. A capacidade da proteína LigBrep de conferir uma imunidade esterilizante foi recentemente reportada (Conrad et al., 2017). Uma imunidade esterilizante de longa duração e uma proteção cruzada contra diferentes sorovares são requisitos necessário para uma formulação recombinante contra a doença.

Neste trabalho foram utilizadas proteínas barril- β transmembrana de *Leptospira* spp. que demonstraram ser conservadas em diferentes espécies patogênicas do gênero. Estas proteínas possuem características interessantes para sua utilização em composições vacinais. Em bactérias didermes, proteínas que assumem esta conformação se localizam exclusivamente na membrana externa, o que permitiria a acessibilidade de uma resposta imune direcionada. A dificuldade em determinar a localização celular de proteínas de espiroquetas, devido a fragilidade da membrana externa destes organismos, torna ainda mais interessante a abordagem utilizada, visto a predição indireta de localização. As proteínas que compuseram este trabalho possuem prováveis funções essenciais para o patógeno. Grassmann et al. (2017) as descreve como receptoras TonB-dependentes, com papel na captação de nutrientes como zinco, ferro e vitamina B12; como proteínas LptD-Like, com funções na alocação do LPS leptospiral; assim como proteínas de efluxo TolC-like e proteínas BamA-like. Estes possíveis papéis no metabolismo do patógeno são interessantes para a utilização destes antígenos buscando-se uma resposta imune que neutralize

estas funções, tornando todas as proteínas identificadas potenciais candidatos vacinais a serem futuramente avaliados.

Embora proteínas barril- β demonstrem ser interessantes alvos vacinais, algumas dificuldades são reconhecidas para a aquisição e utilização destas proteínas em sua forma recombinante como antígenos vacinais. A alta hidrofobicidade, característica de proteínas integrais de membrana promove a precipitação proteica em tampões polares. A solubilização destas proteínas requer o uso de detergentes e agentes desnaturantes que dificultam a sua utilização em formulações vacinais. A incorporação das proteínas barril- β em lipossomos é outra estratégia interessante, porém laboriosa, descrita para a solubilização destas proteínas (Otzen e Andersen, 2013, Schwendener, 2014). Neste estudo, todas as proteínas integrais de membrana expressas formaram agregados proteicos após dialise contra tampão fosfato-salino, dificultando suas avaliações como antígenos vacinais. Proteínas precipitadas assumem uma estrutura terciária diferente da proteína nativa, a qual pode dificultar o correto reconhecimento de seus epítomos (Wang et al., 2012).

Frente as dificuldades encontradas na obtenção das proteínas integrais de membrana, optou-se pela construção de uma metodologia para o desenvolvimento de quimeras recombinantes. A modelagem estrutural *in silico* permitiu identificar a orientação de inserção destas proteínas na membrana, e consequentemente, as porções expostas de cada proteína. Este estudo foi pioneiro no uso de informações estruturais de proteínas de *Leptospira* spp. para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose.

A construção de quimeras utilizando apenas porções externas de cada proteína visou a promoção de uma resposta imune humoral e a possível neutralização da bactéria. Esta abordagem não elimina a necessidade de se identificar quais fragmentos expostos possuem capacidade protetora, mas permite descartar aqueles que não permitem a promoção de uma resposta humoral correta. Além disso, a utilização apenas de porções externas, menos hidrofóbicas, das proteínas integrais, permitiu a obtenção de proteínas recombinantes solúveis em tampão PBS após o processo de diálise, trazendo uma grande vantagem para o trabalho com proteínas barril- β . Após expressão e solubilização, quatro das 5 proteínas quiméricas construídas demonstraram manter epítomos nativos presentes na proteína nativa, sendo estes reconhecidos por soro humano convalescente. A avaliação destas

moléculas como antígenos para diagnóstico da doença, demonstra também ser interessante. Além das vantagens na solubilização utilizando porções externas à membrana, a identificação de fragmentos conservados entre diferentes espécies patogênicas, e a promoção de uma resposta imune-humoral contra estes segmentos, aumenta as chances de obtenção de uma proteção heteróloga. A identificação e utilização de fragmentos conservados combinados já demonstrou sucesso na proteção cruzada para outros patógenos (Gottlieb e Ben-Yedidia, 2014, Sahay et al., 2017).

Apesar destas vantagens as proteínas quiméricas construídas neste estudo falharam em promover uma resposta imune-protetora, não sendo observada uma sobrevivência significativa nos grupos avaliados. Para os experimentos de sobrevivência, as formulações vacinais foram preparadas através da adsorção do antígeno em suspensões de hidróxido de alumínio, adjuvante amplamente aceito para a utilização em formulações humanas e veterinárias. Porém, 2 das 5 formulações falharam em produzir uma resposta humoral, como avaliado por ELISA. A resposta imune protetora contra a leptospirose parece ser dependente de anticorpos, e além disso, a modulação imune desempenhada pelos adjuvantes parece ser crucial para a obtenção de uma proteção (Grassmann et al., 2017b). Assim, a avaliação destes antígenos em novas formulações demonstra ser interessante. A acessibilidade de anticorpos às proteínas β b-OMP em bactérias Gram-negativas é também amplamente discutida, com autores reportando um bloqueio deste reconhecimento por lipopolissacarídeos (van der Ley et al., 1986, Michaelsen et al., 2001, Patel et al., 2016). A acessibilidade dos anticorpos às proteínas utilizadas neste estudo necessita ser ainda avaliada.

Para a união das sequências referentes as alças externas à membrana das β b-OMPs, optou-se pela não utilização de *linkers* entre os segmentos, vista a ausência de domínios tridimensionais a serem mantidos. Esta estratégia, difere-se da utilizada por outros autores. Lin et al. (2016) construiu e avaliou uma quimera formada por epítomos de células T e B das proteínas OmpL1, LipL32 e LipL21, utilizando um *linker* de quatro resíduos de glicina para a separação de cada proteína, relatando uma proteção significativa em modelo animal cobaia de leptospirose. Fernandes et al. (2017), por sua vez, construiu uma molécula quimérica baseada em sequências das proteínas LigA, Mce, Lsa45, OmpL1 e LipL41 de *Leptospira* spp., unindo estes

segmentos através de um *linker* flexível. Esta quimera, porém, falhou em promover uma proteção significativa, apesar da utilização de segmentos proteicos que já demonstraram capacidade protetora em outros estudos, como os domínios 11-13 da proteína LigA (Coutinho et al., 2011). Estes estudos demonstram, portanto, que não só a composição das moléculas, mas também a sua construção, é uma variável importante para a obtenção de proteção.

Este trabalho descreveu pela primeira vez o uso de abordagens estruturais para a identificação e avaliação de antígenos vacinais contra a leptospirose. Através da metodologia empregada foram desenvolvidas moléculas quiméricas buscando a indução de uma resposta imune humoral apenas contra segmentos externos à membrana e conservados de *Leptospira* spp. A utilização destas abordagens representa um avanço para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, e pode ser empregada à outras proteínas na busca de epítomos com capacidade protetora. Novos antígenos estão sendo construídos e avaliados utilizando estas abordagens.

6 CONCLUSÃO GERAL

- As proteínas previamente identificadas como barril- β transmembrana tiveram sua estrutura confirmada por análises *in silico* e demonstram ser interessantes candidatos vacinais a serem futuramente testados;
- A abordagem estrutural utilizada de forma inédita, possibilita a identificação de epítomos com características imunogênicas, expostos na membrana externa, ideais para a promoção de uma resposta imune humoral;
- A metodologia utilizada permite a criação de moléculas sintéticas contendo regiões expostas e conservadas de diferentes proteínas de *Leptospira* spp., aumentando as chances de obtenção de uma vacina protetora de amplo espectro;
- Quatro das cinco moléculas quiméricas construídas foram reconhecidas por soro humano convalescente, demonstrando a manutenção de epítomos nativos e a imunogenicidade destes durante a infecção;
- As formulações vacinais contendo as proteínas quiméricas construídas falharam em promover uma resposta imune protetora frente ao desafio em modelo animal.;

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, H., IBRAHIM, I., NHO, S. W., BANES, M. M., WILLS, R. W., KARSI, A. & LAWRENCE, M. L. 2017. Evaluation of three recombinant outer membrane proteins, OmpA1, Tdr, and TbpA, as potential vaccine antigens against virulent *Aeromonas hydrophila* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 480-486.
- ADLER, B. 2014. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol.*, 172 353-8
- ADLER, B. 2015a. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 1-9.
- ADLER, B. 2015b. *Leptospira and Leptospirosis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ADLER, B. 2015c. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 251-72.
- ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-96.
- ADLER, B. & FAINE, S. 1976. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Seroovar pomona. *Infect Immun*, 14, 703-8.
- ADLER, B. & FAINE, S. 1977. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun*, 17, 67-72.
- ALMEIDA, J. G., PRETO, A. J., KOUKOS, P. I., BONVIN, A. M. J. J. & MOREIRA, I. S. 2017. Membrane proteins structures: A review on computational modeling tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859, 2021-2039.
- AMAMURA, T. A., FRAGA, T. R., VASCONCELLOS, S. A., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2017. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. *Front Microbiol*, 8, 958.
- ANDRADE, L., RODRIGUES, A. C., JR., SANCHES, T. R., SOUZA, R. B. & SEGURO, A. C. 2007. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F586-92.
- ASUTHKAR, S., VELINENI, S., STADLMANN, J., ALTMANN, F. & SRITHARAN, M. 2007. Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun*, 75, 4582-91.
- BIGELOW, H. R., PETREY, D. S., LIU, J., PRZYBYLSKI, D. & ROST, B. 2004. Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes. *Nucleic Acids Res*, 32, 2566-77.

- BOURHY, P., COLLET, L., BRISSE, S. & PICARDEAU, M. 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 4061-7.
- BRANGER, C., CHATRENET, B., GAUVRIT, A., AVIAT, F., AUBERT, A., BACH, J. M. & ANDRE-FONTAINE, G. 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun*, 73, 4062-9.
- BRANGER, C., SONRIER, C., CHATRENET, B., KLONJKOWSKI, B., RUVOEN-CLOUET, N., AUBERT, A., ANDRE-FONTAINE, G. & ELOIT, M. 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun*, 69, 6831-8.
- BRENNER, D. J., KAUFMANN, A. F., SULZER, K. R., STEIGERWALT, A. G., ROGERS, F. C. & WEYANT, R. S. 1999. 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*, 49 Pt 2, 839-58.
- BROWNING, D. F., MATTHEWS, S. A., ROSSITER, A. E., SEVASTSYANOVICH, Y. R., JEEVES, M., MASON, J. L., WELLS, T. J., WARDIUS, C. A., KNOWLES, T. J., CUNNINGHAM, A. F., BAVRO, V. N., OVERDUIN, M. & HENDERSON, I. R. 2013. Mutational and Topological Analysis of the *Escherichia coli* BamA Protein. *PLOS ONE*, 8, e84512.
- BUHLER, S. & SANCHEZ-MAZAS, A. 2011. HLA DNA sequence variation among human populations: molecular signatures of demographic and selective events. *PLoS One*, 6, e14643.
- CAMERON, C. E. 2015. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 21-41.
- CAO, X. J., DAI, J., XU, H., NIE, S., CHANG, X., HU, B. Y., SHENG, Q. H., WANG, L. S., NING, Z. B., LI, Y. X., GUO, X. K., ZHAO, G. P. & ZENG, R. 2010. High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. *Cell Res*, 20, 197-210.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., BREDA, L. C., VASCONCELLOS, S. A., FIGUEIRA, C. P., PICARDEAU, M., WUNDER, E., KO, A. I., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2016. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett*, 173, 61-8.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., SILVA, L. B., MONARIS, D., ABREU, P. A., STROBEL, S., JOZSI, M., ISAAC, L. & BARBOSA, A. S. 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*, 205, 995-1004.

