



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**MAPEAMENTO DE EPITOPOS FUNCIONAIS DO RECEPTOR CD14 POR  
*PHAGE DISPLAY* E O RECONHECIMENTO DE COMPONENTES  
BACTERIANOS**

**Aluna:** Patrícia Terra Alves

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**MAPEAMENTO DE EPITOPOS FUNCIONAIS DO RECEPTOR CD14 POR  
*PHAGE DISPLAY* E O RECONHECIMENTO DE COMPONENTES  
BACTERIANOS**

**Aluna:** Patrícia Terra Alves

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia - MG

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A474m 2013 Alves, Patrícia Terra, 1986-  
Mapeamento de epítomos funcionais do receptor CD14 por *Phage Display* e o reconhecimento de componentes bacterianos / Patrícia Terra Alves. – 2013.  
54 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Epítomos - Teses. 3. *Phage Display* – Teses. 4. CD14- Teses. I. Goulart, Luiz Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**MAPEAMENTO DE EPITOPOS FUNCIONAIS DO RECEPTOR CD14 POR  
*PHAGE DISPLAY* E O RECONHECIMENTO DE COMPONENTES  
BACTERIANOS**

**ALUNA:** Patrícia Terra Alves

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

**Examinadores:** Prof. Dr. Gustavo Fioravanti Vieira (UFRGS)

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo (UFU)

**Data da defesa:** 29/07/2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

---

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

Uberlândia-MG

2013

*Dedico este estudo a Deus, por guiar os meus passos, iluminar os meus caminhos  
e por permitir que o melhor se concretize na minha vida.*

*Aos meus pais, Joaquim e Ivanilde, por todo amor a mim dedicado, amo vocês!*

*“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...*

*Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.*

*Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.*

*Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.*

*Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.*

*Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.*

*Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de supera-las.*

*Naquele dia, descobri que eu não era a melhor e que talvez eu nunca tivesse sido.*

*Deixei de me importar com quem ganha ou perde.*

*Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.*

*Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima e sim, deixar de subir.*

*Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo".*

*Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento,  
"o amor é uma filosofia de vida".*

*Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passado e passei  
a ser uma tênue luz no presente.*

*Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.*

*Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...*

*Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.*

*E desde aquele dia já não durmo para descansar...,  
durmo para sonhar.”*

*Walt Disney*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por caminhar ao meu lado, por permitir que os meus sonhos se tornem reais e colocar pessoas especiais em minha vida;*

*Aos meus pais, Joaquim Faria Alves e Ivanilde Terra Alves, por toda paciência, dedicação, amor, cuidado, cumplicidade, por idealizarem essa etapa e me ajudarem a concluí-la. Vocês são verdadeiros anjos na minha vida!*

*As minhas irmãs, Letícia e Larissa, pelo convívio diário, carinho e por me darem forças ao acreditarem na minha capacidade de vencer desafios, amo vocês!*

*A todos meus familiares, por entenderem as minhas ausências, pelo carinho e apoio, vocês são essenciais na minha caminhada;*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, por ser um chefe e ao mesmo tempo um pai científico, por acreditar em mim, no meu potencial e por me mostrar que eu posso ir cada vez mais longe;*

*A Léa Duarte, por auxiliar com as bactérias;*

*À Patrícia Tiemi, pelas discussões científicas, momentos de descontração, por ser do jeito que é. Japa você faz a diferença!*

*À Juliana Franco, por todo carinho e apoio principalmente nessa reta final, Jujus muito obrigada!*

*Ao Galber Araújo, Emília Rezende e Larissa Prado... por ser o trio fantástico, por todos os momentos juntos, pela amizade sincera, pelo carinho com que sempre me trataram;*

*À Mayara Ingrid, Thaíse Araújo, Caroline Reis, Luciana Machado, Paula Santos, Cláudia Rodrigues e Bruna Matias, por momentos de descontração e várias conversas filosóficas;*

*A todos os “Nanos”, pelo convívio, parceria, aprendizagem diária, pelo amor e a dedicação à pesquisa;*

*À Alice Vieira da Costa, por ter se tornado uma grande amiga;*

*Aos demais amigos leais, que o espaço não coube citar nomes, quero agradecer por toda palavra amiga, por torcerem e vibrarem comigo a cada conquista, por orarem por mim e principalmente floream a minha caminhada, vocês sabem que são especiais!*

*Aos pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, que durante o convívio me mostraram de perto os efeitos da sepse, a importância de se abraçar a causa, a relevância desta pesquisa e que há um “mundo” a ser desvendado. Gostaria de agradecê-los principalmente porque me fizeram mais humana, me mostraram a fragilidade da vida e me ensinaram que não há nada mais importante do que viver;*

*Aos funcionários do departamento, pela ajuda indispensável e atenção;*

*A todos os mestres, que passaram pelo meu caminho, pois foram fundamentais à minha formação acadêmica;*

*Ao CNPq financiador do meu trabalho;*

*À Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer ensino e pesquisa de qualidade.*

*A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, muito obrigada!*



## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>3</b>
OBJETIVOS .....	6
<b>CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica.....</b>	<b>7</b>
Detecção de micro-organismo pelo sistema imune inato.....	8
Receptores <i>Toll Like</i> .....	9
Antígeno de diferenciação 14 .....	12
Sepsis.....	16
<i>Phage Display</i> .....	18
Referências bibliográficas.....	22
<b>CAPÍTULO II: Revisiting the CD14: epitope mapping by Phage Display .....</b>	<b>29</b>
ABSTRACT .....	30
INTRODUCTION.....	31
MATERIALS AND METHODS .....	33
Targeted CD14-antibody.....	33
Peptide selection through phage display .....	33
DNA sequencing.....	34
Bioinformatic analysis .....	35
Bead-ELISA and reactivity to the anti-CD14 antibody.....	35
Detection of bacterial components.....	36
Statistical analysis.....	38
RESULTS .....	38
Mimetic peptides to CD14 selected by Phage Display.....	38
Peptide characterization .....	39
Ability to recognize bacterial structures.....	39
LPS detection .....	40
Detection of bacterial lysates and whole bacteria .....	40
DISCUSSION.....	41
ACKNOWLEDGEMENTS .....	43

GRANT SUPPORT .....	43
REFERENCES .....	44
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1:** Cascata de sinalização ativada por receptores *Toll Like*.....12
- Figura 2:** Esquema representativo do bacteriófago filamentosso M-13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII ..... 19
- Figura 3:** Esquema representativo do processo de “*biopanning*”. .....21

### CAPÍTULO II

- Figure 1:** Reactivity of the CD14 mimetic peptides to the selection target.....46
- Figure 2:** Predict immunogenic regions in CD14 three-dimensional structure by Epitopia Server software ..... 47
- Figure 3:** Epitope Mapping of CD14 ..... 48
- Figura 4:** Helical Wheel projection for M.H1, P.F4 and PB11 mimetics peptides to CD14. ....51
- Figura 5:** Reactivity of clones (M.H2, P.F4, P.F11 and Irrelevant phage clone) to different doses of LPS. ....51
- Figura 6:** Phage-ELISA with peptides that represent different regions of the molecule CD14 and the recognition bacterial components (Gram+: *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*; and Gram-: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proetus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Citrobacter younga*) .....52

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Table 1:** Prediction of conformational epitopes. Alignment of amino acid mimetic peptides selected to the original sequence of the CD14.....49

**Table 2:** Characteristics mimetics peptides of CD14 identified by phage-display...50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Soro albumina bovina
CD14	Antígeno de diferenciação 14
Cfu	Unidades formadoras de colônias
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
fMLP	Peptídeos N-formilados (f-Met-Leu-Phe)
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GPI	Âncora de glicosilfosfatidilinositol
HMGB-1	Proteína de alta mobilidade do grupo1
IκB	Inibidor de NF-κB
IKKs	IκB quinase
IL-1	Interleucina um
IL-1β	Interleucina um beta
IL-2	Interleucina dois
IL-4	Interleucina quatro
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
IL-10	Interleucina dez
IL-12	Interleucina doze
IL-13	Interleucina treze
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IFN-δ	Interferon gama
IRAK ( 1 ou 4)	Receptor de Il-1 (IL-1R) associado a quinase
IRF3	Fator regulador de Interferon-3
kDa	Quilodalton
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Domínios ricos em leucinas
LTA	Ácido lipoteicóico
MAL	Proteína adaptadora de MyD88
mL	Mililitros

MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear Kappa B
nm	Nanometros
ng	Nanograma
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PD	<i>Phage Display</i>
PDB	Banco de dados proteicos
Pfu	Unidades formadoras de partículas
pH	Potencial de hidrogênio
Ph.D-C7C	Biblioteca contendo 7 peptídeos randômicos
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
sCD14-ST	Subtipo do CD14 denominado de presepsina
RPM	Rotações por minuto
TAB1/TAB2/TAB3	Proteínas de ligação a TAK1
TAK1	Quinase ativadora do TGF- $\beta$
TBk1	Quinase "TANK-binding"-1
TBS	Tampão Tris-HCl e Sódio
TBST	Tampão Tris-HCl e Sódio com tween 20
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
TIR	Domínio do receptor Toll/IL-1
TIRAP	Domínio TIR contendo a proteína adaptadora MAL
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRAF	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF)
TRIF	Domínio TIR indutor adaptador IFN $\beta$ , conhecido como TICAM1
$\mu$ L	Microlitros
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

## RESUMO

O antígeno de diferenciação 14 é uma molécula chave da imunidade inata. É um receptor de reconhecimento padrão que reconhece principalmente lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico e ácido araquidônico, após este reconhecimento a indução da liberação de diversas citocinas como um mecanismo de defesa do sistema imunológico. Diversos estudos sugerem diferentes epítopos da região N-Terminal da molécula como sítios de reconhecimento ao LPS, no entanto, resultados contraditórios sobre a sequência de reconhecimento ainda persistem. Neste trabalho, epítopos funcionais da molécula CD14 foram mapeadas através da técnica de Phage Display utilizando anticorpos anti-CD14 comerciais e uma biblioteca de peptídeos Ph.D-C7C expressa na superfície de fagos filamentosos M13. Análises in silico e funcionais foram realizadas para mapear os peptídeos selecionados na estrutura 3D do CD14 e verificar a imunoreatividade dos peptídeos contra componentes bacterianos (bactéria gram-positivas e gram-negativas). Os peptídeos selecionados reagiram fortemente contra diferentes bactérias, além do o reconhecimento da região amino terminal do CD14, foi demonstrado uma segunda região no meio do receptor com a capacidade de ligação a componentes bacterianos. Adicional análise in silico sugeriram um possível papel dos epítopos do CD14 como peptídeos antimicrobianos naturais.

Palavras-chave: CD14, mapeamento de epítopos, receptor de LPS, Phage Display

## **ABSTRACT**

The cluster of differentiation antigen 14 (CD14) is a key molecule of the innate immunity. This pattern recognition receptor binds mainly to lipopolysaccharide (LPS), lipotechoic acid, arachidonic acid and thus induces the releases various cytokines as a defense mechanism. Several studies suggest that different regions of the amino-terminal portion of the molecule may be involved in the LPS binding; however, controversial results on the recognition sequence still persist. In this work, functional epitopes of the CD14 molecule were mapped through Phage Display by using a 7-mer conformational constrained random peptide library against a monoclonal antibody anti-soluble CD14-fraction ST and a polyclonal anti-CD14. In silico and empirical analyzes were performed to map the selected peptides into the CD14 3D structure. Immunoreactivity tests of peptides against bacterial components of Gram+ and Gram- bacteria were performed in order to demonstrate their functional recognition. All peptides strongly reacted against all bacteria, and besides the recongnion of the amino-terminal region, we were able to demonstrate a second epitope site in the middle of the receptor. Additional in silico analysis suggests a possible role of CD14 epitopes as natural antimicrobial peptides.

Keywords: CD14, epitope mapping, LPS receptor, Phage Display



# **APRESENTAÇÃO**

O antígeno de diferenciação 14 (CD14) é uma molécula chave da imunidade inata, capaz de detectar a presença de microrganismo potencialmente patogênico e induzir cascatas de sinalização pró-inflamatória. Devido à capacidade do CD14 de reconhecer diversas estruturas conservadas de diferentes espécies de microrganismos esta proteína é considerada como um receptor de reconhecimento padrão (PRR). No entanto por não possuir um domínio transmembrânico, a sinalização intracelular é desencadeada através da transferência do ligante aos receptores do tipo *Toll* (*Toll Like Receptors*:TLR).

Os TLR conseguem detectar a presença do patógeno sem o auxílio do CD14, todavia com o auxílio desta molécula a sensibilidade no reconhecimento aumenta significativamente. Dentre as funções desencadeadas pelo CD14, a capacidade de reconhecer diversos ligantes da família de TLR é a mais importante sendo esta molécula reconhecida como um cofator deste receptor, possibilitando que ele reconheça a presença de patógenos mesmo em quantidades mínimas.

Ao reconhecer seus ligantes os TLR desencadeiam cascatas de sinalização pró-inflamatória no intuito de ativar o sistema imunológico e eliminar o agente infeccioso. As respostas celulares induzidas na presença do patógeno geralmente são protetoras, mas quando exacerbadas podem resultar em uma fatalidade conhecida como sepse.

A sepse é caracterizada como uma síndrome clínica resultante de uma complexa interação entre o microrganismo infectante e a resposta imunológica pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro. Esta síndrome pode se manifestar em diferentes estágios de gravidade, evoluindo à medida que alterações inflamatórias e hemostáticas aumentam em resposta a infecção. Ela inicia-se com a presença de inflamação sistêmica e pelo menos um foco de infecção, evoluindo para sepse grave quando associada à disfunção em algum órgão, e caso haja hipotensão sanguínea a doença evolui para o choque séptico.

A sepse é a principal causa de morbidade e mortalidade nas Unidades de Terapia Intensiva. Neste contexto vários esforços têm sido destinados a compreender como o sistema imunológico se altera de um mecanismo protetor para um mecanismo autodestrutivo, objetivando com isto desenvolver meios

capazes de interromper a inflamação exacerbada e evitar os efeitos sistêmicos da sepse.

