

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Alana Bazán Corrêa

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade
que aloja o Programa de Pós-graduação)

**Investigação de novos ligantes do peptídeo
antimicrobiano LL-37 por técnica de Phage Display**



São Paulo

2023

Alana Bazán Corrêa

Investigação de novos ligantes do peptídeo antimicrobiano LL-37 por técnica de Phage Display

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva

Coorientador: Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corrêa, Alana Bazán

Investigação de novos ligantes do peptídeo antimicrobiano LL-37 por técnica de Phage Display / Alana Bazán Corrêa. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Coorientador: Ricardo José Giordano.

Descritores: 1.Peptídeos antimicrobianos
2.Técnicas de visualização da superfície celular
3.Catelicidinas 4.Bioinformática 5.Imunidade inata

USP/FM/DBD-206/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

- Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Para meus pais, **Nancy** e **Carlos**,

por seu apoio e amor incondicional.

Para meu *abuelo* **Juan Carlos** e meu avô

Caque, sinto a falta de vocês todos os dias.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, **Nancy** e **Carlos**, por me apoiarem nessa jornada e me auxiliarem sempre, mesmo a distância, com seus conselhos, amor e sabedoria. Obrigada por confiarem em mim, por acreditarem de que eu era capaz de finalizar este estudo e por me deixarem desistir dele. Por todas as orações, pelo carinho e pelas palavras de força em cada ligação de vídeo. Eu amo muito vocês.

À minha **família** por estarem sempre torcendo por mim e por me amarem.

A **Deus** por me ajudar nesse caminho que não foi nada fácil.

Ao Prof. Dr. **Fabiano Pinheiro da Silva** pela oportunidade de ingressar no programa e no caminho que nos trouxe até a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Ricardo José Giordano** por me receber em seu laboratório no Instituto de Química da USP para realização do Phage Display.

À **Heloise** do laboratório do Instituto de Química da USP pelo seu auxílio, orientação e instrução. Você foi fundamental para a execução desse projeto, sem sua ajuda não sei se teria conseguido vencer meu primeiro ano do mestrado.

À **Thais Martins de Lima** por me auxiliar durante os últimos ensaios e pelos seus conselhos, apoio e ensinamentos. Você foi fundamental para a finalização desse projeto.

À **Suely Kubo Ariga** por me auxiliar com a cultura de células, sem você eu não teria conseguido fazer com que elas sobrevivessem.

A todos que fazem parte do **LIM51** da Faculdade de Medicina da USP e a todos que fazem parte laboratório do Prof. Dr. **Ricardo Giordano** no Instituto de Química da USP.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa do LIM51: **Beatriz, Ewerton, Luci, Ismael** e **Rafael**. As conversas antes e após cada reunião, o compartilhamento

de dúvidas, angústias e algumas reclamações. O apoio de todos foi um incentivo para não desistir.

Ao **Dantas, Ken e Azank** pela amizade e acolhimento quando cheguei em São Paulo em 2019.

Ao meu namorado, **Vinicius**, pelo apoio na etapa de finalização, seu amor, carinho e cada abraço em meio as lágrimas derramadas que me deram força.

Ao meu amigo, **Arthur “Wing”**, pela sua amizade de anos, por me ouvir, me ajudar e por todas as ligações na madrugada.

Aos meus **amigos**, todas as ligações na pandemia foram essenciais para não perder o foco e passar pelos momentos difíceis, obrigada.

E por último gostaria de agradecer a mim, por ser forte, por não querer desistir mesmo quando isso me foi proposto, por ter tido a ideia de que poderia sonhar além do que me era oferecido, por ter sido corajosa e saído de casa, da minha cidade, do meu estado para um lugar desconhecido e completamente sozinha. Por não ter fugido mesmo em meio a tanta dor e perdas, por ter levantado a cabeça e seguido em frente, por ter aguentado tanta dor e mesmo assim ter encontrado a felicidade em meio ao caos. Muito obrigada a mim, por ter dado meu sangue, suor e lágrimas pois no final valeu a pena. Eu consegui aproveitar o caminho, por mais difícil que tenha sido, e venci.

“I gave my blood, sweat, and tears for this(...)

You're on your own, kid

Yeah, you can face this”

You're On Your Own, Kid - Taylor Swift

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 Introdução

1.1 Peptídeos antimicrobianos..... 1

1.2 Phage Display..... 6

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral..... 9

2.2 Objetivos específicos..... 9

3 Materiais e Métodos

3.1 Phage Display em *beads* magnéticas de streptavidina..... 10

3.2 *Panning in vitro*..... 11

3.3 Precipitação de fagos com PEG/NaCl..... 12

3.4 Titulação dos fagos..... 13

3.5 Phage PCR 14

3.6 Amplificação dos fagos..... 14

3.7 Ensaio de *Binding*..... 14

3.8 Ensaio de competição..... 14

3.9 Tratamento das células com LL-37..... 15

3.10 Preparação das células - Cross-Linking in vivo..... 16

3.11 Imunoprecipitação..... 16

3.12 Ligação *beads* com anticorpo..... 17

3.13 Imunoprecipitação do Antígeno..... 18

3.14 Western Blot..... 19

4	Resultados	
	4.1 <i>Panning</i> em placa e <i>beads</i> magnéticas.....	20
	4.2 Amplificação dos fagos.....	22
	4.3 Ensaio de <i>Binding</i>	24
	4.4 Ensaio de competição.....	25
	4.5 BLAST.....	26
	4.6 Vetor de clonagem.....	29
	4.7 Imunoprecipitação.....	29
5	Discussão	31
6	Conclusões	40
7	Referências	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
IMC	Índice de massa corpórea
LMA	leucemia mieloide aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MFS	Superfamília dos Facilitadores Maioritários
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células <i>Natural Killer</i>
RPM	Rotações por minuto
SPNS	Homólogo spinster
TLR	Receptor Toll-like
™	Marca registrada
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema representativo da construção de uma biblioteca de <i>Phage Display</i>	7
Figura 2	Esquema de construção das bibliotecas X6 e CX8C feitas no laboratório do Prof. Dr. Ricardo Giordano no Instituto de Química da USP.....	8
Figura 3	Esquema de titulação dos fagos e da bactéria K91Kan para plaquear posteriormente.....	13
Figura 4	Esquema de tratamento das células HEK-293 com LL-37..	16
Figura 5	Colônias de bactérias que produzem fagos.....	20
Figura 6	Sequenciamento dos fagos selecionados em PCR a partir do <i>panning in vitro</i>	21
Figura 7	Sequenciamento dos fagos selecionados em PCR a partir do <i>panning</i> em <i>beads</i> magnéticas de streptavidina.....	22
Figura 8	Fagos amplificados e selecionados a partir do PCR.....	23
Figura 9	Sequenciamento de fagos selecionados a partir da amplificação.....	23
Figura 10	Análise do ensaio de <i>Binding</i>	24
Figura 11	Análise do ensaio de competição com diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano LL-37.....	25
Figura 12	Vetor de clonagem do <i>Prontein Spinster homolog 3</i> do gene SPNS3 em humanos realizado através da sequência de DNA.....	29
Figura 13	Gel de Western Blot em 10% do ensaio de Imunoprecipitação apresentado na forma sem luz e com luz para melhor visualização do resultado.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Descrição de reagentes e volumes para uma reação de Phage PCR	14
Tabela 2	Lista das vinte principais proteínas que exibem sequências com os maiores escores de similaridade e os menores valores de E, quando comparados aos aminoácidos sequência GNWSFV. Resultados obtidos através de uma pesquisa BLAST.....	27

Resumo

Corrêa AB. Investigação de novos ligantes do peptídeo antimicrobiano LL-37 por técnica de Phage Display [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2023.

Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) são moléculas-chave da imunidade inata. Os mecanismos celulares regulados por tais moléculas e o seu modo de ativação, no entanto, permanecem ainda obscuros. Catelicidinas são uma família de peptídeos antimicrobianos, expressas por células do sistema imune e por células epiteliais do intestino, vias aéreas, sistema uro-genital, superfície ocular e da pele. LL-37 é o único membro da família das catelicidinas em humanos. LL-37 é uma molécula capaz de matar microorganismos por ação direta, sendo também capaz de modular a resposta imune de maneira variada e ainda pouco compreendida. Phage Display é uma técnica de clonagem que se utiliza de uma biblioteca de pequenos peptídeos, expressos na superfície de partículas virais (bacteriófagos), para a captura de molécula-alvo. O presente estudo buscou identificar novos ligantes do peptídeo antimicrobiano LL-37, através da técnica de phage Display. Como resultado, descobrimos que a sequência de aminoácidos GNWSFV se liga ao peptídeo antimicrobiano LL-37. Alinhamento por bioinformática revelou que essa sequência apresenta grande similaridade com uma porção da proteína humana Spinster Homolog 3. Tal resultado desvenda um novo mecanismo de sinalização pelo peptídeo LL-37, podendo levar ao desenvolvimento de novas drogas.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, phage display, LL-37, bioinformática, imunidade inata

Abstract

Corrêa AB. Investigation of new ligands for the antimicrobial peptide LL-37 using the Phage Display technique [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2023.

Antimicrobial Peptides (AMPs) are essential components of the innate immunity. Their cellular mechanisms and mode of activation, however, remain unclear. Cathelicidins are a family of antimicrobial peptides expressed by cells of the immune system and by epithelial cells of the intestine, airways, genitourinary tract, ocular surface, and the skin. In humans, LL-37 is the only member of the cathelicidins family. LL-37 can kill microorganisms directly, being also able to modulate the immune response in various ways that are still poorly understood. Phage Display, a cloning technique, utilizes a library of small peptides, expressed on the surface of bacteriophages, to capture a target molecule. In this study, we aimed to identify new ligands of the antimicrobial peptide LL-37 using the phage display technique. Our results showed that the GNWSFV amino acids sequence binds to the antimicrobial peptide LL-37. Bioinformatics search revealed that this sequence bears great similarity to a portion of the human protein Spinster Homolog 3, uncovering a new LL-37 signaling mechanism that may be exploited to the development of new drugs.

Keywords: antimicrobial peptides, phage display, LL-37, bioinformatics, innate immunity

Introdução



1. Introdução

O presente estudo contempla o uso da técnica de Phage Display, utilizada na identificação de novos ligantes para Peptídeos antimicrobianos LL-37. Conceitos estes que são abordados com propriedade nos subcapítulos a seguir.

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Os Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são um grande grupo de compostos produzidos por organismos multicelulares, presentes no reino animal e no reino vegetal. Esses peptídeos atuam na defesa do hospedeiro e são um componente primitivo e conservado da resposta imune inata, moléculas que fornecem proteção contra patógenos ambientais, agindo contra muitos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, vírus, e entre outros. A produção de AMPs é um componente importante da imunidade inata contra a infecção. Sua produção pode ser constituída ou induzida, dependendo de uma ampla gama de características, a saber: o organismo, o tipo celular e o peptídeo a ser considerado (Pinheiro da Silva e Machado, 2012).

Estudos referem que mais de 1200 peptídeos antimicrobianos foram identificados. Os peptídeos antimicrobianos são muitos em sua sequência e estrutura. Geralmente podem ser anfipáticos, pequenos, de 12 a 50 aminoácidos, e ter pelo menos duas cargas positivas, como resíduos de arginina e lisina. Essas propriedades químicas fazem com que seja possível a inserção do AMPs na parede celular aniônica e nas membranas fosfolípídicas de microrganismos, interrompendo-as e resultando em morte bacteriana (Pinheiro da Silva e Machado, 2012).

A primeira catelicidina foi descoberta em granulócitos de coelho. Esta foi identificada como uma proteína precursora de 18kDa, capaz de ligar o lipopolissacarídeo bacteriano da endotoxina (LPS). Tais descobertas propiciaram que vários outros estudos fossem iniciados, determinando que a extremidade C-terminal deveria ser atribuída à atividade de ligação ao LPS. Além

disso, o peptídeo antimicrobiano de 37 aminoácidos mostrou ter um amplo efeito antibacteriano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Vandamme et al., 2012). Em 1995, a proteína catelicidina humana foi identificada e denominada HCAP18, mais tarde chamada de LL-37 por começar com duas leucinas (Larrick et al., 1995 (a)).

Todas as catelicidinas compartilham um padrão de expressão semelhante. Esse padrão é sintetizado como pré-pro-proteína com domínio N-terminal, o qual é altamente conservado e o domínio antimicrobiano C-terminal. Apesar da abundância de catelicidinas em vários eucariotos, os seres humanos sintetizam apenas uma catelicidina, o LL-37, cuja sequência já é conhecida (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES). O LL-37 é um peptídeo anfipático, de estrutura helicoidal favorecida pela concentração fisiológica de sal e pH. Estudos demonstraram que a oligomerização (formação de complexos protéicos a partir da ligação de duas ou mais cadeias peptídicas) do LL-37 facilita sua capacidade de estimular células hospedeiras, enquanto diminui seu potencial antimicrobiano. Sendo assim, o LL-37 torna-se propenso a interagir com o soro e componentes do exterior da parede de patógenos, o que leva ao sequestro de peptídeos (Fabisak et al., 2016).

O LL-37 pode vir a assumir uma estrutura alfa-hélice secundária e adquirir propriedades anfipáticas, em condições fisiológicas, que permitem assim sua interação com membranas bacterianas ou outros componentes aniônicos. Possui uma porção hidrofóbica que pode interagir com o lipopolissacarídeo (LPS) devido aos resíduos com cargas positivas que interagem com moléculas de cargas negativas (Moreno-Angarita et al., 2019; Oren et al., 1999).