- CERQUEIRA, G. M. & PICARDEAU, M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*, 9, 760-8.
- CHASSIN, C., PICARDEAU, M., GOUJON, J. M., BOURHY, P., QUELLARD, N., DARCHE, S., BADELL, E., D'ANDON, M. F., WINTER, N., LACROIX-LAMANDE, S., BUZONI-GATEL, D., VANDEWALLE, A. & WERTS, C. 2009. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*.
- CHOY, H. A., KELLEY, M. M., CHEN, T. L., MOLLER, A. K., MATSUNAGA, J. & HAAKE, D. A. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*, 75, 2441-50.
- CONRAD, N. L., CRUZ MCBRIDE, F. W., SOUZA, J. D., SILVEIRA, M. M., FELIX, S., MENDONCA, K. S., SANTOS, C. S., ATHANAZIO, D. A., MEDEIROS, M. A., REIS, M. G., DELLAGOSTIN, O. A. & MCBRIDE, A. J. 2017. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11.
- COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A. I. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9.
- COUTINHO, M. L., CHOY, H. A., KELLEY, M. M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J. T., LEWIS, M. S., ALEIXO, J. A. & HAAKE, D. A. 2011. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5.
- COZZI, R., SCARSELLI, M. & ILARIA FERLENGHI, I. F. 2013. Structural Vaccinology: A Three-dimensional View for Vaccine Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 2629-2637.
- CRODA, J., FIGUEIRA, C. P., WUNDER, E. A., JR., SANTOS, C. S., REIS, M. G., KO, A. I. & PICARDEAU, M. 2008. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun*, 76, 5826-33.
- DAHER EDE, F., ZANETTA, D. M. & ABDULKADER, R. C. 2004. Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clin Pract*, 98, 8-14.
- DE BRITO, T., AIELLO, V. D., DA SILVA, L. F., GONCALVES DA SILVA, A. M., FERREIRA DA SILVA, W. L., CASTELLI, J. B. & SEGURO, A. C. 2013. Human hemorrhagic pulmonary leptospirosis: pathological findings and pathophysiological correlations. *PLoS One*, 8.
- DE SILVA, N. L., NILOOFA, M., FERNANDO, N., KARUNANAYAKE, L., RODRIGO, C., DE SILVA, H. J., PREMAWANSA, S., HANDUNNETTI, S. M. & RAJAPAKSE, S. 2014. Changes in full blood count parameters in leptospirosis: a prospective study. *Int Arch Med*, 7, 31.

- DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., DA SILVA, E. F. & MCBRIDE, A. J. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*, 7, 1215-24.
- DHANDA, S. K., USMANI, S. S., AGRAWAL, P., NAGPAL, G., GAUTAM, A. & RAGHAVA, G. P. S. 2017. Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Briefings in Bioinformatics*, 18, 467-478.
- DOLHNIKOFF, M., MAUAD, T., BETHLEM, E. P. & CARVALHO, C. R. 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Infect Dis*, 11, 142-8.
- ELLIS, W. A., HOVIND-HOUGEN, K., MOLLER, S. & BIRCH-ANDRESEN, A. 1983. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 255, 323-35.
- ESHGHI, A., LOURDAULT, K., MURRAY, G. L., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., PICARDEAU, M., ADLER, B., SNARR, B., ZUERNER, R. L. & CAMERON, C. E. 2012. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect Immun*, 80, 3892-9.
- EVANGELISTA, K. V., LOURDAULT, K., MATSUNAGA, J. & HAAKE, D. A. 2017. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLOS ONE*, 12.
- FAINE, S. & STALLMAN, N. D. 1982. Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* *Noguchi* 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) *Noguchi* 1918. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 461-463.
- FERNANDES, L. G., SIQUEIRA, G. H., TEIXEIRA, A. R., SILVA, L. P., FIGUEREDO, J. M., COSATE, M. R., VIEIRA, M. L. & NASCIMENTO, A. L. 2016. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. *Vet Immunol Immunopathol*, 176, 50-7.
- FERNANDES, L. G., TEIXEIRA, A. F., FILHO, A. F., SOUZA, G. O., VASCONCELLOS, S. A., HEINEMANN, M. B., ROMERO, E. C. & NASCIMENTO, A. L. 2017. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *Int J Infect Dis*, 57, 61-69.
- FERNANDES, L. G., VIEIRA, M. L., ALVES, I. J., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., ROMERO, E. C. & NASCIMENTO, A. L. 2014. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. *Microbiology*, 160, 149-64.
- FIGUEREDO, J. M., SIQUEIRA, G. H., DE SOUZA, G. O., HEINEMANN, M. B., VASCONCELLOS, S. A., CHAPOLA, E. G. & NASCIMENTO, A. L. 2017. Characterization of two new putative adhesins of *Leptospira interrogans*. *Microbiology*, 163, 37-51.

- FOUTS, D. E., MATTHIAS, M. A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D. E., BULACH, D., BUSCHIAZZO, A., CHANG, Y. F., GALLOWAY, R. L., HAAKE, D. A., HAFT, D. H., HARTSKEERL, R., KO, A. I., LEVETT, P. N., MATSUNAGA, J., MECHALY, A. E., MONK, J. M., NASCIMENTO, A. L., NELSON, K. E., PALSSON, B., PEACOCK, S. J., PICARDEAU, M., RICARDI, J. N., THAIPANDUNGPANIT, J., WUNDER, E. A., JR., YANG, X. F., ZHANG, J. J. & VINETZ, J. M. 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10.
- FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2011. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*, 73, 408-19.
- FRAGA, T. R., COURROL DDOS, S., CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., HIRATA, I. Y., VASCONCELLOS, S. A., JULIANO, L., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2014. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis*, 209, 876-86.
- GOTTLIEB, T. & BEN-YEDIDIA, T. 2014. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine. *J Autoimmun*, 54, 15-20.
- GRASSMANN, KREMER, F. S., DOS SANTOS, J. C., SOUZA, J. D., PINTO, L. D. S. & MCBRIDE, A. J. A. 2017a. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front Immunol*, 8, 463.
- GRASSMANN, A. A., FELIX, S. R., DOS SANTOS, C. X., AMARAL, M. G., SEIXAS NETO, A. C., FAGUNDES, M. Q., SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., CONCEICAO, F. R. & DELLAGOSTIN, O. A. 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 740-5.
- GRASSMANN, A. A., SOUZA, J. D. & MCBRIDE, A. J. 2017b. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol*, 8, 256.
- HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BARNETT, J. K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. N. & BOLIN, C. A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, 68, 2276-85.
- HAAKE, D. A. & LEVETT, P. N. 2015. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 65-97.
- HAAKE, D. A., MAZEL, M. K., MCCOY, A. M., MILWARD, F., CHAO, G., MATSUNAGA, J. & WAGAR, E. A. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*, 67, 6572-82.

- HABARTA, A., ABREU, P. A., OLIVERA, N., HAUKE, P., CEDOLA, M. T., FERRER, M. F., HO, P. L. & GOMEZ, R. M. 2011. Increased immunogenicity to LipL32 of *Leptospira interrogans* when expressed as a fusion protein with the cholera toxin B subunit. *Curr Microbiol*, 62, 526-31.
- HARTWIG, D. D., BACELO, K. L., OLIVEIRA, P. D., OLIVEIRA, T. L., SEIXAS, F. K., AMARAL, M. G., HARTLEBEN, C. P., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN, O. A. 2014. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. *Curr Microbiol*, 68, 524-30.
- HARTWIG, D. D., FORSTER, K. M., OLIVEIRA, T. L., AMARAL, M., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN, O. A. 2013. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 747-52.
- HEINSON, A. I., WOELK, C. H. & NEWELL, M. L. 2015. The promise of reverse vaccinology. *Int Health*, 7, 85-9.
- HERMAN, H. S., MEHTA, S., CARDENAS, W. B., STEWART-IBARRA, A. M. & FINKELSTEIN, J. L. 2016. Micronutrients and Leptospirosis: A Review of the Current Evidence. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004652.
- HOKE, D. E., EGAN, S., CULLEN, P. A. & ADLER, B. 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*, 76, 2063-9.
- HSIEH, C. L., CHANG, E., TSENG, A., PTAK, C., WU, L. C., SU, C. L., MCDONOUGH, S. P., LIN, Y. P. & CHANG, Y. F. 2016. Leptospira Immunoglobulin-Like Protein B (LigB) Binds to Both the C-Terminal 23 Amino Acids of Fibrinogen alphaC Domain and Factor XIII: Insight into the Mechanism of LigB-Mediated Blockage of Fibrinogen alpha Chain Cross-Linking. *PLoS Negl Trop Dis*, 10.
- HU, Y. H., DANG, W. & SUN, L. 2012. A TonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens*: virulence and vaccine potential. *Arch Microbiol*, 194, 795-802.
- IKOEV, V. N., GORBUNOV, M. A., VACHAEV, B. F., YAGOVKIN, E. A., KONDRATENKO, V. F., ANANYINA, Y. V., ANISIMOVA, T. I., KOSTINA, N. I., YURYEVA, I. L. & NIKITIN, M. G. 1999. Evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*, 39-43.
- JESPERSEN, M. C., PETERS, B., NIELSEN, M. & MARCATILI, P. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*.
- JUNG, L. R., BOMFIM, M. R., KROON, E. G. & NUNES, A. C. 2015. Identification of *Leptospira* serovars by RFLP of the RNA polymerase beta subunit gene (rpoB). *Braz J Microbiol*, 46, 465-76.
- KING, A. M., PRETTE, G., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., TOMA, C., SUZUKI, T., ESHGHI, A., PICARDEAU, M., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2014. High-

temperature protein G is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 82, 1123-31.

KOIZUMI, N. & WATANABE, H. 2005. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. *J Postgrad Med*, 51, 210-4.

KORONAKIS, V., ESWARAN, J. & HUGHES, C. 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem*, 73, 467-89.