Como a sinalização pró-inflamatória na presença de microrganismos é regulada pelo reconhecimento do ligante aos receptores *Toll*, acredita-se que o CD14 tem um papel crucial na ativação exacerbada do sistema imunológico devido a constante apresentação dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) aos seus respectivos TLR.

Recentemente foi identificada a presença de uma fração do CD14 (sCD14-ST) que se encontra em grandes quantidades na circulação de indivíduos com sepse, a qual é aumentada à medida que a síndrome se agrava. Estudos sugerem que essa fração resulte de um mecanismo de *feedback* negativo do sistema imunológico na tentativa de diminuir a sinalização direcionada pelo CD14 evitando que receptores da imunidade inata sejam constantemente ativados.

Muitos pesquisadores têm avaliado a interação do CD14 e o LPS (lipopolissacarídeo) na tentativa de desvendar como o CD14 interage com seus ligantes e os direciona aos TLR. O LPS é uma molécula conservada presente na parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas, ele é reconhecido pelo sistema imunológico através do lipídeo A presente nesta molécula, a qual é altamente imunogênica. Vários autores já sugeriram alguns sítios de reconhecimento do CD14 para o LPS, sendo os domínios hidrofóbicos presentes na região N-terminal da molécula a principal relatada.

No intuito de verificar quais são os principais epítomos de reconhecimento do antígeno de diferenciação 14 para o LPS, o estudo aqui apresentado selecionou peptídeos miméticos de epítomos do CD14 por meio da técnica de *Phage Display*, utilizando anticorpos anti-CD14 comerciais e uma biblioteca de peptídeos Ph.D-C7C expressa na superfície de fagos filamentosos M13. Foram realizadas análises funcionais e *in silico* dos peptídeos selecionados, que permitiram inferir homologia aos epítomos do CD14 (mimotopos), além de sugerir uma provável função da fração sCD14-ST.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste estudo foram mapear epítomos da molécula do CD14 por meio da tecnologia de *Phage Display* possibilitando predizer possíveis epítomos da molécula *naive* e verificar a funcionalidade dos peptídeos miméticos quanto à ligação a componentes bacterianos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar peptídeos ligantes ao anticorpo monoclonal da fração sCD14-ST e ao policlonal anti-CD14;
- Determinar a reatividade dos clones contra o alvo selecionado;
- Avaliar a capacidade dos peptídeos reconhecerem estruturas bacterianas;
- Mapear epítomos do CD14 por meio de alinhamento na estrutura proteica tridimensional possibilitando verificar em qual região da molécula se encontra os peptídeos selecionados;
- Verificar o grau de antigenicidade de epítomos da molécula na estrutura 3D do CD14 e correlacionar estes dados com reatividade dos peptídeos selecionados.

**CAPÍTULO I:**

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## RECONHECIMENTO DE MICRORGANISMOS PELO SISTEMA IMUNE INATO

O reconhecimento da presença de patógenos é uma das propriedades mais básicas e importantes do sistema imunológico. A capacidade dos indivíduos em reconhecer os patógenos e distingui-los entre próprio e não próprio ao organismo é uma característica observada desde o aparecimento dos primeiros metazoários (Beutler, 2004). Este processo requer reconhecimento da presença de componentes específicos estruturalmente conservados, produzidos por um amplo grupo de microrganismos potencialmente patogênicos. Estes componentes são assinaturas moleculares dos microrganismos e popularmente conhecido como PAMPs (Pugin, Heumann *et al.*, 1994; Chun e Seong, 2010).

Essas assinaturas são moléculas conservadas que fazem parte do ciclo de vida dos patógenos, nelas incluem os ácidos nucleicos com características únicas a microrganismos, como RNA de fita dupla encontrado em replicação de vírus e em sequências CpG de DNA não metiladas encontradas em bactérias; proteínas típicas de bactérias que possuem sítios de iniciação com N-formilmetionina; complexos de lipídeos e carboidratos que são sintetizados por microrganismos mas não por células de mamíferos, tais como lipopolissacarídeos, ácidos teicóicos em bactérias; e oligossacarídeos ricos em manose encontrados em glicoproteínas microbianas, mas não em mamíferos (Janeway e Medzhitov, 2002; Underhill, 2003; Abbas, 2007).

Os PAMPs são reconhecidos por Receptores do Reconhecimento Padrão (PRR), estes receptores estão presentes em células do sistema imune inato e agem como sensores na detecção de microrganismos, como por exemplo, os TLR e o CD14 (Pasare e Medzhitov, 2004). As principais células envolvidas no processo de reconhecimento de PAMPs são os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Aderem, 2003; Kawai e Akira, 2005).

Os receptores de reconhecimento padrão são constitutivamente expressos na superfície celular, em compartimentos intracelulares e/ou secretados na corrente sanguínea e em fluídos teciduais (Qian e Cao, 2013). As principais funções destes receptores são induzir a opsonização, ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação, fagocitose, mecanismos microbicidas através de produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o estímulo

e produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, as quais tem a função de recrutar e ativar células que regem o desenvolvimento da imunidade adaptativa (Medzhitov, 2001; Underhill, 2003).

## **RECEPTORES *TOLL-LIKE***

Os receptores do tipo *Toll* fazem parte do grupo de receptores de reconhecimento padrão. Já foram descritos 10 TLR em humanos e 13 em camundongos, os quais são expressos em diferentes locais da célula. Os TLR1/2/4/5/6/10 encontram-se na superfície celular enquanto que o TLR3/7/8/9 são expressos em membranas de compartimentos intracelulares (Gay, Gangloff *et al.*, 2006).

A capacidade dos TLR em reconhecer diferentes PAMPs pode ser explicada, em parte, pela cooperação existente entre os receptores que formam heterodímeros, como por exemplo, o TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6.

O TLR2 é capaz de reconhecer diversos produtos microbianos como peptidoglicanos, lipoproteínas, componentes da parede celular de micobactérias e ácido lipoteicóico, dentre outras moléculas. O TLR4 tem como agonista o LPS, ácido lipoteicóico e a proteína de fusão F do vírus respiratório sincicial. Ácidos nucleicos virais ou bacterianos são reconhecidos por TLR3/7/8/9 enquanto o TLR5 tem como ligante a flagelina bacteriana. O TLR11 reconhece moléculas tipo profilina de *Toxoplasma gondii*. Os TLR além de reconhecer PAMPs podem também reconhecer moléculas endógenas ao organismo como ceramida, proteínas de choque térmico humano, etc (Takeda e Akira, 2004).

Os TLR pertencem à família de receptores transmembrânicos do tipo I, caracterizados por um domínio extracelular e um domínio intracelular. O domínio extracelular é composto por uma cadeia rica em leucinas (LRR) a qual está relacionada ao reconhecimento do microrganismo, a transdução de sinal e na dimerização do receptor (Kobe e Kajava, 2001). O domínio intracelular, denominado de TIR (Toll/IL1R), tem a função de mediar interações entre o TLR e proteínas envolvidas na transdução do sinal (Armant e Fenton, 2002). O domínio TIR é assim denominado por ser homólogo a membros da família de receptores

de Interleucina I (IL-1R), os quais possuem uma região de aproximadamente 200 aminoácidos em suas caudas citoplasmáticas (Leulier e Lemaitre, 2008).

Ao reconhecer seus ligantes através do domínio LRR, os TLR são ativados, se dimerizam e sofrem alterações conformacionais, que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular fazendo com que o domínio TIR possa interagir com diversas proteínas adaptadoras ou acessórias como MyD88 (proteína da resposta primária de diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo o domínio TIR, também conhecida como Mal, que é semelhante ao MyD88), TRIF (domínio adaptador contendo o TIR indutor de INF- $\beta$ ), TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF), algumas serina / treonina quinases e as IRAKs (quinase associada ao receptor da IL-1). Estas moléculas adaptadoras recrutam quinases e substratos para os complexos receptores induzindo a sinalização intracelular, fazendo com que fatores da transcrição nuclear, como NF- $\kappa$ B, sejam ativados e promova a expressão gênica de proteínas que culminam na secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória como a IL10, essas citocinas irão recrutar células do sistema imunológico e combater a infecção (Medzhitov e Janeway, 1996; Gerold, Zychlinsky *et al.*, 2007; Yamamoto e Takeda, 2010).

A interação do domínio TIR com as proteínas adaptadoras pode ocorrer por duas vias distintas: a dependente de MyD88 sinalizada por todos os TLR exceto o TLR3 e a via dependente de TRIF desencadeada por TLR3 e por TLR4 como demonstrado na figura 1 (Takeda e Akira, 2004).

Quando o TLR é ativado pelo seu agonista, as proteínas MyD88 e TIRAP/Mal são recrutadas para o domínio intracelular TIR (exceto para TLR-7/8/9 que recrutam apenas o MyD88). O MyD88 recruta IRAK-4, o qual ao se ligar ao complexo proteico desencadeia a fosforilação de IRAK-1, que por sua vez desliga-se do complexo para interagir com TRAF-6. Posteriormente, o TRAF-6 associado com IRAK-1 liga-se ao complexo proteico TAB-1/TAB-2/TAK1 da membrana plasmática e sofre seriadas ubiquitinações. TAK-1 e TAB-2 são fosforiladas, liberando assim, o complexo da membrana, ao mesmo tempo em que ocorre a degradação do IRAK-1. Conseqüentemente, com a ativação da TAK-1, ocorre a fosforilação do complexo citoplasmático das I $\kappa$ B quinases (IKKB), o qual ativado induz a subsequente degradação do I $\kappa$ B, liberando assim o NF- $\kappa$ B.



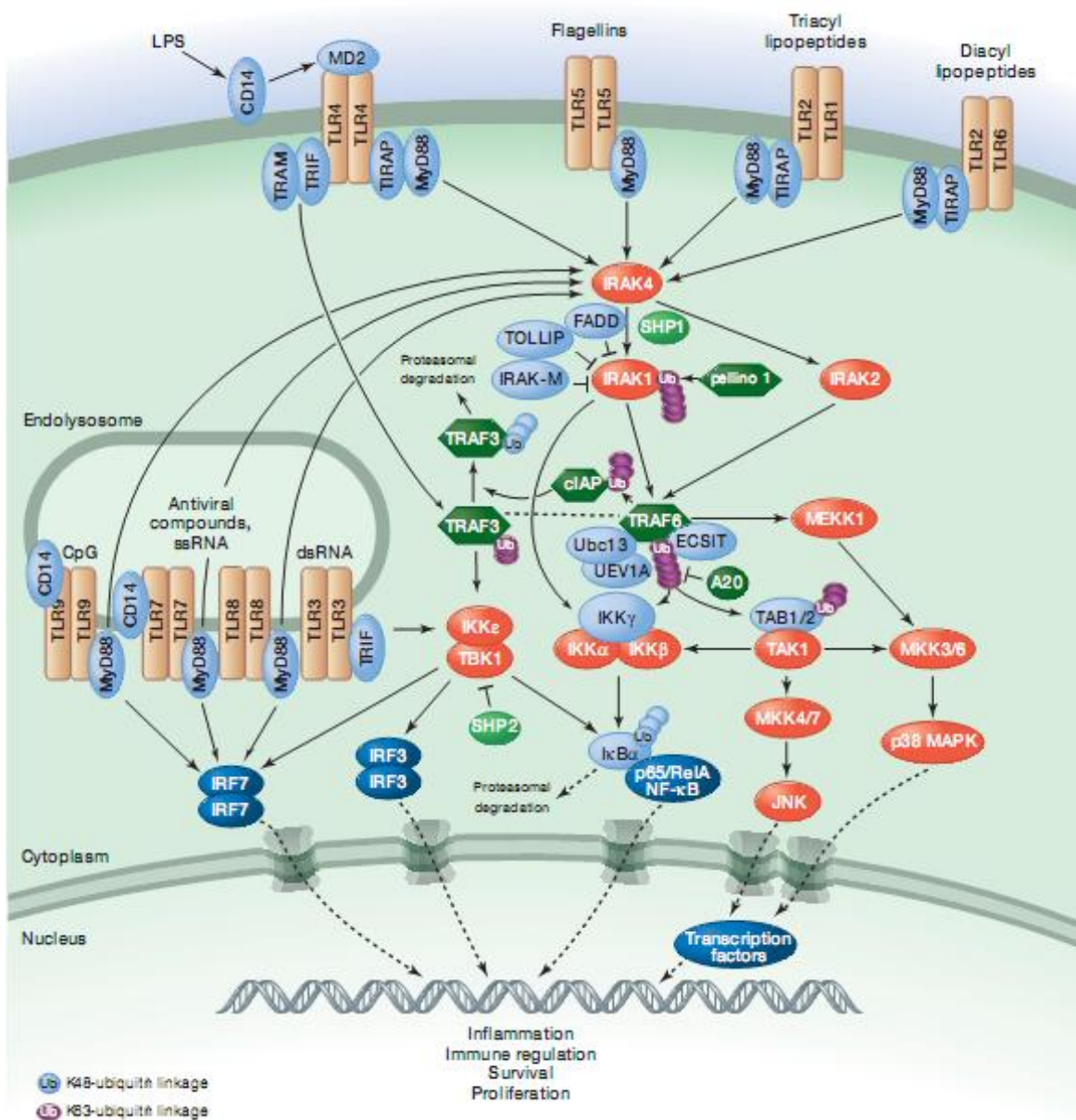
Este por sua vez, transloca-se para o núcleo ligando-se a regiões alvo do DNA para promover a expressão das citocinas pró-inflamatórias (Lye, Mirtsos *et al.*, 2004).

A via de sinalização dependente de TRIF é ativada apenas pelo TLR-3 e pelo TLR-4. Uma vez ativado pelo ligante, o TLR-3 recruta o TRIF para o domínio TIR enquanto o TLR-4 quando ativado, recruta ambos o TRIF e o TRAM. Posteriormente, o TRIF se liga diretamente com o TRAF-6 (de modo independente do IRAK-1/4), ativando o TAK-1. O TRIF também pode se ligar ao TRAF-6 via anterior interação com o RIP-1, levando a subsequente ativação do complexo IKK, resultando na liberação do NF- $\kappa$ B, que por sua vez transloca-se para o núcleo. Essa ativação do NF- $\kappa$ B via dependente de TRIF é realizada com uma cinética mais tardia em comparação à que ocorre na sinalização MyD88-dependente (Akira e Takeda, 2004).