A hélice alfa anfipática catiônica possui três domínios, sendo eles: hélice alfa N-terminal adjacente, uma hélice alfa C terminal, e uma hélice cauda C-terminal. Cada hélice possui uma função única. A alfa-hélice N-terminal está envolvida na quimiotaxia de células imunes inatas, na formação de oligômeros peptídicos, e na proteção proteolítica da célula (Moreno-Angarita et al., 2019). Esta tem atividade hemolítica em humanos. Pesquisas mostraram que os peptídeos antimicrobianos em altas concentrações são capazes de lisar hemácias. Essas concentrações ficam acima do nível que normalmente é

visualizado na eliminação de bactérias. A alfa-hélice C terminal pode ser descrita como o núcleo do peptídeo antimicrobiano, pois, é responsável pela atividade antimicrobiana, antineoplásica e antiviral do LL-37. E, por sua vez, a cauda C-terminal está relacionada a formação de tetrâmeros peptídicos, que interagem com moléculas de cargas negativas, como o LPS de bactérias gram-negativas. A cauda C-terminal fornece também especificidade contra membranas aniônicas bacterianas (Moreno-Angarita et al., 2019; Bucki e Janmey, 2006).

Inicialmente, pensava-se que o LL-37 era um peptídeo presente apenas constitutivamente nos grânulos secundários dos neutrófilos, mas a expressão de LL-37 em múltiplas células epiteliais confere a ela um papel crucial na defesa contra doenças induzidas por patógenos. Nos locais de inflamação, normalmente são encontradas concentrações elevadas de LL-37, onde age como uma defesa primária contra bactérias e outros patógenos. Também se observou o aumento na concentração de LL-37 em resposta às feridas, à radiação UV, bem como, aos danos à barreira epitelial e ao retículo endoplasmático. Foi demonstrado que os peptídeos de catelicidina matam fungos, eliminam bactérias, destroem e inibem os biofilmes bacterianos e podem funcionar como agentes virais. Também, foi identificado que as catelicidinas podem atuar como quimiocinas, modulando ou estimulando as células do sistema imunológico. A catelicidina afeta tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo, que atua como uma espécie de ponte entre os dois sistemas. A catelicidina pode agir também junto com as defensinas, outra família de peptídeos antimicrobianos, ricas em cisteína, responsáveis pela imunidade adaptativa, defesa contra patógenos invasores e podem estar envolvidas na inflamação. (Moreno-Angarita et al., 2019; Vandamme et al., 2012).

O LL-37 pode ser armazenado como uma molécula precursora nos grânulos dos neutrófilos, células *Natural Killer* (NK) e mastócitos. O peptídeo pode ser liberado em resposta ao receptor Toll-like (TLR) ou sinalização de citocinas, como resultado da inflamação ou danos teciduais, gerados por patógenos. Para que ocorra a liberação de mastócitos na corrente sanguínea, o hCAP 18 é liberado para o meio extracelular, onde será clivado em seu domínio C-terminal por serina proteases, pertencente à família das calicreínas, por um

polipeptídeo de ação proteolítica em queratinócitos, e pela proteinase 3 encontrada em neutrófilos. Os neutrófilos amplificam a resposta imune a ponto de erradicar a infecção devido as altas concentrações de LL-37 que foi liberada no local de inflamação. Sendo assim, pode ser entendido que o objetivo principal do LL-37 na resposta a inflamações é estimular o reparo das funções epiteliais após um ataque imunológico (Sørensen et al., 2001; Kahlenberg e Kaplan, 2013; Moreno-Angarita et al., 2019).

As catelicidinas são geralmente expressas pelas células em contato direto com o meio ambiente. Essa expressão foi observada nas células epiteliais do intestino, vias aéreas, órgãos genitais, superfície ocular, pele, e nas glândulas endócrinas. Resultando na primeira linha de defesa contra bactérias e patógenos. Como forma de imunomodulação, o LL-37 é capaz de atrair células do sistema imunológico para combater a infecção, sendo capaz de estimular e modular sua ação. Assim, resultando em uma produção e liberação, de forma equilibrada e controlada, de citocinas pró e anti-inflamatórias. Em seres humanos a expressão de catelicidina pode ser suprimida nos casos de doenças de pele, como a dermatite atópica e úlceras crônicas. Níveis elevados de catelicidina, de forma anormal, são expressos em doenças de pele autoimunes como psoríase e rosácea (Vandamme et al., 2012). Defeitos na expressão ou processamento de LL-37 são associados à patogênese de várias doenças humanas como psoríase, rosácea, fibrose cística e até câncer (Verjans et al., 2016).

Após a infecção, o LL-37 atua como um sinal de alerta e une o sistema imunológico inato e adaptativo, recrutando células imunocompetentes para o local da infecção. Além disso, o LL-37, ajusta os níveis de citocinas inflamatórias, servindo para controlar o equilíbrio entre as pró e anti-inflamatórias. O LL-37 também pode ser encontrado em processos biológicos que não envolvam células imunes, como: apoptose, angiogênese, fechamento de feridas e manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal. Em células hospedeiras, a maioria dos efeitos induzidos por LL-37 é mediada pela ativação específica de receptores da superfície celular. O LL-37 foi relacionado a pelo menos nove receptores que pertencem a diferentes classes de receptores.

Destes, quatro receptores acoplados à proteína G (GPCRS), três receptores tirosina-quinase (RTKS), um canal iônico ativado por ligante (LGIC) e receptores do tipo Toll (TLRS). Pesquisas apresentaram que o LL-37 também inibe o receptor de gordura CD36 em adipócitos e hepatócitos (Verjans et al., 2016).

Em outro estudo, foi mostrado pela primeira vez a migração do LL-37 dentro do núcleo de células eucarióticas. O LL-37 foi estudado como uma molécula imunorreguladora com capacidade de se ligar a numerosos receptores de membrana, bem como receptores intracelulares, induzindo sinal celular. Porém, observou-se a necessidade de mais estudos a esse respeito. Ainda, há relatos de que o *self*-DNA se une ao LL-37 em doenças autoimunes como a psoríase, desencadeando a produção de interferon patológico após o envolvimento em compartimentos endossômicos mediados pela ligação direta ao receptor Toll-like 9. O LL-37 pode, portanto, formar um complexo com DNA e induzir modificações em sua configuração tridimensional ocasionadas em campos eletrostáticos (Pinheiro da Silva et al., 2013).

Atualmente, a hipótese de consenso é de que o LL-37 aciona as células eucarióticas por meio de cinco mecanismos distintos, considerando os modos de ação indiretos e diretos. Em um receptor específico, o LL-37, pode agir como um ligante substituto ou influenciar na formação ou estabilização de micro domínios de membrana contendo receptor. Também, foi verificado que o LL-37 contribui para a ativação de receptores, promovendo sua incorporação em balsas lipídicas. Os receptores que se unem em balsas lipídicas podem ser mais propensos a seus antagonistas cognatos ou até mostras de ativação na ausência de antagonistas. Além disso, os agregados de LL-37 podem penetrar em uma variedade de células hospedeiras, principalmente por vias endocíticas mediadas por receptores (Verjans et al., 2016).

Sendo assim, o LL-37 é um quimioatraente para neutrófilos, monócitos, células epiteliais e leucócitos após a infecção. Células do sistema imunológico inato, como os neutrófilos, são diretamente atraídas pelo LL-37 expresso pelas células epiteliais infectadas. Além disso, os neutrófilos são uma importante fonte de LL-37 armazenada em seus grânulos (Bandurska et al., 2015).

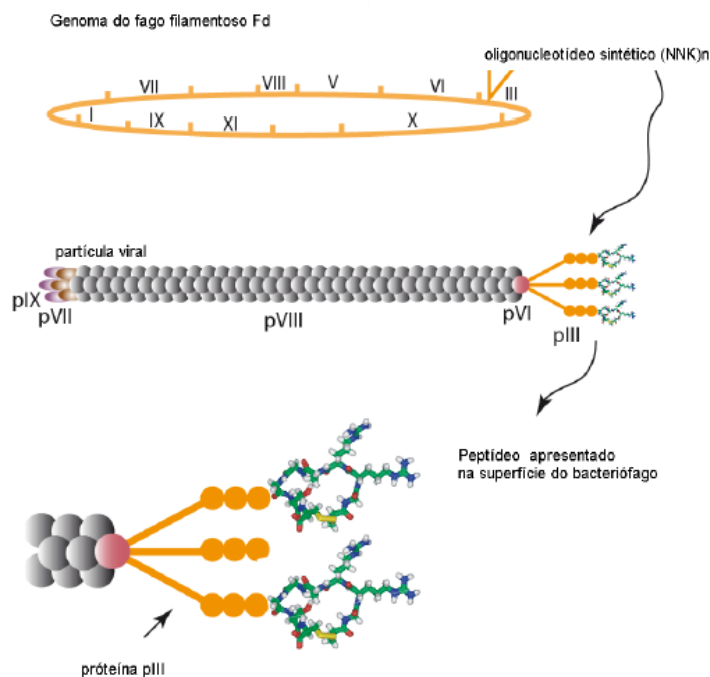
As propriedades anti-inflamatórias do LL-37 foram identificadas por meio de suas ações antagônicas contra as respostas de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-12 em vários tipos de células. O LL-37 diminui a sinalização de TLR-4 mediada por LPS e interrompe a função do receptor TLR-4 em células dendríticas e macrófagos na presença de LPS, resultando em níveis mais baixos de produção de citocinas pró-inflamatórias (Moreno-Angarita et al., 2019).

1.2 Phage Display

Phage Display é uma técnica de clonagem que permite a expressão de diversas sequências de peptídeos na superfície de bacteriófagos (fagos), e a seleção destas, com base na afinidade por uma molécula-alvo. Esta é uma técnica de seleção bastante versátil, que permite ensaios de seleção de peptídeos contra diferentes alvos em diferentes situações, por exemplo, ensaios de seleção de peptídeos (chamados biopanning) podem ser realizados *in vitro* contra moléculas alvo aderidas em superfície. Esta abordagem permite identificar moléculas que potencialmente podem servir para o desenvolvimento de fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e de outros insumos (Smith, 1985; Scott e Smith, 1990; Giordano et al., 2009).

A técnica de Phage Display baseia-se na construção de bibliotecas de bacteriófagos filamentosos de tal forma que pequenos peptídeos (entre 5 e 15 aminoácidos) são apresentados numa das proteínas do capsídeo viral (Figura 1). Uma biblioteca de Phage Display pode conter mais de 10⁸ diferentes peptídeos o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico.

Figura 1 - Esquema representativo da construção de uma biblioteca de *Phage Display*

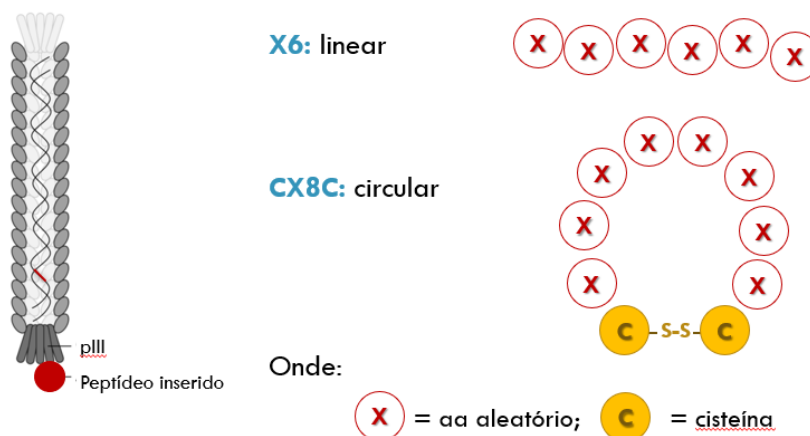


Fonte: Protocolos do laboratório de Bioquímica Combinatorial, 2017

Uma característica do Phage Display é que os peptídeos selecionados frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo (Koivunen et al., 1999; Giordano et al., 2001; Cloutier et al., 2004; Giordano et al., 2005). Essa característica do Phage Display permite identificar alvos terapêuticos e diagnósticos relevantes aos diversos processos biológicos de um organismo e, ao mesmo tempo, isolar e caracterizar peptídeos antagonistas ou agonistas dos alvos identificados.

A eficácia da seleção por Phage Display está diretamente relacionada com a complexidade da biblioteca utilizada, quer dizer, quanto maior for a diversidade de clones contendo peptídeos distintos dentro da biblioteca, maior a probabilidade de se encontrar um ligante afim à molécula alvo. Uma biblioteca de Phage Display pode conter mais de 10^{10} diferentes peptídeos o que resulta em ligantes, para virtualmente qualquer alvo biológico (Resende et al., 2015). (Figura 2)

Figura 2 - Esquema de construção das bibliotecas X6 e CX8C feitas no laboratório do Prof. Dr. Ricardo Giordano no Instituto de Química da USP (Michaloski et al., 2016)



Portanto, Phage Display é uma técnica que encontra múltiplas aplicações, tais como, desenho racional de fármacos, terapias direcionadas, terapias gênicas, produção de vacinas, métodos diagnósticos, entre outras aplicações (Giordano et al., 2009).

Com o intuito de elucidar novos sítios de ligação para o peptídeo antimicrobiano LL-37 e conseqüentemente entender melhor de que forma este atua no organismo, optou-se por usar o protocolo de Phage Display desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Ricardo Giordano no Instituto de Química da USP, já que as funções imunomoduladoras dos peptídeos antimicrobianos ainda são obscuras, aliado ao fato do desconhecimento de como ocorre a sua atuação completa no organismo.