KYRIAKIDIS, I., SAMARA, P. & PAPA, A. 2011. Serum TNF-alpha, sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine*.

LAMBERT, A., PICARDEAU, M., HAAKE, D. A., SERMSWAN, R. W., SRIKRAM, A., ADLER, B. & MURRAY, G. A. 2012a. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun*, 80, 2019-25.

LAMBERT, A., TAKAHASHI, N., CHARON, N. W. & PICARDEAU, M. 2012b. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. *Appl Environ Microbiol*, 78, 8467-9.

LARSEN, J. E., LUND, O. & NIELSEN, M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 2, 2.

LAURICHESSE, H., GOURDON, F., SMITS, H. L., ABDOE, T. H., ESTAVOYER, J. M., REBIKA, H., POULIQUEN, P., CATALINA, P., DUBRAY, C. & BEYTOUT, J. 2007. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. *Clin Microbiol Infect*, 13, 395-403.

LEE, S. H., KIM, K. A., PARK, Y. G., SEONG, I. W., KIM, M. J. & LEE, Y. J. 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene*, 254, 19-28.

LESSA-AQUINO, C., LINDOW, J. C., RANDALL, A., WUNDER, E., PABLO, J., NAKAJIMA, R., JASINSKAS, A., CRUZ, J. S., DAMIAO, A. O., NERY, N., RIBEIRO, G. S., COSTA, F., HAGAN, J. E., REIS, M. G., KO, A. I., MEDEIROS, M. A. & FELGNER, P. L. 2017. Distinct antibody responses of patients with mild and severe leptospirosis determined by whole proteome microarray analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005349.

LEVETT, P. N. 2015. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 11-20.

LEVETT, P. N., MOREY, R. E., GALLOWAY, R. L. & STEIGERWALT, A. G. 2006. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 671-3.

LIAO, S., SUN, A., OJCIUS, D. M., WU, S., ZHAO, J. & YAN, J. 2009. Inactivation of the fliY gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol*, 9, 253.

- LIN, H. H., ZHANG, G. L., TONGCHUSAK, S., REINHERZ, E. L. & BRUSIC, V. 2008. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics*, 9 Suppl 12, S22.
- LIN, X., XIAO, G., LUO, D., KONG, L., CHEN, X., SUN, D. & YAN, J. 2016. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol*, 16, 241.
- LONGHI, M. T., OLIVEIRA, T. R., ROMERO, E. C., GONCALES, A. P., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. & NASCIMENTO, A. L. 2009. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J Med Microbiol*, 58, 1275-82.
- LOURDAULT, K., CERQUEIRA, G. M., WUNDER, E. A., JR. & PICARDEAU, M. 2011. Inactivation of clpB in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect Immun*, 79, 3711-7.
- LOURDAULT, K., WANG, L. C., VIEIRA, A., MATSUNAGA, J., MELO, R., LEWIS, M. S., HAAKE, D. A. & GOMES-SOLECKI, M. 2014. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun*, 82, 893-902.
- LUCAS, D. S., CULLEN, P. A., LO, M., SRIKRAM, A., SERMSWAN, R. W. & ADLER, B. 2011. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*, 29, 3413-8.
- MARCSISIN, R. A., BARTPHO, T., BULACH, D. M., SRIKRAM, A., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2013. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J Med Microbiol*, 62, 1601-8.
- MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., XU, X. & HAAKE, D. A. 2005. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun*, 73, 70-8.
- MATTHIAS, M. A., RICALDI, J. N., CESPEDES, M., DIAZ, M. M., GALLOWAY, R. L., SAITO, M., STEIGERWALT, A. G., PATRA, K. P., ORE, C. V., GOTUZZO, E., GILMAN, R. H., LEVETT, P. N. & VINETZ, J. M. 2008. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique leptospira associated with a *rattus* species reservoir in the peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*, 2.
- MENDE, K., GALLOWAY, R. L., BECKER, S. J., BECKIUS, M. L., MURRAY, C. K. & HOSPENTHAL, D. R. 2013. Interlaboratory agreement of pulsed-field gel electrophoresis identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg*, 89, 380-4.

- MICHAELSEN, T. E., AASE, A., KOLBERG, J., WEDGE, E. & ROSENQVIST, E. 2001. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine*, 19, 1526-1533.
- MIKULSKI, M., BOISIER, P., LACASSIN, F., SOUPE-GILBERT, M. E., MAURON, C., BRUYERE-OSTELLS, L., BONTE, D., BARGUIL, Y., GOURINAT, A. C., MATSUI, M., VERNEL-PAUILLAC, F. & GOARANT, C. 2015. Severity markers in severe leptospirosis: a cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34, 687-95.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2018. *Portal da saúde. Leptospirose, Situação epidemiológica - Dados, 2018.* [Online]. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em: 23/02/2018.
- MIYAHARA, S., SAITO, M., KANEMARU, T., VILLANUEVA, S. Y., GLORIANI, N. G. & YOSHIDA, S. 2014. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. *Int J Exp Pathol*, 95, 271-81.
- MURPHY, K. 2014. *Imunobiologia de Janeway (8. ed.)*, Artmed.
- MURRAY, G. L. 2015. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 139-85.
- MURRAY, G. L., ELLIS, K. M., LO, M. & ADLER, B. 2008. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect*, 10, 791-7.
- MURRAY, G. L., LO, M., BULACH, D. M., SRIKRAM, A., SEEMANN, T., QUINSEY, N. S., SERMSWAN, R. W., ALLEN, A. & ADLER, B. 2013. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*, 31, 495-9.
- MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HENRY, R., HARTSKEERL, R. A., SERMSWAN, R. W. & ADLER, B. 2010. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*, 78, 701-9.
- NALLY, J. E., GRASSMANN, A. A., PLANCHON, S., SERGEANT, K., RENAUT, J., SESHU, J., MCBRIDE, A. J. & CAIMANO, M. J. 2017. Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- NARAYANAVARI, S. A., LOURDAULT, K., SRITHARAN, M., HAAKE, D. A. & MATSUNAGA, J. 2015. Role of sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9.
- NASCIMENTO, A. L., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., VAN, S. M. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., CAMARGO, L. E., DIGIAMPIETRI, L. A., HARSTKEERL, R. A., HO, P. L., MARQUES, M. V., OLIVEIRA, M. C., SETUBAL, J. C., HAAKE,

- D. A. & MARTINS, E. A. 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res*, 37, 459-77.
- NIELSEN, M. & LUND, O. 2009. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics*, 10, 296.
- OSCHERWITZ, J. 2016. The promise and challenge of epitope-focused vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 12, 2113-6.
- OTZEN, D. E. & ANDERSEN, K. K. 2013. Folding of outer membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531, 34-43.
- OYARZUN, P., ELLIS, J. J., BODEN, M. & KOBE, B. 2013. PREDIVAC: CD4+ T-cell epitope prediction for vaccine design that covers 95% of HLA class II DR protein diversity. *BMC Bioinformatics*, 14, 52.
- OYARZÚN, P. & KOBE, B. 2016. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12, 763-767.
- PANICKER, J. N., MAMMACHAN, R. & JAYAKUMAR, R. V. 2001. Primary neuroleptospirosis. *Postgraduate Medical Journal*, 77, 589-590.
- PATEL, DHILON S., RE, S., WU, EMILIA L., QI, Y., KLEBBA, PHILLIP E., WIDMALM, G., YEOM, MIN S., SUGITA, Y. & IM, W. 2016. Dynamics and Interactions of OmpF and LPS: Influence on Pore Accessibility and Ion Permeability. *Biophysical Journal*, 110, 930-938.
- PEROLAT, P., CHAPPEL, R. J., ADLER, B., BARANTON, G., BULACH, D. M., BILLINGHURST, M. L., LETOCART, M., MERIEN, F. & SERRANO, M. S. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 3, 851-8.
- PICARDEAU, M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15, 297-307.
- PINNE, M., CHOY, H. A. & HAAKE, D. A. 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- PUCA, E., MAJKO, J., PUCA, E., QYRA, E., GEGA, A. & PIPERO, P. 2017. Acute encephalitis as initial presentation of leptospirosis. *J Infect Dev Ctries*, 11, 361-363.
- QIAO, S., LUO, Q., ZHAO, Y., ZHANG, X. C. & HUANG, Y. 2014. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature*, 511, 108-11.
- RAMADASS, P., JARVIS, B. D., CORNER, R. J., PENNY, D. & MARSHALL, R. B. 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 215-9.

- REN, S. X., FU, G., JIANG, X. G., ZENG, R., MIAO, Y. G., XU, H., ZHANG, Y. X., XIONG, H., LU, G., LU, L. F., JIANG, H. Q., JIA, J., TU, Y. F., JIANG, J. X., GU, W. Y., ZHANG, Y. Q., CAI, Z., SHENG, H. H., YIN, H. F., ZHANG, Y., ZHU, G. F., WAN, M., HUANG, H. L., QIAN, Z., WANG, S. Y., MA, W., YAO, Z. J., SHEN, Y., QIANG, B. Q., XIA, Q. C., GUO, X. K., DANCHIN, A., SAINT GIRONS, I., SOMERVILLE, R. L., WEN, Y. M., SHI, M. H., CHEN, Z., XU, J. G. & ZHAO, G. P. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422, 888-93.
- RISTOW, P., BOURHY, P., DA CRUZ MCBRIDE, F. W., FIGUEIRA, C. P., HUERRE, M., AVE, P., GIRONS, I. S., KO, A. I. & PICARDEAU, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, I., FILLONNEAU, C., BLANCHET, B., SUARD, I., CATILINA, P. & ANDRE-FONTAINE, G. 2004. Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents. *Med Mal Infect*, 34, 196-200.
- RUBINSTEIN, N. D., MAYROSE, I., HALPERIN, D., YEKUTIELI, D., GERSHONI, J. M. & PUPKO, T. 2008. Computational characterization of B-cell epitopes. *Mol Immunol*, 45, 3477-89.
- SAHAY, B., Q NGUYEN, C. & K YAMAMOTO, J. 2017. Conserved HIV Epitopes for an Effective HIV Vaccine. *J Clin Cell Immunol*, 8.
- SAITO, M., VILLANUEVA, S. Y., KAWAMURA, Y., IIDA, K., TOMIDA, J., KANEMARU, T., KOHNO, E., MIYAHARA, S., UMEDA, A., AMAKO, K., GLORIANI, N. G. & YOSHIDA, S. 2013. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 2457-62.
- SANTOS, J. C. D. 2015. Mineração genômica de *L. interrogans* para identificação de proteínas de superfície. (Trabalho de Conclusão de Curso) Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Brazil.
- SCHARRIG, E., CARESTIA, A., FERRER, M. F., CEDOLA, M., PRETREL, G., DRUT, R., PICARDEAU, M., SCHATNER, M. & GOMEZ, R. M. 2015. Neutrophil Extracellular Traps are Involved in the Innate Immune Response to Infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003927.
- SCHWENDENER, R. A. 2014. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines*, 2, 159-82.
- SEGURO, A. C. & ANDRADE, L. 2013. Pathophysiology of leptospirosis. *Shock*, 39 Suppl 1, 17-23.
- SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., HARTWIG, D. D., CERQUEIRA, G. M., AMARAL, M., FAGUNDES, M. Q., DOSSA, R. G. & DELLAGOSTIN, O. A. 2007. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*, 26, 88-95.

