

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SORAIA FERREIRA

ESTRATÉGIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE E SUA
INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS DE AVES

CURITIBA

2018

SORAIA FERREIRA

ESTRATÉGIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE E SUA
INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS DE AVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre.

Orientador:

Profº Dr Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2018

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ferreira, Soraia.

Estratégia de solubilização de CD28 recombinante e sua interação com macrófagos de aves. / Soraia Ferreira. – Curitiba, 2018.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Silvio Marques Zanata.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Antígenos CD28. 2. Antígenos B7. 3. Imunologia. 4. Macrófagos. 5. Frango de corte.
I. Título. II. Zanata, Silvio Marques. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SORAIA FERREIRA** intitulada: **ESTRATÉGIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28 RECOMBINANTE E SUA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS DE AVES**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Setembro de 2018.

SILVIO MARQUES ZANATA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Avaliador Externo (UFPR /DPB)

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde e disposição que me permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmã pela compreensão na ausência durante meses, além do suporte emocional e financeiro.

Ao meu orientador, professor Silvio Zanata, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

Aos meus queridos amigos Fernanda, Valentin e Ricardo pela amizade e paciência, apoio nos momentos difíceis e ensinamentos que sem dúvidas permitiu o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos meus amigos e colegas do laboratório de Neurobiologia.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Um grande erro: crer-se mais importante do que se é e
estimar-se menos do que se vale.”

Johann Goethe

RESUMO

O sistema imune precisa distinguir entre o próprio e o não-próprio para fornecer proteção contra patógenos que eventualmente invadem os nossos tecidos. Para esta distinção de fato acontecer é necessária uma comunicação entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T. Esta comunicação acontece a partir da aproximação das duas células e conseqüentemente das suas membranas e interação receptor-receptor, formando uma zona de contato chamada de sinapse imunológica. Com esta interação os linfócitos T são ativados, entram num processo de proliferação e se diferenciam dentro de um conjunto de células efetoras. Para esta ativação de fato acontecer, são necessários dois sinais. O primeiro é fornecido através da ligação do peptídeo-MHC e o receptor do linfócito T (TCR) e o segundo pelas proteínas co-estimulatórias, especialmente as proteínas da família B7 (CD80 e CD86) na membrana das APCs, e CD28 na célula T. Um motivo altamente conservado em CD28, o motivo MYPPPY, é responsável pela interação com as proteínas B7. Recentemente estudos têm mostrado que esta ativação pode ser bidirecional, ou seja, durante esse processo a célula APC também é ativada. Até o momento a interação CD28-B7 em macrófagos de aves não foi descrita na literatura. Portanto, este estudo pretende investigar essa sinalização e determinar se ela foi conservada durante a evolução, além de fornecer dados que possam ser úteis no manejo de aves de corte, particularmente em possíveis abordagens de investigação diagnóstica e de aumento de produtividade. Este trabalho tem como objetivo avaliar a ativação de macrófagos de frango frente ao estímulo com CD28 recombinante. O gene que codifica a proteína CD28 foi clonada em um sistema bacteriano e purificada. Pelo fato de apresentar característica de formação de corpos de inclusão, diferentes condições de solubilização foram testadas neste trabalho. Foi possível estabelecer com sucesso um procedimento capaz de manter a proteína recombinante solúvel em condições químicas compatíveis com as diferentes abordagens experimentais tipicamente empregadas pelo grupo. Os estudos de interação de chCD28 com B7 foram realizados utilizando uma linhagem imortalizada de macrófagos de galinha (*macrophage-like cell line-*

HD11). Os resultados sugerem que o mecanismo de ativação parece ter sido conservado em aves, pois a molécula CD28 reconhece os receptores da família B7, CD80 e CD86, presentes na superfície dos macrófagos de aves.

Palavras-chaves: CD28. B7. Imunologia. Macrófagos. Ativação bidirecional.

ABSTRACT

The immune system needs to distinguish between itself and non-self to provide protection against pathogens that eventually could invade our tissues. For this, a communication between antigen-presenting cells (APCs) and T cells is necessary. This communication happens from the approximation of the two cells and consequently their membranes and receptor-receptor interaction, forming a contact zone called immunological synapse. T lymphocytes are activated with this kind of communication, entering into a proliferation process and differentiating within a set of effector cells. Two signals are required for this activation. The first one is provided via MHC-peptide and T lymphocyte receptor (TCR) and the second by costimulatory proteins, especially the B7 family proteins (CD80 and CD86) on the APCs membrane, and CD28 in the T cell. A highly conserved motif in CD28 (MYPPPY) is responsible for the interaction with the B7 proteins. Recently studies have shown that this activation can be bidirectional, resulting in the stimulation of the APC. To date, CD28-B7 interaction in avian macrophages has not been described in the literature. Therefore, this study intends to investigate this signaling and to determine if it has been conserved during the evolution, besides providing data that can be useful in the handling of poultry, particularly in possible approaches of diagnostic, investigation and increase of productivity. This work aims to evaluate the activation of chicken macrophages against the stimulation with recombinant CD28. The gene encoding the CD28 protein was cloned into a bacterial system. Due to the presence of inclusion body formation, different solubilization conditions were tested. A procedure capable of keeping the recombinant protein soluble under chemical conditions, compatible with the different experimental approaches was successfully established. Interaction studies of chCD28 with B7 were performed using an immortalized line of *macrophage-like cell line*-HD11. The results suggest that the mechanism of activation seems to have been conserved in chicken since the CD28 molecule recognizes the B7, CD80 and CD86 family members present on the surface of chicken macrophages.

Key Words: CD28. B7. Immunology. Macrophage. Bidirectional activation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | DINÂMICA DA INTERAÇÃO CD28/ CTLA-4 – CD80 (B7.1) / CD86 (B7.2) | 17 |
| FIGURA 2 | MODELO ATUAL DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T E SEUS COESTIMULADORES..... | 19 |
| FIGURA 3 | PERFIL DA SINAPSE IMUNOLÓGICA FORMADA DURANTE A ATIVAÇÃO DA CÉLULA T..... | 19 |
| FIGURA 4 | REPRESENTAÇÃO DA SINALIZAÇÃO REVERSA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS..... | 21 |
| FIGURA 5 | DESENHO EXPERIMENTAL DO TESTE DE TEMPERATURA E IPTG..... | 27 |
| FIGURA 6 | EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28WT CD28 Δ | 33 |
| FIGURA 7 | SOLUBILIZAÇÃO DE CD28 COM TAMPÃO DESNATURANTE CONTENDO 8M DE UREIA..... | 34 |
| FIGURA 8 | PURIFICAÇÃO EM RESINA NI-NTA..... | 35 |
| FIGURA 9 | EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE CD28 Δ COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA E IPTG..... | 37 |
| FIGURA 10 | LAVAGENS DOS CORPOS DE INCLUSÃO COM QUANTIDADES CRESCENTES DE UREIA..... | 39 |
| FIGURA 11 | LAVAGENS DOS CORPOS DE INCLUSÃO COM QUANTIDADES CRESCENTES DE UREIA..... | 39 |
| FIGURA 12 | REFOLDING DO SOBRENADANTE COM 4M DE UREIA..... | 40 |
| FIGURA 13 | RENATURAÇÃO DA PROTEÍNA CD28 Δ | 41 |
| FIGURA 14 | GEL REDUTOR REPRESENTATIVO DAS AMOSTRAS RESULTANTES DA DIÁLISE..... | 42 |
| FIGURA 15 | CD28 É EXPRESSA E PURIFICADA PRINCIPALMENTE COMO UM MONÔMERO..... | 43 |
| FIGURA 16 | WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DILUÍDAS EM MEIO DE CULTIVO..... | 44 |
| FIGURA16B | QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO WESTERN BLOT DA FIGURA16..... | 44 |
| FIGURA17A | EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD80 E CD86 NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS HD11..... | 46 |

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 17B | COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD80 E CD86..... | 47 |
| FIGURA 18 | ENSAIO DE LIGAÇÃO CD28-HD11..... | 49 |
| FIGURA 19 | MARCAÇÃO DAS CÉLULAS COM CD28WT E CD8 Δ SOLUBILIZADAS..... | 50 |
| FIGURA 20 | MARCAÇÃO DE CÉLULAS HD11 COM CD28WT E CD28 Δ NUMA DILUIÇÃO SERIADA..... | 51 |
| FIGURA 21 | PERFIL DE LIGAÇÃO DE CD28WT, CD28 Δ E TRX..... | 52 |
| FIGURA 22 | COMPARAÇÃO DO PERFIL DE LIGAÇÃO ENTRE CD28WT, CD28 Δ E TRX..... | 53 |
| FIGURA 23 | SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DOS VETORES DE CD28WT E CD28 Δ | 54 |
| FIGURA 24 | GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE ELISA..... | 55 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | OBJETIVOS GERAIS..... | 15 |
| 1.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| 2. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 | BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE CD28 E CTLA-4..... | 16 |
| 2.2 | OS LIGANTES B7.1 E B7.2..... | 17 |
| 2.3 | PAPEL DE CD28 NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T..... | 18 |
| 2.4 | A SINALIZAÇÃO BIDIRECIONAL DE CD28..... | 20 |
| 2.5 | O SISTEMA IMUNE DE AVES..... | 22 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CD28WT e CD28 Δ de <i>G. gallus</i> | 24 |
| 3.1.1 | Expressão recombinante em pequena escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28..... | 24 |
| 3.1.2 | Expressão recombinante em larga escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ | 25 |
| 3.1.3 | Purificação das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ | 26 |
| 3.2 | ESTRATÉGIAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28..... | 26 |
| 3.2.1 | Teste de expressão em pequena escala de CD28 Δ – parâmetros: temperatura e IPTG..... | 27 |
| 3.2.2 | Teste de redobramento (refolding) de CD28 Δ na matriz Ni-NTA- Agarose..... | 28 |
| 3.2.2.1 | Lavagem dos corpos de inclusão | 28 |
| 3.2.2.2 | Refolding de CD28Δ na matriz Ni-NTA-Agarose | 29 |
| 3.2.2.3 | Renaturação de CD28 por diluição e concentração por cromatografia de afinidade | 29 |
| 3.2.3 | Diálise de CD28wt e CD28 Δ | 30 |
| 3.3 | ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES..... | 30 |
| 3.4 | ANÁLISE DO PERFIL DE B7.1 e B7.2 EM CÉLULAS HD11..... | 30 |
| 3.5 | ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES | |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| | EM CÉLULAS HD11..... | 31 |
| 3.6 | SEQUENCIAMENTO DOS VETORES CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DE CD28WT E CD28Δ..... | 32 |
| 3.7 | ENSAIO DE INTERAÇÃO CD28-CD80..... | 32 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 33 |
| 4.1 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CD28WT e CD28Δ..... | 33 |
| 4.1.2 | Expressão recombinante em pequena escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28Δ..... | 33 |
| 4.1.3 | Expressão recombinante em larga escala e purificação das porções extracelulares de CD28wt e CD28Δ..... | 34 |
| 4.2 | ESTRATÉGIAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28..... | 35 |
| 4.2.1 | Teste de expressão em pequena escala de CD28Δ – parâmetros: temperatura e IPTG..... | 36 |
| 4.2.2 | Teste de redobramento (refolding) de CD28Δ na coluna matriz Ni-NTA-Agarose..... | 38 |
| 4.2.2.1 | Lavagem dos corpos de inclusão..... | 38 |
| 4.2.2.2 | Refolding de CD28Δ na matriz Ni-NTA-Agarose..... | 40 |
| 4.2.2.3 | Renaturação de CD28Δ por diluição e concentração por cromatografia de afinidade..... | 41 |
| 4.2.3 | Diálise de CD28wt e CD28Δ..... | 42 |
| 4.3 | ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES..... | 44 |
| 4.4 | ANÁLISE DO PERFIL DE B7.1 e B7.2 EM CÉLULAS HD11..... | 45 |
| 4.5 | ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS HD11..... | 48 |
| 4.6 | SEQUENCIAMENTO DOS VETORES CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DE CD28WT E CD28Δ..... | 54 |
| 4.7 | ENSAIO DE INTERAÇÃO CD28-CD80..... | 55 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 56 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |

1. INTRODUÇÃO

O processo de ativação de linfócitos T, proliferação e produção de citocinas requer a interação do receptor de células T (o receptor TCR) com o complexo de histocompatibilidade maior II (MHC-II). Necessita ainda, do cross-linking das moléculas coestimuladoras CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), encontradas na membrana das células apresentadoras de antígenos (APCs), com CD28 ou CTLA-4 (antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico) na superfície das células T (RUTKOWSKI et al, 2003).

É firmemente estabelecido que na coestimulação das células T a ligação de CD28:B7 é estimulatório e CTLA-4:B7 é inibitório. Acredita-se que a região responsável pela interação destas duas proteínas aos receptores B7 nas APCs seja um domínio de seis aminoácidos altamente conservado na maioria das espécies, também conhecido como sítio MYPPPY (ORABONA et al. 2004).

De acordo com ORABONA et al. (2004) existe uma sinalização bidirecional quando essa interação acontece. Além da ativação da célula T, a célula APC também é estimulada. Eles mostraram essa estimulação quando trataram as células dendríticas com CD28, e observaram que essa interação estimulou as células a desenvolver uma imunidade protetiva contra infecções via aumento da regulação de interleucina-6 (IL-6). Esta proteção também foi observada em testes tumorais, que resultou na erradicação de tumores pobremente imunogênicos. O mesmo efeito foi visto mais tarde no estudo de MIR (2014), onde os macrófagos mostraram-se ativados quando ele utilizou anticorpos monoclonais que mimetizaram a ligação de CD28.

Por isso, o uso de CD28 constitui uma ferramenta valiosa no aumento da resposta imune durante uma vacinação ou indução de respostas anti-tumorais, além de estudos de pesquisa básica e aplicada com o intuito de esclarecer as interações do sistema imune que ainda não foram completamente decifradas e o desenvolvimento de possíveis imunoterapias.

1.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste projeto é avaliar a resposta de uma linhagem imortalizada de macrófagos de galinha (HD11) quando estimulados com CD28 recombinante (rCD28) que atuaria como um mimético do linfócito T. Neste contexto, as consequências da interação rCD28-APC estão sendo analisadas contribuindo para o entendimento da sinalização reversa em aves, o qual ainda não está estabelecido.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressão e purificação da proteína recombinante selvagem (CD28wt) e o mutante (CD28 Δ - deletado para o sítio MYPPPY);
- Solubilização das proteínas recombinantes;
- Análise da interação com os receptores B7.1 e B7.2;
- Análise da importância do sítio MYPPPY;
- Observação da sinalização bidirecional em aves.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE CD28 E CTLA-4

As moléculas CD28 e CTLA-4 existem como glicoproteínas homodiméricas ligadas por ligação dissulfeto. Ambas possuem domínios extracelulares contendo os loops CDR1, CDR2 e CDR3. A maior concentração de resíduos conservados tanto no CD28 como CTLA-4 em quase todas as espécies é o motivo MYPPPY que se encontra no CDR3. Estudos de mutações nesta região mostraram que estes resíduos são importantes para a ligação com B7.1 e B7.2. (HARRIS e RONCHESE, 1999).

A molécula CD28 é uma proteína integral de membrana, que se encontra na superfície de células TCD4+ e TCD8+. A maior parte da contribuição do CD28 na ativação das células T, é dada pela cauda citoplasmática. Esta cauda possui motivos específicos que são fosforilados e iniciam uma cascata de sinalização interna.

Embora o CD28 seja constitutivamente expresso na membrana plasmática, o CTLA-4 tem um padrão de expressão muito mais complexo. A molécula não parece ter expressão em células T em repouso, mas é super-regulada durante a progressão do ciclo celular. Depois da transcrição e tradução, a proteína associa-se com o complexo adaptador de clatrina AP-1 e é encontrado localizado predominantemente nas vesículas intracelulares. A estimulação do receptor TCR leva o transporte da proteína para a superfície da célula T. Entretanto, é rapidamente endocitado por um segundo adaptador de clatrina AP-2 (SANSOM et al, 2003).