Objetivos



2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Buscar novos ligantes do peptídeo antimicrobiano LL-37, através da técnica de Phage Display, e identificar as moléculas por técnica de Bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Utilizar a técnica de Phage Display para pesquisar novos ligantes do LL-37;
- ✓ Identificar os resultados obtidos por Bioinformática;
- ✓ Validar o novo ligante encontrado, por meio da Imunoprecipitação;

Materiais e Métodos



3. Materiais e Métodos

3.1 Phage Display em *beads* magnéticas de streptavidina

Os tubos usados no Phage Display foram bloqueados para que a seleção fosse específica na molécula alvo. Adicionou-se 1mL de PBS com 3% BSA em um microtubo de 1,5mL a ser utilizado. Incubou-se sob rotação leve por 1h em temperatura ambiente. Após o tempo, descartou-se o tampão e foi reservado o tubo.

Em um novo tubo foi adicionado 10 μ L de *beads* magnéticas com streptavidina (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1, 10mg/mL #65601, #65602), e com o auxílio de um ímã, foram baixadas as *beads* e descartado o sobrenadante. Foram lavadas as *beads* com 1mL de PBS e colocadas no ímã novamente por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. Após, as *beads* foram incubadas com 1mL de PBS com 3% BSA, sob rotação leve por 1h em temperatura ambiente. Utilizou-se o ímã para baixar as *beads* e foi descartado o tampão, e suspendeu-se em 10 μ L de PBS.

Iniciou-se o primeiro *round* da clarificação da biblioteca de fagos adicionando 10 μ L de *beads* magnéticas em um tubo de 1,5mL. Utilizou-se o ímã para baixar as *beads* e retirar o sobrenadante. Foi lavado com 1mL de PBS, colocou-se no ímã novamente e foi descartado o sobrenadante. As *beads* foram resuspensas em 45 μ L de PBS 3% BSA e adicionou-se 10⁹ TU de fagos (em aproximadamente 5 μ L) da biblioteca de fagos. Nos *rounds* seguintes, procedeu-se igualmente, mas foi adicionado 5 μ L dos fagos precipitados do *round* anterior no lugar da biblioteca. Incubou-se sob agitação por 1h em temperatura ambiente, após baixadas as *beads* com o ímã, foi coletado o sobrenadante para ser utilizado no ensaio e descartaram-se as *beads*.

Adicionou-se 50 μ L do sobrenadante clarificado da biblioteca de fagos ao tubo bloqueado e 100-500nM (5 μ L) do peptídeo LL-37 biotilado. Incubou-se por 1h à temperatura ambiente sob gentil rotação. As *beads* bloqueadas foram adicionadas à solução contendo os fagos e o peptídeo LL-37 biotilado e

incubadas sob gentil agitação por 15 minutos. As *beads* foram imantadas e retirou-se o sobrenadante com uma ponteira de 200µL acoplada ao sistema de vácuo. Após, lavar por 7 vezes com PBS 0,1% *tween* 20, 2 vezes com PBS 3% BSA e apenas 1 vez com PBS, foram ressuspensas as *beads* em 50µL de PBS e adicionou-se 200µL de K91Kan (DO = 1,6-2,0) e foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Recuperou-se a solução de *beads* com a bactéria adicionando 20mL de LB kan-tet em um tubo falcon e deixou-se crescer durante a noite por 12h sob agitação, para precipitar os fagos no dia seguinte.

No primeiro *round* indica-se não plaquear, apenas nos demais *rounds*, plaqueando a partir dos 20mL: 100µL, 1:10 e 1:100. Ao final do último *round*, contou-se o número de colônias, que foram recuperadas com o auxílio de uma ponteira de 10µL, primeiro em 100µL de PBS 1X estéril e em seguida em 150µL de LB-glicerol. A partir do PBS 1X, procedeu-se para o PCR de fago e sequenciamento.

3.2 *Panning in vitro*

Em um poço de placa de 96 poços de fundo chato, foi realizado o *coating* do *panning in vitro*. Para tanto, colocou-se 1µg de peptídeo LL-37 com PBS estéril. Seguindo a recomendação do protocolo, os poços escolhidos foram fisicamente bem afastados, para evitar contaminações. A placa foi mantida na geladeira durante a noite por 12h.

Retirou-se o peptídeo do poço e foi guardado em um tubo no freezer a -20°C para outros ensaios posteriores. Completou-se o poço com 3% BSA em 1X PBS ou 3% BSA e foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas. Adicionou-se o volume de 5µL da biblioteca em PBS 3% BSA para volume final de 50µL e foi incubado no poço por 2 horas à temperatura ambiente. Após, foram retirados os fagos, da biblioteca dos poços, e lavados com 200µl de PBS, repetindo a ação por 9 vezes. Cada lavagem foi realizada três vezes e homogeneizado com a pipeta. No final, deixou-se 50µL de PBS em cada poço, a fim de que não secasse. Acrescentou-se 200µL de K91Kan (DO = 1,6-2,0) e foi incubado por 30 minutos. Foi transferida a solução de fagos e bactéria para um tubo falcon de 50mL contendo 20mL de LB com tetraciclina (20µg/mL) e kanamicina

(100µg/mL). O tubo falcon foi incubado contendo as bactérias em uma estufa de 37°C com agitação de 250-300 RPM, devendo ficar entre 18 a 20 horas. Após a incubação realizou-se a precipitação dos fagos.

No segundo *round* repetiu-se o *coating* do primeiro dia e o primeiro *round*. Após transferir a solução de fagos e bactéria para um tubo falcon de 50mL, foram plaqueadas em triplicatas a partir dessa solução, em 100µL, 10µL e 1µL. Incubou-se o tubo falcon sob agitação de 250-300 RPM e as placas em uma estufa a 37°C, devendo ficar entre 18 a 20 horas.

3.3 Precipitação de fagos com PEG/NaCl

Com o fim da incubação do tubo falcon com solução na etapa anterior, colocou-se o mesmo para centrifugar a 8.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante de fagos foi transferido para um novo tubo falcon e se acrescentou a solução PEG/NaCl para uma concentração final de 13% (adicionar 0,15mL da solução PEG/NaCl para cada 1mL de sobrenadante de cultura). Misturou-se bem e se manteve no gelo por 1 hora.

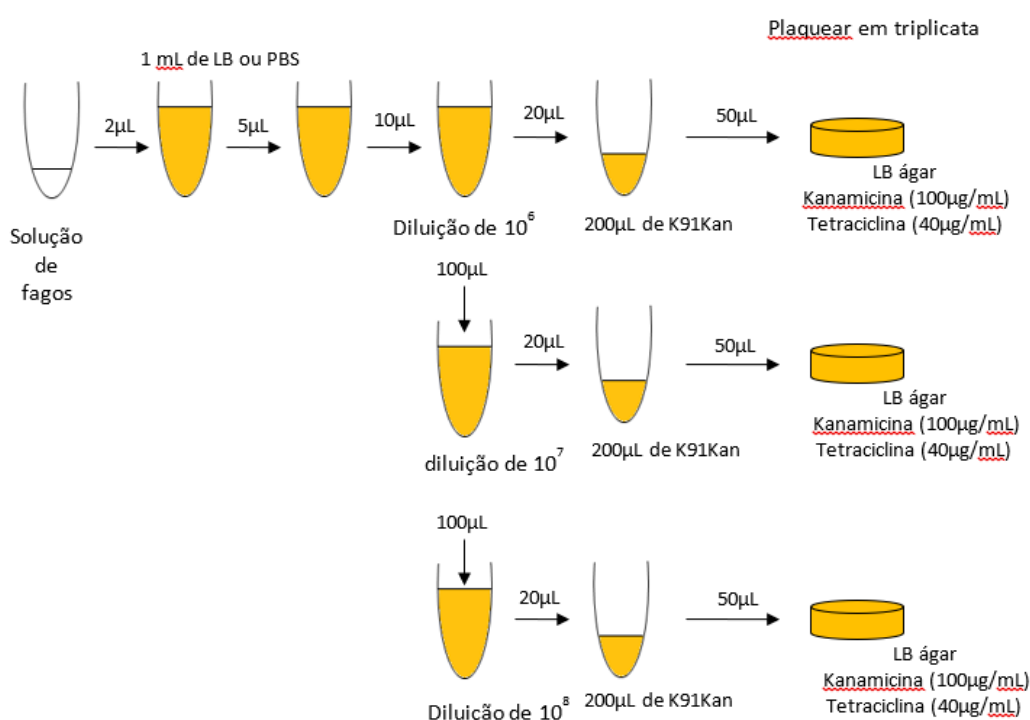
Centrifugou-se a solução com PEG/NaCl 8.000xg por 20 minutos a 4°C. Após, foi desprezado o sobrenadante e o precipitado (*pellet*) de fagos, passando por uma nova centrifugação de 8.000xg a 4°C, desta vez por 5 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e se ressuspendeu o *pellet* de fagos em 1mL de PBS estéril. A suspensão de fagos foi incubada no *shaker*, 250 RPM a 37°C por 15 minutos, e depois, foram transferidos os fagos para um tubo de 1,5mL e centrifugados em velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante de fagos foi novamente transferido para um novo tubo de 1,5mL contendo 13% PEG/NaCl (150µL) e incubado no gelo durante 15 minutos.

O tubo foi centrifugado em velocidade máxima por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e foi centrifugado por mais 5 minutos. Então, se ressuspendeu o *pellet* de fagos em 100 a 500µl de PBS estéril e incubou-se sob agitação de 250 RPM a 37°C por 10 minutos. Foi transferido o sobrenadante de fagos para um novo tubo de 1,5mL e armazenado na geladeira a 4°C para posterior titulação.

3.4 Titulação dos fagos

Foi inoculado a K91Kan da placa LB-Kan em 10mL de meio líquido TB fosfato-Kanamicina (50 µg/mL) e incubado a 37°C, sob agitação de 250RPM até chegar a DO= 1,85 – 2,00. Após, foi infectado 200µL de bactéria, seguindo a representação abaixo com as diluições do fago. (Figura 3)

Figura 3 - Esquema de titulação dos fagos e da bactéria K91Kan para plaquear posteriormente



Após realizar o esquema de titulação, foram incubados por 30 minutos os tubos. Depois realizado o plaqueamento, em triplicatas de 50µl em placas LB kanamicina (100µg/ml) e tetraciclina (40µg/ml). Deixou-se crescer na estufa a 37°C durante 12h e, após esse tempo, foram contadas as colônias, e assim determinou-se o título de fagos.

3.5 Phage PCR

A região que flanqueia a sequência que codifica os peptídeos inseridos no gene da proteína pIII é amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando como alvo colônias de bactérias que produzem fagos. Utilizando este produto de PCR como alvo em reações de sequenciamento de DNA, podemos obter a sequência de peptídeo expressa em determinado fago. Para cada colônia (TU) coletada na placa, é feita uma reação de PCR conforme descrito na tabela abaixo.

Tabela1 – Descrição de reagentes e volumes para uma reação de Phage PCR.

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Água ultra-pura			11,5 µl
Tampão com (NH ₄) ₂ SO ₄	10X	1X	2,5 µl
dNTP	2,5mM	2,5uM	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	2mM	2,0 µl
Primer phage forward	10 pmol/ µl	0,8pmol/ µl	2,0 µl
Primer phage reverse new	10 pmol/ µl	0,8pmol/ µl	2,0 µl
Taq DNA polymerase	5U/ul	1U/ul	0,5ul
Template (1colônia/100ul PBS)			2,0 ul
Total volume			25ul

3.6 Amplificação dos fagos

Foi colocada a bactéria K91Kan para crescer em 10mL de meio TB-fosfato-kanamicina e infectou-se 200µL de K91Kan em 40mL de meio LB (em um Erlenmeyer com 40µL de Kan/Tet). Adicionou-se 5µL dos fagos selecionados da placa de LB-Glicerol e deixou-se crescer durante 12h. Após, foram precipitados e ressuspensos em 40µL de PBS.

3.7 Ensaio de *Binding*

Realizou-se um *coating* no primeiro dia com 100-200ng do peptídeo LL-37 em 50µL de PBS ou TCM, usando como controle o BSA 3%. Aplicou-se cada peptídeo em PBS em um poço de uma placa de 96 poços de fundo chato. É

indicado que os poços escolhidos estejam fisicamente bem afastados, para evitar contaminações. Foram mantidos na geladeira durante 12h.

Na sequência, foi retirado o peptídeo do poço e armazenado em um tubo, em um freezer a -20°C para futuros ensaios. Completou-se totalmente o poço com BSA 3% em PBS 1x e incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas. Foi adicionado entre 10^8 e 10^9 TU/ μL de fago da biblioteca em 50 μL de PBS e incubado no poço por 2 horas.

Foram retirados os fagos da biblioteca do poço e lavados com 200 μL de PBS 1x cada poço, repetindo essa lavagem por 9 vezes em cada. Em cada lavagem foi realizado 3 vezes a homogeneização com a pipeta. Ao final, foi deixado 50 μL de PBS no poço para que não secasse. Foi acrescentado 200 μL da bactéria K91Kan e incubou-se durante 30 minutos. Transferiu-se a solução com bactéria do poço para um falcon com 10mL de LB e foi plaqueado 100 μL em triplicata. Foram diluídos 10 e 100 vezes, e plaqueados 100 μL de cada diluição em triplicatas.