- SHAH, K., AMONKAR, G. P., KAMAT, R. N. & DESHPANDE, J. R. 2010. Cardiac findings in leptospirosis. *J Clin Pathol*, 63, 119-23.
- SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A., MCBRIDE, A. J., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J. G., SANTOS, C. S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O. A., HAAKE, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, 25, 6277-86.
- SINGH, H., ANSARI, H. R. & RAGHAVA, G. P. S. 2013. Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence. *PLoS ONE*, 8.
- SIQUEIRA, G. H., ATZINGEN, M. V., ALVES, I. J., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. & NASCIMENTO, A. L. 2013. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. *Am J Trop Med Hyg*, 89, 1103-16.
- SLACK, A. T., KALAMBAHETI, T., SYMONDS, M. L., DOHNT, M. F., GALLOWAY, R. L., STEIGERWALT, A. G., CHAICUMPA, W., BUNYARAKSYOTIN, G., CRAIG, S., HARROWER, B. J. & SMYTHE, L. D. 2008. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 2305-8.
- SLACK, A. T., KHAIRANI-BEJO, S., SYMONDS, M. L., DOHNT, M. F., GALLOWAY, R. L., STEIGERWALT, A. G., BAHAMAN, A. R., CRAIG, S., HARROWER, B. J. & SMYTHE, L. D. 2009. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 705-8.
- SMYTHE, L., ADLER, B., HARTSKEERL, R. A., GALLOWAY, R. L., TURENNE, C. Y., LEVETT, P. N. & INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF, L. 2013. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 1859-62.
- SORIA-GUERRA, R. E., NIETO-GOMEZ, R., GOVEA-ALONSO, D. O. & ROSALES-MENDOZA, S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, 405-414.
- SPRENG, S., DIETRICH, G., GOEBEL, W. & GENTSCHEV, I. 2003. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein. *Vaccine*, 21, 746-752.
- SRIKRAM, A., ZHANG, K., BARTPHO, T., LO, M., HOKE, D. E., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2011. Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. *J Infect Dis*, 203, 870-9.

- STEVENSON, B., CHOY, H. A., PINNE, M., ROTONDI, M. L., MILLER, M. C., DEMOLL, E., KRAICZY, P., COOLEY, A. E., CREAMER, T. P., SUCHARD, M. A., BRISSETTE, C. A., VERMA, A. & HAAKE, D. A. 2007. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS ONE*, 2.
- STEWART, P. E., CARROLL, J. A., OLANO, L. R., STURDEVANT, D. E. & ROSA, P. A. 2015. Multiple Posttranslational Modifications of *Leptospira biflexa* Proteins as Revealed by Proteomic Analysis. *Appl Environ Microbiol*, 82, 1183-95.
- STORK, M., BOS, M. P., JONGERIUS, I., DE KOK, N., SCHILDERS, I., WEYNANTS, V. E., POOLMAN, J. T. & TOMMASSEN, J. 2010. An Outer Membrane Receptor of *Neisseria meningitidis* Involved in Zinc Acquisition with Vaccine Potential. *PLOS Pathogens*, 6, e1000969.
- TOMA, C., MURRAY, G. L., NOHARA, T., MIZUYAMA, M., KOIZUMI, N., ADLER, B. & SUZUKI, T. 2014. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cellular Microbiology*, 16, 1366-1377.
- ULRICH, T. & RAPAPORT, D. 2015. Biogenesis of beta-barrel proteins in evolutionary context. *International Journal of Medical Microbiology*, 305, 259-264.
- VAN DER LEY, P., KUIPERS, O., TOMMASSEN, J. & LUGTENBERG, B. 1986. O-antigenic chains of lipopolysaccharide prevent binding of antibody molecules to an outer membrane pore protein in *Enterobacteriaceae*. *Microb Pathog*, 1, 43-9.
- VIRIYAKOSOL, S., MATTHIAS, M. A., SWANCUTT, M. A., KIRKLAND, T. N. & VINETZ, J. M. 2006. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun*, 74, 887-95.
- WANG, C., PENG, B., LI, H. & PENG, X.-X. 2016. TolC plays a crucial role in immune protection conferred by *Edwardsiella tarda* whole-cell vaccines. *Scientific Reports*, 6.
- WANG, W., SINGH, S. K., LI, N., TOLER, M. R., KING, K. R. & NEMA, S. 2012. Immunogenicity of protein aggregates—Concerns and realities. *International Journal of Pharmaceutics*, 431, 1-11.
- WHO 2011. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Wkly Epidemiol Rec*, 86, 45-50.
- WIMLEY, W. C. 2003. The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 404-11.
- WITCHELL, T. D., ESHGHI, A., NALLY, J. E., HOF, R., BOULANGER, M. J., WUNDER, E. A., JR., KO, A. I., HAAKE, D. A. & CAMERON, C. E. 2014. Post-translational modification of LipL32 during *Leptospira interrogans* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 8.

- WUNDER, E. A., FIGUEIRA, C. P., BENAROUDJ, N., HU, B., TONG, B. A., TRAJTENBERG, F., LIU, J., REIS, M. G., CHARON, N. W., BUSCHIAZZO, A., PICARDEAU, M. & KO, A. I. 2016. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. *Mol Microbiol*.
- XUE, F., ZHAO, X., YANG, Y., ZHAO, J., YANG, Y., CAO, Y., HONG, C., LIU, Y., SUN, L., HUANG, M. & GU, J. 2013. Responses of Murine and Human Macrophages to Leptospiral Infection: A Study Using Comparative Array Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7.
- YAN, W., FAISAL, S. M., MCDONOUGH, S. P., DIVERS, T. J., BARR, S. C., CHANG, C. F., PAN, M. J. & CHANG, Y. F. 2009. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect*, 11, 230-7.
- YANAGIHARA, Y., VILLANUEVA, S. Y., YOSHIDA, S., OKAMOTO, Y. & MASUZAWA, T. 2007. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30, 399-413.
- YANG, C. W., HUNG, C. C., WU, M. S., TIAN, Y. C., CHANG, C. T., PAN, M. J. & VANDEWALLE, A. 2006. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 69, 815-22.
- YANG, J., YAN, R., ROY, A., XU, D., POISSON, J. & ZHANG, Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12, 7-8.
- YANG, T. C., MA, X. C., LIU, F., LIN, L. R., LIU, L. L., LIU, G. L., TONG, M. L., FU, Z. G. & ZHOU, L. 2012. Screening of the *Salmonella paratyphi* A CMCC 50973 strain outer membrane proteins for the identification of potential vaccine targets. *Mol Med Rep*, 5, 78-83.
- YASUDA, P. H., STEIGERWALT, A. G., SULZER, K. R., KAUFMANN, A. F., ROGERS, F. & BRENNER, D. J. 1987. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 407-415.
- ZHANG, K., MURRAY, G. L., SEEMANN, T., SRIKRAM, A., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. & HOKE, D. E. 2013. Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI. *Infect Immun*, 81, 3872-9.
- ZHANG, L., ZHANG, C., OJCIUS, D. M., SUN, D., ZHAO, J., LIN, X., LI, L., LI, L. & YAN, J. 2012. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol Microbiol*, 83, 1006-23.

ZHUKOVA, A., FERNANDES, L. G., HUGON, P., PAPPAS, C. J., SISMEIRO, O., COPPEE, J. Y., BECAVIN, C., MALABAT, C., ESHGHI, A., ZHANG, J. J., YANG, F. X. & PICARDEAU, M. 2017. Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de *primers* utilizados para a amplificação por PCR e posterior clonagem em vetor pAE das sequências codificadoras de diferentes proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130.

Primer	Sequência 5'-3'*
LIC10714 Forward	ATCGGATCCCAATCAGAAGAAAC
LIC10714 Reverse	ATCTGCAGTTATCTTGCCCAATTC
LIC10496 Forward	ACAGGATCCACTACAAAACAACCTC
LIC10496 Reverse	TTGGTACCCTATTTTTTGGGCTTAG
LIC10881 Forward	TAGGTACCATAAGGCTTCTCTTCGTC
LIC10881 Reverse	ACTAAGCTTTCATTCTCTTGATTTATCG
LIC10896 Forward	AACTGCAGACAATCCACCGGTAAAC
LIC10896 Reverse	CGTAAGCTTCTATTTTGGAGACCATTC
LIC10964 Forward	GCTGGATCCGGTAGACAATTAGACC
LIC10964 Reverse	GCGAAGCTTTTATGGTAAACCAGAATC
LIC11086 Forward	CTAGATCTCACATCACACAGGTATGGG
LIC11086 Reverse	CGCAAGCTTTTACTTTGTCTCTTGAG
LIC11268 Forward	ATCGGATCCCAAAATTCAAAAAAAG
LIC11268 Reverse	ATCTGCAGTTATTGTTCCCATTTTCTATC
LIC11458 Forward	GGCGGATCCAATCATAAAAGGTATC
LIC11458 Reverse	CATAAGCTTTCAGATATTTAGAGCCGTG
LIC11506 Forward	CGTAGATCTCCCAAGCTGAAGAGAAT
LIC11506 Reverse	ATTAAGCTTTTCAAAAACCCACGGAC
LIC11623 Forward	TATGGATCCTCAGGTCGTTTAGAATTCG
LIC11623 Reverse	CGCAAGCTTCTAAACCTATAGTCCCC
LIC12254 Forward	ATAGATCTGGCAACAAGAAGATTGTTT
LIC12254 Reverse	GTGGTACCTCAGAAAATGTGATTAAAG
LIC12374 Forward	ACCTGCAGACAGAATCAAGTTCC
LIC12374 Reverse	GTTAAGCTTTTAAGAAAATTCTGAAAGTG
LIC20019 Forward	TTAGGATCCACCAAACCTTTTTCTAC
LIC20019 Reverse	ATCAAGCTTTTAATACAAAAATCCG
LIC20151 Forward	AAAGGATCCAAGATAGAAGCAAGTG
LIC20151 Reverse	AATAAGCTTCTAGTAAATCACGGGAGG

* Sítios para enzimas de restrição sublinhados.

Anexo 2. Figura S1 do Manuscrito: Construction and evaluation of recombinant chimeric proteins using *Leptospira* spp. antigen fragments identified by reverse and structural vaccinology

Figure S1. Multiple alignment of selected fragments with pathogenic *Leptospira* spp. protein sequences.

All sequences were submitted to MUSCLE (EMBL-EBI) for alignment and identity score results.