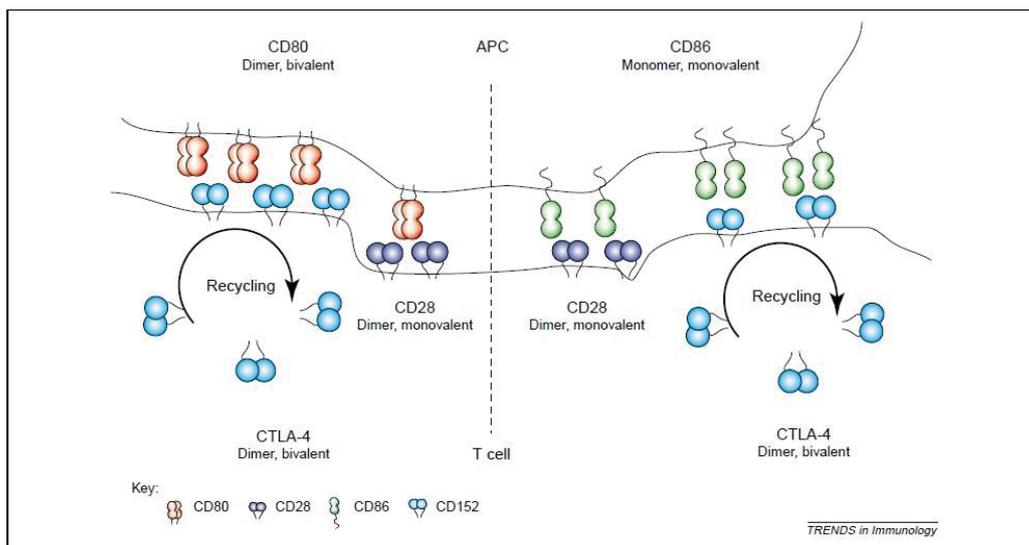


FIGURA 1. DINÂMICA DA INTERAÇÃO CD28/ CTLA-4 – CD80 (B7.1) /CD86 (B7.2). FONTE: SANSOM et al, 2003

Estruturas de cristais mostraram que B7.1 existe como um dímero ligado a dois locais de ligação de CD28 ou CTLA-4 (SANSOM et al, 2003). Dados cristalográficos recentes também indicaram que B7.2 é incapaz de formar dímeros estáveis, sendo portanto um monômero.

Apesar de bem documentado que CD28 é um homodímero, evidências recentes sugerem que esse dímero pode possuir apenas um local de ligação para os ligantes, contrastando com a natureza bivalente de CTLA-4 (SANSOM et al, 2003).

2.2 OS LIGANTES B7.1 E B7.2

Embora B7.1 exista como dímero e B7.2 apresenta-se como um monômero, ambos têm um domínio tipo constante e um tipo variável (Collins *et al.*, 2002). Resíduos conservados encontrados nestes domínios têm demonstrado serem críticos para a ligação com CD28 e CTLA-4 (HARRIS e RONCHESE, 1999). Essas duas moléculas parecem ser distantemente relacionadas, pois apresentam uma identidade de sequência de aminoácidos apenas de 26%.

DAVIS et al, (2003) indicaram que B7.1 é o ligante mais potente para CTLA-4, baseado não somente na afinidade mais alta, mas também por causa da avidéz dele que é maior. Apesar de ter uma afinidade mais fraca para CD28, o B7.2 é provavelmente o ligante mais eficiente comparado com B7.1.

A expressão de B7.1 e B7.2 na superfície das células difere quantitativamente e qualitativamente nas APCs. B7.2 é expresso constitutivamente nos monócitos e pode ser rapidamente induzido nas células B ativadas. Já o B7.1 não é expresso nos monócitos em repouso e apresenta-se pouco nas células dendríticas. Embora a expressão seja induzida em macrófagos ativados, células B e células matadoras profissionais (natural killer), o tempo da indução da expressão de B7.1 é mais lenta do que de B7.2 (SLAVIK *et al*, 1999).

2.3 PAPEL DE CD28 NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

Os linfócitos T são cruciais para a maioria das respostas imunes, e uma imunossupressão severa ocorre em indivíduos ou animais deficientes em células T. O modelo atual de como as células T tornam-se ativadas é derivado de uma teoria de um sinal 2 que foi primeiro observado na ativação das células B proposto por BRETSCHER e COHN em 1970, e mais tarde foi expandido para as células T por LAFFERTY e CUNNINGHAM. (ALEGRE *et al*, 2001)

De acordo com este modelo, além da interação com o MHC (sinal 1), os linfócitos T necessitam reconhecer também moléculas co-estimuladoras (sinal 2). A descoberta do CD28 como um protótipo co-estimulatório do TCR forneceu evidências para que o modelo de sinal 2 seja requerido para a ativação total da célula T (CHEN e FLIES, 2013), já que na ausência dele as células geralmente direcionam-se para um estado apoptótico ou para um estado anérgico, que é caracterizado pela incapacidade de produzir interleucina-2 (IL-2) e/ou proliferar. É importante salientar que a ativação da célula T pode ocorrer na ausência do sinal 2 apenas se o sinal do TCR for muito forte (SHARPE e FREEMAN, 2002).

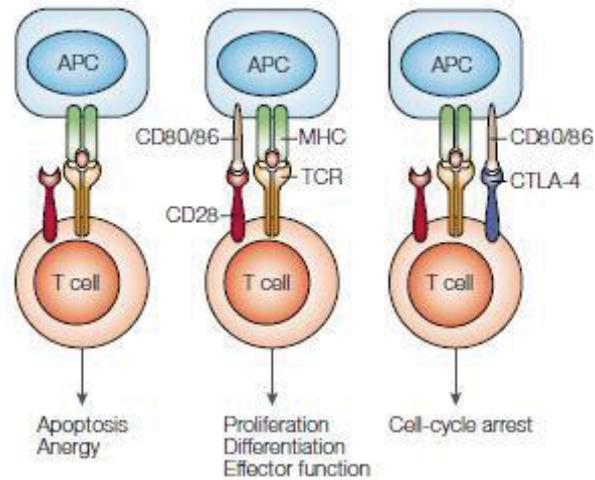


FIGURA 2. MODELO ATUAL DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T E SEUS COESTIMULADORES. FONTE: ALEGRE et al, 2001

Durante o reconhecimento do MHC-peptídeo pelo TCR, uma estrutura juncional é formada entre as células T e APC. A sinapse imunológica é composta de complexos de ativação supra-molecular distal, periférico e central (dSMAC, pSMAC e cSMAC respectivamente), que contém moléculas específicas que são cruciais para a formação da sinapse imune. Estudos de imagem mostraram que na cSMAC, o CD28 forma microclusters com o TCR, e estes microclusters iniciam o recrutamento das moléculas de sinalização e ativação da célula T (CHEN e FLIES, 2013).

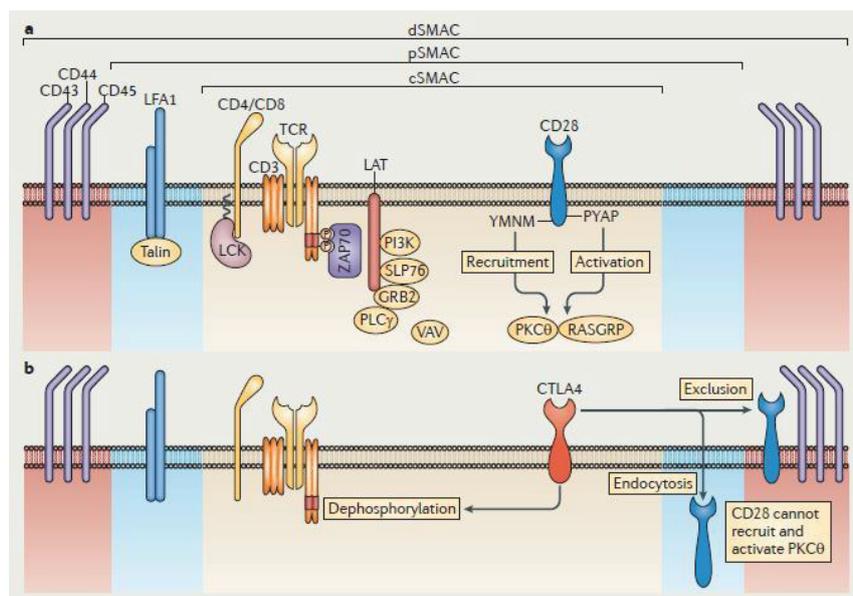


FIGURA 3. PERFIL DA SINAPSE IMUNOLÓGICA FORMADA DURANTE A ATIVAÇÃO DA CÉLULA T. FONTE: CHEN e FLIES, 2013.

Os principais efeitos do CD28 são aumentar e sustentar a resposta da célula T que foi iniciada pela sinalização antígeno-receptor. Essa sustentação é dada pela estimulação da sobrevivência da célula, possibilitando assim a produção de citocinas, expansão clonal e diferenciação. O CD28 também otimiza a resposta das células T previamente ativadas promovendo a produção de IL-2 e sobrevivência (SHARPE e FREEMAN, 2002).

Seguindo a ativação, moléculas co-estimulatórias adicionais como receptores inibitórios, são recrutados para a sinapse imunológica. O CTLA-4 que possui um papel inibitório, acumula-se na mesma região cSMAC do CD28 excluindo-o fisicamente (CHEN e FLIES, 2013) por competição com os ligantes B7.1 e B7.2 e diminuição da expressão de CD28 por endocitose. Além disso, foi demonstrado que ele desliga a sinalização positiva por meio do recrutamento de fosfatases que desfosforilam as moléculas chaves da sinalização do TCR. O CTLA-4 pode também ter um papel na trans-endocitose, onde a molécula sequestra os receptores B7.1 e B7.2 da superfície das APCs e esse complexo é endocitado pela célula T.

A ativação da célula T é um processo muito complexo, que envolve uma rede sincronizada de moléculas co-estimulatórias e co-inibitórias. O equilíbrio destes sinais é crucial para maximizar as respostas imunes protetoras, mantendo a tolerância imunológica e prevenindo a autoimunidade (SHARPE e FREEMAN, 2002).

2.4 A SINALIZAÇÃO BIDIRECIONAL DE CD28

B7.1 e B7.2 podem receber sinais co-inibitórios e co-estimulatórios. Este evento é descrito como sinalização reversa ou bidirecional, onde estes receptores podem ter um importante mecanismo de feedback para a regulação das interações de APCs como parte da rede de co-sinalização (CHEN, 2004).

Estudos de interação das moléculas B7 em células dendríticas (DCs) mostraram que a ligação de CTLA-4 em células T regulatórias induziram a expressão da enzima tolerogênica indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) nas células dendríticas (LOGUE e SHA, 2004). Esta enzima cataboliza o triptofano e leva a inibição da função da célula. ORABONA et al (2004), relataram que a interação CD28-B7 tem resultados diferentes. O tratamento com CD28 levou a

produção de IL-6 e interferon gama (IFN- γ) nas células dendríticas. Entretanto, a IL-6 inibe a super-regulação de IFN- γ através da diminuição da regulação do receptor de IFN- γ (IFN- γ R) e do aumento da regulação do supressor de sinalização da citocina 3 (SOCS3).

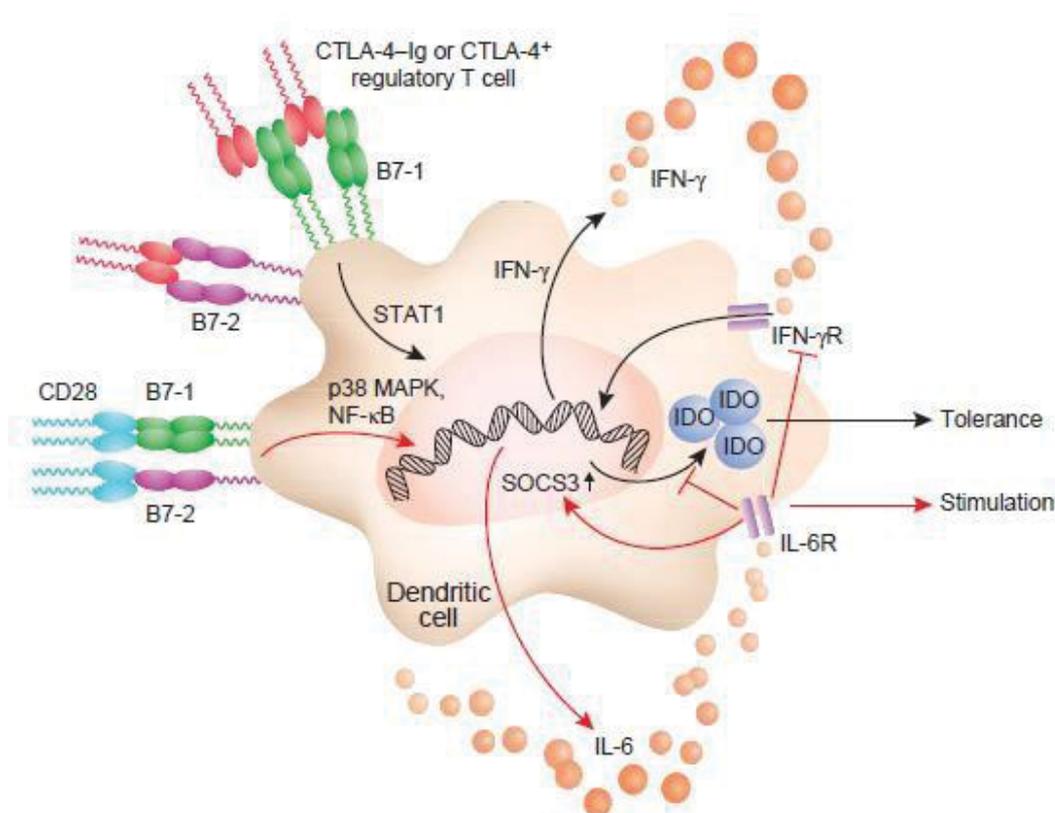


FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DA SINALIZAÇÃO REVERSA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS. FONTE: LOGUE e SHA, 2004.

Os efeitos de IL-6 são dominantes nas células dendríticas tratadas com CD28 e é capaz de aumentar a imunidade mediada por células. Assim a interação das moléculas B7 com CD28 leva a ativação das células dendríticas enquanto a interação com CTLA-4 resulta na tolerogenicidade delas. (LOGUE e SHA, 2004). ORABONA et al (2004) demonstraram em modelos *in vivo* e *in vitro* que o pré-tratamento com CD28 teve um efeito protetivo nas células dendríticas quando infectadas com *Candida albicans*. Observaram também o mesmo efeito protetivo, quando injetaram CD28 e houve a erradicação de tumores pobremente imunogênicos.

O mesmo efeito protetivo foi observado em macrófagos nos estudos de MIR (2013). Ele estimulou os receptores B7 na superfície de macrófagos com

anticorpos monoclonais agonistas, e um efeito protetivo foi visto quando as células foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. Esse efeito também mostrou ser dependente de IL-6, além de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1).

2.5 O SISTEMA IMUNE DE AVES

O sistema imune de aves difere do sistema imune de mamíferos em alguns pontos, como por exemplo, as galinhas possuem diferentes repertórios de receptores Toll-like (TLR) e quimiocinas; além disso, as aves não possuem linfonodos, porém existe a Bursa de Fabricius que funciona como um órgão linfoide primário; não apresentam plaquetas, mas possuem trombócitos que representam as mesmas funções. (KAISER, 2010; WU et al., 2011).

O processo de ativação de células T é similar nas aves, e os co-receptores essenciais para o sinal 2 possuem seus motivos conservados. Comparações de banco de dados revelaram que existem similaridades relevantes do CD28 de aves com o CD28 de mamíferos. Galinhas e mamíferos compartilham 50% de identidade na sequência de aminoácidos, enquanto ratos e humanos compartilham 67% (YOUNG et al, 1994).

Um dos resíduos de cisteína no domínio extracelular e outro na região transmembrana do CD28 estão ausentes nas galinhas. Isto pode explicar do porquê a molécula de galinhas ser monomérica, enquanto o CD28 de mamíferos é um homodímero ligado por uma ponte dissulfeto (YOUNG et al, 1994).

A importância econômica das galinhas exige uma identificação mais extensa das moléculas relacionadas ao sistema imune (POWELL et al, 2009). O que foi descrito na literatura até o momento é bastante superficial comparado com o arsenal que se tem do sistema imune de mamíferos. A galinha é a espécie pecuária mais numerosa do mundo e acredita-se que a produção irá aumentar dramaticamente nas próximas décadas. A intensidade atual e crescente da produção de aves só é possível com o uso da vacinação. Várias vacinas são dadas durante a curta vida de um frango de corte comercial, com cinco semanas ou menos. Mas, este intenso regime de vacinação pode levar os patógenos a desenvolver resistências às vacinas atuais e

consequentemente à uma maior virulência (WU e KAISER, 2011). Para manipular novas vacinas ou estratégias de aumentar a produção de forma saudável, será necessário entender o sistema imune de aves e particularmente o mecanismo de apresentação de antígenos nesses animais. O estudo de moléculas estimulatórias têm, portanto, funções importantes nas galinhas, pois podem fornecer informações relativas para a pesquisa básica, como os mecanismos de evolução por exemplo, além do interesse industrial para o desenvolvimento de ferramentas para o aumento da produção e de diagnóstico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CD28WT e CD28 Δ de *G. gallus*

A porção extracelular da proteína CD28 tipo selvagem, do inglês wild type (wt), foi previamente clonada em vetor pET28a (+), e a sua expressão e purificação foram padronizadas por FIDALGO (2012). A mesma porção extracelular com sítio MYPPPY deletado (CD28 Δ) foi posteriormente construído por INGBERMAN (2015), que também padronizou a expressão e purificação dela.