O TRIF também pode realizar uma terceira ligação, desta vez com o complexo IKK $\epsilon$ /TBK-1, resultando na fosforilação e ativação do fator IFN-regulatório-3 (IRF-3). Este por sua vez, transloca-se para o núcleo onde se liga a regiões específicas do DNA para ativar a produção das citocinas TNF- $\alpha$  (de modo independente do NF- $\kappa$ B) e IFN- $\beta$  (Sato, Sugiyama *et al.*, 2003; Meylan, Burns *et al.*, 2004).

O passo limitante da velocidade inicial da geração de uma resposta imunológica se encontra na superfície celular e não em algum ponto da cascata de sinalização intracelular. A capacidade dos TLR gerarem uma resposta é restringida pelo reconhecimento do ligante.

O reconhecimento do LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, pelo TLR4 é complexo e necessita de pelo menos três moléculas acessórias: a proteína sérica LBP (proteína de ligação ao LPS), o receptor CD14 e a proteína MD-2. A proteína LBP separa o LPS em monômeros e os entrega ao CD14. Posteriormente o CD14 transfere seu ligante ao receptor quatro da família de TLR o qual é facilitado pela ação da proteína MD2. (Akira e Takeda, 2004). Há evidências que o TLR-4 possa interagir diretamente com o LPS, mas o reconhecimento exercido pelo receptor é mais eficiente com a ajuda principalmente de CD14 e de MD2 (Fichorova, Cronin *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Cascata de sinalização ativada por receptores *Toll Like* (Lim e Staudt, 2013).

## ANTÍGENO DE DIFERENCIAÇÃO 14

O antígeno de diferenciação 14 desempenha um papel crucial na imunidade inata. Esta molécula é considerada como um receptor de reconhecimento padrão, capaz de interagir com diversos ligantes de TLR sejam eles exógenos como o LPS (Kelley, Lukk *et al.*, 2013), peptídeoglicano (Dziarski,

Ulmer *et al.*, 2000; Albright, Chen *et al.*, 2008) e ácido lipoteicóico; ou endógenos como proteínas de choque térmico humano (Kol, Lichtman *et al.*, 2000) ceramida, fosfolípidios e partículas opsonizadas (Schmitz e Orso, 2002).

A principal função do CD14 é atuar como um cofator dos TLR, capturando e direcionando de forma específica os ligantes ao receptor, permitindo um aumento na sensibilidade desses receptores e na eficiência da ativação da cascata de sinalização pró-inflamatório na presença de PAMPs (Pugin, Heumann *et al.*, 1994; Akira e Takeda, 2004; Lee, Avalos *et al.*, 2012). A ausência do CD14 faz com que os TLR tornem-se pouco sensíveis ao reconhecimento de patógenos. Estudos demonstram que animais geneticamente deficientes ao CD14 apresentam uma produção de citocinas diminuída mesmo quando são estimulados com patógenos, sendo insensíveis ao choque séptico em doses letais de endotoxinas (Finberg e Kurt-Jones, 2006).

O CD14 além de ativar TLR pode auxiliar o organismo no *clearance* de patógenos, ao direcionar moléculas antigênicas para lipoproteínas para que essas possam ser metabolizadas e eliminadas do organismo (Kitchens e Thompson, 2005). Além disso, o CD14 auxilia os macrófagos a detectarem a presença de células apoptóticas, ao reconhecer fosfolípidios aniônicos como fosfatidilserina na superfície celular de células mortas (Gregory e Devitt, 1999; Miyake, 2003).

O CD14 é uma glicoproteína composta por 375 aminoácidos os quais são codificados por um gene localizado na região 5q31.1 do cromossomo humano (Camussi, Mariano *et al.*, 1995; Ulevitch e Tobias, 1995).

A síntese e expressão do CD14 em leucócitos são reguladas por vários mediadores. Em neutrófilos TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) e o LPS são conhecidos por aumentar a expressão do CD14. Enquanto que em monócitos foi demonstrado que algumas citocinas, tais como IL4 (interleucina 4), IL13 (interleucina13) IFN $\alpha$  (interferon alfa), INF $\delta$  (interferon gama), IL2 (interleucina 2) e TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento beta), são responsáveis pela diminuição da expressão do CD14 (Antal-Szalmas, 2000).

O CD14 pode ser encontrado em compartimentos intracelulares e extracelulares. Acredita-se que esta molécula esteja armazenada em compartimentos intracelulares para que haja uma rápida translocação extracelular

quando a secreção for estimulada. Foi estimado que há cerca de 7000 moléculas em neutrófilos e 40-45000 moléculas em monócitos (Detmers, Zhou *et al.*, 1995). Nos neutrófilos o CD14 intracelular está localizado em vesículas secretórias e em grânulos azurófilos (Detmers, Zhou *et al.*, 1995; Rodeberg, Morris *et al.*, 1997), já nos monócitos esta molécula encontra-se difusa no citoplasma mostrando uma ligeira granulosidade próximo ao complexo de Golgi, podendo existir acúmulo de CD14 em microdomínios da membrana plasmática, nas regiões denominadas de cavéolas em ambas as células (Lisanti, Tang *et al.*, 1995).

Nos domínios extracelulares o CD14 é encontrado sob duas formas: ligado à membrana plasmática (mCD14) via uma ancora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e na forma solúvel (sCD14) a qual é encontrada no sangue e fluídos corporais (Ulevitch e Tobias, 1995).

O mCD14 possui 55kDa e é expresso em altas quantidades em monócitos, macrófagos e neutrófilos mas também é encontrado em basófilos, células de Kupffer e linfócitos (Iida, Hirai *et al.*, 1994; Dai, Gong *et al.*, 2003; Li, Gong *et al.*, 2003). O CD14 solúvel possui 48kDa e é produzido por dois mecanismos distintos: sCD14 é produzido e secretado (Austena, Barozzi *et al.*, 2012), ou a âncora de GPI do mCD14 é clivada seja pela fosfolipase D (Sharom e Radeva, 2004) e/ou por clivagem proteolítica direta da superfície celular, ambas as formas geram sCD14 (Wright, Ramos *et al.*, 1990).

A forma do sCD14 é praticamente idêntica a mCD14 com exceção da âncora de GPI (Bazil, Baudys *et al.*, 1989; Viriyakosol, Mathison *et al.*, 2000). O CD14 solúvel é de extrema importância ao organismo, pois possibilita a sinalização via CD14 em células que não possuem essa molécula expressa, como as células epiteliais e endoteliais (Lloyd-Jones, Kelly *et al.*, 2008).

A capacidade do CD14 reconhecer diferentes ligantes, a alta especificidade da ligação e a sinalização desencadeada por ele, têm feito com que os epítomos dessa molécula sejam investigados, no intuito de desenvolver alvos terapêuticos que impeçam sua ação em indivíduos com inflamação sistêmica. As análises têm sido realizadas com mutações sítio dirigidas e por mapeamento de epítomos por meio da utilização de peptídeos sintéticos e anticorpos bloqueadores. Esses estudos buscam identificar elementos estruturais do CD14 responsáveis pelo

reconhecimento do ligante e direcionamento da resposta imunológica (Shapiro, Cunningham *et al.*, 1997; Kim, Lee *et al.*, 2005).

O LPS é o ligante do CD14 mais investigado, uma molécula antigênica presente na parede celular de bactérias, que quando encontrado em baixas quantidades na circulação sanguínea gera moderadas respostas imunológicas em indivíduos saudáveis, já em quantidades elevadas induz a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias resultando em uma desordem imunológica e fisiológica conhecida como choque séptico (Ulevitch, 1993).

A estrutura cristalográfica do CD14 revela uma molécula em forma de beta solenóide com onze domínios repetidos de leucinas. O CD14 é formado por cinco estruturas em alfa hélice ordenadas para o lado convexo da molécula, bem como onze folhas betas no lado côncavo do beta solenoide, essa estrutura sugere a formação de um túnel na molécula (Kelley, Lukk *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que a região N-terminal do CD14, que compreende os aminoácidos 1 a 152, é a responsável pela ligação e indução da resposta celular ao LPS. Todavia há muita discrepância entre os autores, alguns afirmam que toda esta região é responsável pelo reconhecimento do LPS, outros demonstram que há alguns aminoácidos essenciais para o reconhecimento, visto que mutações pontuais no sCD14 podem impedir a formação do complexo CD14-LPS (Stelter, Bernheiden *et al.*, 1997; Cunningham, Shapiro *et al.*, 2000).

Foram identificadas na porção N-terminal da molécula cinco regiões essenciais para o reconhecimento do LPS pelo CD14. Essas regiões abrangem os aminoácidos 3 a 11, 26 a 32, 41 a 44, 56 a 64 e 78 a 83 os quais se localizam próximo a folha  $\beta_1$  dentro do *loop* que precede  $\alpha_1$ , entre  $\beta_3$  e dentro de  $\alpha_3$ , respectivamente (Juan, Hailman, Kelley, Busse *et al.*, 1995; Juan, Hailman, Kelley, Wright *et al.*, 1995; Juan, Kelley *et al.*, 1995; Stelter, Bernheiden *et al.*, 1997) . O LPS tem demonstrado um efeito protetor impedindo a clivagem do CD14 pela endoprotease AspN quando o LPS interage com os aminoácidos 57 a 64 (Mcginley, Narhi *et al.*, 1995). As quatro primeiras regiões,  $\beta_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  tem papel crucial na entrada do “túnel” para dentro da molécula do CD14, sendo formado por domínios repetidos em leucinas o que confere maior estabilidade e dobramento correto no formato de solenoide pelo CD14(Kelley, Lukk *et al.*, 2013).

As regiões hidrofóbicas do CD14 são importantes domínios de ligação e ativação celular, já os domínios hidrofílicos servem para orientar a molécula de LPS de forma adequada para que essa molécula possa interagir com os receptores TLR, possibilitando o reconhecimento e ativação dos mesmos (Kelley, Lukk *et al.*, 2013).

Acredita-se que o aumento descontrolado das respostas inflamatórias na sepse tenha grandes influências do CD14, uma vez que essa molécula encontra-se em grandes proporções na circulação de indivíduos com inflamação aguda associada à infecção (Cohen, 2002). Além disso, associado à presença de infecção há formação de um subtipo do CD14 solúvel (sCD14-ST), o qual é denominado de presepsina.

A presepsina é derivada da clivagem do CD14 na porção N-Terminal da molécula por catepsina e/ou enzimas lisossomais. Ela é uma forma truncada do sCD14 pesando cerca de 13kDa, constituída por 63 aminoácidos. Sua função ainda não foi esclarecida (Mussap, Puxeddu *et al.*, 2012).

Há muitas controvérsias a respeito de como o CD14 reconhece seus ligantes e executa a sua função. Desvendar a atuação dos epítomos isolados do CD14 pode ser fundamental para desenvolvimento de ferramentas que impeçam a exacerbação da resposta imune inata e conseqüentemente a sepse.

## **SEPSE**

A sepse é uma síndrome clínica que pode se manifestar em diferentes estágios de gravidade (sepse, sepse grave, choque séptico), evoluindo à medida que as alterações inflamatórias e hemostáticas aumentam em resposta à infecção. Estímulos externos como infecções graves, queimaduras, traumas e hemorragias podem ativar células do sistema imunológico do indivíduo desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica, a qual pode estar associada a um quadro de sepse (Munford, 2006).

A fisiopatologia da sepse envolve o início de reações complexas desencadeadas por agentes microbianos patogênicos. Dois mecanismos distintos contribuem para o colapso hemodinâmico: extrínseco e intrínseco. O mecanismo extrínseco envolve a presença de toxinas, endotoxinas, partículas de proteínas de

bactérias, fungos ou vírus. O mecanismo intrínseco, endógeno envolve a produção de mediadores inflamatórios de forma sistêmica pelo sistema imune do hospedeiro (Jean-Baptiste, 2007).

De maneira genérica, os mecanismos extrínsecos ativam a produção de mecanismos intrínsecos. O sistema imunológico do hospedeiro é ativado principalmente por componentes presentes na parede das células de micro-organismos (lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico) que interagem com os receptores do sistema imune inato, TLR (Takeuchi, Hoshino *et al.*, 1999; Akira, Uematsu *et al.*, 2006). Essa interação desencadeia cascatas de sinalização pró-inflamatórias com a produção de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 6 e 8, e proteína de alta mobilidade do grupo 1 (HMGB-1). A ativação do sistema imunológico também promove a produção de mediadores como o óxido nítrico, fator ativador plaquetário e fatores do sistema complemento. Todos estes elementos quando liberados de forma sistêmica leva a um colapso circulatório ocasionando sintomas como febre, hipotensão arterial, disfunção ou até mesmo falência de órgãos, situações comuns a sepse (Sriskandan e Altmann, 2008).

A ação descontrolada do sistema imunológico na detecção e eliminação de micro-organismo é tão maléfica ao hospedeiro quanto à presença do patógeno, visto que a mesma sinalização para o combate e a eliminação do patógeno é evidenciada nas alterações patofisiológicas de indivíduos com sepse.

Como dito anteriormente, o CD14 tem papel crucial na detecção, ativação da inflamação e no *clearance* de agonistas microbianos (Kitchens e Thompson, 2005). Acredita-se que CD14 está intimamente ligado a exacerbação da resposta inflamatória. Nos estágios iniciais da sepse há um aumento significativo de sCD14 nos fluídos corporais juntamente com um quadro clínico de super ativação da resposta imunológica enquanto que à medida que essa síndrome se agrava, nota-se uma imunossupressão associada à presença de um subtipo do CD14 (presepsina), o qual é denominado de sCD14-ST sendo esta molécula derivada da clivagem do CD14 na fração N-terminal, a função da presepsina ainda não foi desvendada (Yaegashi, Shirakawa *et al.*, 2005).