LIC10496

Fragment	
L_inte_LIC10496	NNQFTHDSYGVNFNLMVPLGSSVVQSNGNTGVQKDGNGIQTYPGFGNQTVGPGT 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3438	NNQFTHDSYGVNFNLMVPLGSSVVQSNGNTGVQKDGNGIQTYPGFGNQTVGPGT 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_0339	NNQFTHDSYGVNFNLMVPLGSSVVQSNGNTGVQKDGNGIQTYPGFGNQTVGPGT 100.0
L_alex_LEP1GSC062_4247	TFPLQHNITGVNFNITLPLGSNVVQSTHSSGIQKDGTYPGFGNQTVGPGT 64.81
L_alst_LEP1GSC193_3818	TYPLQNDTWNVNVKVVFLGGSTNTTTEILCMRYNNQASSGFAC----TVNPNF 28.00
L_weil_LEP1GSC086_2122	TYPLQNDTWNVNVKVVFLGGSTNTTTEILCMRYNNQASSGFAC----TVNPNF 28.00
L_borg_LEP1GSC103_0021	TYPLQNDTWNVNVKVVFLGGSTNTTTEILCMRYNNQASSGFAC----TVNPNF 28.00
L_sant_LEP1GSC048_2963	TYPLQNDTWNVNVKVVFLGGSTNTTTEILCMRYNNQASSGFAC----TVNPNF 26.00
L_mayo_LEP1GSC190_0013	TYPLQNDTWNVNVKVVFLGGSTNTTTEILCMRYNNQASSGFAC----TVNPNF 26.00
L_kmet_LEP1GSC052_4103	RYDPKQREYGFNEKFSIALGPNSIGDTSNFIISRNEANRSLTS----- 20.93

LIC10714

Fragment	
L_inte_LIC10714	PPTPDYAI FGN GFNNPPTG VASSEYSLAKSGNV 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1295	PPTPDYAI FGN GFNNPPTG VASSEYSLAKSGNV 93.94
L_kirs_LEP1GSC049_1462	PPTPDYAI FGN GFNNPPTG VASSEYSLAKSGNV 93.94
L_alst_LEP1GSC193_3584	PSTPDYAI FGN GFNNPPTG AASSEYSLAKSGNI 84.85
L_borg_LEP1GSC103_2095	PPTPDYAI FGN GFNDKPPPTG TASSEYSLAKSGNI 84.85
L_alex_LEP1GSC062_0065	PPTPDYAI FGN GFNDKPPPTG TASSEYSLAKSGNI 84.85
L_weil_LEP1GSC086_1761	PPTPDYAI FGN GFNDKPPPTG TASSEYSLAKSGNI 84.85
L_kmet_LEP1GSC052_2955	PSTPDYAI FGN GLGNPPTG TASSEYSLAKSGNI 81.82
L_sant_LEP1GSC048_3462	PSTPDYAI FGN GLDKPPPTG TASSEYSLAKSGNI 78.79
L_mayo_LEP1GSC190_2495	PPTPDYAI FGN GFNDKPAATGAASSEYSLAKSGNI 81.82

Fragment	
L_inte_LIC10714	RTILRQQTIDPVTNQPDNPSPSQEVDKGSK 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1295	RTILRQQTIDPVTNQPDNPSPSQEVDKGSK 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1462	RTILRQQTIDPVTNQPDNPSPSQEVDKGSK 100.0
L_mayo_LEP1GSC190_2495	RTILRQQSLDPVTNQPLNPSPSQEVDKGSK 90.00
L_kmet_LEP1GSC052_2955	RTILRQQAIDPATNQPDNPSPSQEVDKGSR 86.67
L_alst_LEP1GSC193_3584	RTILRQQTVNEPATNQPDNPSPSQEVDKGSR 86.67
L_sant_LEP1GSC048_3462	RTILRQQSLDPVTNQPLANSPSQEVDKGSK 86.67
L_alex_LEP1GSC062_0065	RTILRQQSLDEPATNQPLNPSPSQEVDKGSK 86.67
L_weil_LEP1GSC086_1761	RTILRQQSLDPATNQPLNPSPSQEVDKGSK 86.67
L_borg_LEP1GSC103_2095	RTILRQQSLDEPATNQPLNPSPSQEVDKGSK 83.33

Fragment	
L_kirs_LEP1GSC049_1462	RADARMNQYSIDTSKITADQSLDFVVTQKDKNGNYVPYVSRDT 100.0
L_inte_LIC10714	RADARMNQYSIDTSKITADQSLDFVVTQKDKNGNYVPYVSKDT 97.73
L_nogu_LEP1GSC059_1295	RADARMNQYSIDTSKITADQSLDFVVTQKDKNGNYVPYVSRDT 97.73
L_kmet_LEP1GSC052_2955	RADAKMNQYSIDTSKVTANQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 90.91
L_alst_LEP1GSC193_3584	RADAKMNQYSIDTSKVTANQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 90.91
L_alex_LEP1GSC062_0065	RADARMNQYSIDASKITPNQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 90.91
L_mayo_LEP1GSC190_2495	RADARMNQYSIDVAKITPNQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 88.64
L_borg_LEP1GSC103_2095	RADARMNQHSIDAKITPNQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 86.36
L_weil_LEP1GSC086_1761	RADARMNQSVDAKITPNQSLDFIVAKDKDKNGNYVPYVSRDT 84.09
L_sant_LEP1GSC048_3462	RADAKMNQYSIDATKFAIPNQSLDFIVTQKDKNGNYVPYVSRDT 81.82

LIC10881

Fragment	RNYFNEVTENGLDMLVLDITKIGYPPSLYKRVQTIQN	
L_inte_LIC10881	RNYFNEVTENGLDMLVLDITKIGYPPSLYKRVQTIQN	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_0746	RNYFNEVTENGLDMLVLDIAKIGYPPSLYKRVQTIQN	97.30
L_nogu_LEP1GSC059_3004	RNYFNEVTENGLDMLVLDIAKIGYPPSLYKRVQTIQN	94.59
L_alst_LEP1GSC193_4079	RNYFNEVTENGLDMVVTDISKIGYPPSLYKRVQTIQN	86.49
L_borg_LEP1GSC103_1904	RNYFNEVVEGGLDILVFDIAKTAIPPSLYKRVQTIQN	83.78
L_mayo_LEP1GSC190_0385	RNYFNEVVEGGLDILVFDIAKTAIPPSLYKRVQTIQN	83.78
L_alex_LEP1GSC062_4164	RNYFNEVTETGMDTLVTDIKKIGYPPSLYQRVHTIRN	78.38
L_weil_LEP1GSC086_1012	RNYFNEVTETGMDTLVTDIKKIGYPPSLYQRVHTIRN	78.38
L_sant_LEP1GSC048_0398	RNYFKEVTEGMDAFVLDIFSKKANFLSIFERVYIVON	59.46

Fragment	QIDLDPITYNFIHQQLLNSSDVKSIVLEGDSVRT	
L_inte_LIC10881	QIDLDPITYNFIHQQLLNSSDVKSIVLEGDSVRT	100.0
L_borg_LEP1GSC103_1904	QMDLDPITYNFIHQQLFNSSDVKSIVLEGDSVRT	93.75
L_mayo_LEP1GSC190_0385	QMDLDPITYNFIHQQLFNSSDVKSIVLEGDSVRT	93.75
L_kirs_LEP1GSC049_0746	QTNLDPITYNFIHQQLLNSSDVKSIVLEGDSVRT	96.88
L_nogu_LEP1GSC059_3004	QIDLDPITYSFLHQQLLNSSDVKSIVLEGDSVRT	93.75
L_alst_LEP1GSC193_4079	QANLDPISYNEVHQQLLDSPNVKSVLEGDSVRT	75.00
L_sant_LEP1GSC048_0398	QFNPDFFLEYLHKQLLSDFDAVAVLEGDSVRT	56.25
L_alex_LEP1GSC062_4164	QLNLDPALEFLQKQYLNPEAREVLEGDSVRT	53.12
L_weil_LEP1GSC086_1012	QLSLDPALEFLQKQYLNPEAREVLEGDSVRT	50.00

Fragment	PYAMDPPFSRNRDLMRSLDPNADLSLVRRSN	
L_inte_LIC10881*	PYAMDPPFSRNRDLMRSLDPNADLSLVRRSN	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_0746	PYAMDPPFSRNRDLMRSLDPNADLSLVRRSN	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3004	PYAMDPPFSRNRDLMRSLDPNADLSLVRRSN	96.77
L_mayo_LEP1GSC190_0385	PYAMDPPFSKNRDLVRSLDPSADLSLVRRSN	87.10
L_borg_LEP1GSC103_1904	PYAMDPPFSKNRDLVRSLDPSVDSLVRRSN	83.87
L_weil_LEP1GSC086_1012	PFIMDPYSINRDLRREALDPSADPSLVRRSN	67.74
L_alst_LEP1GSC193_4079	RFVMDPPFSRNRDLARESLDPSADPSLVRRSN	67.74
L_sant_LEP1GSC048_0398	PYAMDPPFSHRDLARETLNPNSSGSLLRANR	64.52
L_alex_LEP1GSC062_4164	PFIMDPYSINRDLRREALDPSADPSLVRRSN	64.52

Fragment	TPVVGSKSITSEQFNSQLLPSAAPPPSSSSSSSLFSIYQPVYS	
L_inte_LIC10881*	TPVVGSKSITSEQFNSQLLPSAAPPPSS--SSSSSSSLFSIYQPVYS	
L_kirs_LEP1GSC049_0746	TPVVGSKSITSEQLSSQIFPSAAPPPSS--SSSSSSSLFSIYQPVYS	89.13
L_alst_LEP1GSC193_4079	TPVTGSKTITLQQLSLSEIFPSL--FELPA--SSSTSSSLPLFYQHIIYS	63.64
L_mayo_LEP1GSC190_0385	TPVVGSKSITSTQQLISEIFPYL--PQFSS--SSNSSPSGFALYQPVYS	63.64
L_borg_LEP1GSC103_1904	TPVVGSKTSTTQQLISEIFPYL--PQFSS--SSNSTPSGFALYQPVYS	61.36
L_alex_LEP1GSC062_4164	TPVSGSKSMTLNQISIDLFFDLPIPPSTAPSSGDSSTLPLFYQPVYS	54.35
L_weil_LEP1GSC086_1012	TPVSGSKSMTLNQISIDLFFDLPIPPSTAPSSGDSSTLPLFYQPVYS	52.17
L_sant_LEP1GSC048_0398	THLSGSNQTTILQKSLAEVFTDVTIPAT---NNGGSSSNPPLYEPVYS	31.82