Diferentes partidas de expressão e também de purificação das proteínas recombinantes foram realizadas durante a execução experimental deste trabalho, sendo que após a avaliação da pureza de cada lote, o mesmo foi estocado de forma adequada a -20°C.

3.1.1 Expressão recombinante em pequena escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ

Para expressão da porção extracelular das duas proteínas, os plasmídeos que foram previamente construídos por FIGALGO (2012) e INGBERMAN (2015) para CD28wt e CD28 Δ respectivamente, foram eletroporados em *E. coli* BL21 (DE3) STAR. Após a eletroporação, as bactérias transformadas foram deixadas 1 hora em estufa a 37°C para a recuperação das mesmas antes do plaqueamento. Depois as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar com 30ug/ml de antibiótico kanamicina. A placa de Petri foi armazenada em estufa por 16h a 37°C. Para o pré-inóculo, quatro colônias isoladas foram selecionadas em 3ml de meio LB acrescido de 30ug/ml do mesmo antibiótico utilizado anteriormente. Estes inóculos foram deixados 16 horas a 37°C sob agitação constante de 220 rpm. As culturas saturadas foram diluídas na proporção 1:50 em 10ml de meio LB com 30ug/ml de kanamicina e crescidas a 37°C sob agitação constante até atingirem a absorbância de 0,6 a 600nm. Depois da D.O ser atingida, cada amostra foi dividida pela metade e 5ml de cada foram induzidos com 0,2mM de IPTG (isopropil- β -D-

tiogalactosideo) com o intuito de ativar a expressão da proteína. As culturas induzidas e seus respectivos controles não induzidos foram incubados a 37°C e 220 rpm por 3 horas.

Alíquotas de 1ml de cada amostra foram coletadas e centrifugadas a 6000 rpm por 5min em temperatura ambiente. Os sedimentos de bactérias foram ressuspensos em 50ul de tampão de amostra redutor (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofeno) e aquecidos a 95°C por 20min.

As amostras foram submetidas a uma separação eletroforética por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15% (SAMBROOK et al, 2001), onde 10ul de cada amostra foram inseridos em cada poço. Após a corrida em eletroforese, o gel foi corado com o uso de azul de coomassie para a verificação das colônias que tiveram maior expressão da proteína de interesse.

3.1.2 Expressão recombinante em larga escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ

A partir da análise do gel referente às expressões em pequena escala, uma das quatro colônias foi selecionada para prosseguir com a expressão em larga escala. Para esta expressão, o mesmo protocolo descrito no item 3.1.1 foi feito, com a diferença do volume de pré-inóculo e inóculo utilizados. O pré-inóculo na expressão foi de 20ml e o inóculo de 1000ml. Além disso, logo após a expressão a cultura de bactérias foi separada em volumes de 250ml e centrifugada 5000 rpm por 15 min a 4°C. Os pellets foram congelados em -80°C até a sua purificação. Dois pellets referente a 250ml de bactéria, foram descongelados e ressuspensos em 12,5ml de tampão de lise (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA e 50mM NaCl, pH 8.0) acrescido de 1mM de inibidores de protease NEM e PMSF.

As bactérias passaram por uma lise mecânica em prensa de French, sob pressão de 1000 Pa. Após a ruptura das células bacterianas, os lisados foram centrifugados a 9000 g por 30min a 4°C. Como já era conhecido que as proteínas formavam corpos de inclusão quando eram expressas em cepas bacterianas (FIDALGO, 2012 e INGBERMAN, 2015), os pellets foram ressuspensos diretamente em 12,5ml de tampão desnaturante (50 mM

NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 8 M ureia, pH 8,8 1mM PMSF e NEM). Depois, a suspensão foi centrifugada novamente com a velocidade de 9000g por 30min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram unidos e uma alíquota foi analisada em gel de poliacrilamida 15% da mesma forma que na mini expressão.

3.1.3 Purificação das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ

As purificações foram feitas em 1,5ml de resina de níquel (Ni-NTA agarose QIAGEN). O lisado de bactéria que foi ressuspendido em tampão desnaturante, do item 3.1.2, foi incubado com a resina por 1 hora em temperatura ambiente com 20mM de imidazol. Duas lavagens de 10ml foram feitas com 40mM de imidazol. A eluição foi realizada com 10ml de tampão desnaturante com 300mM de imidazol, com coletas de 2ml. Amostras das lavagens e eluatos foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% em tampão de amostra redutor (com 5% de β -mercaptoetanol), onde 10ul/poço foram depositados no gel. As proteínas purificadas foram alíquotadas e estocadas a -20 °C.

3.2 ESTRATÉGIAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28

Experimentos que foram feitos anteriormente pelo grupo (FIDALGO, 2012 e INGBERMAN, 2015) mostraram que tanto a proteína CD28wt quanto CD28 Δ tendem a formar corpos de inclusão durante a expressão nas bactérias e que a sua solubilização é feita somente com a utilização de um agente caotrópico, no caso a ureia. Mas, este agente desnaturante precisa ser retirado da amostra porque ele impossibilita a utilização desta em ensaios de cultivo celular, por ser extremamente tóxico às células em grandes quantidades.

Por isso, foi decidido testar alguns parâmetros para que as proteínas fossem expressadas diretamente na forma solúvel.

3.2.1 Teste de expressão em pequena escala de CD28 Δ – parâmetros: temperatura e IPTG

As temperaturas de 20°C e 37°C com diferentes concentrações de IPTG foram testadas com a proteína CD28 Δ , conforme o esquema da FIGURA 5.

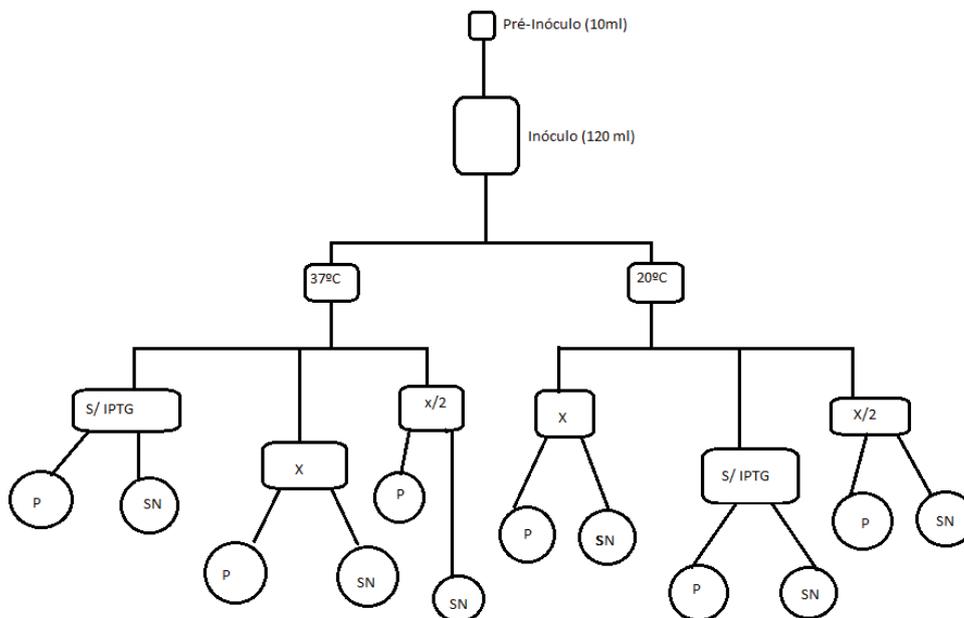


FIGURA 5. DESENHO EXPERIMENTAL DO TESTE DE TEMPERATURA E IPTG. X=0,2mM; X/2=0,1mM; P = pellet e SN = sobrenadante. FONTE: o autor (2018).

A metodologia foi a mesma do item 3.1.2, diferenciando nos volumes de pré-inóculo e inóculo que foram de 10 e 120ml respectivamente, e proporção de diluição que foi de 1:100. Uma vez atingida a absorbância de 0,6 a 600nm, o inóculo foi dividido em 6 frascos com 20ml/cada. As concentrações de 0,2mM e 0,1mM de IPTG foram adicionadas a cada dois frascos. As duas amostras restantes não receberam adição de IPTG, sendo os controles negativos.

Os dois grupos foram separados e colocados em shakers com temperaturas diferentes por 3 horas, para a indução da expressão. Depois as bactérias foram submetidas a uma centrifugação de 6000 rpm por 5min, e os pellets ressuspensos em 10ml de tampão de lise nativa (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, pH 7.0) com 1mM de PMSF e NEM. A suspensão de células passou por uma lise por cisalhamento em prensa de French a 1000 Pa e posteriormente o lisado foi centrifugado por 30min a 9000g a 4°C. Os

sobrenadantes foram armazenados em -20°C e em uma pequena parte dos pellets foram adicionados 5ml de tampão de lise desnaturante (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 8 M uréia, pH 8,8 1mM PMSF e NEM). O restante dos pellets foi também guardado em -20°C .

Uma alíquota de cada sobrenadante e pellet ressuspendido foi misturada com tampão de amostra redutor e aquecidos a 95°C por 20min. Depois as amostras passaram por uma separação eletroforética por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%, onde 10ul de cada foram depositados no gel. Após a corrida, o gel foi corado com o uso de azul de coomassie.

3.2.2 Teste de redobramento (refolding) de CD28 Δ na matriz Ni-NTA-Agarose

A metodologia para este teste foi montada com base em dois protocolos – SAMBROOK e RUSSEL (2001) e AMERSHAM (1999) e está descrita abaixo.

3.2.2.1 Lavagem dos corpos de inclusão

O pellet correspondente à amostra de 0,2mM e 37°C do item 3.2.1, foi descongelado e ressuspendido em 10ml de tampão de lise celular (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 0,5% Triton X-100, pH 8.0) acrescido de 1mM de PMSF e NEM. Esta suspensão foi deixada em repouso por 5min em temperatura ambiente, e depois centrifugada em velocidade alta 10000 g por 15min a 4°C . Alíquotas do sobrenadante e pellet foram guardadas e prosseguiu-se então com as lavagens dos corpos de inclusão com tampão (20mM Tris-HCl, 2% Triton X-100, 1mM PMSF pH 8.0) com concentrações de ureia crescentes. Quatro lavagens de 5ml/cada foram feitas com variação na concentração de ureia de 2M, 4M, 6M e 8M no tampão desnaturante. Entre cada lavagem foi feita uma centrifugação de 6000g por 10min a 4°C , alíquotas do sobrenadante e pellet ressuspendidas em 100ul de água miliQ foram guardados a 4°C . Os sobrenadantes foram sempre guardados enquanto os pellets ressuspendidos no tampão com quantidade de ureia superior. O mesmo processo foi feito com a amostra controle (não induzido com IPTG). Todas as alíquotas foram diluídas em tampão de amostra redutor e aquecidos a 95°C por 20min. Depois as amostras passaram por uma separação eletroforética por

SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%, onde 10ul de cada foram depositados no gel. Após a corrida, o gel foi corado com o uso de azul de coomasie.

3.2.2.2 Refolding de CD28 Δ na matriz Ni-NTA-Agarose

Como a proteína foi solubilizada com 4M de ureia e o objetivo era ainda retirar completamente o agente caotrópico, o sobrenadante desta lavagem do item 3.2.2.1, foi usado no teste de refolding na coluna de níquel. Esta solução de 5ml foi incubada com 200ul de resina e 10mM de imidazol a 4°C por 1 hora. Depois do void (produto não ligado) ter sido coletado, foram feitas 2 lavagens com 2ml de tampão desnaturante 4M e 2M de ureia, acrescido de 10mM e 20mM de imidazol, nesta ordem. A eluição foi feita com 1ml do mesmo tampão sem ureia e com 500mM de imidazol. Uma alíquota de cada amostra foi diluída com tampão de amostra redutor e aquecida a 95°C por 20min. Posteriormente foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, onde 10ul/poço foram depositados.

3.2.2.3 Renaturação de CD28 Δ por diluição e concentração por cromatografia de afinidade

Um novo protocolo foi sugerido pelo pesquisador Nilson Ivo Tonin Zanchin (pesquisador do Instituto Carlos Chagas – ICC), onde 4ml da proteína previamente purificada no item 3.1.3 foi diluída gota a gota em 320ml de tampão de renaturação (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% glicerol, 0,2mM DTT pH 9.3), deixando a concentração final de ureia por volta de 100mM. A mistura foi mantida a 4°C e depois depositada em 500ul de resina de níquel Ni-NTA através de um sistema de bomba peristáltica com um fluxo baixo (0,5 a 1ml/min). A proteína foi eluída com 5ml de PBS em 300mM de imidazol.

3.2.3 Diálise de CD28wt e CD28 Δ

As amostras purificadas foram submetidas à uma diálise sucessiva e decrescente do seu agente caotrópico (8M ureia) utilizando a metodologia de KAKOULIDOU et al (2007), com a modificação da última etapa onde as amostras permaneceram no tampão Mix – sem a glicina-éster. Para chegarmos à conclusão de que as proteínas são estáveis somente com o tampão Mix (20 mM Tris / HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 50 mM glicina–NaOH, pH 10.8, 1 mM glutathiona reduzida, 0.1 mM glutathiona oxidada, 0.4 M arginina–HCl), testes foram realizados modificando a última etapa deste protocolo. As amostras foram testadas em tampão fosfato (PBS do inglês *Phosphate Buffer Saline*) e tampão Mix com e sem as glutathionas. Depois da diálise as amostras foram centrifugadas 13000 rpm por 2 min para a separação do que havia precipitado e o que ainda estava solúvel. As amostras foram submetidas a uma separação eletroforética em gel redutor e não-redutor 15% 1mm.

3.3 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas dialisadas foram diluídas em meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugadas 13400rpm por 5min. Os sobrenadantes foram submetidos a uma corrida eletroforética SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%. Após a corrida, foi feito um Western Blot. O anticorpo primário contra as duas recombinantes, previamente desenvolvido por FIDALGO (2012) foi utilizado na diluição de 1:2000 (ug/ul) enquanto o anticorpo secundário (anti-mouse HRP), 1:3000.

3.4 ANÁLISE DO PERFIL DE B7.1 e B7.2 EM CÉLULAS HD11

Para verificar o perfil de expressão dos receptores que interagem com CD28 nas células *macrophage-like cell line* (HD11), foi feita uma marcação com anticorpos primários contra CD80 e CD86.

As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 120ug de sulfato de gentamicina em estufa 5% de CO² a 37°C. Cada 5x10⁵ células foram colocadas em microtubos

de 600ul. Em seguida, um bloqueio com 1% de albumina de soro bovino (BSA do inglês *Bovine Serum Albumin*) por 30 min a 4°C foi realizado. As marcações foram feitas com diluições seriadas do anticorpo mouse anti-chicken CD80 (GeneTex) e mouse anti-chicken CD86 (AbD Serotec). Como controle foi utilizada uma imunoglobulina IgG irrelevante de camundongo (Invitrogen). Lavagens foram feitas com PBS e um novo bloqueio com 1%BSA foi feito antes da marcação com o segundo anticorpo ligado a um fluoróforo. A marcação com 1:500 do anticorpo secundário (anti-mouse FITC – Sigma) diluído em 0,5% de BSA por 40 min na ausência de luz foi feita. As amostras foram fixadas com 1% de PFA por 15min. Para retirar o PFA, as amostras foram centrifugadas 2min 5000rpm e o pellet foi diluído em uma solução de bloqueio PBS, 2%BSA, 0,05% azida. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.5 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS HD11

Com o intuito de observar a diferença da interação entre as duas proteínas, uma análise de citometria foi feita com as células HD11 que foram cultivadas como descrito no item 3.4. 5×10^5 células foram colocadas em microtubos de 600ul e fixadas com 1% de PFA por 10min. Os bloqueios com 0,5% de glicina por 10min e 1% de BSA por 20 min, foram feitos em seguida. Posteriormente, as proteínas dialisadas foram diluídas em DMEM 15% e incubadas overnight a 4°C com as células. Foi realizada uma marcação com 1:2000 (ug/ul) do anticorpo primário (anti-CD28; FIDALGO, 2012) diluído em 0,5% de BSA por 1h a 4°C, e depois uma outra marcação com 1:500 do anticorpo secundário (anti- mouse FITC – Sigma) diluído em 0,5% de BSA por 40 min na ausência de luz. As amostras foram diluídas em 500ul de PBS e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Entre cada uma das etapas, centrifugações de 5000 rpm por 2min foram feitas para pelletizar as células. Lavagens com PBS depois da fixação, incubação overnight e anticorpos foram realizadas. O volume trabalho foi de 200ul.