A avaliação de epítopos conformacionais pode auxiliar na descoberta de novas drogas bloqueadoras de regiões específicas do CD14 de maneira a impedir

o reconhecimento de patógenos ou possibilitar a formação do sCD14-ST, visto que presepsina parece ser resultante de *feedback* negativo do organismo no objetivo de degradar o CD14 e bloquear a sua sinalização (Pham, 2008).

## **PHAGE DISPLAY**

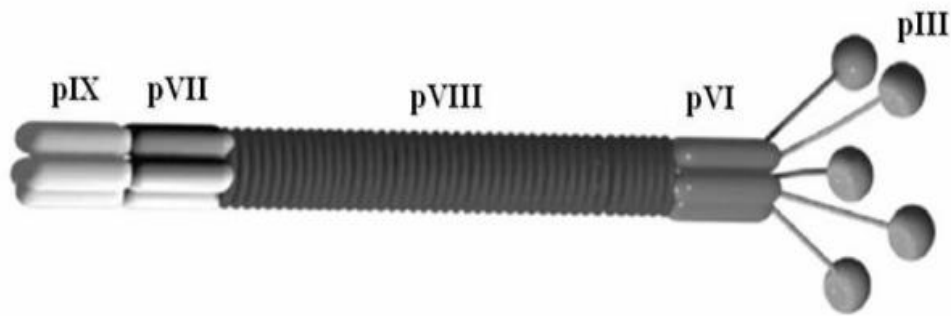
Peptídeos com sequência conformacional a epítomos de proteínas podem ser selecionados pela técnica de *Phage Display*, a qual se baseia na seleção de peptídeos expressos em fagos contra moléculas alvo (Barbas, 2001).

A metodologia de *Phage Display* foi desenvolvida por George Smith (Smith, 1985) após conseguir expressar a enzima EcoR1 fusionada à proteína pIII do capsídeo viral. Bibliotecas combinatórias de peptídeos podem ser produzidas por meio da fusão de fragmentos aleatórios de sequências DNA com genes codificadores de proteínas do capsídeo viral, de modo que o peptídeo ou proteína expresso fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena (Jacobsson, Rosander *et al.*, 2003; Pande, Szewczyk *et al.*, 2010).

Normalmente, utiliza-se o bacteriófago filamentoso M-13 para construção de uma biblioteca de pequenos peptídeos fusionados à proteína pIII ou a pVIII, que permite realizar “*screening*” de peptídeos ligantes à molécula alvo por seleção *in vitro*, essa seleção é denominada de “*biopanning*” (Barbas, 2001).

O bacteriófago M-13 é formado por uma fita simples de DNA envolta por uma capa proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) detalhadas na figura 2. Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2.800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um desses genes (pVIII ou pIII) que produzem a capa proteica do fago (Zanconato, Minervini *et al.*, 2011). Devido à baixa representatividade da pIII em relação à pVIII, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas as bibliotecas ligadas a pVIII (Kehoe e Kay, 2005; Paschke, 2006).





**Figura 2:** Esquema representativo do bacteriófago filamentosso M13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII (Arap, 2005)

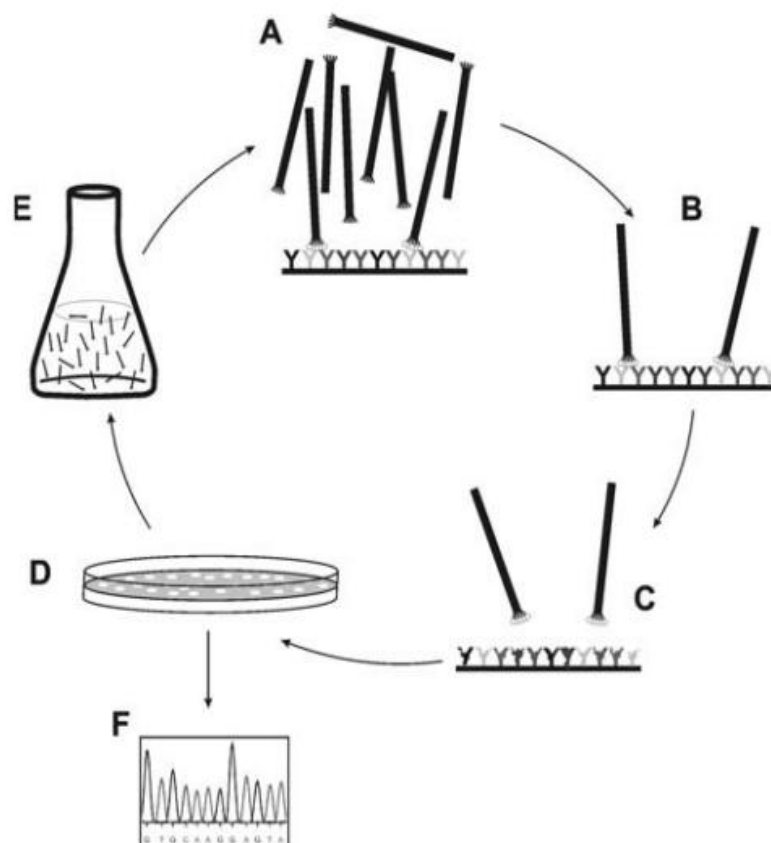
Uma das vantagens do uso de bacteriófagos é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao pilus f de uma bactéria (Hemminga, Vos *et al.*, 2010). Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos proteicos e é expulsa da bactéria através da membrana para o meio extracelular (Azzazy e Highsmith, 2002).

A biblioteca de peptídeos é uma ferramenta poderosa para a identificação de ligantes específicos de uma proteína alvo por um processo denominado de *biopanning*, o qual é ilustrado na figura 3 (Wu, Park *et al.*, 2011). O *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Os alvos podem ser proteínas, como anticorpos (Zhang, Davis *et al.*, 2005), ou moléculas não proteicas, incluindo ácidos graxos (Gargir, Ofek *et al.*, 2002), fosfolipídios (Nakai, Nomura *et al.*, 2005), polissacarídeos (Deng, Mackenzie *et al.*, 1994), RNAs (Danner e Belasco, 2001), DNAs (Cicchini, Ansuini *et al.*, 2002), etc. Também podem ser complexos multi-moleculares, assim como, vírus (Lim,

Chan *et al.*, 2008), células (Kehoe e Kay, 2005; Zhang, Chen *et al.*, 2007), tecidos e órgãos (Valadon, Garnett *et al.*, 2006). Estes alvos são imobilizados em um suporte sólido que pode ser placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas.

Na seleção os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens os clones individuais são caracterizados por sequenciamento do DNA.

O sucesso desta técnica está na complexidade da biblioteca original juntamente com a capacidade e afinidade de ligação entre o peptídeo e a molécula alvo na seleção. Quanto maior a diversidade da biblioteca, mais numerosas serão as sequências capazes de se ligar a uma molécula alvo (Zanconato, Minervini *et al.*, 2011). Assim esta tecnologia tem sido aplicada com sucesso para muitos fins apresentando grande impacto na imunologia, biologia celular, e descoberta de novos fármacos assim como no bloqueio de receptores farmacológicos e o no desenvolvimento de vacinas e drogas (Willats, 2002; Liu, Wu *et al.*, 2009). Muitos peptídeos ligantes com afinidades a diversas biomoléculas (Pande, Szewczyk *et al.*, 2010) inorgânicas (Sarıkaya, Tamerler *et al.*, 2003) e moléculas orgânicas (Serizawa, Sawada *et al.*, 2005) também já foram descritos.



**Figura 3:** Esquema representativo do processo de “*biopanning*”. (A) a biblioteca de fagos é incubada com o alvo imobilizado; (B) fagos não ligantes são lavados; (C) os fagos ligantes são eluídos; (D) fagos eluídos são semeados em bactérias; (E) amplificados em meio líquido e submetidos a novos ciclos de seleção; (F) sequenciamento dos fagos ligantes(Bratkovic, 2010).

Diante do exposto, o mapeamento de epítomos conformacionais por meio da seleção de peptídeos miméticos ao CD14, poderá elucidar a função de diferentes epítomos desta molécula no reconhecimento do LPS e na sinalização pró-inflamatória, podendo auxiliar no desenvolvimento de alvos contra exacerbação da resposta inata desencadeada pelo CD14.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. L., A. H.; PILLAI, S. Nature Immunology. **Cellular and molecular immunology Book**, n. 6, p. 20-23, 2007.
- ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **J Infect Dis**, v. 187 Suppl 2, p. S340-5, Jun 15 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006.
- ALBRIGHT, S. et al. Solution NMR studies provide structural basis for endotoxin pattern recognition by the innate immune receptor CD14. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 368, n. 2, p. 231-7, Apr 4 2008.
- ANTAL-SZALMAS, P. Evaluation of CD14 in host defence. **Eur J Clin Invest**, v. 30, n. 2, p. 167-79, Feb 2000.
- ARAP, M. A. Phage display technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 1, n. 28, p. 1-9, 2005.
- ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. **Genome Biol**, v. 3, n. 8, p. REVIEWS3011, Jul 29 2002.
- AUSTENAA, L. et al. The histone methyltransferase Wbp7 controls macrophage function through GPI glycolipid anchor synthesis. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 572-85, Apr 20 2012.
- AZZAZY, H. M.; HIGHSMITH, W. E., JR. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem**, v. 35, n. 6, p. 425-45, Sep 2002.
- BARBAS, C. F. B., D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. . Phage display: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- BAZIL, V. et al. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. **Mol Immunol**, v. 26, n. 7, p. 657-62, Jul 1989.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v. 40, n. 12, p. 845-59, Feb 2004.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 5, p. 749-67, Mar 2010.

CAMUSSI, G. et al. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 modulate the synthesis of platelet-activating factor by human monocytes and mesangial and endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. **J Immunol**, v. 155, n. 1, p. 316-24, Jul 1 1995.

CHUN, K. H.; SEONG, S. Y. CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 1, p. 98-106, Jan 2010.

CICCHINI, C. et al. Searching for DNA-protein interactions by lambda phage display. **J Mol Biol**, v. 322, n. 4, p. 697-706, Sep 27 2002.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, Dec 19-26 2002.

CUNNINGHAM, M. D. et al. CD14 employs hydrophilic regions to "capture" lipopolysaccharides. **J Immunol**, v. 164, n. 6, p. 3255-63, Mar 15 2000.

DAI, L. L. et al. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 3, p. 622-6, Mar 2003.

DANNER, S.; BELASCO, J. G. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 23, p. 12954-9, Nov 6 2001.

DENG, S. J. et al. Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. **J Biol Chem**, v. 269, n. 13, p. 9533-8, Apr 1 1994.

DETMERS, P. A. et al. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. **J Immunol**, v. 155, n. 4, p. 2085-95, Aug 15 1995.

DZIARSKI, R.; ULMER, A. J.; GUPTA, D. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. **Chem Immunol**, v. 74, p. 83-107, 2000.

FICHOROVA, R. N. et al. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. **J Immunol**, v. 168, n. 5, p. 2424-32, Mar 1 2002.

FINBERG, R. W.; KURT-JONES, E. A. CD14: chaperone or matchmaker? **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 127-9, Feb 2006.

GARGIR, A. et al. Single chain antibodies specific for fatty acids derived from a semi-synthetic phage display library. **Biochim Biophys Acta**, v. 1569, n. 1-3, p. 167-73, Jan 15 2002.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M.; WEBER, A. N. Toll-like receptors as molecular switches. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 9, p. 693-8, Sep 2006.

GEROLD, G.; ZYCHLINSKY, A.; DE DIEGO, J. L. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? **Semin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 41-7, Feb 2007.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. CD14 and apoptosis. **Apoptosis**, v. 4, n. 1, p. 11-20, Feb 1999.

HEMMINGA, M. A. et al. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. **Eur Biophys J**, v. 39, n. 4, p. 541-50, Mar 2010.

IIDA, M. et al. Lipopolysaccharide primes human basophils for enhanced mediator release: requirement for plasma co-factor and CD14. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n. 2, p. 1295-301, Sep 15 1994.

JACOBSSON, K. et al. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. **Biol Proced Online**, v. 5, p. 123-135, 2003.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med**, v. 22, n. 2, p. 63-72, Mar-Apr 2007.

JUAN, T. S. et al. Identification of a lipopolysaccharide binding domain in CD14 between amino acids 57 and 64. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 5219-24, Mar 10 1995.

JUAN, T. S. et al. Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. **J Biol Chem**, v. 270, n. 29, p. 17237-42, Jul 21 1995.

JUAN, T. S. et al. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. **J Biol Chem**, v. 270, n. 3, p. 1382-7, Jan 20 1995.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 338-44, Aug 2005.

KEHOE, J. W.; KAY, B. K. Filamentous phage display in the new millennium. **Chem Rev**, v. 105, n. 11, p. 4056-72, Nov 2005.

KELLEY, S. L. et al. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 1304-11, Feb 1 2013.

KIM, J. I. et al. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11347-51, Mar 25 2005.

KITCHENS, R. L.; THOMPSON, P. A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. **J Endotoxin Res**, v. 11, n. 4, p. 225-9, 2005.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 6, p. 725-32, Dec 2001.

KOL, A. et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. **J Immunol**, v. 164, n. 1, p. 13-7, Jan 1 2000.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 3, p. 168-79, Mar 2012.

LEULIER, F.; LEMAITRE, B. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 3, p. 165-78, Mar 2008.

LI, X. H. et al. In vitro expression of CD14 protein and its gene in Kupffer cells induced by lipopolysaccharide. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 2, n. 4, p. 571-5, Nov 2003.

LIM, A. P. et al. Neutralizing human monoclonal antibody against H5N1 influenza HA selected from a Fab-phage display library. **Virology**, v. 5, p. 130, 2008.

LIM, K. H.; STAUDT, L. M. Toll-like receptor signaling. **Cold Spring Harbor Perspect Biol**, v. 5, n. 1, p. a011247, Jan 2013.

LISANTI, M. P. et al. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. **Mol Membr Biol**, v. 12, n. 1, p. 121-4, Jan-Mar 1995.

LIU, N. et al. A novel peptide isolated from phage display peptides library recognized by an antibody against connective tissue growth factor (CTGF). **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 3, p. 291-7, Mar 2009.