3.8 Ensaio de competição

No primeiro dia realizou-se um *coating* com 100-200ng do peptídeo LL-37 em 50 μL de PBS, usando como controle BSA 3%. Foram aplicados cada peptídeo em PBS em um poço de placa, de 96 poços de fundo chato. É indicado que os poços escolhidos estejam fisicamente bem afastados, para evitar contaminações. Manteve-se na geladeira durante 12h.

Na sequência, foi retirado o peptídeo do poço e guardado em um tubo em um freezer a -20°C para futuros ensaios. Completou-se totalmente o poço com BSA 3% em PBS 1x e foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas. Adicionou-se então, entre 10^8 e 10^9 TU/ μL de fago da biblioteca juntamente com peptídeo LL-37 em 50 μL de PBS e incubou-se no poço por 2 horas. Foi realizado o controle negativo apenas com fago, sem peptídeo.

Foram retirados os fagos da biblioteca do poço e lavados com 200 μL de PBS 1x cada poço, repetindo essa lavagem por 9 vezes em cada. Em cada lavagem foi feita 3 vezes a homogeneização com a pipeta. Ao final, deixou-se

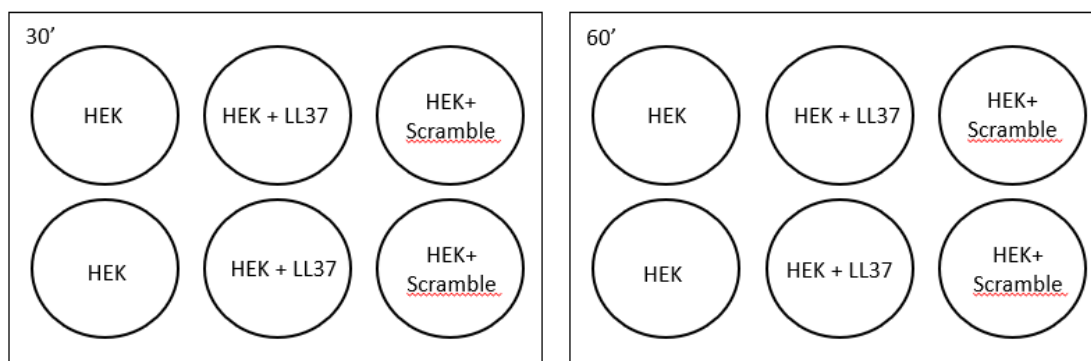
50µL de PBS no poço para que não secasse. Foi acrescentado 200µL da bactéria K91Kan e foi incubado durante 30 minutos. Transferiu-se a solução com bactéria do poço para um tubo falcon com 10mL de LB e foi plaqueado 100µL em triplicata, diluindo 10 e 100 vezes e plaqueado 100µL de cada diluição, em triplicatas.

3.9 Tratamento das células com LL-37

Realizou-se um tratamento das células HEK-293 com LL-37 seguindo a representação do esquema da imagem abaixo. As células são provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro, linhagem 293 [HEK-293]. Foram obtidas a partir de um rim embrionário primário humano, transformado por adenovírus tipo 5. Células do tipo aderente. (Figura 4)

Foi utilizado a concentração de 5×10^6 células por poço em uma placa de 6 poços. Adicionou-se 10µM de LL-37 por poço para um volume final de 500µL, por poço, e foi incubado em estufa por 2h a 4°C.

Figura 4 - Esquema de tratamento das células HEK-293 com LL-37



3.10 Preparação das células - *Cross-Linking in vivo*

As células foram lavadas com tampão de reação (Salina tamponada com fosfato (PBS) fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4) gelado, 5 vezes para remover o meio de cultura. Após a lavagem, foram ressuspendidas as células peletizadas no tampão de reação na concentração de aproximadamente 5×10^6 células/mL. Foi adicionado 20 e 50µL de agente de *cross-linking* 100mM a 1 mL de suspensão de células para determinar a concentração ideal (2 e 5mM final).

A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos com agitação leve.

Após este tempo, a incubação foi paralisada com 50µL de tampão de extinção (1M Tris (pH 7.5)) e após novamente incubada por mais 5 minutos à temperatura ambiente.

3.11 Imunoprecipitação

Para células em suspensão, foi centrifugada a suspensão de células a 1000×g por 5 minutos para sedimentar as células e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com tampão de reação gelado (PBS) 5 vezes para remover o excesso de *cross-linker* não reagidos. Após foi adicionado o tampão de lise/lavagem (4µL) gelado ao *pellet* de células e usado 500µL de tampão de lise/lavagem por 50mg de *pellet* de células úmidas. O lisado foi incubado em gelo por 30 minutos com mistura periódica. Após a incubação, os resíduos celulares foram removidos por centrifugação a 13.000×g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para determinação da concentração de proteína e análise posterior.

3.12 Ligação *beads* com anticorpo

Primeiramente os anticorpos foram purificados com o Kit de limpeza de anticorpos Thermo Scientific™ Pierce™ (Produto nº 44600), devido ao BSA e a gelatina.

Foi agitado, no vórtex, o frasco de esferas magnéticas ativadas pelo NHS para obter uma suspensão homogênea. Adicionou-se 25µL de *beads* em um tubo de microcentrífuga. O tubo foi colocado em um suporte magnético e coletado as esferas por 1 minuto. Removeu-se e descartou-se a solução de armazenamento. Após, foi adicionado ao tubo 400µL de HCl 1mM gelado e agitado suavemente no vórtex para misturar por 5 segundos. Foram coletadas as esferas em um suporte magnético, removido e descartado o sobrenadante e lavado com borado 0,083M 1x.

Foi preparada a solução de anticorpos diluindo o anticorpo LL-37 (<https://datasheets.scbt.com/sc-166770.pdf>) ou isotipo controle (IgG1) (<https://datasheets.scbt.com/sc-3877.pdf>) em 10 μ L de tampão borato (0,67 M) para elevar o volume final a 100 μ L. A concentração final de anticorpo foi de 5 μ g / 100 μ L e a concentração final de Tampão Borato foi de 0,067M (20 μ L de anticorpo + 80 μ L de borato 0,083M).

Adicionou-se 100 μ L da solução de anticorpo preparada nas *beads*. Suavemente misturou-se e foi incubado em uma plataforma giratória por 60 minutos em temperatura ambiente. Após foram coletadas as *beads* com um suporte magnético, removido o sobrenadante e salvo para análise posterior. Foi adicionado 100 μ L de tampão de eluição e agitado suavemente no vórtex. Coletou-se as *beads* em um suporte magnético e foi descartado o sobrenadante. Adicionou-se 500 μ L de PBS 3% BSA as *beads*, agitado delicadamente e incubado em uma plataforma giratória por 60 minutos. As *beads* foram coletadas com um suporte magnético, e após descartado o sobrenadante.

Foi preparado 500 μ L de Tampão Borato Modificado (Modified Borate Buffer) para cada reação de Imunoprecipitação (IP) diluindo 25 μ L de Tampão de Lise / Lavagem IP com 475 μ L de Tampão Borato. Esse preparo ocorre a partir de um Pacote de Tampão Borato Thermo Scientific BupH, conteúdo dissolvido em um volume final de 500mL de água ultrapura. Adicionou-se 500 μ L de Tampão Borato Modificado ao tubo e levado ao vórtex para misturar. As *beads* foram coletadas em um suporte magnético e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 500 μ L de tampão de lise / lavagem IP e levado ao vórtex para misturar. As *beads* foram coletadas em um suporte magnético e descartado o sobrenadante.

3.13 Imunoprecipitação do Antígeno

O lisado celular obtido na etapa de Imunoprecipitação (item 3.10) foi diluído com o Tampão de Lise / Lavagem IP para 2 mg / mL. Adicionou-se 500 μ L de solução de lisado diluída ao tubo que continha as *beads* magnéticas acopladas ao anticorpo e incubado por 2 horas em temperatura ambiente em um rotador. As esferas foram agitadas suavemente a cada 15-30 minutos durante a incubação para garantir que as *beads* permanecessem em suspensão. Após,

foram coletadas as *beads* em um suporte magnético e removida a amostra não ligada para análise posterior. Foi adicionado 500µL de tampão de lise / lavagem IP ao tubo e levado ao vórtex para misturar. As *beads* foram coletadas em um suporte magnético e descartado o sobrenadante. Foi repetida 2 vezes esta lavagem. Acrescentou-se 500µL de água ultrapura ao tubo e levado ao vórtex para misturar. As *beads* foram coletadas em um suporte magnético e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 100µL de tampão de eluição ao tubo e foi incubado por 5 minutos, em temperatura ambiente em um rotador. As *beads* foram separadas magneticamente e o sobrenadante foi salvo para análise contendo o antígeno alvo. Para neutralizar o baixo pH, foi adicionado 10µL de Tampão de Neutralização para cada 100µL de eluato.

3.14 Western Blot

Foi realizado um gel de 10% para corrida de Western Blot com 1,5mm de espessura de acordo com o protocolo realizado previamente pelo LIM51. Nesse gel foram colocadas as amostras de ThP1 como controle positivo, e HEK-293 como controle negativo. Também, foram colocados os sobrenadantes das etapas anteriores de Imunoprecipitação como controles, IgG e o anticorpo SPNS3, e as amostras testes de IgG e SPNS3. Após o tempo de corrida em gel, foi realizada a transferência para ser realizado o bloqueio e reação com o anticorpo para posterior análise.

Foram bloqueados os sítios inespecíficos com TBST + albumina 5% (10mL) por 1 hora. Lavou-se a membrana 3 vezes com TBST (10mL), cada lavagem de 7 minutos. Após se incubou com 10mL de TBST + albumina 5% com anticorpo primário (10µL de LL-37 com 10mL de Superblocker) durante 12h na geladeira e no rocker. A membrana foi lavada 3 vezes com TBST (10mL), cada lavagem de 10 minutos. Se incubou com 10mL de TBST + albumina 2% com anticorpo secundário (1µL de anti-mouse) por 1 hora em temperatura ambiente, e no rocker. Após foi lavada a membrana 3 vezes com TBST (10mL), cada lavagem de 10 minutos. Após a lavagem da membrana, se pipetou 1mL de cada reagente do Super Signal sobre a membrana para leitura.

Resultados

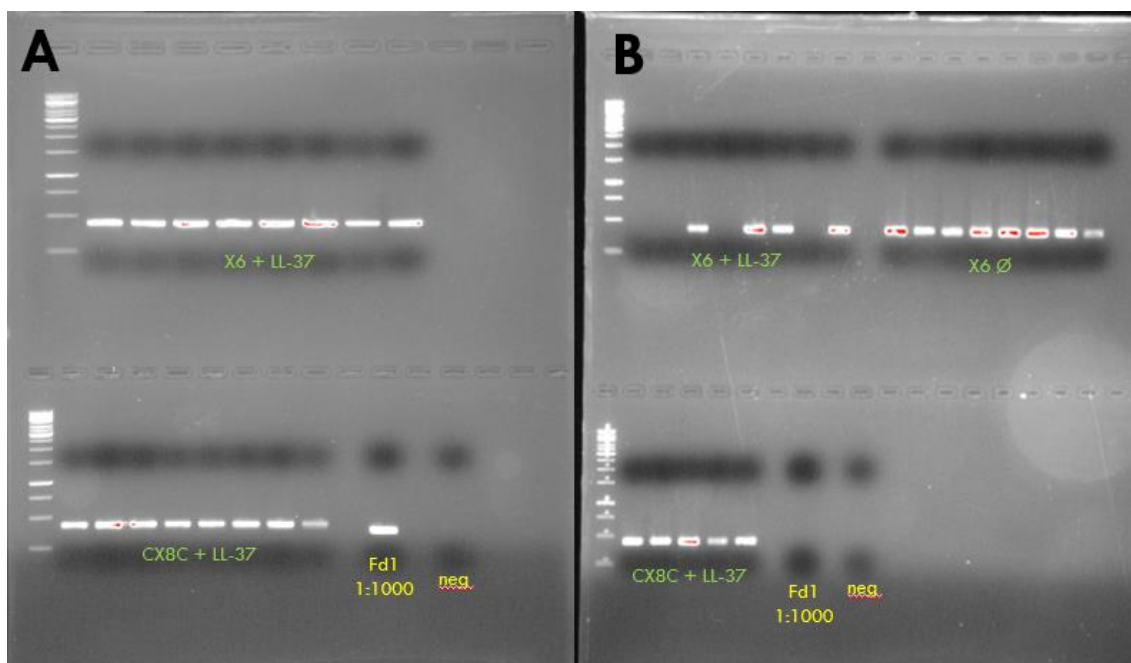


4. Resultados

4.1 *Panning* em placa e *beads* magnéticas

Após a realização dos *rounds* do *panning* na placa de 96 poços, foi realizado o PCR para visualizar quais colônias haviam produzidos fagos e quais teriam o resultado positivo. O teste mostrou que se obteve todas as colônias com resultado positivo para a próxima etapa, de acordo com os controles usados para tal experimento. Conforme apresentado na figura abaixo. (Figura 5)