LIC10896

Fragment	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	
L_inte_LIC10896	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1657	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGSNYIDNFNFKSTNLNFI	99.0
L_nogu_LEP1GSC059_2520	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	96.00
L_alex_LEP1GSC062_1843	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	96.00
L_weil_LEP1GSC086_0726	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	95.00
L_borg_LEP1GSC103_0491	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	95.00
L_alst_LEP1GSC193_2923	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	95.00
L_sant_LEP1GSC048_2781	YNRTYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	94.00
L_mayo_LEP1GSC190_4085	YNRSYNYREEANARFQASNPIIYLKDSNMLRPLNQNNLKIYGEEVLWGNNLNLAYEP	
	KIGQQFFIKTLYSVQSDKIVREGDGANYIDNFNFKSTNLNFI	93.00

Fragment	WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR	
L_inte_LIC10896	WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR	100.00
L_alst_LEP1GSC193_2923	WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR	100.00
L_nogu_LEP1GSC059_2520	WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR	100.00
L_kirs_LEP1GSC049_1657	WSQGGTDLANGYRRLGNNPDGTR	100.00
L_mayo_LEP1GSC190_4085	WSQGGTDLANGFRLGNNPDGTR	100.00
L_sant_LEP1GSC048_2781	WSQGGTDLANGFRLGNNPDGTR	95.65
L_borg_LEP1GSC103_0491	WSQGGTDLANGFRLGNNPDGTR	95.65
L_alex_LEP1GSC062_1843	WSQGGTDLANGFRLGNNPDGTR	95.65
L_weil_LEP1GSC086_0726	WSQGGTDLANGFRLGNNPDGTR	95.65

Fragment	REIAQRNFTGSDRDVIYPIPGEVYINPLAYANGNRK	
L_inte_LIC10896*	REIAQRNFTGSDRDVIYPIPGEVYINPLAYANGNRK	100.00
L_kirs_LEP1GSC049_1657	REIAQRNFTGSDRDVIYPIPGEVYINPLAYANGNRK	100.00
L_nogu_LEP1GSC059_2520	REIAQRNFTGSDRDVAIPIPGEVYINPLAYANGNRK	100.00
L_alst_LEP1GSC193_2923	REIAQRNFTGSDRDSIYPIPGEVYINPLIYANGNRK	88.89
L_alex_LEP1GSC062_1843	REIAQRNFTGSDKDIYPIPGETIYNPLINYANGNRK	86.11
L_mayo_LEP1GSC190_4085	REIAQRNFTGSDKDIYPIPGETIYNPLINYVNGNRK	83.33
L_borg_LEP1GSC103_0491	REIAQRNFTGSDKDIYPIPGETIYNPLINYVNGNRK	83.33
L_sant_LEP1GSC048_2781	REIAQRNFTGSDKDIYPIPGEFVYNPLINYVNGNRK	80.56
L_weil_LEP1GSC086_0726	REIAQRNFTGSDKDIYPIPGETVYNPLINYVNGNRK	80.00

Fragment	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVANICDAT	
L_inte_LIC10896*	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVANICDAT	100.00
L_kirs_LEP1GSC049_1657	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVANICDAT	100.00
L_nogu_LEP1GSC059_2520	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVANICDST	93.55
L_mayo_LEP1GSC190_4085	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNICDAN	93.55
L_sant_LEP1GSC048_2781	SWSGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNICDAN	90.32
L_alex_LEP1GSC062_1843	SWSGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNICDAN	90.32
L_weil_LEP1GSC086_0726	SWSGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNICDAN	90.32
L_borg_LEP1GSC103_0491	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNICDTN	90.32
L_alst_LEP1GSC193_2923	SWNGFNTSYGCKTNSEERLLLVRSNVCIDVN	87.10

Fragment	DSKIYGLISTGQVDPLSTYAAYSPTTLNRPLQGQSD	
L_inte_LIC10896*	DSKIYGLISTGQVDPLSTYAAYSPTTLNRPLQGQSD	100.00
L_nogu_LEP1GSC059_2520	DSKIYGLITTGQVDPLSTYAAYSPTTLNRPLQGQSD	97.22
L_kirs_LEP1GSC049_1657	DSKIYGLITTGQVDPLSTYAAYSPTTLNRPLQGQSD	97.14
L_alst_LEP1GSC193_2923	DSNIYGFATGQVDPISTYAAAPTTLNRPLQGQSD	86.11
L_sant_LEP1GSC048_2781	DANIYGFATGQVDPISTYAAAPTTLNRPLQGQSD	83.33
L_mayo_LEP1GSC190_4085	DANIYGFATGQVDPISTYSAYAPTTLNRPLQGQSD	80.56
L_alex_LEP1GSC062_1843	DANIYGFATGQVDPISTYSAYAPTTLNRPLQGQSD	80.56
L_borg_LEP1GSC103_0491	DANIYGFATGQVDPISTYSAYAPTTLNRPLQGQSD	80.56
L_weil_LEP1GSC086_0726	DANIYGFATGQVDPISTYSAYAPTTLNRSLQGQSD	77.78

LIC10964

Fragment	DLLDNPENPGATVSQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQQR	
L_inte_LIC10964	DLLDNPENPGATVSQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQQR	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_4224	DLLDNPENPGATVSQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQQR	97.73
L_alst_LEP1GSC193_3780	DLLDNPENPGATVSQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQQR	97.73
L_nogu_LEP1GSC059_2587	DLLDNPENPGATVSQKLLHEKSHLHSFFIFSAGNLELDFSQQR	95.45
L_kmet_LEP1GSC052_2231	DLLDNPENPGATVFQKLLHEKSHFHSFFIFSAGNLELDFSQQR	90.91
L_sant_LEP1GSC048_0454	DLLDNPENPGSTVYQKLLHEKSHFHSFLIFPAGNLELDFSQQR	90.91
L_alex_LEP1GSC062_1651	DLLDNPENPGSTVYQKLLHEKSHFHSFLIFPAGNLELDFSQQR	90.91
L_weil_LEP1GSC086_3478	DLLDNPENPGSTVYQKLLHEKSHFHSFLIFPAGNLELDFSQQR	90.91
L_borg_LEP1GSC103_3191	DLLDNPENPGSTVHQKLLHEKSHFHSFLIFPAGNLELDFSQQR	88.64
L_mayo_LEP1GSC190_2194	DLLDNPENPGSTVYQKLLHEKSHFHSFLIFPAGNLELDFSQQR	88.64

Fragment	IQNFIYAASIAQIDLDSGLPKYKYKQGN	
L_inte_LIC10964	IQNFIYAASIAQIDLDSGLPKYKYKQGN	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_2587	IQNFIYAASIAEIDLDSGLPKYKYKQGN	92.86
L_kirs_LEP1GSC049_4224	IQNFIYAASIAEINPDSGLPKYKYKQGN	89.29
L_alex_LEP1GSC062_1651	IQNFIYAASIAEIDPDSGLPKYKYKQGN	89.29
L_weil_LEP1GSC086_3478	IQNFIYAASIAEIDPDSGLPKYKYKQGN	89.29
L_alst_LEP1GSC193_3780	IQNFIYAASIAIDIDDSGLPKYKYKQGN	85.71
L_kmet_LEP1GSC052_2231	IQNFIYAASIAEIDVDSGLPKYKYKQGN	85.71
L_borg_LEP1GSC103_3191	IQNFIYAASIAEIDPNSGLPKYKYKQGN	85.71
L_mayo_LEP1GSC190_2194	IQNFIYSSSIAEIDPNSGLPKYKYKQGN	78.57
L_sant_LEP1GSC048_0454	IQNFIYSTNIAEIDADTGLPKYKYKQGN	75.00

LIC11086

Fragment	
L_inte_LIC11086	SKSQPSNLQDNDGIVYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_4303	SKLQPSNLQDNDGIVYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 97.14
L_weil_LEP1GSC086_1478	SKSQPTNLQDNDGIVYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 97.14
L_nogu_LEP1GSC059_1496	SKSQPYNLQDNDGIVYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 94.29
L_mayo_LEP1GSC190_3404	SKSQPTNLQDNDGIFYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 94.29
L_alex_LEP1GSC062_1096	SKSQPTNLQDNDGIYWLNRNPSSSPPEETYLLKKT 94.29
L_borg_LEP1GSC103_3999	SKSQPTNLQDNDGIVYWLNRNPSSLEPEETYLLKKT 91.43
L_alst_LEP1GSC193_0460	SRSKPSNLQDNDGIVYWLNRNPSSAPEETYLLKKT 88.57
L_sant_LEP1GSC048_0761	SKSRFANLQDNDGIEYWFNRNPSSLEPEETYLLKKT 85.71
L_kmet_LEP1GSC052_0701	SRSQPSNLQDNDGIPYWLRTPSAAPEQDPYLLKKT 77.14

LIC11211

Fragment	
L_inte_LIC11211	FGQETEEQSKFYGPYLKVSTGFPSFDSQLEKKLNTYE 100
L_nogu_LEP1GSC059_1611	FGQETEEQSKFYGPYLKVSTGFPSFDSQLEKKLNTYE 94.59
L_kirs_LEP1GSC049_1709	FGQETEEQSKFYGPYLKASTGFPSFDSQLEKKLNTYE 91.89
L_alst_LEP1GSC193_4480	FGQETEKQNRFGYPYLKVSSGYTFGDSQAGRKLNTYE 75.68
L_borg_LEP1GSC103_1191	FGQETEKQEKFGYPYLKVSTGLSTFDPEATKKLNTYE 75.68
L_kmet_LEP1GSC052_2469	FGQETQEQRMFGYPYLKVSSGNAAFDSDATKKLNTYE 72.97
L_weil_LEP1GSC086_4170	FGQETEKQNTFYGPYLKISSGYTFVDSEANKRLNTYE 67.57
L_sant_LEP1GSC048_3209	FGQETAKQRTFYGPYLKISSGFIVDSEANRRRLNTYE 64.86
L_alex_LEP1GSC062_3292	FGQETAKQNTFYGPYLKISSGYTFVDSEANKLNTYE 64.86
L_mayo_LEP1GSC190_3055	FGQETAKQNI FYGPYLKISSGYTFVDSEANKRLNTYE 64.86

Fragment	
L_inte_LIC11211	TPKRDYIGDSYTAEDRKT KINGLEYSTSEANELIANGRTLD 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1709	TPKRDYIGDSYTAEDRKT KINGLEYSTSEANELIANGRTLD 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1611	TPKRDYIGDSYTTEDRKT KINGLEYSTSEANELIANGRTLD 97.56
L_alex_LEP1GSC062_3292	APKRDYIGDSYAAEDRKT KINGVEYSVSEVNDLIANGRTLD 85.37
L_alst_LEP1GSC193_4480	TPKRDYIGDSYAAEDRKT KINGVEYSASEVNDLIASGRTLD 85.37
L_kmet_LEP1GSC052_2469	TPKRDYIGDSYATEDRKT KINGVEYSASEVNDLIARGKTLD 78.05
L_sant_LEP1GSC048_3209	TPKRDYIGDSYSEENRKT KINGAKYSASEINDLIATGRTLD 78.05
L_mayo_LEP1GSC190_3055	SPKRDYIGYSYSEESRKT KINGVEYSASEINDLIANGRTLD 75.61
L_borg_LEP1GSC103_1191	SPKRDYIGDSYAAENRKT KINGVEYSASEVNDLIARGKTLD 75.61
L_weil_LEP1GSC086_4170	SPKRDYFGHSYSEENRKT KINGAKYSASEINDLIANGRTLD 73.17