3.6 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DE CD28WT E CD28 Δ

As reações de sequenciamento foram feitas incubando 2 μ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 3 μ L de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciador forward e reverso e 500 ng do plasmídeo em um volume final de 20 μ L. A reação foi realizada a 96 °C por 2 minutos, 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos, num total de 35 ciclos. As sequências obtidas foram analisadas por alinhamento com a sequência referência usando-se o programa ClustalW. Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 2 μ L de solução de precipitação (acetato de sódio 1,5 M, EDTA 0,25 M) e 30 μ L de etanol 100% (Merck), com incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação por 20 minutos a 18.000xg e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recebeu 500 μ L de etanol 70% (Merck) gelado para lavagem e remoção de resíduos de sais. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados e o precipitado seco por uma hora. As reações foram mantidas em -20 °C até serem aplicadas no sequenciador, cuja aplicação requer adição de 10 μ L de formamida (HI-DI) logo antes da corrida.

3.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO CD28-CD80

A interação entre CD80 e CD28 recombinante foi observada no ensaio de Elisa, onde 600ng de proteína recombinante CD28 foi imobilizada na placa (Nunc MaxiSorp) por 16h a 4°C. À parte, 1000ug de extrato celular (lise com tampão PBS 1% triton x-100) foi incubado nas células HD11 nas mesmas condições com o anticorpo mouse anti-chicken CD80 (GeneTex) na diluição de 1:1000. A placa foi lavada 3x com tampão Mix, e bloqueada com 1%BSA por 1h 37°C. Depois a incubação do complexo CD80-anticorpo foi adicionada e a incubação por 2h a 37°C foi feita. A placa foi lavada com PBS e bloqueada novamente sob as mesmas condições. A incubação do anticorpo mouse anti-HRP (Sigma) 1:5000 foi feita por 2h a 37°C. A revelação foi feita com TMB e a reação foi parada com 10mM H₂SO₄.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CD28WT e CD28 Δ

4.1.2 Expressão recombinante em pequena escala das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ

Para analisar a expressão da porção extracelular de CD28wt e CD28 Δ foram feitas culturas líquidas bacterianas em pequena escala (tipicamente 10 mL) de células transformadas com os vetores de interesse. A separação eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de coloração com a azul de coomassie pode ser observada na fig. 6.

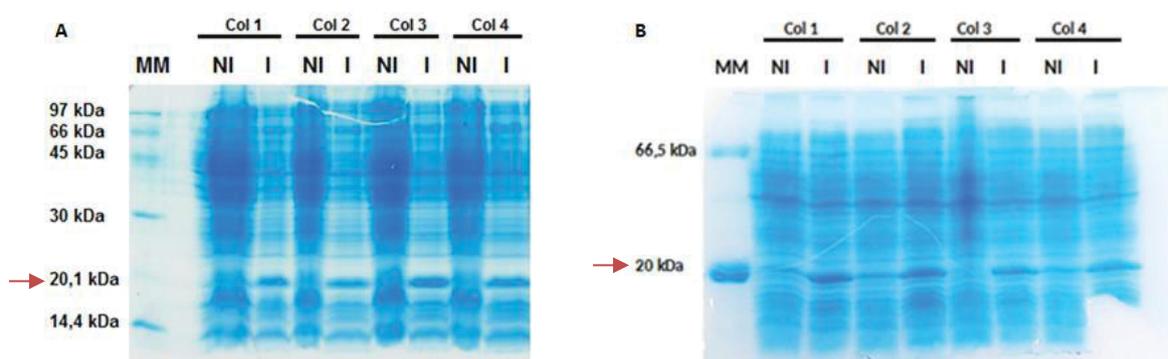


FIGURA 6. EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DA PORÇÃO EXTRACELULAR DE CD28WT CD28 Δ . Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% de quatro colônias bacterianas distintas expressando a porção extracelular de CD28 Δ (A-esquerda) e CD28wt (B-direita). I – Colônias induzidas; NI- Colônias não-induzidas. As proteínas resolvidas no gel foram evidenciadas através de coloração por azul de coomassie. FONTE: O autor (2018).

Tanto para CD28wt (Fig. 6B) como CD28 Δ (Fig. 6A) é possível notar que as expressões foram eficientes, pois as bandas esperadas para cada uma das proteínas apresentaram perfil aparente de migração eletroforética compatível com a massa molecular prevista de 20kDa. Além disso pode ser observado que há pouco ou nenhum vazamento de expressão uma vez que as bandas esperadas são expressas apenas com a adição de IPTG às culturas (comparar culturas não induzidas (NI), *i.e.* sem adição de IPTG, com culturas incubadas com IPTG (I)). As colônias que apresentaram qualitativamente melhor eficiência

de expressão foram escolhidas para a obtenção de proteína recombinante em larga escala.

4.1.3 Expressão recombinante em larga escala e purificação das porções extracelulares de CD28wt e CD28 Δ

Tanto CD28wt quanto CD28 Δ mostraram a característica de formar corpos de inclusão, encontrando-se nos precipitados quando as bactérias foram rompidas por força de cisalhamento, através de prensa de French, em tampão de lise nativo não contendo detergentes ou agentes caotrópicos (FIDALGO, 2012 e INGBERMAN, 2015). Para permitir a solubilização e purificação das mesmas, optou-se pela utilização de agente desnaturante (8M de ureia).

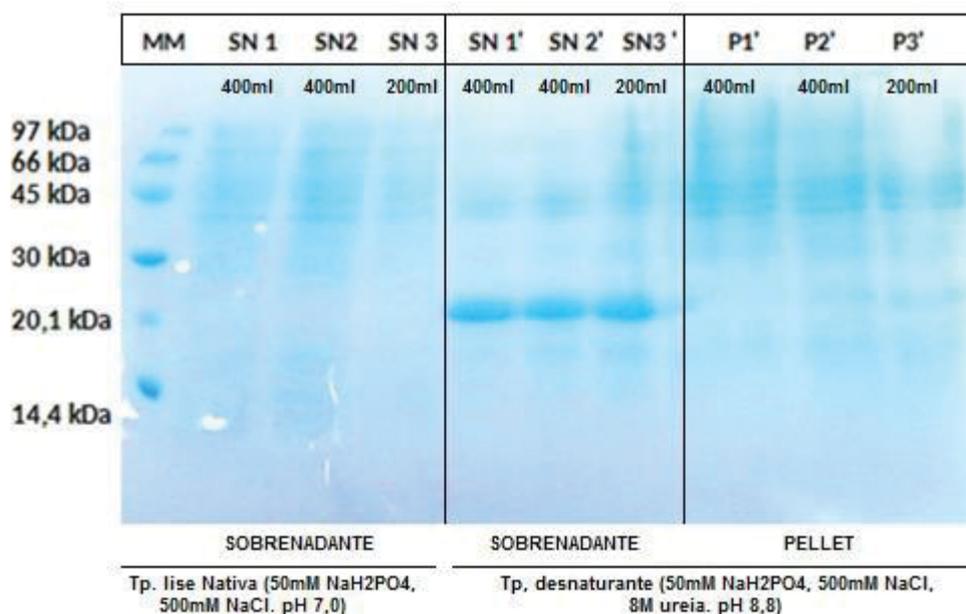


FIGURA 7. SOLUBILIZAÇÃO DE CD28 COM TAMPÃO DESNATURANTE CONTENDO 8M DE UREIA. Perfil eletroforético em gel de poli-acrilamida 15% da proteína CD28 usando tampão de lise desnaturante com 8M ureia. SN1-SN3 – Sobrenadantes do tampão da lise nativa; SN1'-SN3' – Sobrenadantes provenientes do tampão desnaturante com 8M de ureia; P1'-P3' – sedimentos restantes da solubilização com tampão desnaturante contendo ureia. MM: marcador de massa molecular; SN: sobrenadante; P: precipitado. FONTE: O autor (2018).

Na figura 7 é possível observar que a proteína foi solubilizada com a adição do tampão desnaturante, permanecendo no sobrenadante. As duas proteínas apresentaram a mesma característica de formação de corpos de inclusão e solubilização com ureia.

As purificações também foram bem-sucedidas, como pode ser observado na imagem representativa (Fig.8A) de um dos diversos lotes obtidos de proteína recombinante. As condições de purificação que foram estabelecidas permitiram pouca perda de proteínas nas frações de lavagem (LAV1 e LAV2) e o enriquecimento de proteína purificada nas primeiras frações eluídas da matriz cromatográfica. Na Fig. 8B é apresentado o perfil eletroforético das proteínas purificadas, podendo ser claramente visualizada a pequena variação de massa molecular apresentada entre as duas proteínas.

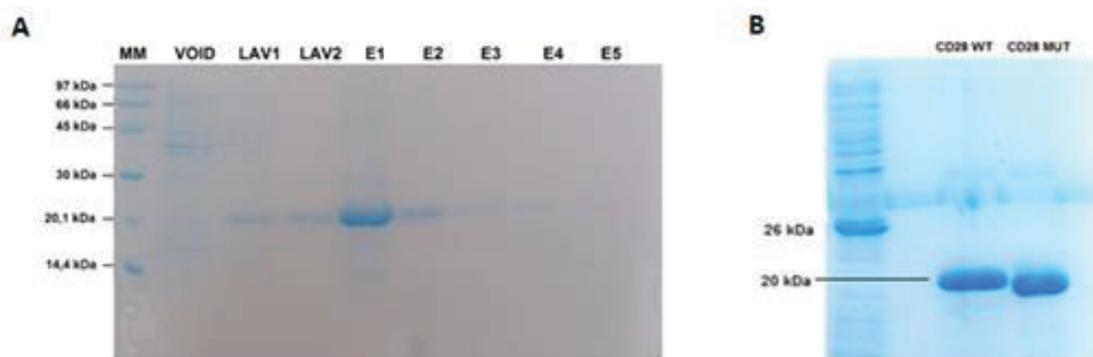


FIGURA 8. PURIFICAÇÃO EM RESINA NI-NTA. A. Imagem ilustrativa de uma das purificações realizadas para CD28wt. MM: marcador de peso molecular; VOID: produto não ligado; LAV: lavagens com 40mM imidazol; E: eluato – 300mM imidazol; a purificação de CD28 Δ foi bastante similar ao da proteína CD28wt. B. Perfil eletroforético das duas proteínas purificadas em gel de poliacrilamida 15% - 15ul/poço. FONTE: O autor (2018).

4.2 ESTRATÉGIAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE CD28

A produção de uma determinada proteína na forma de corpos de inclusão pode ser vantajosa uma vez que grandes quantidades (miligramas por litro de cultura) da proteína de interesse permanece pura, na forma de um precipitado, enquanto todas as outras proteínas contaminantes solúveis podem ser facilmente separadas através do simples processamento físico das amostras por centrifugação. De fato, a lise de bactérias em tampão nativo, a

remoção de contaminantes periféricamente presentes nos corpos de inclusão a partir da lavagem destes em tampões com concentrações crescentes de agente caotrópico (e.g. uréia ou guanidina) e por fim a obtenção de corpos de inclusão puros já tem sido descrita na literatura (VENTURA et al. 2006). Além disso, a expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão pode proteger o produto de degradação proteolítica (FIDALGO, 2012). Entretanto a obtenção de proteína solúvel acaba invariavelmente necessitando o uso de altas concentrações (acima de 2M) de agente caotrópico, inviabilizando o uso direto destas soluções em células vivas.

Outro problema metodológico enfrentado pelo grupo desde o início dos estudos de CD28 tem sido o fato das proteínas recombinantes precipitarem após a remoção do agente caotrópico, por diálise, depois da primeira fase da purificação. Como mencionado, tais agentes necessitam ser posteriormente removidos uma vez que são incompatíveis com grande parte das abordagens bioquímicas ou funcionais deste projeto (e.g. interação proteína-proteína e cultivo celular). Aparentemente intermediários estruturais instáveis acabavam se formando durante a retirada do agente desnaturante e proporcionando a associação destas formas entre si e a formação de agregados proteicos (FINK, 1998; RUDOLPH e LILIE, 1996).

Durante boa parte do desenvolvimento deste projeto, o foco foi em encontrar na literatura abordagens experimentais já empregadas para outras proteínas recombinantes e que trouxessem alternativas (e.g. tampões com agentes estabilizantes) para a minimização da formação de precipitado após a remoção do agente caotrópico. Na verdade, grande parte dos resultados descritos a seguir foram obtidos pela combinação de metodologias já utilizadas com abordagens empíricas testadas especificamente para as proteínas recombinantes de interesse.

4.2.1 Teste de expressão em pequena escala de CD28 Δ – parâmetros: temperatura e IPTG

Temperaturas mais baixas frequentemente levam à uma redução da formação dos corpos de inclusão devido a menor síntese proteica, mudanças nos níveis do estresse celular, diminuição da taxa de agregação e de

interações hidrofóbicas entre os polipeptídios (FINK, 1998) que são favorecidas em temperaturas mais altas.

De acordo com ROSANO e CECCARELLI (2014) quando a formação dos corpos de inclusão é um problema, a síntese da proteína recombinante deve ser feita na faixa de 15-25°C, apesar de SAN-MIGUEL et al (2013) demonstrarem uma expressão em 4°C por 72h. Entretanto, quando se trabalha com uma temperatura mais baixas, o crescimento é mais devagar, levando muitas vezes à uma síntese reduzida que pode resultar em rendimentos de proteína mais baixos.

Apesar de vários autores afirmarem que um crescimento e uma taxa de expressão mais lentos favorecem a solubilização da proteína recombinante, a proteína CD28 Δ não apresentou mudanças na solubilização quando testada em diferentes concentrações de IPTG. Entretanto é possível afirmar que a sua expressão é bastante dependente da temperatura, já que em 20°C ela não apresentou nenhuma expressão aparente, conforme pode ser observado na figura 9.

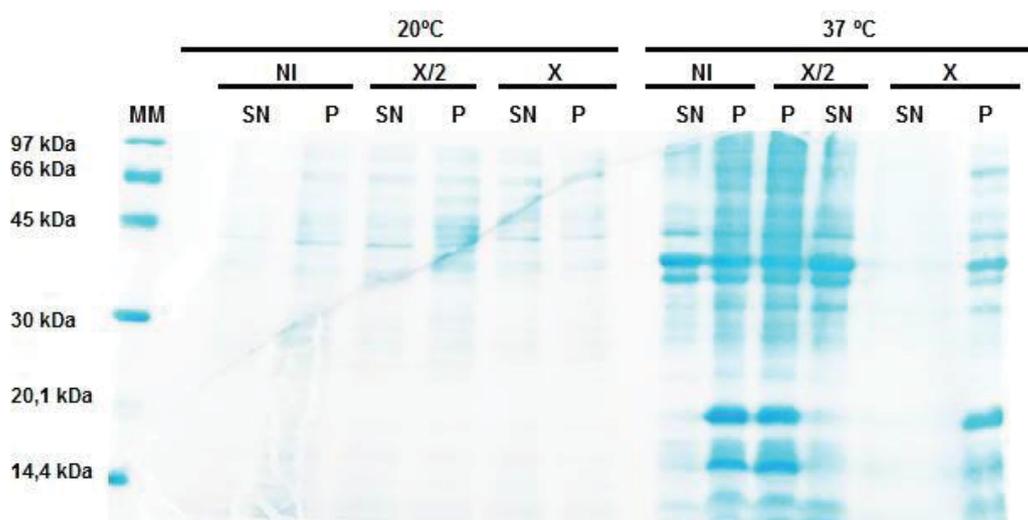


FIGURA 9. EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE CD28 Δ COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA E IPTG. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% da expressão de CD28 Δ submetida a diferentes concentrações de IPTG e temperatura sob condições de tampão nativo. SN – Sobrenadante; P – Pellet; NI – Colônias não-induzidas; X/2 – 0,1mM de IPTG; X – 0,2mM IPTG. FONTE: O autor (2018).

4.2.2 Teste de redobramento (refolding) de CD28 Δ na matriz Ni-NTA-Agarose

Em muitos casos, a produção de proteínas recombinantes em hospedeiros procariontes, resulta em um processo incompleto de dobramento que geralmente leva a acumulação dos agregados proteicos, no citoplasma e/ou no espaço periplasmático das células (GROOT e VENTURA, 2006).

As proteínas recombinantes frequentemente requerem a assistência de moduladores para o dobramento das mesmas, tais como chaperonas, durante a expressão em *E. coli*. Num sistema de super expressão, a taxa de agregação de proteínas é geralmente muito maior do que o dobramento e as chaperonas são rapidamente utilizadas (YAMAGUCHI e MIYAZAKI, 2014).

4.2.2.1 Lavagem dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão contêm proteínas relativamente puras e intactas, e muitos trabalhos têm relatado a recuperação destas formas agregadas como proteínas biologicamente ativas.