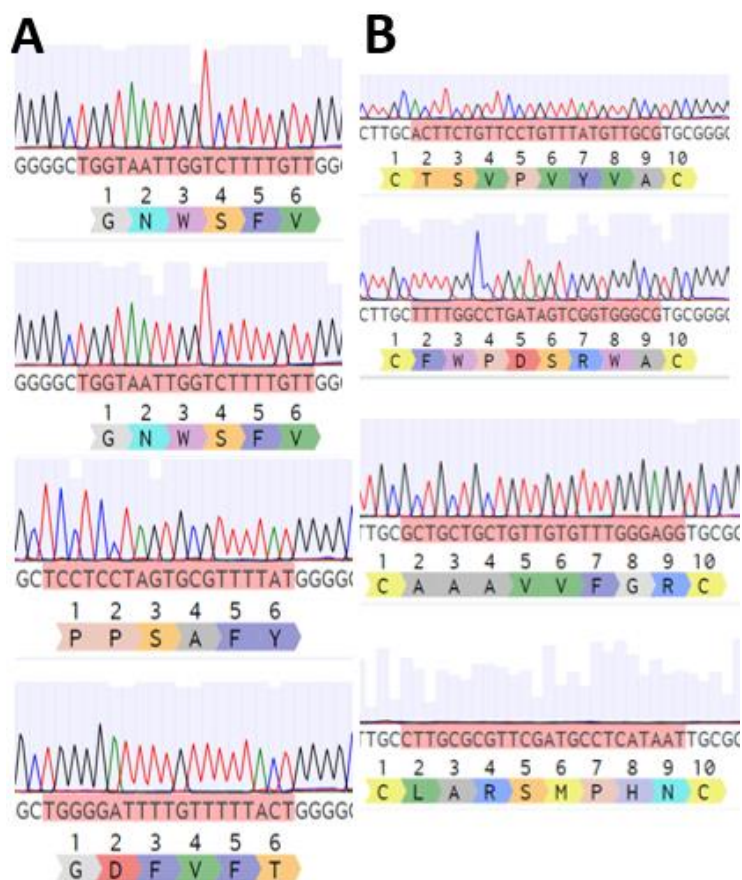
Figura 5 - Colônias de bactérias que produzem fagos



Legenda: **A.** *Panning in vitro*. **B.** *Panning* em *beads* magnéticas

Após o resultado do PCR, as colônias foram enviadas para a Central Analítica do Instituto de Química da USP para a realização do sequenciamento, conforme as Figuras a seguir. (Figura 6)

Figura 7 - Sequenciamento dos fagos selecionados em PCR a partir do *panning* em *beads* magnéticas de streptavidina.



Legenda: **A.** Sequência dos fagos da biblioteca X6. **B.** Sequência dos fagos da biblioteca CX8C

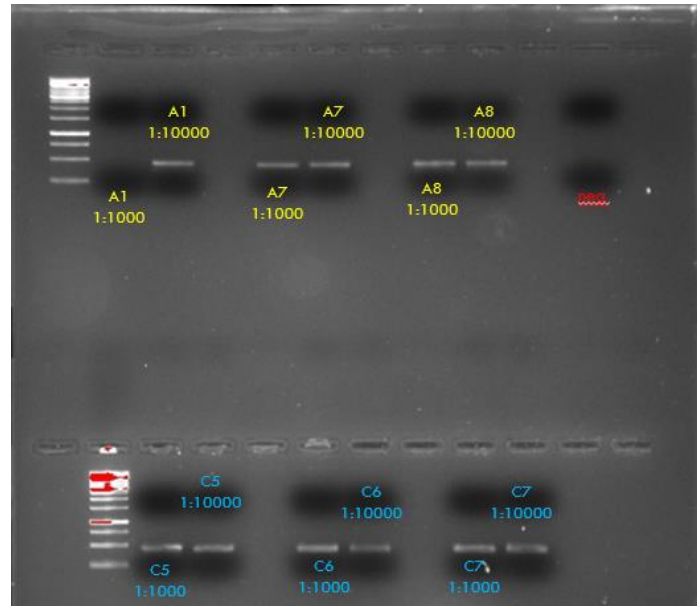
Observou-se que a sequência GNWSFV foi encontrada em ambos os testes, *panning in vitro* e no *panning* em *beads* magnéticas de streptavidina. Para realizar a análise de cada sequência de forma correta e clara, estas foram colocadas no programa Clustal Omega para posterior seleção. O Clustal Omega é um programa de alinhamento de múltiplas sequências que utiliza árvores guia, já implantadas na plataforma, e técnicas de perfil-perfil HMM para gerar alinhamentos entre três ou mais sequências.

4.2 Amplificação dos fagos

Após selecionar os fagos nos primeiros ensaios de seleção, estes foram submetidos a uma nova etapa - a amplificação. Foram titulados os fagos

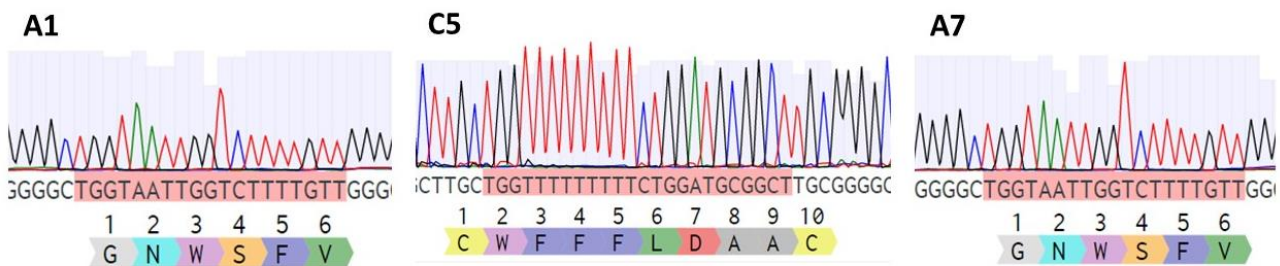
selecionados por mais algumas etapas e se monitorou o processo através do PCR.

Figura 8 - Fagos amplificados e selecionados a partir do PCR



Após a conclusão das etapas de amplificação e do PCR, os fagos selecionados foram enviados para o sequenciamento na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Conforme os resultados recebidos e posterior análise, foram selecionadas as três seqüências de fagos, conforme a Figura 9, a seguir.

Figura 9 - Sequenciamento de fagos selecionados a partir da amplificação



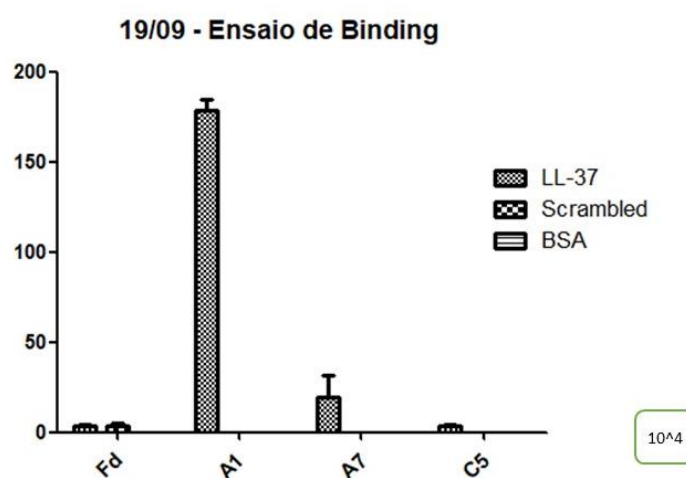
Legenda: **A1 e A7**. Sequências selecionadas a partir da biblioteca X6. **C5**. Sequência selecionada a partir da biblioteca CX8C

As amostras de fagos foram selecionadas para as próximas etapas após a análise do PCR da amplificação de fagos e da titulação de fagos. Onde as contagens satisfatórias para prosseguir para os próximos ensaios eram das amostras A1, A7 e C5 por mostrarem que tinham quantidade de amostra mínima suficiente. Ambas as amostras, A1 e C5 selecionadas são referentes ao *panning in vitro*. A mostra A7 foi selecionada do *panning* em *beads* magnéticas de streptavidina.

4.3 Ensaio de *Binding*

Com as três sequências de fagos selecionadas, chamadas de A1, A7 e C5, respectivamente, a partir do ensaio de amplificação de fagos, foi realizado o ensaio de validação para ensaios de ligação, o ensaio de *binding*. Em que o Fd atua como controle positivo e o BSA como controle negativo. (Figura 10)

Figura 10 - Análise do ensaio de *Binding*

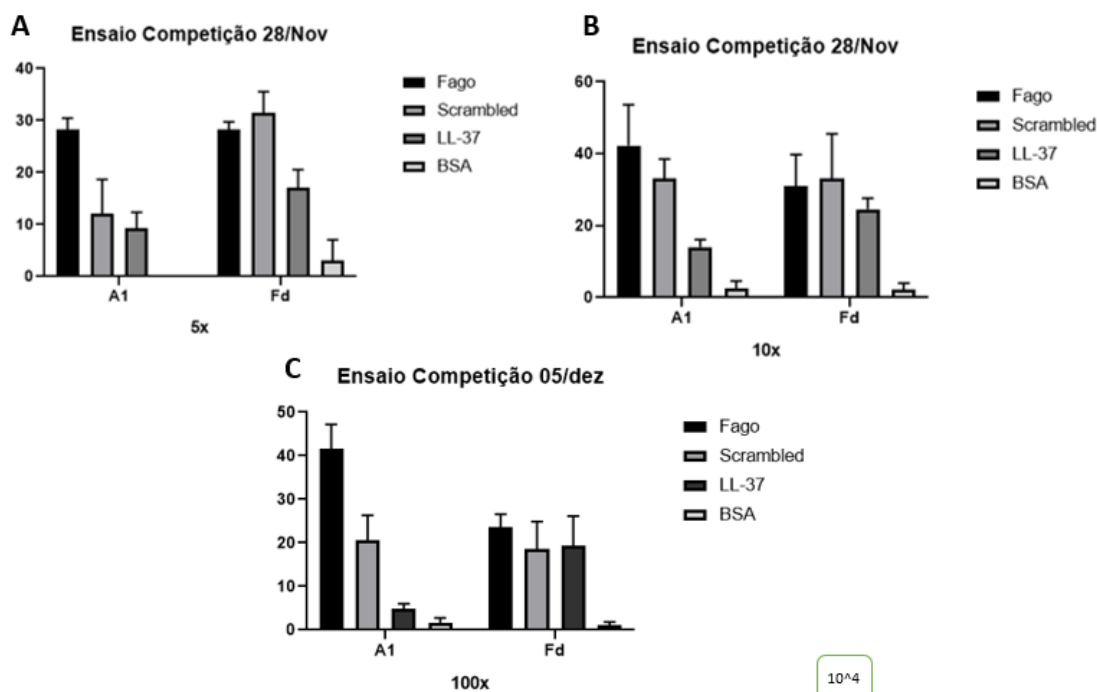


Com a contagem das placas realizada e visualizadas a partir do gráfico acima, vimos que a amostra A1 foi a única que conseguiu ligar-se ao LL-37 de forma satisfatória, já que no controle negativo não houve nenhum crescimento de colônias. Sendo assim, entende-se que o fago A1, selecionado a partir do *panning in vitro* está apto para a próxima etapa de validação.

4.4 Ensaio de competição

Foram realizados três ensaios de competição com diferentes concentrações de LL-37, sendo o BSA e a sequência *scrambled* de LL-37 como controles. Mostrando assim, qual a concentração necessária para a saturação do peptídeo. Foi utilizado no ensaio de competição apenas a sequência de fago A1, visto que essa se mostrou satisfatória no ensaio de ligação. (Figura 11)

Figura 11 - Análise do ensaio de competição com diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano LL-37



Legenda: **A.** 5 vezes concentrado. **B.** 10 vezes concentrado. **C.** 100 vezes concentrado

Observa-se, a partir da contagem das colônias de cada amostra nas placas (plaqueadas em triplicatas) que o fago A1 com 100 vezes elevada sua concentração, permitiu visualizar a saturação do peptídeo. Sendo assim, concluiu-se que a sequência encontrada e chamada de A1, conseguiu ligar-se ao peptídeo LL-37.

4.5 BLAST

Após a realização do ensaio de competição e a análise do resultado apresentar-se satisfatória ao que se estava procurando, foi colocada a sequência do fago A1, encontrada no Phage Display, no programa BLAST. O BLAST é uma ferramenta que encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas, comparando assim as sequências de nucleotídeos ou proteínas com bancos de dados de sequências e calculando a significância estatística.