LIC11268

Fragment	
L_inte_LIC11268	YSHNADFDKRTQDDRNYATQNSQ 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1672	YSHNADFDKRTQDDRNYATQNSQ 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1107	YSHNADFDKRTQDDRNYATQNSQ 100.0
L_alst_LEP1GSC193_4423	YSHNADFDKRTQDDRNYATQNSQ 100.0
L_sant_LEP1GSC048_3345	YSHNADFDKRTQDDRN FATQNSQ 95.65
L_borg_LEP1GSC103_1279	YSHNADFDKRTQDDRN FATQNSQ 95.65
L_alex_LEP1GSC062_3352	YSHNADFDKRTQDDRN FATQNSQ 95.65
L_mayo_LEP1GSC190_3001	YSHNADFDKRTQDDRN FATQNSQ 95.65
L_weil_LEP1GSC086_4105	YSHNADFDKRTQDDRN FATQNSQ 95.65
L_kmet_LEP1GSC052_1816	YSHNADFDKRTLDDRNYATQNSQ 95.65

Fragment	
L_inte_LIC11268	TANNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFADG 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1107	TANNSI SIKNNNTDLREGFVQLKNFADG 96.30
L_nogu_LEP1GSC059_1672	TTNNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFANG 92.59
L_alst_LEP1GSC193_4423	TATNSVSIKNNNTDLREGFIQLKNFADG 92.59
L_sant_LEP1GSC048_3345	TATNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFAEG 92.59
L_borg_LEP1GSC103_1279	TATNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFAEG 92.59
L_alex_LEP1GSC062_3352	TATNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFAEG 92.59
L_mayo_LEP1GSC190_3001	TATNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFAEG 92.59
L_weil_LEP1GSC086_4105	TATNSVSIKNNNTDLREGFVQLKNFAEG 92.59
L_kmet_LEP1GSC052_1816	TATNSVSIKNNNTDLREGFIQLKNFAEG 88.89

LIC11458

Fragment	VDRGALYSADPNAPLRNIGPDVEPW	
L_inte_LIC11458	VDRGALYSADPNAPLRNIGPDVEPW	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3496	VDRGALYSADPNAPLRNIGPDVEPW	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_0906	VDRGALYSADPNAPLRNIGPDVEPW	100.0
L_alst_LEP1GSC193_0379	VDRGALFSANPNAPLRNIGPDTEPW	88.00
L_borg_LEP1GSC103_3744	VDRGALFSTNPNAPLRNIGPDTEPW	84.00
L_mayo_LEP1GSC190_0221	VDRGALFSTNPNAPLRNIGPDTEPW	84.00
L_weil_LEP1GSC086_2774	VDRGALFSTNPNAPLRNIGPDTEPW	84.00
L_kmet_LEP1GSC052_0949	VDRGAYYSADPNAPLRIGEDTEPW	84.00
L_alex_LEP1GSC062_1270	VDRGPLEFSTNPNAPLRNIGPDTEPW	80.00
L_sant_LEP1GSC048_1482	VDRGPLEFSTNPNAPLRNIGPDTEPW	80.00

Fragment	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKTEIYKPELQDPILGKTRQH	
L_inte_LIC11458	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKTEIYKPELQDPILGKTRQH	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_0906	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKTEIYKPELQDPILGKTRQH	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3496	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKTEIYKPELQDPILGKTRQH	97.78
L_sant_LEP1GSC048_1482	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILARTQH	91.11
L_borg_LEP1GSC103_3744	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILARTQH	91.11
L_mayo_LEP1GSC190_0221	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILSRTRQH	91.11
L_weil_LEP1GSC086_2774	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILARTQH	91.11
L_alst_LEP1GSC193_0379	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILAKTRQH	91.11
L_alex_LEP1GSC062_1270	SYEYLRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILFARTQH	88.89
L_kmet_LEP1GSC052_0949	SYEYVRTSSNLRFGIPLFFNTTYRKSHAYKPELQDPILAKTRQH	86.67

LIC11506

Fragment	RWTPYDYTSYTERSILETTIKTDSIKQNQKVLIP	
L_inte_LIC11506	RWTPYDYTSYTERSILETTIKTDSIKQNQKVLIP	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3436	RWTPYDYTSYTERSILETTIKTDSIKQNQKVLIP	97.06
L_kirs_LEP1GSC049_0855	QWTPYDYTSYTERSILETTIKTDSIKQNQKVLIP	94.12
L_kmet_LEP1GSC052_0587	QWTPYDYTSYTERSILETTSIKTDSVKQNQKVLIP	85.29
L_sant_LEP1GSC048_1139	QWTPYDYTSYTERSISISTKTDSVKQNQKVLIP	82.35
L_alex_LEP1GSC062_3772	RWTPYDYTSFSEHSSLESSNKTDSVKQNQKVLIP	76.47
L_mayo_LEP1GSC190_0024	RWTPYDYTSFSEHSSLESSNKTDSIKQNQKVLIP	76.47
L_weil_LEP1GSC086_0146	RWTPYDYTSFSEHSSLESSNKTDSVKQNQKVLIP	73.53
L_alst_LEP1GSC193_2649	RWTPYDYTSFSEHSSLESSNKTDSVKQNQKVLIP	70.59
L_borg_LEP1GSC103_3352	QWTPYDYTSFSEHSSLESSNKTDSVKQNQKVLIP	70.59

Fragment	EIELANPNTNVIESGTLGYETRKQYFNPMLRS	
L_inte_LIC11506	EIELANPNTNVIESGTLGYETRKQYFNPMLRS	100.00
L_alex_LEP1GSC062_3772	EIELANPNTIVTKAGDGSIAIQRHYFNPMLRS	59.38
L_weil_LEP1GSC086_0146	EIELANPNAIVTKAGGGSIEIQRHYFNPMLRS	59.38
L_alst_LEP1GSC193_2649	EIELANANTNFTRSGD---QVRHYFNPMLRS	68.97
L_borg_LEP1GSC103_3352	EIELANANTNFTRQAGD---QVRHYFNPMLRS	65.52
L_mayo_LEP1GSC190_0024	EIELANANTNFTRAGD---RVRRYFNPMLRS	65.52
L_kirs_LEP1GSC049_0855	EVELANPNTNVVQSGSLGYETRQYFNPMLRS	84.38
L_nogu_LEP1GSC059_3436	EIELVNPNTNVVQFGSLGFDARQYFNPMLRS	71.88
L_kmet_LEP1GSC052_0587	EIELANPNMIVTRTGSSGFEIGROYLNPMIRS	59.38
L_sant_LEP1GSC048_1139	EIELANANTIVTRADSGSYSTKROYFNPMLRS	65.52

Fragment	TQGTRFYKPOALALESITVSAGTAGAQGIY	
L_inte_LIC11506	TQGTRFYKPOALALESITVSAGTAGAQGIY	100.0
L_alex_LEP1GSC062_3772	TEGNRFYKPKTVSLDFVLISSGTAGVIRGIY	56.67
L_weil_LEP1GSC086_0146	TEGNRFYKPKTVSLDSVLIISNGIVGVIRGIY	56.67
L_kmet_LEP1GSC052_0587	TEGNRFYKPKTFTLDSVLSISGTAGVIRGIY	56.67
L_borg_LEP1GSC103_3352	TEGNRFYKDRMIMPDSTIVVSNAGVKGIIY	53.33
L_kirs_LEP1GSC049_0855	TEGSRFYKQKTITPDWIVVPIGSAGAKGIY	53.33
L_nogu_LEP1GSC059_3436	TEGNRFYKQKTITPDWMVVSFGAGAKGIY	53.33
L_sant_LEP1GSC048_1139	TEGNRFYKSKTMTLESTISISTNSGVIRGIY	53.33
L_alst_LEP1GSC193_2649	TEGNRFYKDRITITPDATVVSNAGVKGIIY	50.00
L_mayo_LEP1GSC190_0024	TEGNRFYKDRMITPDLIVVSNAGVKGIIY	50.00

Fragment	NYIYSYFSYSHFQTDIRLQTSLLDPFISENSSAP-ILHMFRRSGNHDILQ	
L_inte_LIC11506	NYIYSYFSYSHFQTDIRLQTSLLDPFISENSSAP-ILHMFRRSGNHDILQ	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3436	NYIYSFFSYYGFOQTNLNFQTNNDPFTKEQTPA--ITTPSRSGNHDILQ	64.58
L_kirs_LEP1GSC049_0855	NYIYSFFSYYGFOQTNLNFQTNNDPFTKERTPP-ITTPSRSGNHDILQ	61.22
L_alst_LEP1GSC193_2649	NYIYSYFSYYGFRQTDFTNLGNPQISPEQTQVDNSFSLSSIRSGNHDILQ	57.14
L_weil_LEP1GSC086_0146	NYIYSYFSYLGFNQTDFTVLGNSQVSPIQMHTNDVFFMTRPIRSGNHDILQ	53.06
L_alex_LEP1GSC062_3772	GIIYSYFSYSLGNQTDFTLGNQISPIQMHTNDVFFMTRPIRSGNHDILQ	51.02
L_borg_LEP1GSC103_3352	NYIYSYFSYLGFNQIDFTLGNVQISPIQTQTNVFFMIRPIRSGNHDILQ	48.98
L_mayo_LEP1GSC190_0024	NYIYSYFSYLGFNQIDFTLGNQNSPIQTQANDVFFMVRPIRSGNHDILH	48.98
L_sant_LEP1GSC048_1139	SYIYSYFSYYGFNQTDNLNGTVPSPNPFNTAAFT-MLSPIKSGDHDILR	48.98

LIC11623

Fragment	
L_inte_LIC11623	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR
L_kirs_LEP1GSC049_2475	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_0588	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_sant_LEP1GSC048_3025	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_borg_LEP1GSC103_1744	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_alex_LEP1GSC062_2892	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_weil_LEP1GSC086_3808	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 100.0
L_alst_LEP1GSC193_1910	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAVYSR 96.15
L_mayo_LEP1GSC190_2598	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAVYSR 96.15
L_kmet_LEP1GSC052_1064	IYNVGAVSITENNNQSSIKEQAIYSR 96.15

Fragment	
L_inte_LIC11623	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPAEWRDGAA
L_kirs_LEP1GSC049_2475	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPAEWRDGAA 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_0588	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 97.44
L_alst_LEP1GSC193_1910	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 97.44
L_kmet_LEP1GSC052_1064	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 97.44
L_sant_LEP1GSC048_3025	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 94.87
L_mayo_LEP1GSC190_2598	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 94.87
L_borg_LEP1GSC103_1744	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 94.87
L_alex_LEP1GSC062_2892	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 94.87
L_weil_LEP1GSC086_3808	IQKPYIQLQDLQFLGGYESLRGWFYNDAKYPTWDRDGA 94.87