LLOYD-JONES, K. L.; KELLY, M. M.; KUBES, P. Varying importance of soluble and membrane CD14 in endothelial detection of lipopolysaccharide. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1446-53, Jul 15 2008.

LYE, E. et al. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 39, p. 40653-8, Sep 24 2004.

MCGINLEY, M. D. et al. CD14: physical properties and identification of an exposed site that is protected by lipopolysaccharide. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 5213-8, Mar 10 1995.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, Nov 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. On the semantics of immune recognition. **Res Immunol**, v. 147, n. 4, p. 208-14, May 1996.

MEYLAN, E. et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. **Nat Immunol**, v. 5, n. 5, p. 503-7, May 2004.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **Int Immunopharmacol**, v. 3, n. 1, p. 119-28, Jan 2003.

MUNFORD, R. S. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 467-96, 2006.

MUSSAP, M. et al. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) presepsin in critically ill preterm newborns: preliminary reference ranges. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. Suppl 5, p. 51-3, Oct 2012.

NAKAI, Y. et al. Isolation of a Drosophila gene coding for a protein containing a novel phosphatidylserine-binding motif. **J Biochem**, v. 137, n. 5, p. 593-9, May 2005.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 849-58, Nov-Dec 2010.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Microbes Infect**, v. 6, n. 15, p. 1382-7, Dec 2004.

PASCHKE, M. Phage display systems and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 70, n. 1, p. 2-11, Mar 2006.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 6-7, p. 1317-33, 2008.



PUGIN, J. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 509-16, Sep 1994.

QIAN, C.; CAO, X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1283, n. 1, p. 67-74, Apr 2013.

RODEBERG, D. A.; MORRIS, R. E.; BABCOCK, G. F. Azurophilic granules of human neutrophils contain CD14. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4747-53, Nov 1997.

SARIKAYA, M. et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. **Nat Mater**, v. 2, n. 9, p. 577-85, Sep 2003.

SATO, S. et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol**, v. 171, n. 8, p. 4304-10, Oct 15 2003.

SCHMITZ, G.; ORSO, E. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. **Curr Opin Lipidol**, v. 13, n. 5, p. 513-21, Oct 2002.

SERIZAWA, T. et al. A peptide motif recognizing a polymer stereoregularity. **J Am Chem Soc**, v. 127, n. 40, p. 13780-1, Oct 12 2005.

SHAPIRO, R. A. et al. Identification of CD14 residues involved in specific lipopolysaccharide recognition. **Infect Immun**, v. 65, n. 1, p. 293-7, Jan 1997.

SHAROM, F. J.; RADEVA, G. GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. **Subcell Biochem**, v. 37, p. 285-315, 2004.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 14 1985.

SRISKANDAN, S.; ALTMANN, D. M. The immunology of sepsis. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 211-23, Jan 2008.

STELTER, F. et al. Mutation of amino acids 39-44 of human CD14 abrogates binding of lipopolysaccharide and Escherichia coli. **Eur J Biochem**, v. 243, n. 1-2, p. 100-9, Jan 15 1997.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, Feb 2004.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-51, Oct 1999.

ULEVITCH, R. J. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. **Adv Immunol**, v. 53, p. 267-89, 1993.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**, v. 13, p. 437-57, 1995.

UNDERHILL, D. M. Toll-like receptors: networking for success. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 7, p. 1767-75, Jul 2003.

VALADON, P. et al. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 2, p. 407-12, Jan 10 2006.

VIRIYAKOSOL, S. et al. Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. **J Biol Chem**, v. 275, n. 5, p. 3144-9, Feb 4 2000.

WILLATS, W. G. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol Biol**, v. 50, n. 6, p. 837-54, Dec 2002.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431-3, Sep 21 1990.

WU, J. et al. Rapid development of new protein biosensors utilizing peptides obtained via phage display. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e24948, 2011.

YAEGASHI, Y. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. **J Infect Chemother**, v. 11, n. 5, p. 234-8, Oct 2005.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2010, p. 240365, 2010.

ZANCONATO, S. et al. Selection dynamic of Escherichia coli host in M13 combinatorial peptide phage display libraries. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n. 4, p. 812-5, 2011.

ZHANG, Y. et al. Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. **J Biomol Screen**, v. 12, n. 3, p. 429-35, Apr 2007.

ZHANG, Y.; DAVIS, J. L.; LI, W. Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. **Mol Immunol**, v. 42, n. 11, p. 1275-81, Jul 2005.

# CAPÍTULO II:

## Revisiting the CD14: epitope mapping by Phage Display

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da revista

*Immunobiology Journal*, fator de impacto:3,205

(<http://www.elsevier.com/journals/immunobiology/0171-2985>)

## **ABSTRACT**

The cluster of differentiation antigen 14 (CD14) is a key molecule of the innate immunity. This pattern recognition receptor binds mainly to lipopolysaccharide (LPS), lipotechoic acid, arachidonic acid, and thus induces the releases various cytokines, as a defense mechanism. Several studies suggest that different regions of the amino-terminal portion of the molecule may be involved in the LPS binding; however, controversial results on the recognition sequence still persist. In this work, functional epitopes of the CD14 molecule were mapped through Phage Display by using a 7-mer conformational constrained random peptide library against a monoclonal antibody anti-soluble CD14-fraction ST and a polyclonal anti-CD14. *In silico* and empirical analyzes were performed to map the selected peptides into the CD14 3D structure. Immunoreactivity tests of peptides against bacterial components of Gram+ and Gram- bacteria were performed in order to demonstrate their functional recognition. All peptides strongly reacted against all bacteria, and besides the recongion of the amino-terminal region, we were able to demonstrate a second epitope site in the middle of the receptor. Additional *in silico* analysis suggests a possible role of CD14 epitopes as natural antimicrobial peptides.

**Keywords:** CD14, epitope mapping, LPS receptor, Phage Display

### **Abbreviations used in this article:**

CD14: Cluster differentiation 14; LPS: Lipopolysaccharide; GPI: Glycosilphosphatidylinositol; PD: Phage Display

## INTRODUCTION

Cluster differentiation antigen 14, CD14, plays a crucial role in the immune system acting in the detection and clearance of pathogens on host organism (Kitchens and Thompson, 2005). CD14 is a pattern recognition receptor that enhances innate immune responses to infection by sensitizing host cells to bacterial LPS (endotoxin), lipoproteins, lipoteichoic acid, and other acylated microbial products (Kelley, et al., 2013). This molecule also recognizes endogenous ligands such as the human heat shock protein 60 (Kol, et al., 2000), ceramide, phospholipids, modified lipoproteins and opsonized particles (Schmitz and Orso, 2002). After recognizing its ligands, CD14 initiates the activation of the downstream complex inflammatory network.

The CD14 is a glycoprotein composed of 375 amino acids which are encoded by a gene located at 5q31.1 region of chromosome humano (Camussi, et al., 1995, Ulevitch and Tobias, 1995). Myeloid lineage cells can express this protein in two forms: bound to the plasma membrane (mCD14) via an anchor glycosylphosphatidylinositol (GPI) and the soluble form (sCD14), which is found in the blood and body fluids (Ulevitch and Tobias, 1995)

The mCD14 has 55 kDa and is expressed at high levels of monocytes, macrophages and neutrophils, but can also be found in basophils, Kupffer cells and lymphocytes (Li, et al., 2003, Dai, et al., 2003, Iida, et al., 1994). The sCD14 has 48kDa and it may be generated by two distinct mechanisms: produced and secreted (Austena, et al., 2012) or through a proteolytic cleavage or phospholipase D action on the GPI anchor. Both mechanisms will induce the release of a soluble form of CD14 (Sharom and Radeva, 2004).

The sCD14 and mCD14 are the same protein except the GPI anchor, which is found only in mCD14 (Viriyakosol, et al., 2000). The sCD14 is of extreme importance to the body because enables the CD14 signaling pathway in cells that do not express this molecule in the membrane, such as epithelial and endothelial cells (Lloyd-Jones, et al., 2008).

The ability to bind different targets, the high binding specificity, and the incomplete information about the CD14-triggered signaling, make its epitopes excellent targets for investigations. Epitope mapping has been performed elsewhere by site directed mutagenesis (Kim, et al., 2005, Shapiro, et al., 1997) synthetic peptides (Voss, et al., 2006) and neutralizing antibodies (Kirkland, et al., 1993) in order to identify structural elements of the CD14 responsible for the recognition and signaling to the immune response.

Among CD14 ligands, LPS is the main molecule investigated, which binds to the N-terminal region comprising amino acids 1–152, a site present in both soluble and membrane-bound forms that is sufficient for binding and enabling cellular responses (Kim, et al., 2005); however, controversies about the recognition sequence still persist. Some authors claimed that the N-terminal region is responsible for LPS recognition (Voss, et al., 2006, Juan, et al., 1995, Viriyakosol and Kirkland, 1996), but others have shown that only few critical amino acids are necessary, since sCD14 individual mutations may prevent the formation of the complex CD14-LPS (Kelley, et al., 2013, Kim, et al., 2005).

The sCD14 is found in high concentrations in the bloodstream of individuals with several pathologies associated with systemic inflammation. Among them, it is believed that the collapse of the immune response in the

presence of infection, as demonstrated in sepsis, is closely correlated to the action of CD14.

In this investigation we have revisited the CD14 receptor and its functional epitopes for bacterial recognition through Phage Display using a 7-mer conformational restrained random peptide library to identify mimetic peptides (mimotopes) of CD14 3D structure with bacterial detection function. This strategy helped us to map a new epitope site besides the N-terminal region, and all mimotopes presented a broad recognition of bacterial components with a possible relevance to the immune response of inflammatory-associated diseases.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Targeted CD14-antibody**

Human monoclonal and polyclonal antibodies anti-CD14 used in this study were obtained from the PATHFAST™ Presepsin kit diagnosis (Mitsubishi Chemical Medience, Japan). The monoclonal antibody anti-soluble CD14-fraction ST was already coupled to magnetic beads, and the polyclonal antibody anti-CD14 was coupled with protein G-conjugated magnetic beads, as recommended by the manufacturer (Dynabeads Protein G, Life Technology, Carlsbad, CA, USA).

### **Peptide selection through phage display**

For the peptide selection, a PhD-C7C phage library (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used. This is a 7-mer random peptide library fused to the minor coat protein (pIII) of the M13 bacteriophage, with a peptide

diversity of  $1.9 \times 10^9$ . A sample of the library containing  $2 \times 10^{11}$  infectious phage particles was subjected to three rounds of selection and amplification.

The selection was carried out using 20  $\mu$ L of magnetic beads previously coupled with the anti-CD14, which was incubated with  $2 \times 10^{11}$  phage particles from the PhD-C7C library in 180  $\mu$ L of TBS-T 0.05% solution (Tris Buffered Saline plus 0.05% of Tween 20) at room temperature, under slight shaking with gentle rocking for 1 hour. Unbound phages were removed by ten washing steps with TBS-T 0.05%, followed by elution of bound phages with 100  $\mu$ L of elution buffer (0.2M Glicine-HCl, pH2.2) for 10min at room temperature. After elution, beads were captured from the supernatant with the aid of a magneto and the supernadant was transferred to a new microtube containing 20  $\mu$ L of 1M Tris-HCl (pH9.1) for neutralization.

Eluted phages were amplified in *E. coli* ER2738 strain (New England Biolabs, Beverly, MA,USA), purified using PEG-NaCl precipitation, and after each selection cycle, individual bacterial colonies containing amplified phages were grown in a microtiter plate and titrated essentially, as described elsewhere (Barbas, 2001).

### **DNA sequencing**

Phagemid DNA was isolated from 1 mL overnight cultures, and the sequencing reactions were carried out by using the DyEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing Kit (GE Healthcare) with the primer -96 M13 (59-CCCTCATTAGTTAGCGCGTAA-CG-39), according to the manufacturer's instructions, and detection was performed in a MegaBace 1000 Genetic Analyzer (Amersham Biosciences) automatic capillary sequencer.



## **Bioinformatic analysis**

DNA sequences were analyzed through bioinformatics online softwares. ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)). Amino acid sequences were deduced based on the nucleotide sequences through the ExPASy translate program (<http://web.expasy.org/translate/>). The three-dimensional structure of the CD14 was obtained from the Protein Data Bank (PDB:1WWL) (Kim, et al., 2005). The antigenicity degree of the CD14 molecule was calculated for its entire three-dimensional structure by the EpiTope Server program (<http://epitopia.tau.ac.il/>) (Rubinstein, et al., 2009). The location of epitopes of the CD14 molecule were pointed out by 3D-conformational alignment between the molecule and selected peptides using the PEP-SURF online software (<http://peptide.tau.ac.il/>) (Mayrose, et al., 2007, Mayrose, et al., 2007). Physicochemical properties of the peptide (Molecular weight and p.I) were predicted using the Compute pI/Mw tool ExPASy Server ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). To evaluate the potential role of CD14 epitopes as antimicrobial peptides (AMPs), hydrophobicity and net charge of the peptides were predicted using the Antimicrobial peptide database Server ([http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction\\_main.php](http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php)) (Wang, et al., 2009). The sequences of  $\alpha$ -helical peptides are presented according to the Shiffer-Edmundson wheel projection (<http://cti.it.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>).

## **Bead-ELISA and reactivity to the anti-CD14 antibody**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to check the reactivity and binding specificity of selected phage clones. An irrelevant

peptide fused to a bacteriophage was used as a negative control. Reactions were performed in 96-well microtiter plates by mixing  $1 \times 10^{11}$  pfu/well in 100  $\mu$ L of TBS and 1  $\mu$ L the magnetic beads coupled with anti-CD14, which were incubated at 37°C under 100 rpm agitation for one hour. Plates were washed three times with TBST 0.1% followed by an additional incubation with HRP-conjugated anti-M13 (Roche Applied Science) diluted (1:2500) in TBS with 3% BSA for 1h at 37°C. The beads were washed four times in TBS-T, and revealed with OPD SigmaFast™ (Sigma-Aldrich) and read at 492nm.