A pesquisa BLAST permitiu encontrar a proteína de membrana: *Prontein Spinster homolog 3* do gene SPNS3 em humanos (organismo: *Homo sapiens*). O SPNS3 foi encontrado a partir da listagem das 20 proteínas principais que apresentaram os maiores escores de similaridade, apresentadas na tabela a seguir. (Tabela 1)

Tabela 2 - Lista das vinte principais proteínas que exibem sequências com os maiores escores de similaridade e os menores valores de E, quando comparados aos aminoácidos sequência GNWSFV. Resultados obtidos através de uma pesquisa BLAST (continua)

Descrição	Espécie	Pontuação Máxima	Pontuação Total	Percentual de alinhamento	E valor	Percentual de identidade	Comprimento	Número de acesso
Proteína spinster homólogo 3 isoforma 1	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	512	NP_872344.3
Produto proteico sem nome	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	512	BAD18797.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X1	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	490	XP_011522025.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X2	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	490	XP_054171389.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X2	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	479	XP_011522026.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X3	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	479	XP_054171390.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X4	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	399	XP_054171392.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X5	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	399	XP_047291544.1
Proteína SPNS3	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	385	AAH23646.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma 2	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	385	NP_001307378.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X6	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	316	XP_054171394.1
Proteína spinster homólogo 3 isoforma X7	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	83%	36	100	316	XP_011522030.1

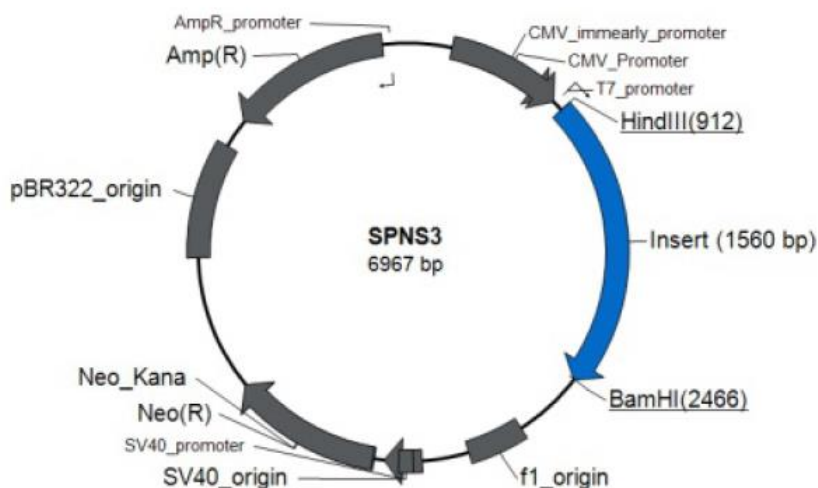
Tabela 2 - Lista das vinte principais proteínas que exibem sequências com os maiores escores de similaridade e os menores valores de E, quando comparados aos aminoácidos sequência GNWSFV. Resultados obtidos através de uma pesquisa BLAST (final)

Descrição	Espécie	Pontuação Máxima	Pontuação Total	Percentual de alinhamento	E valor	Percentual de identidade	Comprimento	Número de acesso
Região de junção de cadeia pesada de imunoglobulina	<i>Homo sapiens</i>	21.4	21.4	100%	39	83.33	21	MBN4194273.1
Região de junção de cadeia pesada de imunoglobulina	<i>Homo sapiens</i>	21	21	83%	41	100	13	MOM49453.1
Região de junção de cadeia pesada de imunoglobulina	<i>Homo sapiens</i>	21	21	83%	51	100	18	MBX79929.1
Região de junção de cadeia pesada de imunoglobulina	<i>Homo sapiens</i>	21	21	83%	53	100	19	MBB1828429.1
Isoforma X1 da proteína de ligação a IgGFc	<i>Homo sapiens</i>	19.3	19.3	100%	208	75	5405	XP_054178463.1
Proteína de ligação IgG Fc	<i>Homo sapiens</i>	19.3	19.3	100%	208	75	5405	BAA19526.1
Precursor de proteína de ligação a IgGFc	<i>Homo sapiens</i>	19.3	19.3	100%	208	75	5405	NP_003881.2
Isoforma X2 da proteína de ligação a IgGFc	<i>Homo sapiens</i>	19.3	19.3	100%	208	75	4204	XP_054187620.1

4.6 Vetor de clonagem

Com o resultado da sequência encontrado através do programa BLAST, foi possível realizar a montagem de um vetor de clonagem para produção e assim realizar o ensaio de Imunoprecipitação para validação do resultado encontrado no Phage Display. O vetor foi produzido e comprado da empresa Thermo Fisher Scientific. Onde o vetor de clonagem expressa/RS: pcDNA3.1(+), HindIII/BamHI conforme imagem abaixo. (Figura 12)

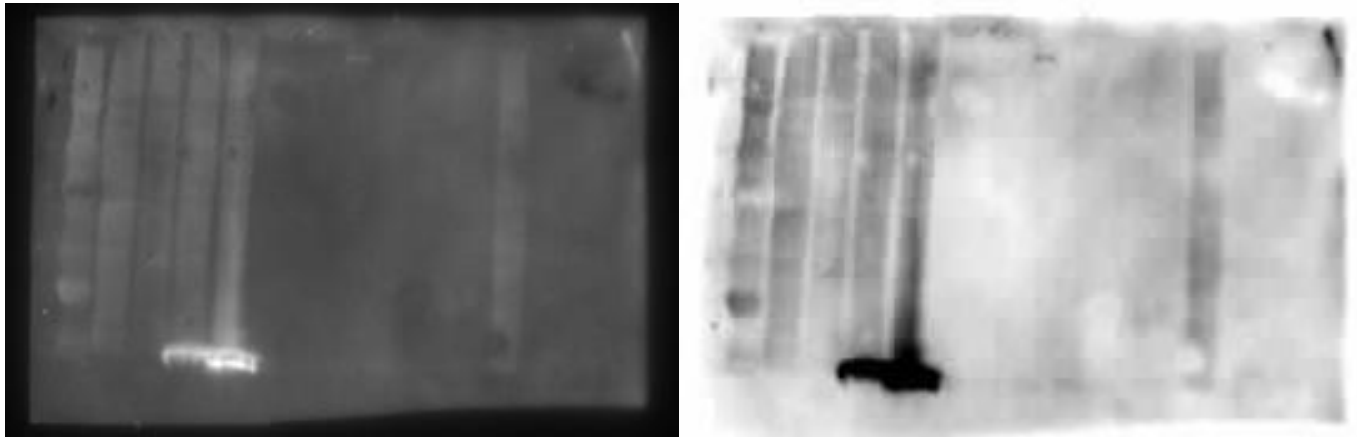
Figura 12 - Vetor de clonagem do *Prontein Spinster homolog 3* do gene SPNS3 em humanos realizado através da sequência de DNA



4.7 Imunoprecipitação

A Imunoprecipitação foi realizada como uma forma de validação dos resultados encontrados. A visualização do resultado desse tipo de ensaio é vista a partir da corrida de gel realizado no Western Blot. Foi utilizado como anticorpo primário 10 μ L de LL-37 com 10mL de Superblocker e anticorpo secundário 1 μ L de anti-*mouse*, já que o anticorpo primário foi produzido em camundongo. Na figura 14 pode ser visualizado a seguinte ordem de amostras: padrão, IgG controle (sobrenadante), SPNS3 controle (sobrenadante), IgG amostra teste (sobrenadante), SPNS3 amostra teste (sobrenadante), IgG controle, SPNS3 controle, IgG amostra teste, SPNS3 amostra teste, ThP1 e HEK-293. (Figura 13)

Figura 13 - Gel de Western Blot em 10% do ensaio de Imunoprecipitação apresentado na forma sem luz e com luz para melhor visualização do resultado



Os controles positivo e negativo funcionaram conforme o esperado, mas as amostras do teste não positivaram da forma prevista, já que a amostra SPNS3 teste e controle acendeu apenas no final do gel de 10%, assim como a amostra de IgG teste. Podemos observar-se, então, que a leitura do gel de Western Blot gerou um resultado inconclusivo.

Discussão



5. Discussão

O homólogo spinster (SPNS) é um transportador transmembranar amplamente distribuído, que auxilia esfingolípido a desempenhar seus papéis através da membrana celular. A família SPNS pertence à Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS), de acordo com análises de homologia de sequência. O SPNS2 é conhecido como transportador fisiológico. O SPNS1 é um meio eficaz e biologicamente ativo de promover sinalização das células que promovem a regulação da proliferação de células cancerígenas. Alguns estudos mostraram que o SPNS3 pode estar envolvido em hiperresponsividade esfingolípido e ativação de mastócitos em pacientes asmáticos. Porém, ainda não se entende a maioria dos papéis que o SPNS3 desempenha nas patologias humanas (Huang et al, 2020).

Segundo Huang et al. (2020), no prognóstico do SPNS na Leucemia Mieloide Aguda (LMA), foi encontrada uma alta expressão SPNS2 e SPNS3, que foram vistos como fatores de prognóstico ruim em pacientes submetidos apenas a quimioterapia. Além disso, a alta expressão do SPNS3 foi negativa como fator de prognóstico para a sobrevida global em pacientes com transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas.

O SPNS3 é um transportador atípico de Solute (SLCs) pertencente ao MFS, e foi observado que ele pode mediar o progresso de apoptose e autofagia em mamíferos, e participa também da sinalização esfingolipídica. A super expressão do SPNS3, de acordo com os pesquisadores, pode regular e controlar progressão, proliferação e diferenciação da LMA por autofagia. Como os pacientes observados com alta expressão de SPNS3 teve um índice alto de sobrevivência. Como por exemplo, o SPNS3 pode ser usado como preditor para pacientes com LMA no futuro (Huang et al., 2020). Sendo assim, o SPNS3 pode também ser usado como preditor para pacientes com outros tipos de câncer no futuro.

No estudo realizado por Hong et al. (2021), foi demonstrado que a expressão de SPNS3 na LMA promoveu efeito de resistência contra a apoptose

nas células leucocitárias, responsável pela baixa sobrevida na LMA. A alta expressão de SPNS3 pode ser considerada um marcador de mau prognóstico, por ser mediado pelo seu efeito antiapoptótico. Sendo assim, a expressão de SPNS3 na LMA possui efeito patológico nesses pacientes devido a resistência das células.

Também foi observado que a S1P, é uma molécula de sinalização que promove a carcinogênese na LMA mediando a proliferação celular, migração das células para os tecidos e a vascularização. A S1P é transportada para fora das células pelas proteínas SPNS (SPNS1, SPNS2 e SPNS3), promovendo sua sinalização e proliferação de células. Sendo assim, os pesquisadores indicaram que o SPNS3 pode ser um alvo potencial para a terapia de LMA, podendo ser combinada com as terapias já usadas atualmente nesses pacientes (Hong et al, 2021).

No estudo realizado por Eshibona et al. (2022), também foi observado que a expressão de SPNS3 em pacientes com LMA prevê um mau prognóstico do paciente, visto que a super expressão de SPNS3 pode regular e controlar a proliferação e diferenciação de LMA por autofagia. Desse modo, vem sendo sugerido nos estudos de que o SPNS3 venha a ser um potencial alvo terapêutico na LMA pediátrica e adulta.

SPNS2 e SPNS3 estão situados de ponta a ponta no genoma de espécies que variam de elefantes e tubarões até os mamíferos. Isso indica, na história da evolução, que eles foram conservados desde a divergência evolutiva dessas espécies há pelo menos 400 milhões de anos. Embora a função do SPNS3 ainda não tenha sido elucidada, seu forte nível de conservação prevê um alto nível de importância para a espécie humana, já que, por exemplo, o SPNS1 não foi conservado em filós aviários. Os estudos realizados com a família *spinster* mostraram que eles possuem papéis importantes em processos biológicos como a autofagia e a metástase tumoral. Um estudo mais aprofundado sobre as funções dos SPNS poderá ajudar a entender processos biológicos básicos e auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico e tratamento de doenças associadas aos SPNS (Nakano, 2019).

Por sua vez, O LL-37 é um peptídeo antimicrobiano (AMPs) e sabe-se que esses peptídeos atuam na defesa do hospedeiro, fazendo parte da resposta

imune inata. É uma molécula que fornece proteção contra patógenos ambientais, agindo contra muitos microrganismos. A sua produção é uma resposta imune inata importante contra infecções. A produção do LL-37 vai depender de características, como: organismo, tipo celular e o peptídeo a ser considerado (Pinheiro da Silva e Machado, 2012).

Sabe-se que após a entrada de um patógeno invasor no sistema do hospedeiro, o LL-37 irá atuar como uma sinalização de perigo unindo assim a resposta imunológica inata e adaptativa, recrutando células imunocompetentes para o local da infecção. O LL-37 consegue modular os níveis de citocinas inflamatórias. Tal função ajuda no controle do equilíbrio entre as pró e anti-inflamatórias. Além disso, ele pode ser encontrado em processos biológicos que não envolvam células imunes, como: apoptose, angiogênese, fechamento de feridas e manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal. Porém, o LL-37 foi associado a pelo menos nove receptores pertencentes a diferentes classes de receptores incluindo quatro receptores acoplados à proteína G (GPCRS), três receptores tirosina-quinase (RTKS), um canal iônico ativado por ligante (LGIC) e receptores do tipo Toll (TLRS) (Verjans et al., 2016; Henzler et al., 2003; Liu et al., 2013; Yang et al., 2000; Nijnik et al., 2009). Estudos revelaram que o LL-37 também bloqueia o receptor de gordura CD36 em adipócitos e hepatócitos, assim como o acúmulo de lipídeos. O LL-37 circulante na corrente sanguínea em pacientes com obesidade, mostrou a relação com o aumento do IMC e a modulação do desenvolvimento da obesidade (Hoang-Yen Tran et al., 2016).

Foi observado que o LL-37 possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, como: *Pseudomonas* (Bals et al., 1998), *Escherichia* (Dorschner et al., 2001), *Salmonella* e *Klebsiella* (Larrick et al., 1995 (b)), e Gram-positivas, como: *Staphylococcus* (Dorschner et al., 2001), *Streptococcus* (LaRock e Nizet, 2015), *Enterococcus* (Turner et al., 1998) e *Clostridium* (McQuade et al., 2012), também contra patógenos dos gêneros *Enterococcus* (Bals et al, 1998), *Mycobacterium* (Neshani et al., 2019), *Treponema* (Sambri et al., 2022) e *Mycoplasma* (Neshani et al., 2019). O LL-37 tem habilidade de matar bactérias por meio de atividades antibacterianas diretas, principalmente por meio de interações de membrana, mas também por meio de imunomodulação. Devido a interação de membrana, para conseguir matar as bactérias, os AMPs têm sido

considerados menos propensos à resistência do que os antibióticos convencionais. Os AMPs são considerados um potencial agente terapêutico por suas atividades de amplo espectro e imunomodulação, bem como por suas habilidades de morte direta e baixas taxas de resistência. O LL-37 possui respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que são importantes para a morte indireta de bactérias. Por exemplo, LL-37 é capaz de induzir migração, proliferação e diferenciação celular na geração da resposta imune contra bactérias (Ridyard e Overhage, 2021).