De acordo com YAMAGUCHI e MIYAZAKI (2014) em um procedimento típico, as formas agregadas são desnaturadas e dissolvidas com altas concentrações de um agente desnaturante, como ureia, hidrócloro de guanidina (GdnHCl) ou detergentes iônicos como N-lauroylsarcosina. Estes reagentes químicos são usados para diminuir as interações não covalentes entre as proteínas. Além disso, os agentes redutores como dithiothreitol ou 2-mercaptoethanol são adicionados para reduzir as pontes dissulfeto indesejadas inter- e/ou intra-moleculares.

O procedimento para remover o agente desnaturante é considerado o passo chave na eficiente recuperação das mesmas proteínas e atividade biológica das mesmas. Com base nisso, abordagens de redobramento foram testadas com o objetivo de promover o dobramento correto das proteínas desnaturadas durante o procedimento de remoção do agente desnaturante. Para determinar se as proteínas recombinantes poderiam ser solubilizadas com concentrações mais baixas de desnaturante, os corpos de inclusão bacterianos obtidos por centrifugação foram lavados com tampão contendo quantidades crescentes de uréia (Fig. 10 e 11).

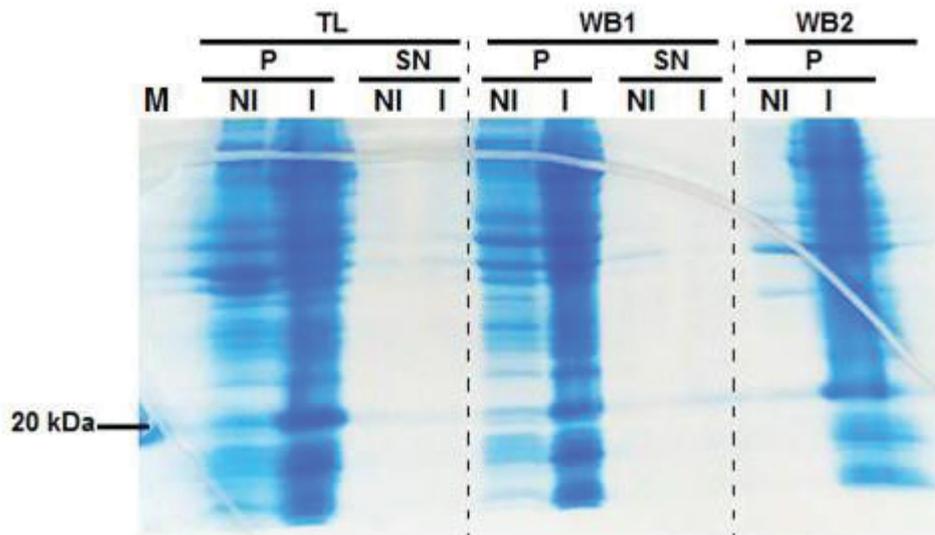


FIGURA 10. LAVAGENS DOS CORPOS DE INCLUSÃO COM QUANTIDADES CRESCENTES DE UREIA. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% das lavagens com tampão desnaturante com diferentes quantidades de ureia. NI – Colônias não-induzidas; I – Colônias induzidas; SN – Sobrenadante; P – Pellet; TL – Tampão de lise nativa; WB1 – Tampão desnaturante 2M ureia; WB2 – Tampão desnaturante 4M ureia. M – Marcador proteína purificada CD28 Δ . FONTE: O autor (2018).

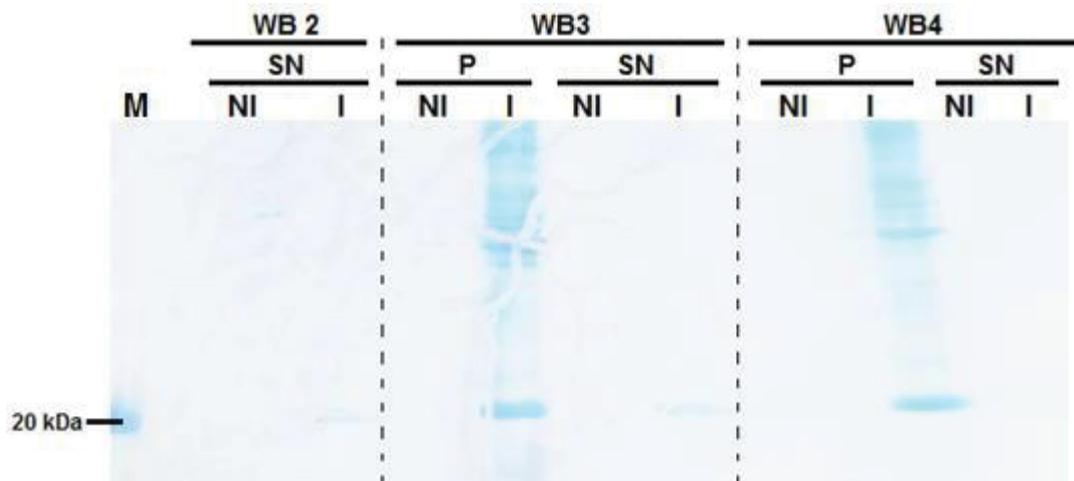


FIGURA 11. LAVAGENS DOS CORPOS DE INCLUSÃO COM QUANTIDADES CRESCENTES DE UREIA. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% das lavagens com tampão desnaturante com diferentes quantidades de ureia. NI – Colônias não-induzidas; I – Colônias induzidas; SN – Sobrenadante; P – Pellet; WB2 – Tampão desnaturante 4M ureia; WB3 – Tampão desnaturante 6M ureia; WB4 – Tampão desnaturante 8M ureia. M – Marcador proteína purificada CD28 Δ . FONTE: O autor (2018).

Uma pequena parte da proteína foi solubilizada com 4M e 6M de ureia (Fig. 11, painel da esquerda e do meio). Como a proteína não foi detectada no sobrenadante na lavagem do sedimento com 8M, acredita-se que a mesma pode ter sido perdida no processo de solubilização (Fig. 11, painel direita).

4.2.2.2 Refolding de CD28 Δ na matriz Ni-NTA-Agarose

Diante do resultado obtido anteriormente, o sobrenadante referente a lavagem com 4M de ureia, foi incubado com a matriz Ni-NTA-Agarose. Foram feitas lavagens da resina com tampão desnaturante contendo quantidades decrescentes.

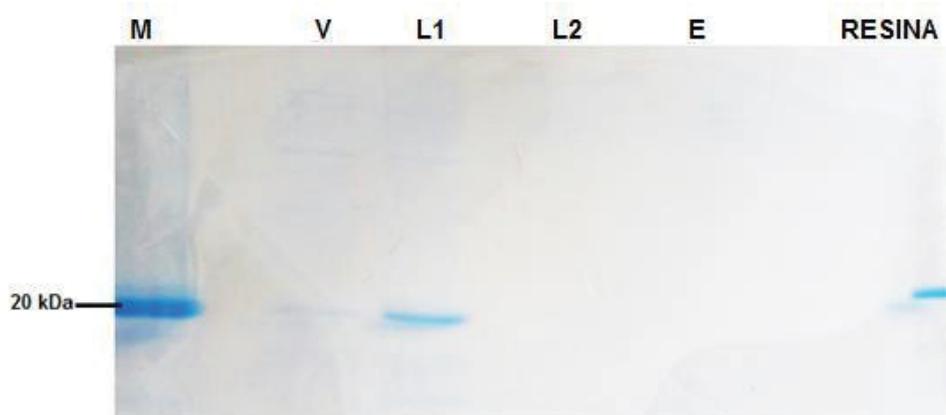


FIGURA 12. REFOLDING DO SOBRENADANTE COM 4M DE UREIA. Perfil eletroforético em gel de poli-acrilamida 15% das lavagens com tampão desnaturante com quantidades decrescentes de ureia. V – Produto não ligado na resina; L1 – Lavagem com tampão desnaturante contendo 4M de ureia e 10mM de imidazol; L2 – Lavagem com tampão desnaturante contendo 2M de ureia e 20mM de imidazol; E – eluição com tampão desnaturante com 500mM de imidazol. M – Marcador proteína purificada CD28 Δ . FONTE: O autor (2018).

Acreditava-se que a ligação da proteína com a resina poderia ajudar o dobramento dela quando as concentrações de ureia diminuíssem e a eluição da mesma seria forçada pela grande quantidade de imidazol adicionado no tampão. Apesar deste possuir uma maior afinidade ao metal, provavelmente com a retirada da ureia a proteína se dobrou de tal forma que escondeu o metal, não permitindo a interação com o imidazol. Sendo assim, a proteína ficou presa na matriz cromatográfica.

4.2.2.3 Renaturação de CD28 Δ por diluição e concentração por cromatografia de afinidade

A metodologia deste protocolo foi feita a partir do uso de um sistema de bombeamento, onde 4ml da proteína purificada foram diluídos gota a gota num volume grande de tampão de renaturação, o qual permitiria o dobramento da mesma. O tampão contendo a proteína diluída foi ligado numa bomba peristáltica, que injetou lentamente a mistura na matriz cromatográfica.

Acredita-se que a renaturação, que foi realizada com uma diluição lenta, foi eficiente porque não foi observado nenhum tipo de precipitado sendo formado. Mas como era necessário concentrar a proteína, quando esta foi submetida à passagem entre a resina de níquel ela precipitou no topo da coluna, pois foi observada uma camada branca granular. Por isso não foi possível observar nenhuma banda na FIGURA 13 correspondente à proteína desejada, pois esta não foi eluída. Mais tarde, uma alíquota da resina foi analisada e foi possível comprovar que a proteína estava na resina (dados não mostrados).

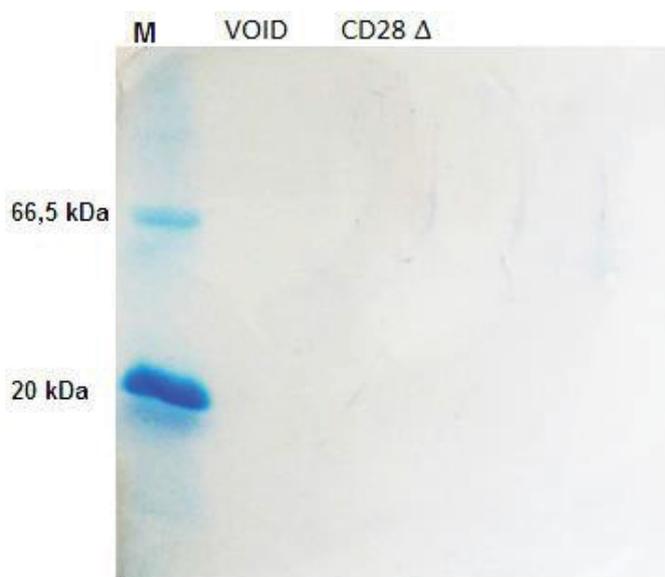


FIGURA 13. RENATURAÇÃO DA PROTEÍNA CD28 Δ . Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% da tentativa de renaturação de CD28 Δ . VOID: produto não ligado; CD28 Δ : eluição da proteína com 300mM de imidazol. FONTE: O autor (2018).

4.2.3 Diálise de CD28wt e CD28 Δ

A arginina é muito usada no dobramento de proteínas obtidas a partir de corpos de inclusão e parece funcionar para muitas proteínas com diferentes propriedades químicas e físicas. De acordo com TSUMOTO et al (2004), pouco se sabe sobre o mecanismo de ação da arginina, mas acredita-se que ela estabiliza as proteínas por supressão da agregação, não sendo tão forte a ponto de desnaturá-las.

O protocolo de KAKOULIDOU et al (2007) foi o que melhor apresentou resultados na solubilização das proteínas recombinantes. Com 400mM de arginina as duas proteínas ficaram solúveis e possivelmente se encontravam próxima à conformação correta. Tal afirmação poderia ser confirmada com estudos espectroscópicos (e.g. dicroísmo circular ou difração de raios-X) os quais poderiam ser empregados para estudos estruturais mais detalhados.

Porém, na última etapa onde houve a troca para o PBS, uma grande quantidade das duas proteínas precipitadas foi observada visivelmente. Com isso, novas diálises foram realizadas e uma amostra de cada foi coletada para a análise em SDS-PAGE como pode ser observado na figura 14.

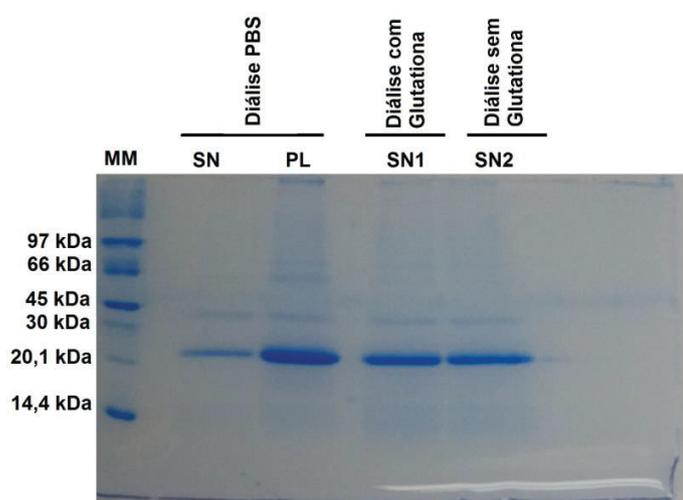


FIGURA 14. GEL REDUTOR REPRESENTATIVO DAS AMOSTRAS RESULTANTES DA DIÁLISE. Perfil eletroforético das amostras após às diálises decrescentes utilizando como base o protocolo de KAKOULIDOU et al (2007). SN-sobrenadante; PL-pellet. FONTE O autor (2018). Os resultados mostrados são referentes à proteína CD28wt. As diálises da proteína CD28 Δ apresentaram resultados similares (dados não mostrados).

Na figura 14 a análise de precipitados (PL) das amostras contendo arginina (com e sem glutathione) não foi incluída pois nenhum precipitado foi detectado após centrifugação do dialisado, sugerindo que a adição de arginina ao tampão foi eficiente na manutenção da proteína recombinante na forma solúvel.

A mesma avaliação foi feita em gel não redutor, para observar se esta proteína poderia ter formado dímeros ou pontes dissulfeto já que possui cisteínas na sua composição. Na figura 15 é possível observar que a maioria da proteína se encontra na conformação monomérica, a qual é a forma desejada.

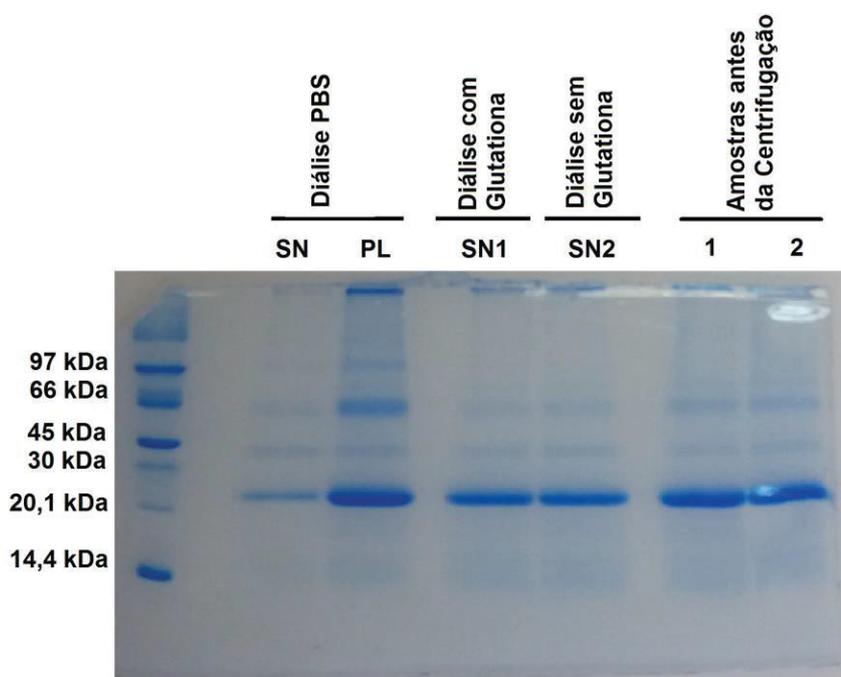


FIGURA 15. CD28 É EXPRESSA E PURIFICADA PRINCIPALMENTE COMO UM MONÔMERO. Amostras submetidas a uma separação eletroforética em gel não-redutor 15%. SN-sobrenadante; PL-pellet. Linhas 1 e 2: amostras da diálise com glutathione antes da centrifugação. FONTE: o autor (2018).

4.3 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para avaliar a estabilidade da proteína após à dialise, foi realizada uma curva de diluição da proteína dialisada com o meio em que as células seriam incubadas. Foi observado que as proteínas permaneceram solúveis quando comparado com a curva de proteína recombinante diluída em tampão de amostra redutor.