## **Detection of bacterial components**

### Endotoxin assay detection

A 96-well Maxisorp™ microtiter plate (NUNC, NY, USA) was coated with 1, 10, 100 or 1000 ng/well of Lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich) in 50  $\mu$ L of PBS (phosphate-buffered saline). The phage ELISA assay was performed as described elsewhere (Matsumoto, et al., 2010).

### Bacterial detection

The ability to recognize bacterial structures was verified by ELISA. All bacteria samples were obtained at the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia. Colonies were isolated from cultures of patients' biological samples that were further diluted to a concentration of  $1 \times 10^8$  cfu/mL in saline buffer, with turbidity equivalent to 0.5 McFarland (Soloaga, et al., 2000).

### Detection of bacterial lysate

Isolated colonies of gram-negative (*S. marcescens*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E. coli*) and gram-positive (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and

*E. faecalis*) bacteria were diluted in PBS, and the bacterial cell membrane was lysed by physical mechanisms (heat shock and vortex). Ninety-six-well Maxisorp™ microtiter plates (NUNC, NY, USA) were coated with  $1\mu\text{g mL}^{-1}$  of lysed bacteria in 50mL of carbonate buffer (0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.6) and incubated overnight at 4°C. Antigen-coated wells were emptied and washed once with 200 $\mu\text{L}$  PBS, and then blocked with 300 $\mu\text{L}$  of PBS containing 5% BSA (Bovine Serum Albumin) (w/v) for 1hr at 37°C. Wells were emptied and washed once with 200 $\mu\text{L}$  PBS. We then added 50 $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^{11}$  pfu /well diluted in PBS and incubated at 37°C for one hour. Excess phage particles were removed with three washes of 200 $\mu\text{L}$  PBST 0.05%. The anti-M13-HRP conjugate (Roche Applied Science) was added at a 1:5000 dilution for 1h in 5% PBS/BSA at 37°C. The plate was washed four times in PBS-T, revealed with OPD SigmaFast™ (Sigma-Aldrich) and read at 492 nm.

#### Detection of whole bacteria

The ability to recognize native bacteria was measured by ELISA, which was performed as described for bacterial lysates. However, the plates were coated with 50 $\mu\text{L}$ /well containing 10 $\mu\text{L}$  of whole bacteria ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) diluted in 40 $\mu\text{L}$  of carbonate buffer. The Gram-negative bacteria tested were: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proetus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Citrobacter youngae*. The Gram-positive bacteria were: *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

## **Statistical analysis**

The ELISA Index was calculated using the ratio between the absorbance of the reaction and three times of the average reactivity of irrelevant clone. The GraphPad Prism 5 was used to determine reactivity average differences among phage clones. A two-way ANOVA with Bonferroni post test was used to determine significance. Values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Mimetic peptides to CD14 selected by Phage Display**

Thirty-one randomly selected CD14 mimotopes were obtained after three rounds of biopanning using a phage displayed 7-mer random peptide library (Ph.D-7C7) against both anti-CD14 antibodies. Five clones were selected against the monoclonal antibody (M.A2, M.A3, M.E1, M.H1 and M.H2) and nine against the polyclonal anti-CD14 antibody (P.B11, PC10, P.C12, P.D8, P.F4, P.F11, P.G6, P.G8 and P.H7). The selected clones showed different reactivities against each target (Figure 1). The CD14 molecule was highly antigenic and presented different degrees of immunogenicity, which are depicted in its three-dimensional structure (Figure 2).

Conformational analyzes were performed with the 7-mer peptide sequence and the surrounded pIII phage amino acid sequences (ACxxxxxxxCGGGS). Previous molecular modeling and immunoassay results showed that for correct exposure of the peptide to the target recognition, one must include part of the fused pIII sequence (data not shown).

The selected mimotopes of the CD14 molecule were aligned with its 3D structure through the Epitope Server software (Figure 3), and the alignment identified two major epitope core regions: the N-terminal region from 8 to 46 residues, and the central region from 159 to 214 residues. The functional epitopes mapped by mimotopes matched the predicted antigenic sites of putative epitopes of CD14 (Figure 2).

The similarity analysis between the selected peptides and the CD14 protein using the Pepitope Server program showed statistically significant correspondence (Table 1), evidenced by very low P-values for all peptides.

### **Peptide characterization**

The mimotope characteristics were predicted (Table 2) and demonstrated to present zero or positive net charges, and hydrophobicity ratio lower than 50% for almost all peptides. All selected peptides presented partial similarity (37 to 40%) to the natural antibiotic proteins, with activity against gram negative, gram positive and fungi, which was verified by alignment with the Antimicrobial Peptide Database (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/prediction/actionInput.php>).

Additional evidences that suggest antimicrobial function to mimotopes are provided by simulations of helical wheel projections for mimotopes, and the positive net charges, especially observed for M.H1, P.F4 and P.B11. The sequences adopt a  $\alpha$ -helical amphipathic conformation, as subtended by hydrophilic (positively charged) and hydrophobic sectors (Figure 4).

### **Ability to recognize bacterial structures**

The recognition of bacterial molecules by the CD14 is the main feature described in the literature. To assess the functionality of the CD14 mimotopes that mimic the two epitope regions, we have selected three reactive peptides, two for the N-terminal (M.H2 and P.F4) and one for the central portion (P.F11), and tested them against different bacterial species by ELISA. An irrelevant peptide was used as negative control. Statistical differences were observed between clones and the irrelevant phage ( $p < 0.0001$ ), demonstrating that the peptide fused to the phage protein III specifically recognizes the target. The sequence of the irrelevant phage clone is NMSDFLRIQLRS.

### **LPS detection**

The reactivity of clones M.H2, P.F4 and P.F11 was evaluated with different concentrations of LPS. All clones recognized the endotoxin of Gram-bacteria (LPS). However, only the M.H2 clone presented a dose-dependent reactivity to LPS (Figure5).

### **Detection of bacterial lysates and whole bacteria**

ELISA assays were carried out to mimic the *in vivo* function of CD14, which may bind to bacterial lysates and whole bacteria. All clones were able to recognize molecules present in both bacterial lysates and whole bacteria; however, none of them were statistically different in the recognition of different bacterial species, demonstrating that clones that mimic CD14 epitopes may recognize common bacterial structures present in both Gram- and Gram+ bacteria (Figures 6 and 7).

## DISCUSSION

In this investigation, we have used Phage Display (PD) to select peptides that mimic CD14 epitopes (mimotopes) in order to map functional regions in the molecule using as targets a polyclonal antibody anti-CD14 and a monoclonal antibody anti-sCD14ST. The selected mimotopes recognized Gram- and Gram+ bacterial components and could mimic CD14 binding affinity to LPS.

Our PD approach has never been used for CD14 epitope mapping before, which has been intensively investigated by site direct mutagenesis, overlapping synthetic peptides, and neutralizing anti-CD14 antibody (Kim, et al., 2005, Shapiro, et al., 1997). These previous studies have reached the consensus that the CD14 N-terminal region was responsible for the recognition of LPS and immune activation of associated receptors.

Due to the great similarity and conserved sequences between human and mouse CD14 proteins (Kelley, S.L. et al., 2013), our conformational mimotopes were mapped into the mouse 3D CD14 crystallographic structure based on *in silico* and functional analyses. All selected peptides could recognize LPS, and were mapped inside the previously described amino acid region 1-152 (Kim, et al., 2005), with specific reactivity sequences that include amino acids 3 to 11, 26 to 32, 41 to 44, 56 and 64, and 78 to 83, which are located near the sheet inside the  $\beta$ 1 loop preceding  $\alpha$ 1 between  $\beta$ 3 and within  $\alpha$ 3, respectively (Juan, et al., 1995). There is much discrepancy between authors on the LPS-binding sites. The selected peptides were aligned in specific points of the CD14 molecule encompassing the amino acids 8-214. The peptides were able to recognize LPS, bacterial lysates and whole bacteria, demonstrating that all epitopes can bind to PAMPs with different degrees of sensitivity. Suggesting

that some amino acids are essential for LPS recognition in different regions of the molecule.

The ability of CD14 in recognizing different molecules of microorganisms may not only be associated with PAMPs' recognition, pro-inflammatory signaling, or pathogens' clearance, but also, our *in silico* analysis provided evidences that some peptides may function as antimicrobial peptides (AMPs), with action in both bacteria and fungi.

Anti-microbicide effects as a result of the sCD14 action and of a synthetic peptide (amino acids 81-100) of the CD14 showed significant inhibition of *E. coli* growth in culture (Voss, et al., 2006, Ohnishi, et al., 2010). Interestingly, clones P.F4, P.B11 and M.H1 also presented characteristics of cationic and hydrophobic AMPs. It is believed that the cationic charge of peptides electrostatically attracts them to negatively charged microbial membranes, and the hydrophobic properties enable peptides subsequently to insert and disrupt membranes (Eliasson and Egesten, 2008, Shai, 2002, Shai, 2002).

However, in sepsis, there is an increasing amount of CD14 subtype (sCD14-ST), which is generated by cleavage of CD14 in the N-terminal region by an unclear mechanism (Shozushima, et al., 2011), but probably mediated by neutrophil serine proteases (neutrophil elastase and cathepsin G) (Pham, 2008). The role of sCD14 cleavage in the inflammatory response followed by immunosuppression, or as anti-microbicides is yet to be defined.

It is important to emphasize that our mimotopes have shown a dominant recognition site in the N-terminal sequence of the CD14 for both monoclonal antibody anti-sCD14-ST and polyclonal anti-sCD14, specifically targeting residues 8 to 46, coinciding with the LPS recognition epitope region (Kim, et al.,



2005). However, a second antigenic site mapped by 20% of reactive mimotopes to the polyclonal antibody was also demonstrated, which may explain the low frequency of detection of the entire sCD14 in sepsis patients(FUKUSAKO, 2004). Interestingly, high sCD14 levels are associated with the severity of sepsis (Aalto, et al., 2007), as well as the sCD14-ST(Shozushima, et al., 2011), and this molecular event seems to play a detrimental role in sepsis yet to be clarified. The broad recognition of many molecules by CD14 is also unexplained, but our work provides novel evidences that may improve our understanding of the CD14 role and its relevance to the immune response in inflammatory-associated diseases.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Léa Duarte de Moraes and the staff of Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia for providing the bacterial samples.

#### **GRANT SUPPORT**

The authors would like to thank to the financial support from CNPq, CAPES and FAPEMIG.

#### **DECLARATION OF INTEREST**

The authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

- Kitchens, R.L., Thompson, P.A. 2005. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 11, 225.
- Kelley, S.L., Lukk, T., Nair, S.K., Tapping, R.I. 2013. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *J Immunol* 190, 1304.
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P., Kurt-Jones, E.A. 2000. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164, 13.
- Schmitz, G., Orso, E. 2002. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* 13, 513.
- Camussi, G., Mariano, F., Biancone, L., De Martino, A., Bussolati, B., Montrucchio, G., Tobias, P.S. 1995. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 modulate the synthesis of platelet-activating factor by human monocytes and mesangial and endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 155, 316.
- Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13, 437.
- Li, X.H., Gong, J.P., Shi, Y.J., Liu, C.A., Peng, Y. 2003. In vitro expression of CD14 protein and its gene in Kupffer cells induced by lipopolysaccharide. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2, 571.
- Dai, L.L., Gong, J.P., Zuo, G.Q., Wu, C.X., Shi, Y.J., Li, X.H., Peng, Y., Deng, W., Li, S.W., Liu, C.A. 2003. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World J Gastroenterol* 9, 622.
- Iida, M., Hirai, K., Shinohara, S., Yamaguchi, M., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Morita, Y. 1994. Lipopolysaccharide primes human basophils for enhanced mediator release: requirement for plasma co-factor and CD14. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 1295.
- Austena, L., Barozzi, I., Chronowska, A., Termanini, A., Ostuni, R., Prosperini, E., Stewart, A.F., Testa, G., Natoli, G. 2012. The histone methyltransferase Wbp7 controls macrophage function through GPI glycolipid anchor synthesis. *Immunity* 36, 572.
- Sharom, F.J., Radeva, G. 2004. GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. *Subcell Biochem* 37, 285.
- Viriyakosol, S., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Kirkland, T.N. 2000. Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 275, 3144.
- Lloyd-Jones, K.L., Kelly, M.M., Kubes, P. 2008. Varying importance of soluble and membrane CD14 in endothelial detection of lipopolysaccharide. *J Immunol* 181, 1446.
- Kim, J.I., Lee, C.J., Jin, M.S., Lee, C.H., Paik, S.G., Lee, H., Lee, J.O. 2005. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 280, 11347.
- Shapiro, R.A., Cunningham, M.D., Ratcliffe, K., Seachord, C., Blake, J., Bajorath, J., Aruffo, A., Darveau, R.P. 1997. Identification of CD14 residues involved in specific lipopolysaccharide recognition. *Infect Immun* 65, 293.
- Voss, S., Welte, S., Fotin-Mleczek, M., Fischer, R., Ulmer, A.J., Jung, G., Wiesmuller, K.H., Brock, R. 2006. A CD14 domain with lipopolysaccharide-binding and -neutralizing activity. *Chembiochem* 7, 275.
- Kirkland, T.N., Finley, F., Leturcq, D., Moriarty, A., Lee, J.D., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. 1993. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J Biol Chem* 268, 24818.
- Juan, T.S., Kelley, M.J., Johnson, D.A., Busse, L.A., Hailman, E., Wright, S.D., Lichenstein, H.S. 1995. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. *J Biol Chem* 270, 1382.
- Viriyakosol, S., Kirkland, T.N. 1996. The N-terminal half of membrane CD14 is a functional cellular lipopolysaccharide receptor. *Infect Immun* 64, 653.