Os peptídeos antimicrobianos possuem um papel fundamental para controlar doenças infecciosas. Muitos estudos têm associado a falta ou baixa secreção dos AMPs com a suscetibilidade em desenvolver algumas doenças infecciosas como a tuberculose (Lee et al., 2019). Estudiosos sugerem que restabelecer ou induzir a produção das catelicidinas evitaria o desenvolvimento de doenças infecciosas. Esses estudos referiram que a criação de compostos sintéticos, como para promover a indução de LL-37 em células epiteliais do cólon e do epitélio pulmonar, aumentou a potência na inibição de enzimas de remodelação da cromatina (HDAC). Quando aumentada, a HDAC consegue modular a cromatina e aumentar a ativação de vias celulares e fatores nucleares como STAT3, HIF-1 α NF-kB, C/EBP α e, AP-1. Essas vias estão relacionadas com à resposta imune dos peptídeos antimicrobianos a doenças infecciosas (Rodríguez-Carlos et al., 2021; Rivas-Santiago et al., 2011; Chung et al., 2020).

O LL-37 foi encontrado pela primeira vez em leucócitos e testículos, mas após foi descrito também em uma grande variedade de células, tecidos e fluidos corporais em diferentes concentrações devido à sua dupla natureza como peptídeo antimicrobiano e molécula sinalizadora ligada a imunidade inata (Dürr et al., 2006). Também foram observadas diferentes concentrações de LL-37 em algumas doenças, essas concentrações foram chamadas de concentrações positivas, doenças como lúpus eritematoso sistêmico (Kim et al., 2005), dermatite de contato (Kim et al., 2005), infecção por *H. pylori* (Hase et al., 2003), e negativas, em doenças como dermatite atópica (Howell et al., 2005), epitélio de úlcera crônica (Heilborn et al., 2003), infecção entérica (Islam et al., 2001) e Leucemia Mielóide Aguda, concentrações aumentadas ou diminuídas (Yang et al., 2003; Turner et al., 1998).

A concentração positiva foi mais encontrada do que a negativa, mostrando que o LL-37 auxilia o sistema imunológico no combate a doenças. Quando em contato com bactérias, o LL-37 tem sua síntese aumentada em células epiteliais. Já, a beta-defensina-2 humana pode aumentar a concentração da expressão de LL-37 nas células epiteliais do cólon e da mama. Por sua vez, o baixo nível de LL-37 encontrado na infecção entérica, pode estar relacionado com uma regulação negativa na expressão causada pelos patógenos invasores (Dürr et al., 2006; Stroinigg et al., 2005).

A concentração aumentada de LL-37 pode ser encontrada na pele após o aparecimento de uma ferida, que ao ser fechada, retorna os níveis normais. Um estudo mostrou que o epitélio em formação que migra sobre a ferida é o principal local de expressão de LL-37. Também foi visualizado que a inibição de LL-37 por anticorpos específicos, que impediu a cicatrização de feridas, foi encontrado também em níveis reduzidos de LL-37 no epitélio da úlcera crônica (Dürr et al., 2006).

Em um estudo que visava investigar a atividade quimiotática de LL-37 para eosinófilos e explorar os mecanismos envolvidos na atração mediada por LL-37 de neutrófilos e eosinófilos, foi visto que os peptídeos antimicrobianos derivados de neutrófilos, defensinas e o LL-37, mediarão a quimiotaxia de células inflamatórias via ativação de quimiocina e formil-peptídeo receptores (FPRs). Também foi observado que o LL-37 pode induzir o recrutamento de monócitos em locais de inflamação e lesão. Esse recrutamento foi induzido a partir da quimiotaxia. Contudo, depois que os monócitos se diferenciaram em células dendríticas imaturas, não conseguiram responder ao LL-37 a partir da quimiotaxia (De Yang et al., 2000).

A capacidade dos neutrófilos de ingerir e fagocitar bactérias e fungos é um dos principais componentes da imunidade inata e o que difere da imunidade adaptativa. Os neutrófilos possuem a capacidade microbicida devido aos seus mecanismos oxidativos e não oxidativos. O mecanismo oxidativo funciona a partir da ativação do NADPH, que produz superóxido em grandes quantidades. Por sua vez, o mecanismo não oxidativo é mediado pelos peptídeos antimicrobianos armazenados nos grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos possuem dois tipos de peptídeos antimicrobianos: as defensinas e o LL-37. As

defensinas se encontram nos grânulos primários e o LL-37 nos grânulos secundários (específicos) dos neutrófilos (Turner et al., 1998).

Em suma, a expressão de LL-37 já foi observada em células da imunidade inata, como neutrófilos e monócitos, e em células T da imunidade adaptativa (Sorensen et al.; 2003, Agerberth et al., 2000). Também, foi visualizado nos queratinócitos quando ocorre inflamação na pele e nos epitélios escamosos. Nas vias aéreas, houve expressão de hCAP-18/LL-37 no epitélio de superfície das vias aéreas condutoras e nas glândulas submucosas. Ainda, foi observado em fluido de lavagem broncoalveolar (Agerberth et al., 1999). Estas descobertas demonstram que o LL-37 pode vir a inibir respostas inflamatórias, principalmente àquelas que tiveram estímulos microbianos. Isso reforça a teoria de que o LL-37 está presente e possui um papel regulador nas respostas inflamatórias, na imunidade adaptativa e no processo de cicatrização (Tjabringa et al., 2006; Frohm et al., 1997; Frohm et al., 1999).

O estudo de Tjabringa et al. (2006) demonstrou também que o LL-37 induz quimiotaxia eosinófilos e neutrófilos. Esse efeito pode ser inibido pela ação do antagonista FPR peptídeo tBoc-MLP (Yang et al., 2000). Também, foi visto que a ação prolongada do beta 2-adrenoceptor agonista de formoterol inibiu a quimiotaxia induzida por LL-37 nos neutrófilos e eosinófilos. Tal ação sugere que as respostas inflamatórias mediadas por LL-37 podem ser inibidas. Outro ponto importante nesse estudo é o fato de que o LL-37 além de conseguir regular a resposta inflamatória, consegue também atrair as células inflamatórias de forma seletiva através da quimiotaxia. Isso pode ser visto no recrutamento dos neutrófilos e eosinófilos que são quimioatraídos pelo LL-37 (Tjabringa et al., 2006; Eda et al., 1993).

Portanto, o LL-37 possui diversas funções no sistema imune dos seres humanos. Possui atividade antimicrobiana e está envolvido diretamente na morte de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também está envolvido na morte de outros patógenos com atividade microbicida. Pode induzir a desgranulação de neutrófilos e mastócitos, e induzir a regulação positiva de citocinas inflamatórias e receptores de citocinas (Wessely-Szponder et al., 2010; Xiao et al., 2006; Bommineni et al., 2007). Também, pode elevar a fagocitose por meio da opsonização de bactérias e regulação positiva de receptores de

reconhecimento bacteriano. E, ainda, aumentar a captação de DNA/RNA, elevando assim a sinalização intracelular do receptor *toll-like* (TLR). O LL-37 pode induzir a regulação de IL-10 e TGF- β R, moléculas anti-inflamatórias. Está envolvido no processo de cicatrização realizando a indução da migração de células epiteliais. Por fim, o LL-37 pode atuar influenciando a diferenciação de células como os monócitos, por exemplo, os atraindo para os tecidos inflamados, que acabam sendo diferenciados em macrófagos (Van Harten et al, 2018; Kościuczuk et al, 2012; Mansour et al., 2014).

A associação do LL-37 a diferentes tipos de receptores mostrada em estudos, provocou o questionamento sobre a existência de mais receptores, de diferentes classes que o LL-37. E se este poderia ser associado ou quais receptores poderiam se associar a ele. Nesse entendimento, propiciou-se encontrar o SPNS3, uma proteína homóloga *spinster*, um transportador transmembranar, muito comum em pacientes com LMA.

Dentro das limitações da pesquisa salienta-se as dificuldades encontradas decorrentes da pandemia de COVID-19, que ocasionou o fechamento dos laboratórios no ano de 2020. Tal situação estagnou os dados da pesquisa, que estava sendo realizada durante o ano de 2019, até a reabertura dos laboratórios em 2021.

Ainda, o tempo investido nos vários ensaios realizados em busca de resultados satisfatórios, o aprendizado do uso da ferramenta Phage Display, e os estudos realizados para chegar ao protocolo de Imunoprecipitação, foram de suma importância para alcançar aos resultados e oportunizar novos estudos.

Nessa mesma linha, destaca-se que o resultado deste estudo aponta uma proteína *spinster* que não apresenta compreensão total da sua atuação. Pois, a insuficiência de estudos sobre o assunto e o funcionamento do SPNS3, impede o entendimento sobre a maioria dos papéis que desempenha nas patologias humanas. Ou ainda, que possa vir a desempenhar em associação com a resposta imune adaptativa ou inata. Bem como, entender em qual dessas respostas imunes se enquadra.

A ausência de referências bibliográficas e documentais a respeito do SPNS3 ou sobre seu comportamento e suas vias de sinalização inviabilizaram

um aprofundamento maior nesta pesquisa. Mesmo assim, entende-se que se deixam contribuições importantes para estudos futuros. Como por exemplo, incentivando a exploração da Imunoprecipitação, com um possível teste onde o resultado seria satisfatório ou gerasse algum tipo de resposta, ou ainda, investigar o papel do SPNS3 em doenças patológicas e na resposta imune, bem como na associação com o LL-37.

Observa-se também que o teste de validação usado não conseguiu confirmar de maneira satisfatória uma possível elucidação de como poderia funcionar tal via de sinalização entre o LL-37 e o SPNS3. A Imunoprecipitação com revelação através do gel de Western Blot gerou um resultado inconclusivo, o que resultou em uma dúvida de se a escolha do teste não foi assertiva ou se a escolha da linhagem de células HEK-293 de rim embrionário, foi o que não contribuiu para o sucesso do experimento.

Em um estudo realizado por De Yang et al. (2000) mostrou que o LL-37 apresenta um efeito citotóxico *in vitro* em células provenientes de mamíferos em uma concentração acima de 5×10^{-5} M. Porém esse efeito pode ser bloqueado se as células estiverem na presença de soro humano ou suíno. Nossas células foram tratadas com uma concentração de $10 \mu\text{M}$ de LL-37 para uma concentração de 5×10^6 células HEK-293 por poço de uma placa de seis poços, também foi utilizado soro suíno para bloquear o efeito citotóxico do LL-37 nas células. Devido ao resultado apresentado na Imunoprecipitação, poderia ser possível que a linhagem de células escolhidas não conseguisse sobreviver aos efeitos citotóxicos da concentração de LL-37 no momento do tratamento das células.

Outro ponto que chamou atenção na tabulação de resultados do estudo foi que a sequência encontrada no Phage Display que posteriormente o BLAST revelou ser do SPNS3, foi encontrada no ensaio de *panning in vitro* do Phage Display, e a sequência encontrada no ensaio do Phage Display em *beads* magnéticas de *streptavidina* acabou sendo reprovada no ensaio de validação para ensaios de ligação, o ensaio de *Binding*. No ensaio de validação, a Imunoprecipitação, foi usado as *beads* magnéticas para que o anticorpo LL-37 se ligasse nelas e posteriormente no Western Blot houvesse a formação da via LL-37 com o vetor de clonagem do SPNS3.

Sendo assim, questiona-se: poderia o LL-37 não conseguir se ligar nas *beads* magnéticas em ambos os ensaios gerando uma falha na Imunoprecipitação? Ou o tratamento realizado na linhagem de células HEK-293 com o LL-37 antes da Imunoprecipitação, que ficou incubado por 2 horas não foi o suficiente para gerar a expressão? Essas indagações mostram a necessidade de testes posteriores para avaliar e validar a ligação entre o SPNS3 e o LL-37 de forma satisfatória e conclusiva.

Conclusões



6. Conclusões

Observou-se que a técnica de Phage Display trouxe um resultado satisfatório. Pois, foi possível selecionar uma sequência capaz de se ligar ao peptídeo antimicrobiano LL-37, tendo como base os testes de validação para a conclusão de tal achado. Sendo assim, afirma-se que o uso da técnica em um peptídeo antimicrobiano que ainda não se tem esclarecido todos os mecanismos responsáveis pelas funções imunomoduladoras, trouxe mesmo assim, um resultado positivo.

Entretanto, no teste de validação do resultado encontrado no Phage Display através da Imunoprecipitação, observa-se na leitura do gel de Western Blot um resultado inconclusivo, visto que os controles funcionaram, porém as amostras testes não positivaram da forma esperada. Pode-se inferir também que a linha da amostra do SPNS3 teste e controle está brilhando no final do gel, assim como, a linha da amostra de IgG teste. O que mostra que esse tipo de ensaio usado, de Imunoprecipitação, para a validação de resultados encontrados em Phage Display não foi uma escolha assertiva, já que demonstrou que o vetor de clonagem do SPNS3 usado não conseguiu reagir com o LL-37 em células HEK-293 em Imunoprecipitação. Demonstrando a necessidade de testes posteriores para validar a via de ligação do SPNS3 com o LL-37.