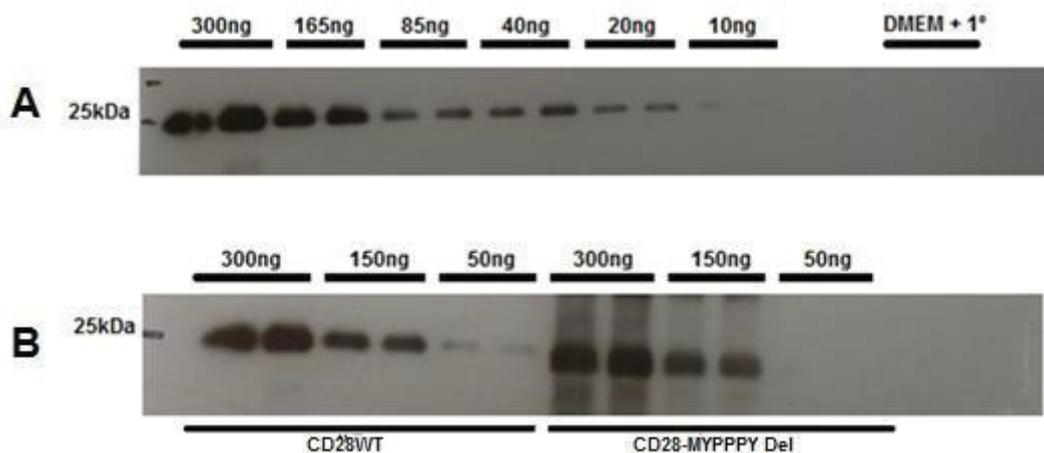


FIGURA 16. WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DILUÍDAS EM MEIO DE CULTIVO. A: Curva padrão obtida a partir da diluição seriada de CD28 purificado (em tampão desnaturante) em DMEM 5%SFB acrescido de tampão de amostra (TA) 2,5x. B: Proteínas recombinantes dialisadas sem glutaniona que foram diluídas em DMEM 15% SFB e centrifugadas 13400rpm 2min. A massa desejada para ser depositada no gel foi diluída em TA 2,5x. DMEM+1° (controle negativo), meio acrescido de anticorpo primário. FONTE: o autor (2018).

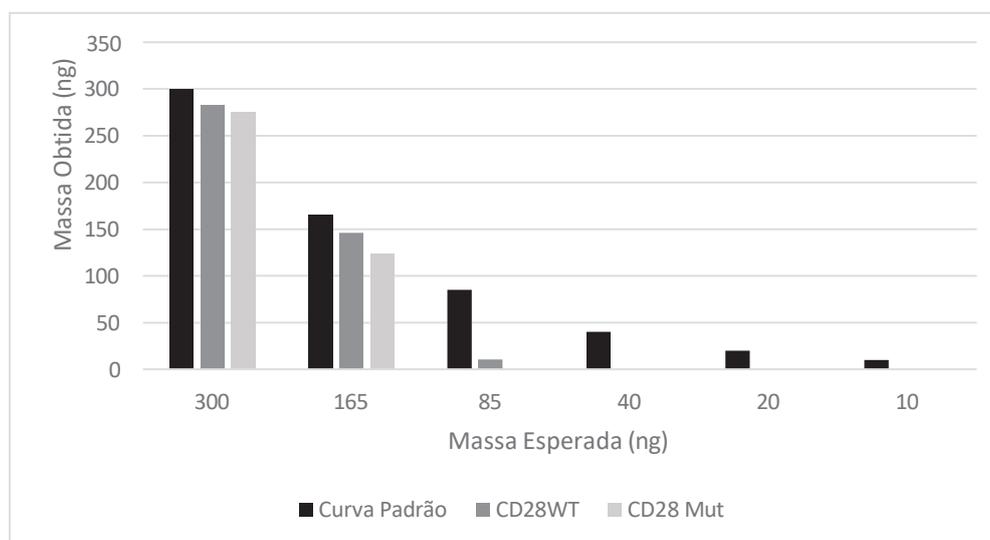


FIGURA 16B. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO WESTERN BLOT DA FIGURA 16. Densitometria do Western Blot com o uso do software IMAGEJ. FONTE: o autor (2018).

Acredita-se que as proteínas permaneceram solúveis pela estabilidade dada pelo conjunto de proteínas e outros componentes do soro presentes no meio DMEM completo.

4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE B7.1 e B7.2 EM CÉLULAS HD11

Linhagens imortalizadas são frequentemente usadas no lugar de células de cultivo primário na pesquisa. Elas oferecem muitas vantagens como relação custo-benefício, manipulação fácil, fornecimento ilimitado de material, e contorno com as preocupações éticas associadas ao uso de tecidos animais e humanos. Linhagens celulares também fornecem uma população pura de células, que são valiosas, uma vez que proporcionam uma amostra consistente e resultados reprodutíveis (KAUR e DUFOUR, 2012).

A linhagem HD11 têm sido usada por numerosos investigadores para estudos da biologia de macrófagos de aves (SCHAT et al, 2014). Como os macrófagos também são considerados células apresentadoras de antígenos profissionais e participam amplamente de praticamente todos os eventos do sistema imune, foi escolhida esta linhagem para a análise da interação com CD28 recombinante.

O primeiro passo foi investigar a expressão dos receptores neste modelo experimental por citometria de fluxo. Na figura 17A é possível observar que a linhagem HD11 expressa os receptores CD80/CD86 (B7.1/B7.2) que interagem com CD28.

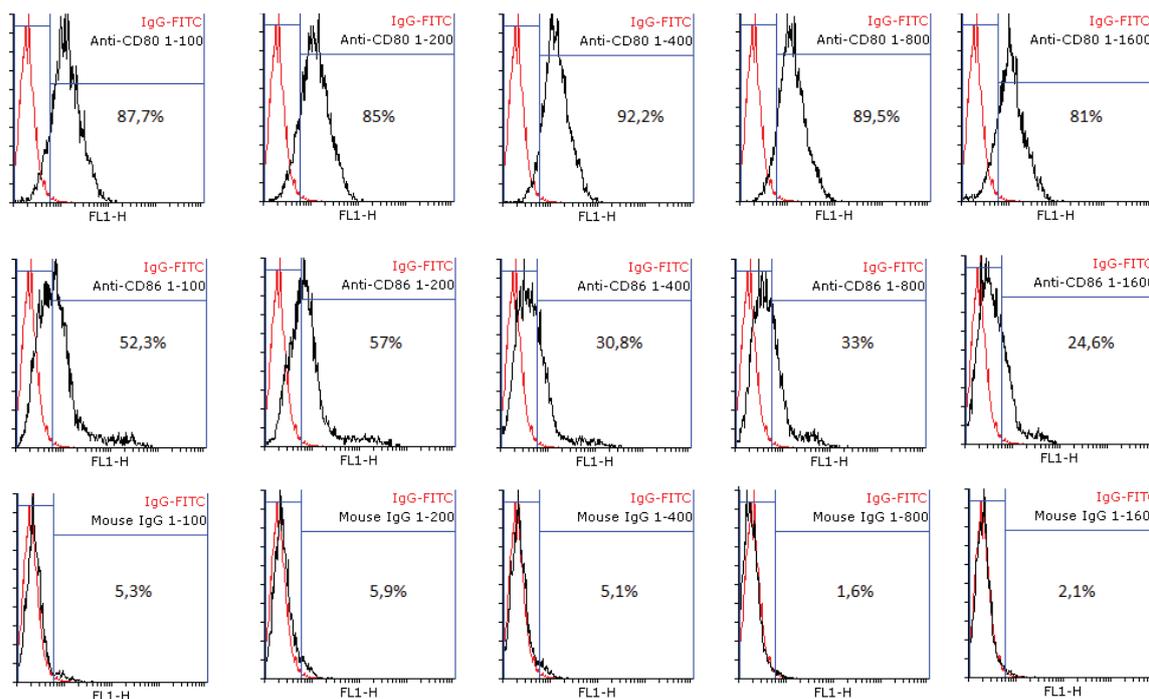


FIGURA 17A. EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD80 E CD86 NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS HD11. Diluição dos anticorpos mouse anti-chicken CD80 (TexasGen) e mouse anti-chicken CD86 (AbD Serotec). Como controle foi utilizada uma imunoglobulina IgG irrelevante de camundongo (Invitrogen) como pode ser visualizada na última linha. O anticorpo ligado ao fluoróforo (anti-mouse FITC – Sigma - diluição 1:500) o qual reconhece os anticorpos primários foi utilizado como controle negativo de fluorescência. Eixos x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software 2.5.1 FONTE: o autor (2018).

Interessantemente o perfil de expressão dos receptores é similar ao perfil de uma outra linhagem de macrófagos de aves (MQ-NCSU) (BARJESTE et al, 2014) e contrário ao que é descrito na literatura (figura 17B). SUBAUSTE, MALEFYT e FUH (1998) disseram “enquanto as células dendríticas expressam ambos os ligantes coestimuladores, monócitos/macrófagos expressam somente CD86.”

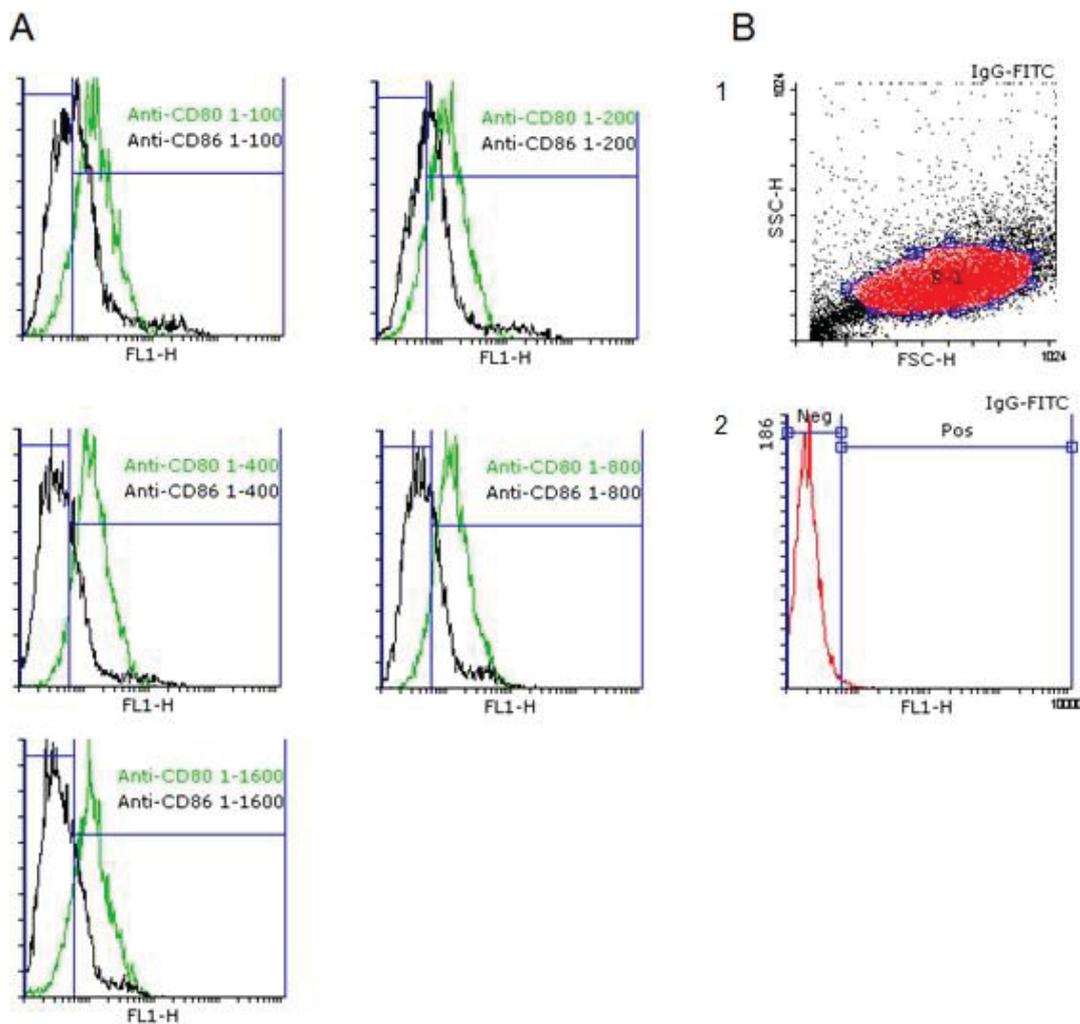


FIGURA 17B. COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD80 E CD86. A. Sobreposição dos picos de fluorescência da figura 17A correspondentes às diluições de CD80 e CD86. B. População selecionada para as análises (gráfico 1) e determinação dos quadrantes positivo e negativo (gráfico 2) utilizando como controle a fluorescência da célula marcada apenas com o anticorpo anti-mouse-FITC. Eixos x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software 2.5.1 FONTE: o autor (2018).

Por isso, KAUR e DUFOUR (2012) afirmam que apesar das linhagens celulares serem uma ferramenta poderosa, deve-se ter cuidado ao utilizá-las no lugar de células de cultivo primário. As linhagens celulares são geneticamente manipuladas e isto pode alterar o fenótipo delas, funções nativas e respostas aos estímulos.

Como a linhagem HD11 possui um perfil contrário de expressão às células de cultivo primário, o estudo torna-se mais interessante. Uma vez que, é possível comparar as respostas de ambas as células frente ao estímulo com CD28 e determinar se a resposta reversa é dependente do ligante CD28 ou do

receptor que é estimulado. Como foi descrito no item 2.2 o CD80 interage melhor com CTLA-4, que promove uma resposta inibitória tanto para célula T como para a APC, enquanto o CD86 interage melhor com CD28, que é amplamente descrito ser coestimulatório. Mas MIR (2014) observou a resposta reversa em macrófagos não com o estímulo de CD28, mas com anticorpos específicos para CD80 e CD86. Isto sugere que, talvez a ativação da APC não seja dependente do ligante, mas da estimulação que ele exerce sobre os receptores de superfície.

Linhagens de mamíferos, como RAW 264.7, demonstraram ter também o mesmo perfil de expressão (em anexo). Sendo assim, estudos de comparação de resposta celular frente ao CD28 recombinante de aves podem ser feitos, afim de analisar se um sistema heterólogo de ave poderia ser capaz de ativar um sistema de mamíferos.

4.5 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS HD11

Vários ensaios de ligação de rCD28 nas células HD11 foram realizados. O objetivo sempre foi determinar se o sítio MYPPPY é a região crucial para que a interação ocorra. O sítio, como já foi mencionado no item 2.1, é um motivo altamente conservado em todas as espécies, inclusive nas aves. Muitos autores afirmam que esse motivo é a região determinante para que a ligação com os receptores CD80 e CD86 aconteça. TRUNEH et al (1996) por exemplo, demonstraram que mutações pontuais e até a deleção total deste sítio afeta diretamente a ligação com os receptores B7. Portanto, a proteína mutada, CD28 Δ (MYPPPY-deletado), foi desenhada por INGBERMAN (2015) com o intuito de ser o melhor controle para a proteína CD28wt nos ensaios de ligação e ativação das células APCs.

Inicialmente, antes da obtenção das proteínas solúveis, análises da interação na superfície de células HD11 foram realizadas. Nestes ensaios, as células foram incubadas com as proteínas purificadas e diluídas em PBS. Os resultados sempre mostraram que as duas proteínas, CD28wt e CD28 Δ , interagem igualmente e que a quantidade de células marcadas era muito baixa.

TRUNEH et al (1996), mostraram um ensaio de ligação similar com concentrações bastante altas do ligante. A princípio, foi pensado que as concentrações testadas até aquele momento estavam abaixo do limite de detecção do citômetro. Por isso, as concentrações de CD28wt e CD28 Δ foram aumentadas 20 e 50x no ensaio de ligação, como pode ser observado na figura 18.