- Barbas, C.F.B., D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. . 2001. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rubinstein, N.D., Mayrose, I., Martz, E., Pupko, T. 2009. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics* 10, 287.
- Mayrose, I., Shlomi, T., Rubinstein, N.D., Gershoni, J.M., Ruppin, E., Sharan, R., Pupko, T. 2007. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res* 35, 69.
- Mayrose, I., Penn, O., Erez, E., Rubinstein, N.D., Shlomi, T., Freund, N.T., Bublil, E.M., Ruppin, E., Sharan, R., Gershoni, J.M., Martz, E., Pupko, T. 2007. Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 23, 3244.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37, D933.
- Matsumoto, M., Horiuchi, Y., Yamamoto, A., Ochiai, M., Niwa, M., Takagi, T., Omi, H., Kobayashi, T., Suzuki, M.M. 2010. Lipopolysaccharide-binding peptides obtained by phage display method. *J Microbiol Methods* 82, 54.
- Soloaga, R., Defain, V., Blanco, M., Buchovsky, A., Fernandez, A., Gutfraind, Z., Nagel, C., Russo, M., Tokumoto, M. 2000. [Blood cultures: use of presumptive antibiograms]. *Rev Argent Microbiol* 32, 149.
- Ohnishi, T., Muroi, M., Tanamoto, K. 2010. Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth. *Microbiol Immunol* 54, 74.
- Eliasson, M., Egesten, A. 2008. Antibacterial chemokines--actors in both innate and adaptive immunity. *Contrib Microbiol* 15, 101.
- Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236.
- Shai, Y. 2002. From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des* 8, 715.
- Shozushima, T., Takahashi, G., Matsumoto, N., Kojika, M., Okamura, Y., Endo, S. 2011. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother* 17, 764.
- Pham, C.T. 2008. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1317.
- FUKUSAKO, S.S., KAMON.; HIROSE, JIRO. 2004. NOVEL SOLUBLE CD14 ANTIGEN, Tokyo.
- Aalto, H., Takala, A., Kautiainen, H., Siitonen, S., Repo, H. 2007. Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. *Scand J Infect Dis* 39, 596.

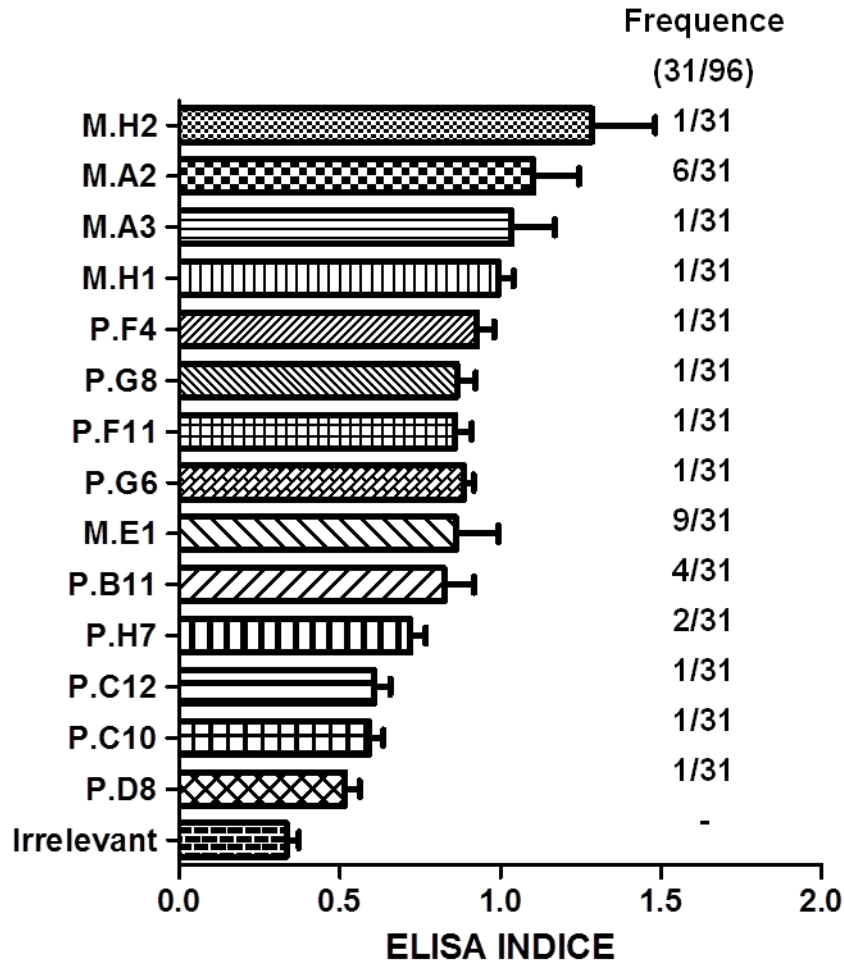


Figure 1: **Reactivity of the CD14 mimetic peptides to the selection target.** (A) Interaction of phage clones with the commercially available anti-CD14 antibody (M. selected by monoclonal antibody and P. selected by polyclonal antibody)(B) Frequency of clones selected and percentage of epitope aligned with an antigenic region.

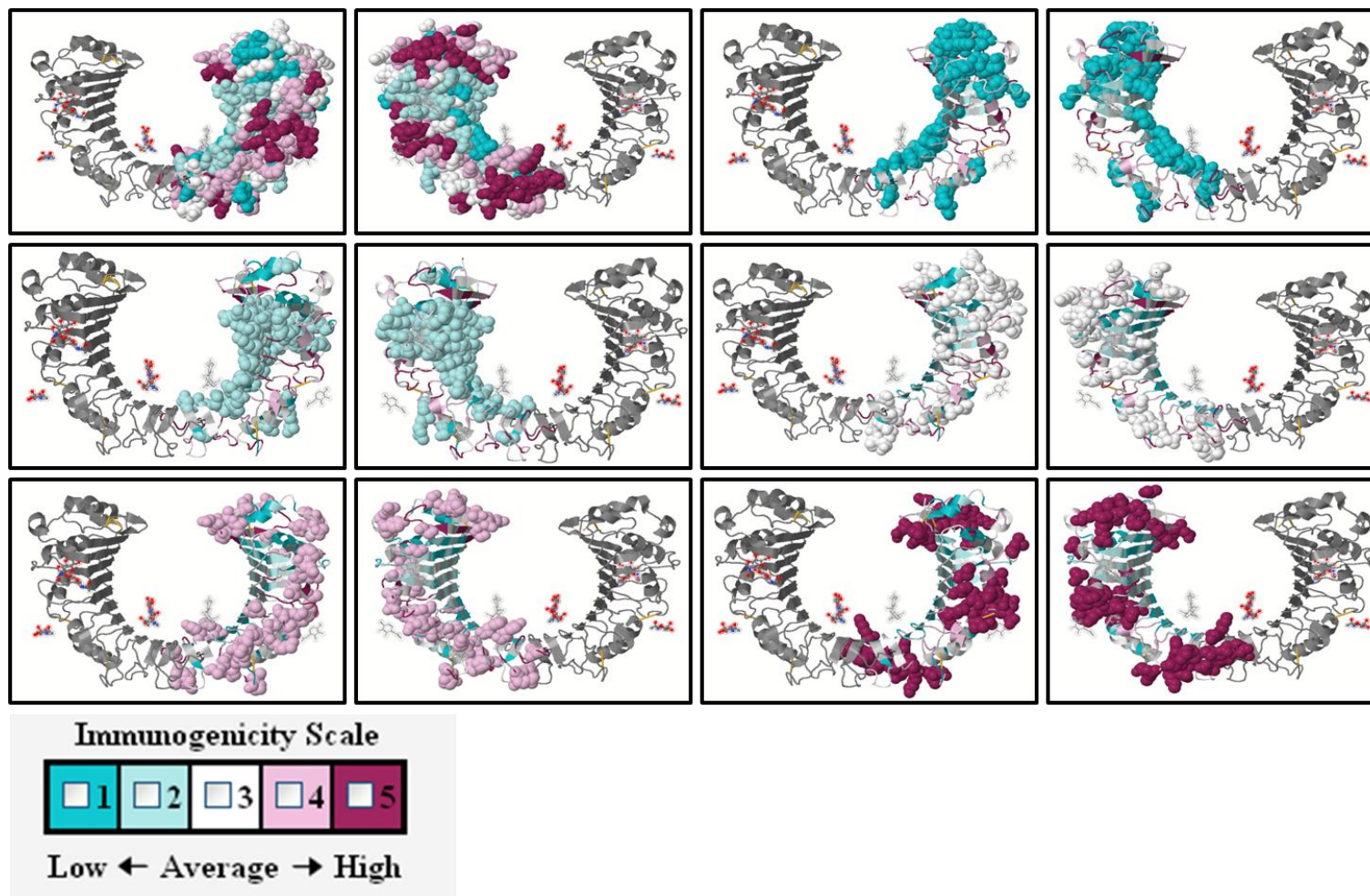


Figure 2: Predict immunogenic regions in CD14 three-dimensional structure by Epitopia Server software (<http://epitopia.tau.ac.il/>)(Rubinstein, et al., 2009).

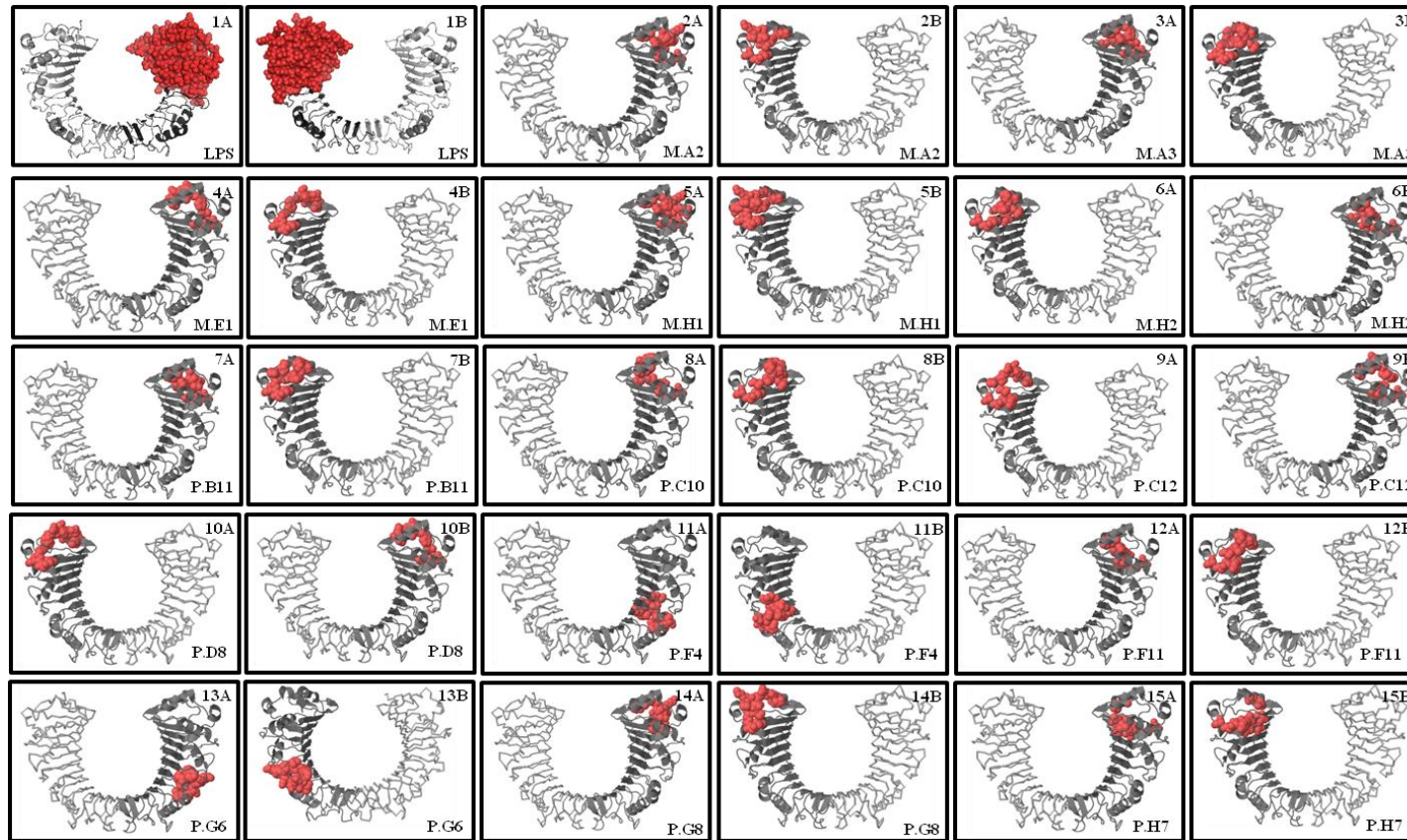


Figure 3: **Epitope Mapping of CD14.** The figure represent regions in CD14 are localized the peptide selected. A and B are mirrored representation of the location of the selected peptide. (1) Represent the binding site of LPS in CD14 (amino acids 1-151), it was determined according to the literature (Kelley, et al., 2013, Kim, et al., 2005) and predicted in the PyMol server software. The molecules shown in Figures 2<sup>nd</sup> to 15<sup>th</sup> were predicted in Pepsurf program and representing selected epitopes by phage display. Epitopes are (2) M.A2, (3) M.A3, (4) M.E1, (5) M.H1, (6) M.H2, (7) P.B11, (8) P.C10, (9) P.C12, (10) P.D8, (11) P.F4, (12) P.F11, (13) P.G6, (14) P.G8 and (12) P.H7.

**Table 1:** Prediction of conformational epitopes. Alingment of amino acids sequences mimetic peptides selected to the original sequence of the CD14. Alingment the amino acid, score alingment and P-value were preditions by pepsurf software. Considered statistically significant if P-value <0.01(Mayrose, et al., 2007).