Nesse contexto, o presente estudo traz novas perspectivas sobre outra utilização do Phage Display, em que além de encontrar novos ligantes, conseguimos demonstrar a possibilidade de descobrir novas vias de sinalização da reposta imune. Ao estudarmos os vários protocolos, entendeu-se a necessidade de criar um protocolo específico de Imunoprecipitação, para verificação de vias de sinalização. Esse protocolo criado foi essencial para finalização desta pesquisa.

Sendo assim, os objetivos propostos neste estudo foram alcançados. Apesar da etapa de validação através da criação do protocolo de Imunoprecipitação ter gerado um resultado inconclusivo, a técnica de Phage Display gerou um novo ligante para o LL-37. Essa descoberta foi identificada

pela ferramenta BLAST, como SPNS3. Sendo que é uma nova via de sinalização da resposta inata entre o LL-37 e o SPNS3.

Devido aos achados do SPNS3 como um novo ligante do LL-37, assim como, a função do SPNS3 no sistema imunológico humano, entende-se a importância de estudar de forma mais aprofundada a ligação do peptídeo antimicrobiano LL-37 com o SPNS3. Em vista disso, entende-se que o presente estudo mostrou uma nova via de sinalização através da técnica de Phage Display qual pode auxiliar em pesquisas futuras.

Referências



7. Referências

Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L et al: The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000; 96: 3086–3093.

Agerberth B, Grunewald J, Castanos-Velez E, Olsson B, Jornvall H, Wigzell H et al: Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:283–290.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9541-6.

Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R, Krupa P. Unique features of human cathelicidin LL-37. *Biofactors*. 2015 Sep-Oct;41(5):289-300. doi: 10.1002/biof.1225. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26434733.

Bommineni YR, Dai H, Gong YX, Soulages JL, Fernando SC, Desilva U, Prakash O, Zhang G. Fowlicidin-3 is an alpha-helical cationic host defense peptide with potent antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing activities. *FEBS J*. 2007 Jan;274(2):418-28.

Bucki R, Janmey PA. Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):2932-40. doi: 10.1128/AAC.00134-06. PMID: 16940084; PMCID: PMC1563552.

Chung C, Silwal P, Kim I, Modlin RL, Jo EK. Vitamin D-Cathelicidin Axis: at the Crossroads between Protective Immunity and Pathological Inflammation during Infection. *Immune Netw*. 2020 Feb 11;20(2):e12.

Cloutier SM, Kündig C, Felber LM, Fattah OM, Chagas JR, Gygi CM, Jichlinski P, Leisinger HJ, Deperthes D. Development of recombinant inhibitors specific to human kallikrein 2 using phage-display selected substrates. *Eur J Biochem*. 2004 Feb;271(3):607-13. doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03963.x. PMID: 14728688.

D. Islam, L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator, *Nat. Med.* 7 (2001) 180–185.

De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1069-74. doi: 10.1084/jem.192.7.1069. PMID: 11015447; PMCID: PMC2193321.

De Yang, Q. Chen, A.P. Schmidt, G.M. Anderson, J.M. Wang, J. Wooters, J.J. Oppenheim, O. Chertov, LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells, *J. Exp. Med.* 192 (7) (2000) 1069–1074, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>.

Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol.* 2001 Jul;117(1):91-7.

Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep;1758(9):1408-25. doi: 10.1016/j.bbame.2006.03.030. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16716248.

Eda R, Sugiyama H, Hopp RJ, Okada C, Bewtra AK, Townley RG: Inhibitory effects of formoterol on platelet-activating factor induced eosinophil chemotaxis and degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 391–398.

Eshibona N, Giwa A, Rossouw SC, Gamielien J, Christoffels A, Bendou H. Upregulation of *FHL1*, *SPNS3*, and *MPZL2* predicts poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia patients with *FLT3-ITD* mutation. *Leuk Lymphoma.* 2022 Aug;63(8):1897-1906. doi: 10.1080/10428194.2022.2045594. Epub 2022 Mar 6. PMID: 35249471.

Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Rep.* 2016 Aug;68(4):802-8. doi: 10.1016/j.pharep.2016.03.015. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27117377.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H et al: The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997; 272: 15258–15263.

Frohm NM, Sandstedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M: The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* 1999; 67: 2561–2566.

Giordano RJ, Anobom CD, Cardó-Vila M, Kalil J, Valente AP, Pasqualini R, Almeida FC, Arap W. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem Biol.* 2005 Oct;12(10):1075-83. doi: 10.1016/j.chembiol.2005.07.008. PMID: 16242650.

Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1249-53. doi: 10.1038/nm1101-1249. PMID: 11689892.

Giordano RJ, Edwards JK, Tuder RM, Arap W, Pasqualini R. Combinatorial ligand-directed lung targeting. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Aug 15;6(5):411-5. doi: 10.1513/pats.200903-014AW. PMID: 19687212; PMCID: PMC3266014.

Hase K, Murakami M, Iimura, Cole SP, Horibe Y, Ohtake T, Obonyo M, Gallo RL, Eckmann L, Kagnoff MF. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2003 Dec;125(6):1613-25. doi: 10.1053/j.gastro.2003.08.028. PMID: 14724813

Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003 Mar;120(3):379-89.

Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry.* 2003 Jun 3;42(21):6545-58.

Hoang-Yen Tran D, Hoang-Ngoc Tran D, Mattai SA, Sallam T, Ortiz C, Lee EC, Robbins L, Ho S, Lee JE, Fisseha E, Shieh C, Sideri A, Shih DQ, Fleshner P, McGovern DP, Vu M, Hing TC, Bakirtzi K, Cheng M, Su B, Law I, Karagiannides I, Targan SR, Gallo RL, Li Z, Koon HW. Cathelicidin suppresses lipid accumulation and hepatic steatosis by inhibition of the CD36 receptor. *Int J Obes (Lond).* 2016 Sep;40(9):1424-34. doi: 10.1038/ijo.2016.90. Epub 2016 May 10. PMID: 27163748; PMCID: PMC5014693.

Hong Y, Tian X, Wang M, Chen C, Sun A. Bioinformatics-based identification of SPNS3 (Spinster homolog 3) as a prognostic biomarker of apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. *Bioengineered.* 2021 Dec;12(1):7837-7848. doi: 10.1080/21655979.2021.1982303. PMID: 34608834; PMCID: PMC8806827.

Howell MD, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo RL, Leung DY. Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):738-45.

Huang W, Qian T, Cheng Z, Zeng T, Si C, Liu C, Deng C, Ye X, Liu Y, Cui L, Fu L. Prognostic significance of Spinster homolog gene family in acute myeloid leukemia. *J Cancer.* 2020 May 18;11(15):4581-4588. doi: 10.7150/jca.44766. PMID: 32489475; PMCID: PMC7255376.

Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J Immunol.* 2013 Nov 15;191(10):4895-901. doi: 10.4049/jimmunol.1302005. PMID: 24185823; PMCID: PMC3836506.

Kim JE, Kim BJ, Jeong MS, Seo SJ, Kim MN, Hong CK, Ro BI. Expression and modulation of LL-37 in normal human keratinocytes, HaCaT cells, and inflammatory skin diseases. *J. Korean Med.* 2005 Aug; 20(4): 649–654. doi: 10.3346/jkms.2005.20.4.649. PMID: 16100459. PMCID: PMC2782163.

Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med.* 1999 May;40(5):883-8. PMID: 10319765.

Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep.* 2012 Dec;39(12):10957-70.

LaRock CN, Nizet V. Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Nov;1848(11 Pt B):3047-54.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995 Apr;63(4):1291-7. doi: 10.1128/iai.63.4.1291-1297.1995. PMID: 7890387; PMCID: PMC173149. (a)

Larrick JW, Hirata M, Zhong J, Wright SC. Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology.* 1995 May;1(1):65-72. (b)

Lee AC, Harris JL, Khanna KK, Hong JH. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int J Mol Sci.* 2019 May 14;20(10):2383.

Liu W, Dong SL, Xu F, Wang XQ, Withers TR, Yu HD, Wang X. Effect of intracellular expression of antimicrobial peptide LL-37 on growth of escherichia coli strain TOP10 under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Oct;57(10):4707-16.

Mansour, S.C.; Pena, O.M.; Hancock, R.E.W. Host defense peptides: Front-line immunomodulators. *Trends Immunol.* 2014, 35, 443–450.

McQuade, R.; Roxas, B.; Viswanathan, V.K.; Vedantam, G. Clostridium difficile clinical isolates exhibit variable susceptibility and proteome alterations upon exposure to mammalian cationic antimicrobial peptides. *Anaerobe* 2012, 18, 614–620.

Michaloski JS, Redondo AR, Magalhães LS, Cambui CC, Giordano RJ. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. *Sci Adv.* 2016 Oct 28;2(10):e1600611. doi: 10.1126/sciadv.1600611. PMID: 27819042; PMCID: PMC5091360.

Moreno-Angarita A, Aragón CC, Tobón GJ. Cathelicidin LL-37: A new important molecule in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *J Transl Autoimmun.* 2019 Dec 17;3:100029. doi: 10.1016/j.jtauto.2019.100029. PMID: 32743514; PMCID: PMC7388365.

Nakano Y. Stories of *spinster* with various faces: from courtship rejection to tumor metastasis rejection. *J Neurogenet.* 2019 Mar-Jun;33(2):90-95. doi: 10.1080/01677063.2019.1586897. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30939968.

Neshani A, Zared H, Eidgahi MRA, Kakhri RK, Safdari H, Khaledi A, Ghazuinik K. LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens. *Gene Reports*, 100519; 2019.

Nijnik A, Pistollic J, Wyatt A, Tam S, Hancock RE. Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs. *J Immunol*. 2009 Nov 1;183(9):5788-98.

Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341 (Pt 3)(Pt 3):501-13. PMID: 10417311; PMCID: PMC1220385.

Pinheiro da Silva F, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012 Aug;36(2):308-14. doi: 10.1016/j.peptides.2012.05.014. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22659161.

Pinheiro da Silva F, Medeiros MC, Dos Santos ÂB, Ferreira MA, Garippo AL, Chammas R, Caldini E, Velasco IT, Possolo de Souza H, Machado MC. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue Cell*. 2013 Oct;45(5):318-20. doi: 10.1016/j.tice.2013.04.003. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23742816.

Resende RR, et al., *Biotecnologia Aplicada À Saude: fundamento e aplicações*. Vol 3, São Paulo: Blucher; 2015.

Ridyard KE, Overhage J. The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent. *Antibiotics (Basel)*. 2021 May 29;10(6):650. doi: 10.3390/antibiotics10060650. PMID: 34072318; PMCID: PMC8227053.

Rivas-Santiago CE, Rivas-Santiago B, León DA, Castañeda-Delgado J, Hernández Pando R. Induction of β -defensins by l-isoleucine as novel immunotherapy in experimental murine tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2011 Apr;164(1):80-9.

Rodríguez-Carlos A, Jacobo-Delgado YM, Santos-Mena AO, Rivas-Santiago B. Modulation of cathelicidin and defensins by histone deacetylase inhibitors: A potential treatment for multi-drug resistant infectious diseases. *Peptides*. 2021 Jun;140:170527. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170527. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33744370.

Sambri V, Marangoni A, Giacani L, Gennaro R, Murgia R, Cevenini R, Cinco M. Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50(6):895-902.

Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990 Jul 27;249(4967):386-90. doi: 10.1126/science.1696028. PMID: 1696028.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7. doi: 10.1126/science.4001944. PMID: 4001944.

Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001 Jun 15;97(12):3951-9. doi: 10.1182/blood.v97.12.3951. PMID: 11389039.

Sorensen OE, Gram L, Johnsen AH, Andersson E, Bangsboll S, Tjabringa GS et al: Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem* 2003; 278: 28540–28546.

Stroinigg N, Srivastava MD. Modulation of toll-like receptor 7 and LL-37 expression in colon and breast epithelial cells by human beta-defensin-2. *Allergy Asthma Proc*. 2005 Jul-Aug;26(4):299-309.

Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):103-12. doi: 10.1159/000092305. Epub 2006 Mar 24. PMID: 16557028.

Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Sep;42(9):2206-14. doi: 10.1128/AAC.42.9.2206. PMID: 9736536; PMCID: PMC105778.

van Harten RM, van Woudenberg E, van Dijk A, Haagsman HP. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines (Basel)*. 2018 Sep 14;6(3):63. doi: 10.3390/vaccines6030063. PMID: 30223448; PMCID: PMC6161271.

Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol*. 2012 Nov;280(1):22-35. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.11.009. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23246832.

Verjans ET, Zels S, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Molecular mechanisms of LL-37-induced receptor activation: An overview. *Peptides*. 2016 Nov; 85:16-26. doi: 10.1016/j.peptides.2016.09.002. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27609777.

Wessely-Szponder, J.; Majer-Dziedzic, B.; Smolira, A. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *J. Microbiol. Methods* 2010, 83, 8–12.

Xiao, Y.; Cai, Y.; Bommineni, Y.R.; Fernando, S.C.; Prakash, O.; Gilliland, S.E.; Zhang, G. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. *J. Biol. Chem*. 2006, 281, 2858–2867.

Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J et al: LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl

peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes and T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1069–1074.

Yang YH, Zheng GG, Li G, Zhang B, Song YH, Wu KF. Expression of LL-37/hCAP-18 gene in human leukemia cells. *Leuk Res.* 2003 Oct;27(10):947-50.