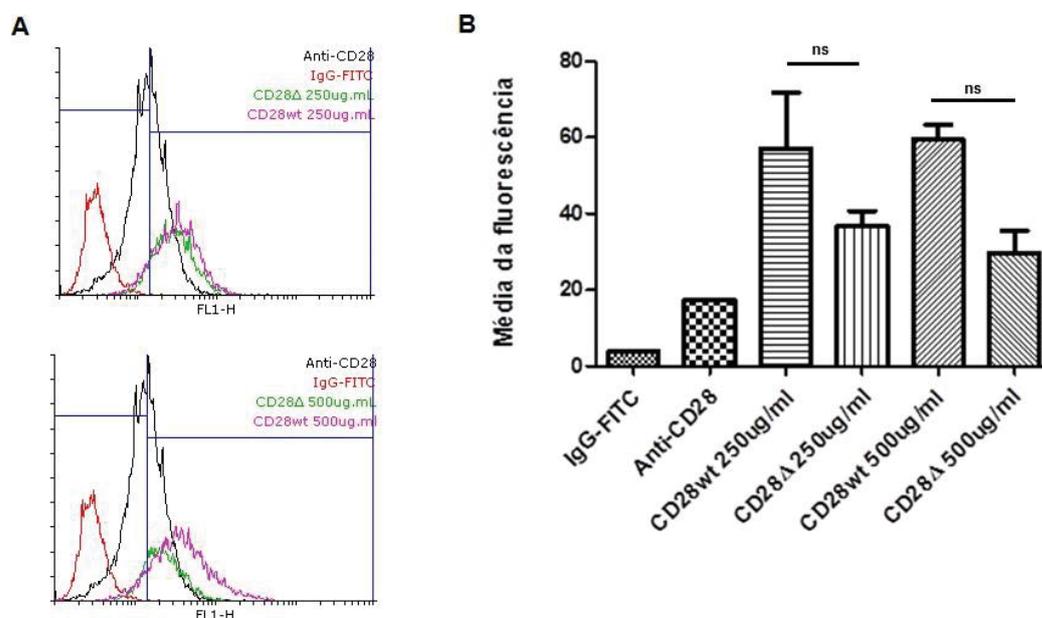


FIGURA 18. ENSAIO DE LIGAÇÃO CD28-HD11. A. Interação de CD28wt e CD28 Δ em concentrações altas na superfície de células HD11; Anti-CD28 monoclonal: 1:200 (ul/ul), IgG-FITC: 1:500. Eixos x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software 2.5.1 B. Análise estatística da interação de CD28wt e CD28 Δ no software GraphPad Prism. Análise por test t, * $p < 0,01$. FONTE: o autor (2018).

Na figura 18, é possível observar que as duas proteínas interagem igualmente pois não há diferença significativa na ligação entre elas. Além disso, a quantidade de células marcadas é baixa. Por isso, foi concluído naquele momento, que durante a diluição das proteínas em PBS, as mesmas poderiam estar precipitando. E o padrão de marcação aparentemente menor de CD28 Δ na superfície das células HD11, poderia ser devido à diferença da taxa de precipitação entre CD28 Δ e CD28wt (observado em ensaio de ELISA por INGBERMAN, 2015). Frente a isso estratégias de solubilização das duas proteínas recombinantes foram testadas como mencionado no item 3.2.

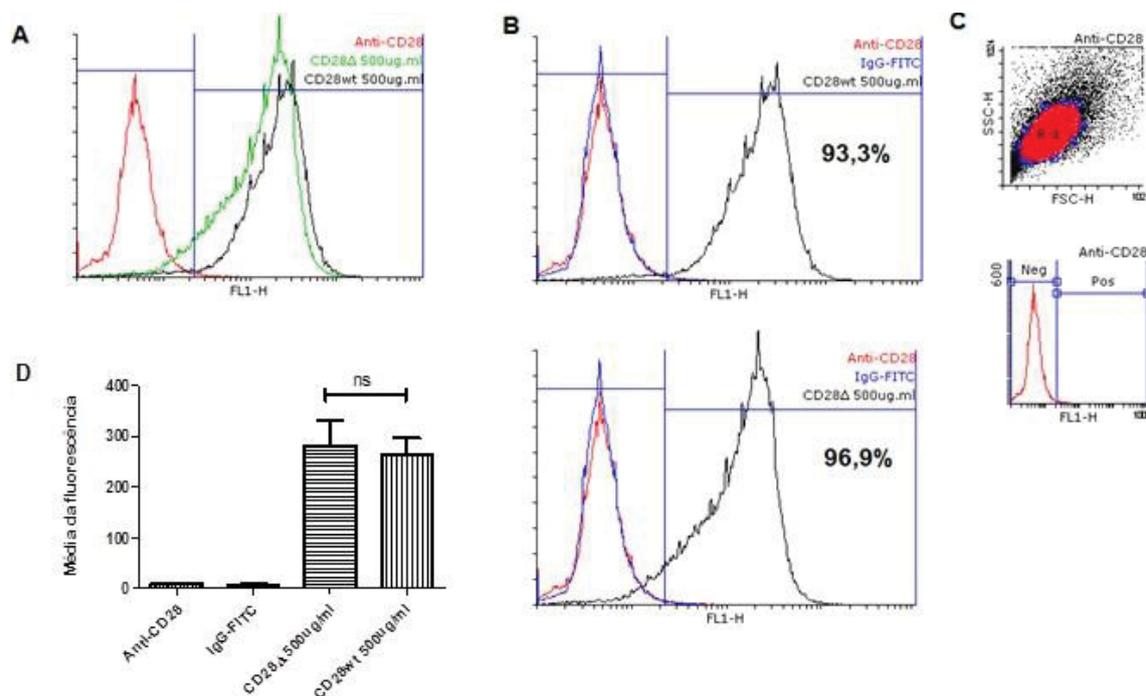


FIGURA 19. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS COM CD28WT E CD28 Δ SOLUBILIZADAS. A. Sobreposição dos picos de fluorescência de chCD28. B. Padrão de ligação de cada proteína separadamente. C. População selecionada para as análises e determinação dos quadrantes positivo e negativo (gráfico da direita) utilizando como controle a fluorescência da célula marcada apenas com o anticorpo anti-CD28 (1:2000 - ug/ul) e IgG-FITC (1:500). D. Análise estatística da interação de CD28wt e CD28 Δ no software GraphPad Prism. Análise por test t, * $p < 0,01$. Eixos x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software. FONTE: o autor (2018).

Quando as proteínas foram solubilizadas em tampão Mix e diluídas em DMEM com SFB, a quantidade de células marcadas aumentou (comparar figuras 18 e 19) no ensaio de citometria. Os resultados sugerem que de fato, as proteínas precipitaram quando foram diluídas anteriormente em PBS.

O objetivo inicial do projeto sempre foi investigar uma possível ativação da APC frente ao estímulo de CD28. Para determinar a concentração que deveria ser usada para ativar as células HD11 num futuro ensaio de qPCR (PCR em tempo real), diluições de CD28wt e CD28 Δ foram feitas com intuito de encontrar uma diferença de interação entre as duas proteínas.

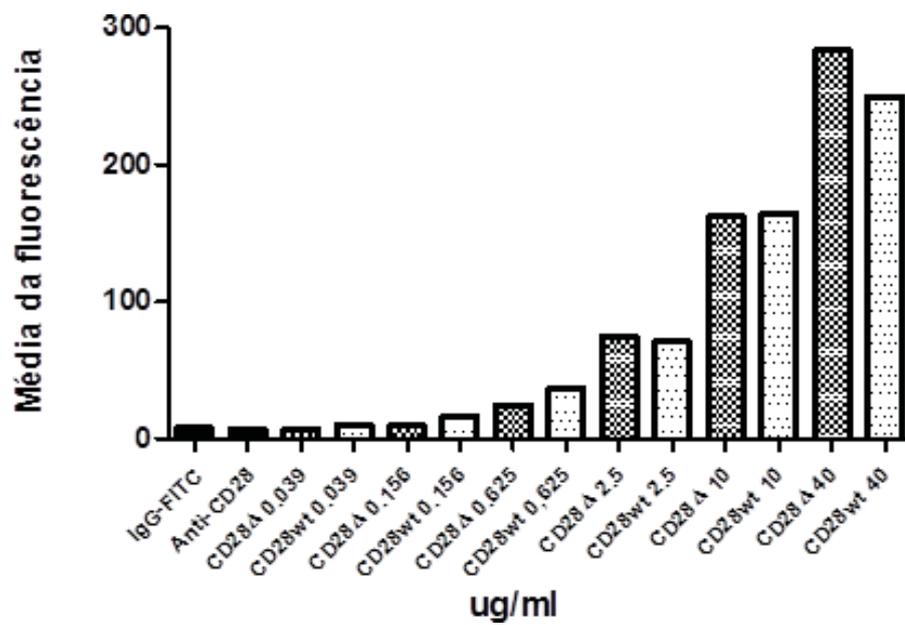


FIGURA 20. MARCAÇÃO DE CÉLULAS HD11 COM CD28WT E CD28 Δ NUMA DILUIÇÃO SERIADA. Proteínas recombinantes em tampão mix diluídas em DMEM 15%SFB. Controles: Anti-CD28 monoclonal (1:2000 ug/ul) e IgG-FITC (1:500). FONTE: o autor (2018).

A figura 20 demonstra que as duas proteínas interagem de forma similar na superfície dos macrófagos.

Um outro ensaio de interação nas células HD11 foi feito, uma proteína não-relacionada, a tiorredoxina (TRX), que possui o tamanho de 17 kDa, foi utilizada como controle negativo de ligação. O resultado pode ser observado na figura 21 e 22.

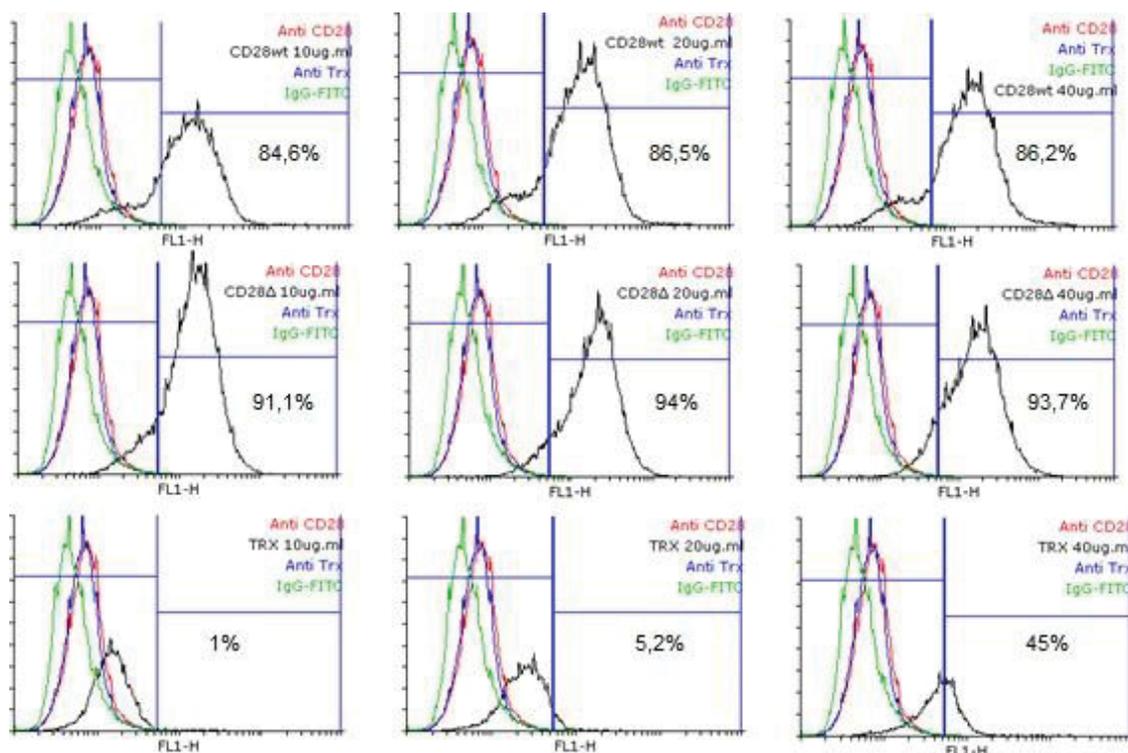


FIGURA 21. PERFIL DE LIGAÇÃO DE CD28WT, CD28 Δ E TRX. Diluição das proteínas dialisadas 10ug/ml, 20ug/ml e 40ug/ml em DMEM 15% SFB da esquerda para direita. Controle negativo de interação: Trx (última linha). Controle da fluorescência: anticorpo anti-CD28 (1:2000 - ug/ul) e IgG-FITC (1:500). Eixos x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software 2.5.1 FONTE: o autor (2018).

A ligação da proteína CD28 Δ na superfície das células HD11 apesar de surpreendente, poderia ser explicada por exemplo pela presença de outros ligantes de CD28, que interagem com esta molécula de forma independente da presença do sítio MYPPPY. De fato, CHEN e FLIES (2013) descrevem a presença de um terceiro ligante para CD28, o B7-H2, e essa interação parece ser independente do sítio MYPPPY.

Ainda, a ligação de CD28 com CD80/86 poderia ocorrer através de sítios de ligação diferentes do sítio MYPPPY já descrito para mamíferos. Talvez a ligação entre CD28 e seus parceiros clássicos CD80/CD86 na célula HD11 seja biologicamente relevante, entretanto como consequência das condições experimentais aqui empregadas, outras interações não investigadas em detalhe (e.g. com B7-H2 ou outros receptores não descritos) podem suplantam ou competir pela disponibilidade das proteínas recombinantes empregadas.

O nosso grupo optou pelo desenvolvimento da proteína mutada (CD28 Δ) porque ela é o controle mais adequado para o ensaio. ORABONA et al (2004) realizaram um estudo similar de interação CD28-APC. Eles utilizaram uma proteína não relacionada (IgG) como controle da proteína quimérica CD28-IgG, assim como nesse ensaio foi usada a Trx. Se compararmos a ligação da Trx e das chCD28, observaremos que ela se liga muito menos na superfície das células, mas essa diminuição é principalmente pela não relação com o sistema e não pela falta ou diminuição da interação com os receptores da célula. Em outras palavras, a proteína Trx naturalmente não tem interação com as proteínas CD80/86, assim como IgG, por isso não estão relacionadas com o sistema e interagem muito menos com as células.

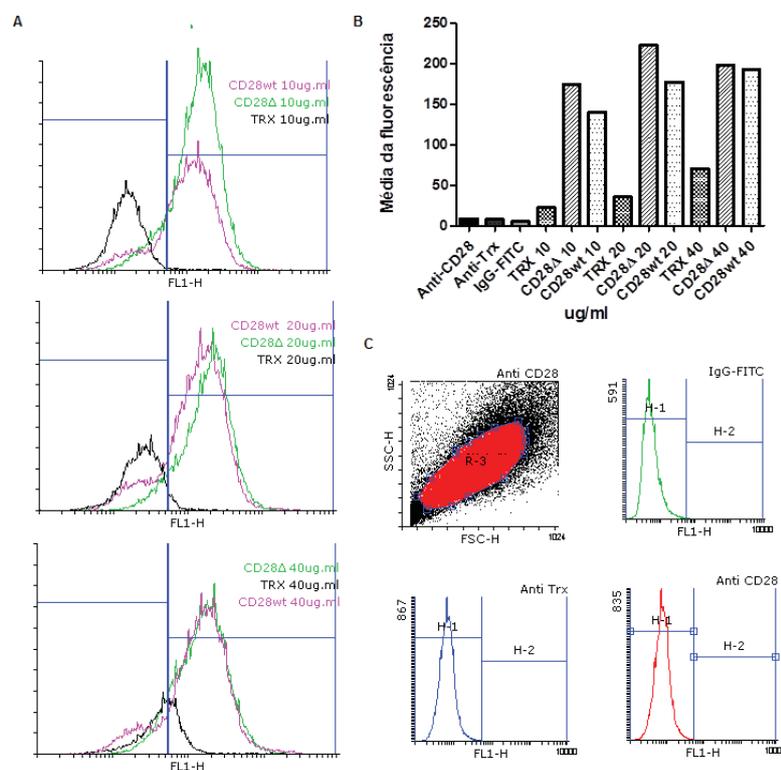


FIGURA 22. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE LIGAÇÃO ENTRE CD28WT, CD28 Δ E TRX. A. Sobreposição dos picos das fluorescências de rCD28 e Trx. B. Gráfico representativo das médias de fluorescência. C. População selecionada para as análises e determinação dos quadrantes positivo (H2) e negativo (H1). Controle: fluorescência da célula marcada apenas com o anticorpo anti-CD28 (1:2000 ug/ul) e IgG-FITC (1:500). Diluição de anti-Trx: 1:500. Eixo

x: fluorescência; y: células marcadas. Programa utilizado: Flowing Software 2.5.1. FONTE: o autor (2018).

Também não pode ser descartada a possibilidade de que a proteína recombinante heterologicamente expressa em bactéria possa ter adquirido propriedades adesivas inesperadas as quais possam apresentar ou não atividade biológica que ainda não foram descritas, mas que merece ser futuramente investigada.