Peptide	Sequence	Alingment (peptide sequence / CD14 sequence match)														Score Alingment	P-value
M.A2	ACPFPSPTWCGGGS	1A	2C	3P	4F	5P	6S	7P	8T	9W	10C	11G	12G	13G	14S	26.8715	3,71e <sup>-05</sup>
		29A	8C	-	19F	24P	23K	22P	20S	-	-	42G	43G	44G	46S		
M.A3	ACFGLPSWACGGGS	1A	2C	3F	4G	5L	6P	7S	8W	9A	10C	11G	12G	13G	14S	29.1532	3.23e <sup>-06</sup>
		29A	8C	19F	18A	16S	7P	28S	26W	45R	-	42G	43G	44G	46S		
M.E1	ACNGFPSWSCGGGS	1A	2C	3N	4G	5F	6P	7S	8W	9S	10C	11G	12G	13G	14S	28.2946	2.95e <sup>-06</sup>
		29A	32C	31N	28S	30F	-	27S	26W	45R	-	42G	43G	44G	46S		
M.H1	ACLGRPLWACGGGS	1A	2C	3L	4G	5R	6P	7L	8W	9A	10C	11G	12G	13G	14S	26.5821	1.98e <sup>-05</sup>
		29A	8C	19F	21N	23K	22P	49Y	26W	45R	-	42G	43G	44G	46S		
M.H2	ACPHYSTLLCGGGS	1A	2C	3P	4H	5Y	6S	7T	8L	9L	10C	11G	12G	13G	14S	26.024	4.39e <sup>-06</sup>
		29A	8C	7P	-	-	16S	18N	19F	40L	-	42G	43G	44G	46S		
P.B11	ACTPTFPPRCGGGS	1A	2C	3T	4P	5T	6F	7P	8P	9R	10C	11G	12G	13G	14S	33.8461	7.76e <sup>-08</sup>
		29A	8C	28S	7P	18N	19F	24P	22P	45R	-	43G	42G	44G	46S		
P.C10	ACLNPVSSSCGGGS	1A	2C	3P	4F	5P	6S	7P	8T	9W	10C	11G	12G	13G	14S	27.0472	6.64e <sup>-06</sup>
		29A	32C	30F	28S	7P	8C	16S	18N	20S	-	43G	42G	44G	46S		
P.C12	ACSTSSPSYCGGGS	1A	2C	3P	4F	5P	6S	7P	8T	9W	10C	11G	12G	13G	14S	28.3356	1.75e <sup>-06</sup>
		29A	32C	28S	27S	25D	24P	22P	20S	41Y	-	43G	42G	44G	46S		
P.D8	ACSLASLPACGGGS	1A	2C	3S	4L	5A	6S	7L	8P	9A	10C	11G	12G	13G	14S	27.3836	2.09e <sup>-05</sup>
		28S	32C	31N	33L	29A	27S	26W	24P	45R	-	43G	42G	44G	46S		
P.F4	ACTAQLPSCGGGS	1A	2C	3T	4A	5Q	6R	7L	8P	9S	10C	11G	12G	13G	14S	25.6161	1.19e <sup>-05</sup>
		209A	-	183S	159A	160Q	185N	188L	186P	212N	-	214G	189G	192G	195S		
P.F11	ACTPLLSPFCGGGS	1A	2C	3T	4P	5L	6L	7S	8P	9F	10C	11G	12G	13G	14S	26.1128	1.75e <sup>-05</sup>
		29A	32C	28S	7P	8C	19P	20S	-	41V	-	43G	42G	44G	46S		
P.G6	ACSLLATAPCGGGS	1A	2C	3S	4L	5L	6A	7T	8A	9P	10C	11G	12G	13G	14S	27.3569	1.14e <sup>-05</sup>
		201K	168C	167S	166F	164L	161A	185N	187E	186P	-	214G	189G	192G	195S		
P.G8	ACDHGPLPRCGGGS	1A	2C	3D	4H	5G	6P	7L	8P	9R	10C	11G	12G	13G	14S	26.0481	2.19e <sup>-05</sup>
		29A	8C	28S	-	25D	24P	23K	22P	45R	-	43G	42G	44G	46S		
P.H7	ACTLPVPLHCGGGS	1A	2C	3T	4L	5P	6V	7P	8L	9H	10C	11G	12G	13G	14S	24.6294	2.65e <sup>-05</sup>
		29A	32C	38V	75L	-	77V	-	40L	41Y	-	43G	42G	44G	46S		

**Table 2:** Characterization mimetics peptides of CD14 identified by phage-display

Clone	Sequence	Net charge	Hydrophobicity	Mw <sup>1</sup>	% similarity AMP <sup>2</sup>	Target of AMPs <sup>3</sup>
M.A2	ACPFPSPTWCGGGS	0	35%	1348.542	37,5% (APD:AP01305)	Gram +, Gram- and fungi
M.A3	ACFGLPSWACGGGS	0	50%	1306.494	40% (APD:AP01764)	Gram + and Gram -
M.E1	ACNGFPSWCGGGS	0	35%	1236.359	36,8% (APD:AP02231)	Gram -
M.H1	ACLGRPLWACGGGS	+1	50%	1341.587	40% (APD:AP01595)	Gram+
M.H2	ACPHYSTLLCGGGS	0	35%	1359.555	37,5% (APD:AP01935)	Gram+ and Gram-
P.B11	ACTPTFPFRCGGGS	+1	28%	1332.544	40% (APD:AP00303)	Gram+ and Gram-
P.C10	ACLNPVSSSCGGGS	0	35%	1232.366	37,5% (APD:AP00605)	Gram+ and cancer cells
P.C12	ACSTSSPSYCGGGS	0	21%	1257.328	38% (APD:AP01912)	Gram+
P.D8	ACSLASLPACGGGS	0	50%	1187.369	37% (APD:AP01512)	Gram+, mammalian and cancer cells
P.F4	ACTAQRLPSCGGGS	+1	35%	1301.476	35% (APD:AP01206)	Gram+
P.F11	ACTPLLSPFCGGGS	0	42%	1297.532	40% (APD:AP00820)	Gram+
P.G6	ACSLLATAPCGGGS	0	50%	1201.396	38% (APD:AP01677)	Fungi
P.G8	ACDHGPLPRCGGGS	0	28%	1314.482	37,5% (APD:AP01803)	Fungi
P.H7	ACTLPVPLHCGGGS	0	42%	1299.551	40% (APD:AP01935)	Gram+ and Gram-

<sup>1</sup>MW : Molecular weight (theoretical)

<sup>2</sup>AMP: Antimicrobial Peptide

<sup>3</sup>Target of AMPs: Based in the action of peptides described in Antimicrobial Peptide databased (APD).



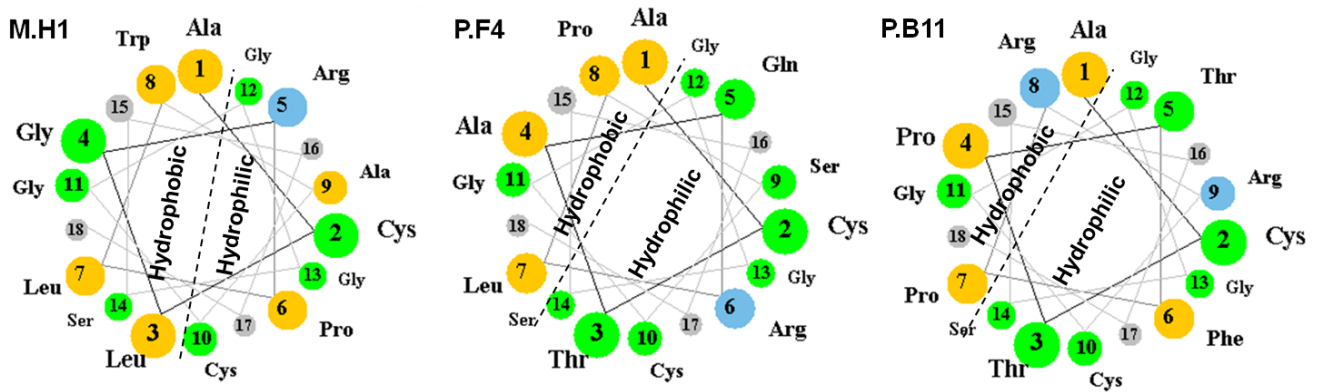


Figure 4: **Helical Wheel projection for M.H1, P.F4 and PB11 mimetics peptides to CD14.** Helical wheel projection for M.H1, P.F4 and PB11 mimetics peptides to CD14. The sequences of  $\alpha$ -helical peptides are presented according to the Shiffer-Edmundson wheel projection. The hydrophilic and hydrophobic sectors are divided by dashed lines. The characteristics amphipathic of the antimicrobial peptides are responsible to lysis of the cell membrane.

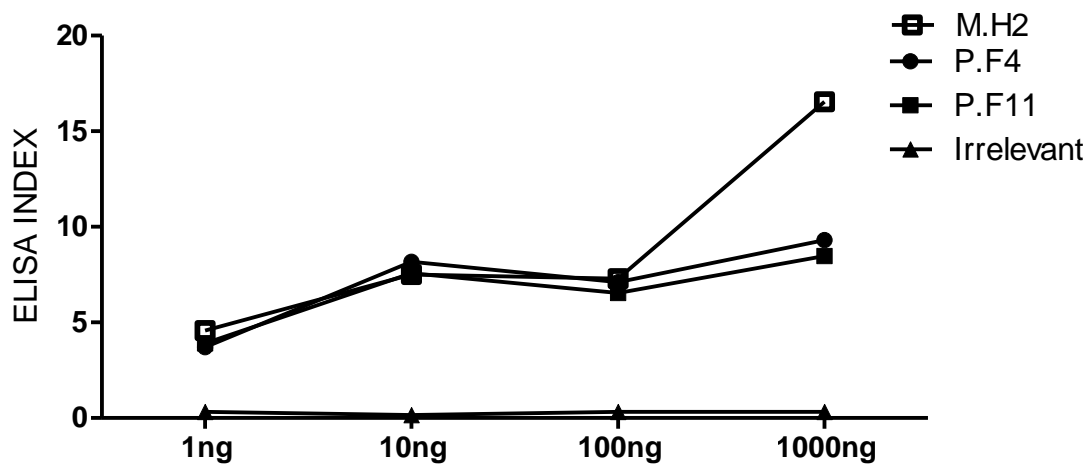


Figure 5: **Reactivity of clones (M.H2, P.F4, P.F11 and Irrelevant phage clone) to different doses of LPS.**

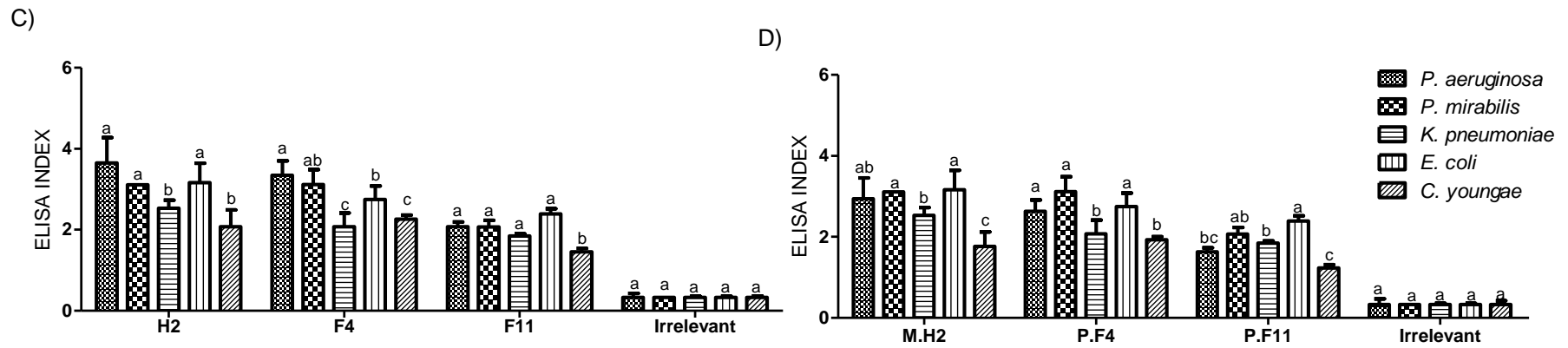
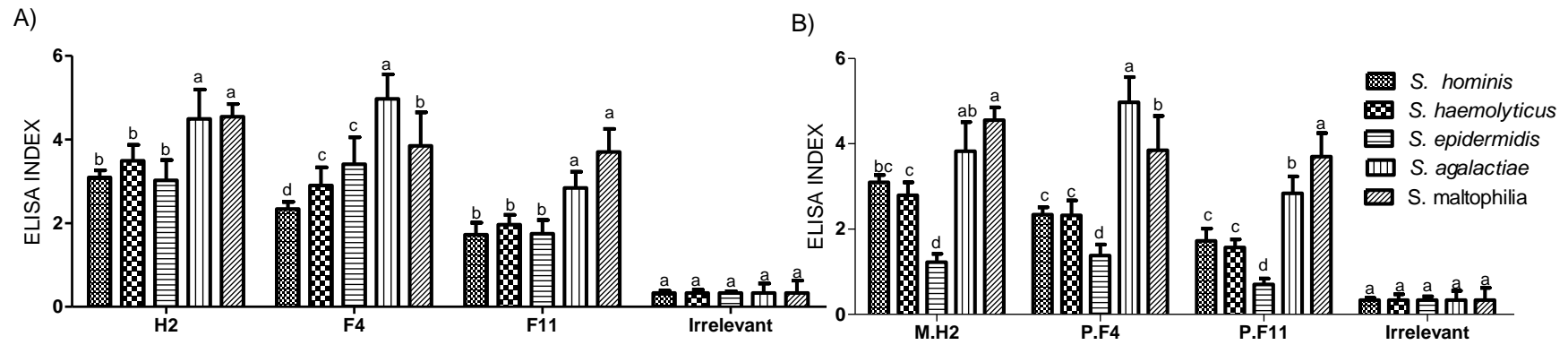


Figure 6: **Phage-ELISA with peptides that represent different regions of the molecule CD14 and the recognition bacterial components** (Gram+: *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*; and Gram-: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proetus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Citrobacter younga*). Graphs A and C show the reactivity in the recognition of bacteria lysed while B and D represent entire bacteria. A and B are Gram- and C and D, Gram+ bacteria.

## PERSPECTIVAS

- Sintetizar os mimotopos selecionados por *Phage Display*;
- Avaliar a atuação dos peptídeos M.H1, P.F4 e P.B11 como antimicrobicidas;
- Avaliar o perfil imunológico desencadeado pelos peptídeos sintéticos *in vitro* e *in vivo* para o entendimento da atuação do sCD14-ST no colapso da sepse.