Fragment	
L_inte_LIC11623	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK
L_nogu_LEP1GSC059_0588	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 100.0
L_kirs_LEP1GSC049_2475	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 97.22
L_alst_LEP1GSC193_1910	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 94.44
L_kmet_LEP1GSC052_1064	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 91.67
L_mayo_LEP1GSC190_2598	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 87.50
L_weil_LEP1GSC086_3808	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 87.50
L_borg_LEP1GSC103_1744	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 86.11
L_alex_LEP1GSC062_2892	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 84.72
L_sant_LEP1GSC048_3025	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 84.72
	LYEEVNRRATGVRKDLFETYDQVRVEAQM KDPVGYLLANN YNLTALRKADYTFEELNNPANLVLSGNNVALDK 83.33

Fragment	
L_inte_LIC11623	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF
L_kirs_LEP1GSC049_2475	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_0588	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 100.0
L_alst_LEP1GSC193_1910	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 100.0
L_kmet_LEP1GSC052_1064	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31
L_sant_LEP1GSC048_3025	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31
L_mayo_LEP1GSC190_2598	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31
L_borg_LEP1GSC103_1744	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31
L_alex_LEP1GSC062_2892	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31
L_weil_LEP1GSC086_3808	FAQKLKTYGVADHPFTKFESD NAFQF 92.31

LIC12254

Fragment	
L_inte_LIC12254	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVKS
L_alex_LEP1GSC062_3377	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVKS 100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1782	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 96.00
L_kirs_LEP1GSC049_1839	NAKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 96.00
L_sant_LEP1GSC048_3800	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00
L_weil_LEP1GSC086_4082	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00
L_mayo_LEP1GSC190_2981	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00
L_borg_LEP1GSC103_1305	NGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00
L_alst_LEP1GSC193_4396	NAKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00
L_kmet_LEP1GSC052_1741	AGKTKVTEDAEAGKIIIGANGGNVNS 92.00

Fragment	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	
L_inte_LIC12254	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_1839	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1782	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_sant_LEP1GSC048_3800	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_mayo_LEP1GSC190_2981	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_alst_LEP1GSC193_4396	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	100.0
L_borg_LEP1GSC103_1305	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	97.50
L_alex_LEP1GSC062_3377	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	97.50
L_weil_LEP1GSC086_4082	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	95.00
L_kmet_LEP1GSC052_1741	AFGLTEGDAPFFEYRNWSTEGGITGLGGLRTLRYKQDR	95.00

LIC12374

Fragment	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	
L_inte_LIC12374	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_2710	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	96.55
L_kirs_LEP1GSC049_1720	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	96.55
L_sant_LEP1GSC048_0703	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	93.10
L_kmet_LEP1GSC052_2138	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	93.10
L_alex_LEP1GSC062_4342	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	89.66
L_weil_LEP1GSC086_0503	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	89.66
L_borg_LEP1GSC103_1969	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	89.66
L_mayo_LEP1GSC190_2376	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	86.21
L_alst_LEP1GSC193_0115	DQNFSYKNDHGTVVNLTLDDTIDRRKNAS	82.76

Fragment	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	
L_inte_LIC12374	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	100.0
L_mayo_LEP1GSC190_2376	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	89.47
L_alst_LEP1GSC193_0115	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	89.47
L_alex_LEP1GSC062_4342	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	89.47
L_weil_LEP1GSC086_0503	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	89.47
L_kirs_LEP1GSC049_1720	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	84.21
L_kmet_LEP1GSC052_2138	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	84.21
L_sant_LEP1GSC048_0703	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	78.95
L_nogu_LEP1GSC059_2710	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	78.95
L_borg_LEP1GSC103_1969	FPSEEPWYRRQDPLSGDIK	73.68

LIC12575

L_inte_LIC12575	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	
L_nogu_LEP1GSC059_2939	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	
L_kirs_LEP1GSC049_0132	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	97.01
L_alst_LEP1GSC193_3408	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	95.52
L_sant_LEP1GSC048_0583	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	91.04
L_mayo_LEP1GSC190_2420	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	89.55
L_weil_LEP1GSC086_0552	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	89.55
L_alex_LEP1GSC062_0380	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	89.55
L_borg_LEP1GSC103_2007	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	88.06
L_kmet_LEP1GSC052_1941	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	88.06
	ILPFNQANFFTGTKISDDTIKGGIEKVLQTTGTY	85.07

LIC13477

Fragment	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	
L_inte_LIC13477	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	100.0
L_alst_LEP1GSC193_2428	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	85.00
L_nogu_LEP1GSC059_3810	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	85.00
L_alex_LEP1GSC062_2390	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	85.00
L_weil_LEP1GSC086_2488	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	85.00
L_mayo_LEP1GSC190_1628	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	85.00
L_sant_LEP1GSC048_2057	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	80.00
L_borg_LEP1GSC103_2481	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	80.00
L_kmet_LEP1GSC052_3542	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	80.00
L_kirs_LEP1GSC049_2731	TIKSIDKTTNVRGAVIALDS	80.00

Fragment	TGRPGFDKDGNRANLKGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	
L_inte_LIC13477	TGRPGFDKDGNRANLKGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_2731	TGRPGFDKDGNRANLKGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_3810	TGRPGFDKDGNRANLKGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	98.00
L_alst_LEP1GSC193_2428	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	92.00
L_sant_LEP1GSC048_2057	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	92.00
L_kmet_LEP1GSC052_3542	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	92.00
L_borg_LEP1GSC103_2481	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	92.00
L_alex_LEP1GSC062_2390	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	92.00
L_mayo_LEP1GSC190_1628	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	90.00
L_weil_LEP1GSC086_2488	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	90.00
L_alex_LEP1GSC062_2390	TGRPGFDKDGTKANLRGGGYKTLMPGYSISNIANDFTGGYALFSGKDSSG	88.00

LIC20019

Fragment	FETGTKYPNLSGLKGS	
L_inte_LIC20019	FETGTKYPNLSGLKGS	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1024	FETGTKYPNLSGLKGS	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3085	FETGTKYPNLSGLKGS	100.0
L_sant_LEP1GSC048_1364	FETGTKYPNLSGLKGS	100.0
L_alst_LEP1GSC193_1569	FETGTKYPNLSGLRGS	94.12
L_weil_LEP1GSC086_1907	FETGTKYPNLSGLRGS	94.12
L_alex_LEP1GSC062_4441	FETGTKYPNLSGLRGS	94.12
L_borg_LEP1GSC103_0776	FETGTKYPNLSGLRGS	94.12
L_mayo_LEP1GSC190_1280	FETGTKYPNLSGLRGS	94.12
L_kmet_LEP1GSC052_0460	FETGTKYANLSGLRGN	82.35

Fragment	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	
L_inte_LIC20019	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3085	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1024	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	97.37
L_sant_LEP1GSC048_1364	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	97.37
L_weil_LEP1GSC086_1907	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	97.37
L_alex_LEP1GSC062_4441	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	97.37
L_borg_LEP1GSC103_0776	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	97.37
L_mayo_LEP1GSC190_1280	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	94.74
L_kmet_LEP1GSC052_0460	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	94.74
L_alst_LEP1GSC193_1569	FFLGDPPTVERGKISTREFSYDDTPYTFIGSRNFADGK	86.84

LIC20151

Fragment	PGYRLVPNSQATTGN	
L_inte_LIC20151	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1080	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3174	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_sant_LEP1GSC048_0186	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_borg_LEP1GSC103_0620	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_weil_LEP1GSC086_2084	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_mayo_LEP1GSC190_1091	PGYRLVPNSQATTGN	100.0
L_kmet_LEP1GSC052_0212	PGYRLVPNSQATTGN	93.33
L_alex_LEP1GSC062_3199	PGYRLVPNSQATTGN	93.33
L_alst_LEP1GSC193_1731	PGYRLVPNSQATTGN	86.67

Fragment	DTRDLSSDRPLEGRALH	
L_inte_LIC20151	DTRDLSSDRPLEGRALH	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1080	DTRDLSSDRPLEGRALH	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3174	DTRDLSSDRPLEGRALH	94.12
L_sant_LEP1GSC048_0186	DTRDLSSDRPLEGRALH	94.12
L_alst_LEP1GSC193_1731	DTRDLSSDRPLEGRALH	88.24
L_borg_LEP1GSC103_0620	DTRDLSSDRPLEGRALH	88.24
L_alex_LEP1GSC062_3199	DTRDLSSDRPLEGRALH	88.24
L_weil_LEP1GSC086_2084	DTRDLSSDRPLEGRALH	88.24
L_mayo_LEP1GSC190_1091	DTRDLSSDRPLEGRALH	88.24
L_kmet_LEP1GSC052_0212	DTRDLSSDRPLEGRALH	76.47

Fragment	SSTNNLSAAGQDYIPSEVKLNENPPVIY	
L_inte_LIC20151	SSTNNLSAAGQDYIPSEVKLNENPPVIY	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1080	SSTNNLSAAGQDYIPSEVKLNENPPVIY	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3174	SSTNNLSAAGQDYIPSEVKLNENPPVIY	100.0
L_kmet_LEP1GSC052_0212	SSTNNLSAAGQDYIPT EVKLNENPPVIY	92.86
L_sant_LEP1GSC048_0186	SSTNNLSAAGQDYIPT EVKLNENPPVIY	92.86
L_alex_LEP1GSC062_3199	SATNNLSAAGQDYIPT EVKLNENPPVIY	92.86
L_alst_LEP1GSC193_1731	SSTNNLSAAGQDYIPT EVKLNENPPVIY	92.86
L_mayo_LEP1GSC190_1091	SATNNL--AGQDYIPT EVKLNENPPVIY	92.31
L_borg_LEP1GSC103_0620	SATNNL--AGQDSIPT EVKLNENPPVIY	88.46
L_weil_LEP1GSC086_2084	SATNNL--GQDYIPT EVKLNENPPVIY	88.46

Fragment	DNLLNQYELAYNPTRPRFYY	
L_inte_LIC20151	DNLLNQYELAYNPTRPRFYY	100.0
L_nogu_LEP1GSC059_1080	DNLLNQYELAYNPTRPRFYY	100.0
L_kirs_LEP1GSC049_3174	DNLLNQYELAYNPTRPRFYY	100.0
L_alst_LEP1GSC193_1731	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_kmet_LEP1GSC052_0212	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_sant_LEP1GSC048_0186	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_alex_LEP1GSC062_3199	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_weil_LEP1GSC086_2084	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_mayo_LEP1GSC190_1091	DNV LNQYELAYNPTRPRFYY	95.00
L_borg_LEP1GSC103_0620	DNV LNQYELT YNPTRPRFYY	85.00