4.6 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DE CD28WT E CD28 Δ

Para confirmar a deleção do sítio MYPPPY e descartar qualquer possível erro foi feito o sequenciamento dos vetores das duas proteínas e como observado na figura 23 o sítio MYPPPY está ausente na construção CD28 Δ .

```

CD28wt      MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASVTENKILVAQRPLLIVANRTATLVCNYTYNGTGKEFR
Esperada    -----VTENKILVAQRPLLIVANRTATLVCNYTYNGTGKEFR
              *****

CD28wt      ASLHKGTDSAVEVCFISWNMTKINSNSNKEFNCRGIHDKDKVIFNLWNMSASQTDIYFCK
Esperada    ASLHKGTDSAVEVCFISWNMTKINSNSNKEFNCRGIHDKDKVIFNLWNMSASQTDIYFCK
              *****

CD28wt      IEA MYPPPY VYNEKSNGTVIHVRETPIQTQEPESATSYWStop
Esperada    IEA MYPPPY VYNEKSNGTVIHVRETPIQTQEPESATSYWV---
              *****

CD28 $\Delta$     MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASVTENKILVAQRPLLIVANRTATLVCNYTYNGTGKEFR
Esperada    -----VTENKILVAQRPLLIVANRTATLVCNYTYNGTGKEFR
              *****

CD28 $\Delta$     ASLHKGTDSAVEVCFISWNMTKINSNSNKEFNCRGIHDKDKVIFNLWNMSASQTDIYFCK
Esperada    ASLHKGTDSAVEVCFISWNMTKINSNSNKEFNCRGIHDKDKVIFNLWNMSASQTDIYFCK
              *****

CD28 $\Delta$     IEA ---- VYNEKSNGTVIHVRETPIQTQEPESATSYWStop
Esperada    IEA MYPPPY VYNEKSNGTVIHVRETPIQTQEPESATSYWV---
              ***          *****

```

FIGURA 23. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DOS VETORES DE CD28WT E CD28 Δ . Alinhamento da sequência referência (esperada) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos. O símbolo (*) representa aminoácidos da sequência analisada que coincidem com aquelas da referência. Em rosa, o sítio MYPPPY presente na proteína CD28wt e ausente na CD28 Δ . FONTE: o autor (2018).

4.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO CD28-CD80

Um ensaio de ligação direta (Fig. 24) entre proteínas purificadas foi realizado com o intuito de dissecar, sob o aspecto molecular, a contribuição de CD80 nas interações evidenciadas com o uso de CD28 recombinante e células HD11 íntegras.

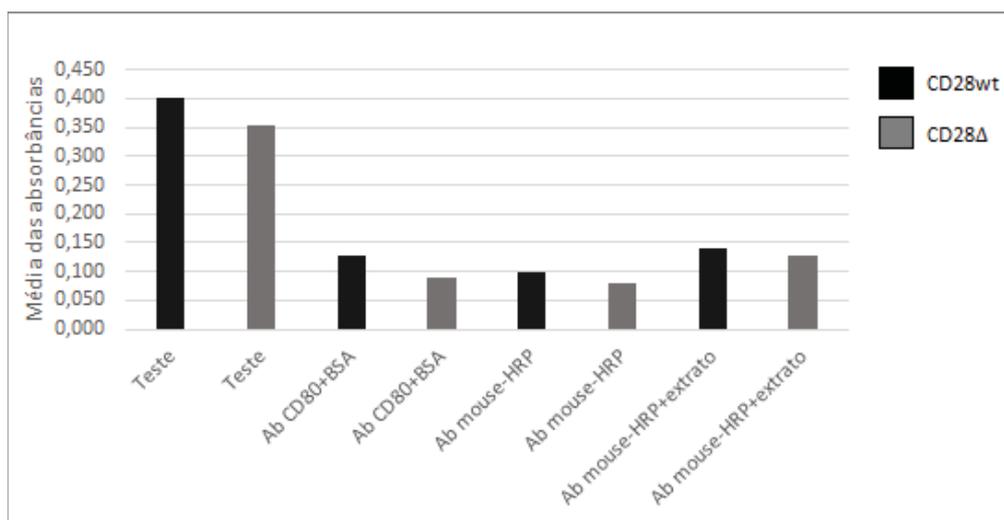


FIGURA 24. GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE ELISA. Ligação de chCD28 na placa (600ng/poço). Incubação com 1000ug de extrato de HD11 que foi previamente incubado com anti-chicken CD80 (1:1000). Anti-HRP 1:5000. Bloqueio com 1%BSA e revelação com TMB. FONTE: o autor (2018).

Quando observamos a figura 23, é possível afirmar que as proteínas CD28wt e CD28Δ apresentam o mesmo padrão de ligação. Acredita-se que a mutação da proteína CD28Δ tenha dado à ela uma característica de ser altamente aderente, já que mesmo em concentrações mais baixas ela continua interagindo com os receptores B7. Esta hipótese é corroborada pelos dados apresentados na figura 20. Ainda, o resultado da figura 23 sugere que a interação com um terceiro ligante poderia ser excluída, ou pelo menos teria menor participação, pois com o uso de anticorpos anti-CD80, apenas a interação entre CD28wt/CD28Δ e CD80 está sendo evidenciada. Apesar da expressão de CD80 ser maior que a de CD86 nas células HD11 sugerindo que neste modelo experimental a interação CD28-CD80 seja mais biologicamente relevante, a interação CD28-CD86 merece ser também futuramente investigada.

5. CONCLUSÃO

O problema da solubilidade das proteínas recombinantes foi resolvido permitindo assim os testes que foram feitos em seguida.

O mecanismo de ativação de células T é conservado nas aves e, possivelmente existe também uma ativação bidirecional nos macrófagos. Os resultados deste estudo indicam que CD28 recombinante reconhece os receptores da superfície de macrófagos. Estudos futuros empregando PCR em tempo real e detecção direta de citocinas secretadas pelos macrófagos por ELISA confirmarão se os macrófagos são ativados após interação com CD28.

Se a ativação de fato ocorrer será a primeira vez que a sinalização reversa será demonstrada em aves. Este resultado é bastante promissor, pois CD28 pode ser uma ferramenta bastante útil no desenvolvimento de novas tecnologias para mercado de aves. A proteína pode ser utilizada como adjuvante e/ou na fabricação de tetrâmeros, além de auxiliar no desenvolvimento de kits tais como multiplex.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

ALEGRE, ML, FRAUWIRTH, KA and THOMPSON, CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Immunology*. 2001.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Rapid and efficient purification and refolding of a (His)₆ -tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. 18-1134-37 AB, 1999-09.

ARNOLD, CE. GORDON, P. X BARKER, RN. WILSON, HM. The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. *Immunobiology* 220 (2015) 10–19.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA), 2015.

BARJESTEHI, N. BEHBOUDI, S. BRISBIN, JT. VILLANUEVA, AI. NAGY, E. SHARIF, S. TLR Ligands Induce Antiviral Responses in Chicken Macrophages. *PLoS ONE* 9(8): e105713. doi:10.1371/journal.pone.0105713

BOUR-JORDAN, H.; ESENSTEN, J. H.; MARTINEZ-LLORELLA, M.; PENARANDA, C.; STUMPF, M.; BLUESTONE, J. A. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunology Reviews*, v. 241, n.1, p.180–205, 2012.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v.72, p.248–54, 1976.

BRZOSTEK J, GASCOIGNE, NRJ and RYBAKIN, V. Cell Type-Specific Regulation of Immunological Synapse Dynamics by B7 Ligand Recognition. *Front. Immunol*, 2016.

ROSANO, GL and CECCARELLI, EA. Recombinant protein expression. In *Escherichia coli: advances and challenges*. *Frontiers in Microbiology*, 2014.

CHEN, L and FLIES, DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews*, 2013.

CHEN L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 May;4(5):336-47.

COLLINS, M.; LING,V.;CARRENO, B. M. The B7 family of immune-regulatoryligands. **Genome biology**, v.6, n.6, p.223, 2005.

COLLINS, A. et al. (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201–210

CROW, MK. Modification of accessory molecule signaling. **Springer Semin Immun** (2006) 27:409–424.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, n.3-4, p.268-273, 2008.

FAUCI J. M.; STRAUGHN J. M. JR; FERRONE S.; BUCHSBAUM D. J.A review of B7-H3 and B7-H4 immune molecules and their role in ovarian cancer. **Gynecology Oncology**. 127, n.2; p.420-425, 2012.

FIDALGO, C. Produção de anticorpos monoclonais para a molécula CD28 de linfócitos de galinha. [s.l.], 2012. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2012.

FINK, AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Folding & Design** 01 February 1998, 3:R9–R23.

HARRIS, N E RONCHESE, F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. **Immunology and Cell Biology** (1999) **77**, 304–311.

HE H, GENOVESE KJ, KOGUT MH. Modulation of chicken macrophage effector function by TH1/TH2 cytokines. Southern Plain Agricultural Research Center. **Cytokine** p. 363–369, United States, 2011.

INGBERMAN, M. Ativação de macrófagos de frango através da interação entre os receptores CD80 e CD86 com a proteína CD28 recombinante. 2015. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba 2015.

JHAMB, K. e SAHOO, DK. Production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. **Bioresource Technology** 123 (2012)

KAISER, P. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v.39, n.5, p.309-324, 2010.

KAKOULIDOU, M. GISCOMBE, R. ZHAO, X. LEFVERT, A. K. & WANG, X. Human Soluble CD80 is Generated by Alternative Splicing, and Recombinant Soluble CD80 Binds to CD28 and CD152 Influencing T-cell Activation. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2007.

KAUR, G and DUFOUR, J M. Cell lines Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis** 2:1, 1–5; January/February/March 2012.

LEE HYI BISWAS DII AHN JIII. In-Vitro Adhesion and Invasion Properties of Salmonella Typhimurium Competing with Bacteriophage in Epithelial Cells and Chicken Macrophages. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 2014.

LINSLEY, PS and LEDBETTER, JA. The role of the CD28 receptor during t cell responses to antigen. **Annu. Rev. Immunol.** 1993. 11:191-212.

LOGUE, EC & SHA, WC. CD28-B7 bidirectional signaling: a two-way street to activation. *Nature* 2004.

MALEK, M, HASENSTEIN, J. R.; LAMONT, S. J. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. **Poultry science**, v.83, n.4, p.544–549, 2004.

MIR, MA. Immunotherapy by reverse signaling inhibits the growth of Intracellular pathogens and cancer cells. Proceedings of International Research Conference on Engineering, Science and Management (IRCESM) 4th and 5th June 2014 Dubai, UAE.

ORABONA, C.; GROHMANN, U.; BELLADONNA, M. L.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BOZZA, S.; VOLPI, C.; SALOMON, B. L.; FIORETTI, M. C.; ROMANI, L.; PUCCETTI, P. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. **Nature immunology**, v.5, n.11, p.1134–42, 2004.

O'REGAN, M N, PARSONS, K. R.; TREGASKES, C.; YOUNG, J. R. A chicken homologue of the co-stimulating molecule CD80 which binds to mammalian CTLA-4. **Immunogenetics**, v.49, n.1, p.68–71, 1999.

PARSONS, K R; YOUNG, J. R.; COLLINS, B.; HOWARD, C. J. Cattle CTLA-4, CD28 and chicken CD28 bind CD86: MYPPPY is not conserved in cattle CD28. **Immunogenetics**, v.43, n.6, p.388–91, 1996.

PEACH, R. J.; BAJORATH, J.; BRADY, W.; LEYTZE, G.; GREENE, J.; NAE-MURA, J.; LINSLEY, P. S. Complementarity determining region 1 (CDR1)-and

CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. **J. Exp. Med.** The Rockefeller University Press. Volume 180 December 1994.

PENTCHEVA-HOANG, T. EGEN, JG. WOJNOONSKI, K and ALLISON. JP. B7-1 and B7-2 Selectively Recruit CTLA-4 and CD28 to the Immunological Synapse. *Immunity*, Vol. 21, 401–413, September, 2004.

RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**. v. 10, n. 1, p. 49-56, 1996.

RUDD, CE, TAYLOR, A and SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. **Immunol Rev.** 2009 May; 229(1): 12–26.

RUTKOWSKI1, R. MONIUSZKO, T. BARMUTA, AS. KOSZTYŁA-HOJNA, B. ALIFIER, M, KRZYSZTOF RUTKOWSKI, K and TATARCZUK-KRAWIEL, A. CD80 and CD86 Expression on LPS-Stimulated Monocytes and the Effect of CD80 and CD86 Blockade on IL-4 and IFN- γ Production in Nonatopic Bronchial Asthma. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 2003, 51, 421–428.

SHARPE, AH; GORDON, JF. The B7–CD28 superfamily. **Nature Immunol.** 2002

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboraroty manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA, 2001, 3 v.

SAN-MIGUEL, T. PEREZ-BERMUDEZ, P., AND GAVIDIA, I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *Springerplus* 2 2013, 89. doi:10.1186/2193-18 01-2-89.

SA'NCHEZ DE GROOTA, N e VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters** 580 (2006) 6471–6476.

SANSOM, DM. MANZOTTI, CN and ZHENG, Y. What's the difference between CD80 and CD86? **TRENDS in Immunology** Vol.24 No.6 June 2003.

SCHAT, KA. KASPERS, B. KAISER, P. *Avian Immunology*. 2014, Published by Elsevier.

SLAVIK, JM. HUTCHCROFT, JE and BIERER, BE. CDIS/CTLA-4 and CDS0/CD86 Families Signaling and Function. **Immunologic' Research** 1999.

SUBAUSTE, CS. MALEFYT, RW and FUH, F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the Immune Response to an Intracellular Pathogen. **J Immunol** 1998; 160:1831-1840;

TRUNEH, A; REDDY, M; RYAN, P; LYN, S.D; EICHMAN, C; COUEZ, D; HURLE, M. R.; SEKALY, R. P.; OLIVE, D.; SWEET, R. Differential recognition by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7.1) and B70 (B7.2): Analysis by site directed mutagenesis. **Molecular Immunology**, v. 33, n. 3, pp 321-324, 1996.

TSUMOTO, K. UMETSU, M. KUMAGAI, I. EJIMA, D. PHILO, JS. And ARAKAWA, T. Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. **Biotechnol. Prog.** 2004.

VAUGHAN, AN. MALDE, P. ROGERS, JN. JACKSON, IM. LECHLER, R and DORLING, A. Porcine CTLA4-Ig Lacks a MYPPPY Motif, Binds Inefficiently to Human B7 and Specifically Suppresses Human CD4+ T Cell Responses Costimulated by Pig But Not Human B7. **J Immunology** 2000; 165:3175-3181. WANG S and CHEN, L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. **Microbes and Infection** 6, p.759–766. 2004.

WARD, S G. CD28: a signalling perspective. **The Biochemical journal**, v.318, p.361–377, 1996.

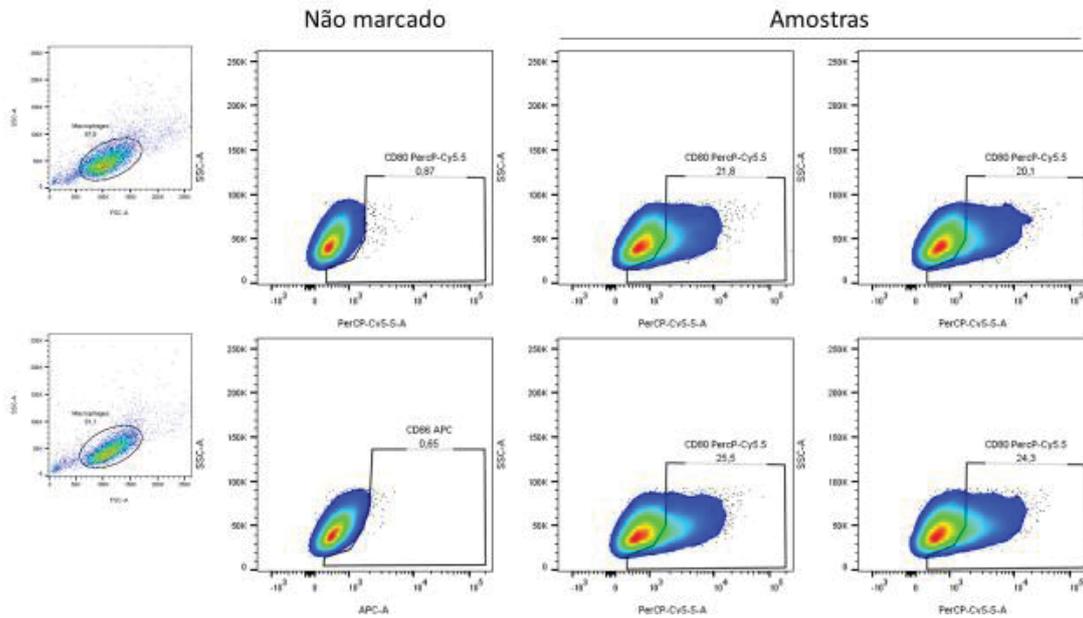
WU, Z.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology** ,v.216, n.11, p.1177–83, 2011.

YAMAGUCHI, H and MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules** 2014, 4, 235-251; doi:10.3390/biom4010235.

YOUNG JR, DAVISON TF, TREGASKES CA, RENNIE MC, VAINIO O. Monomeric homologue of mammalian CD28 is expressed on chicken T cells. **J Immunol.** 1994 Apr 15;152(8):3848-51.

ANEXO

Marcação anti-CD80 murino



Marcação anti-CD86 murino

