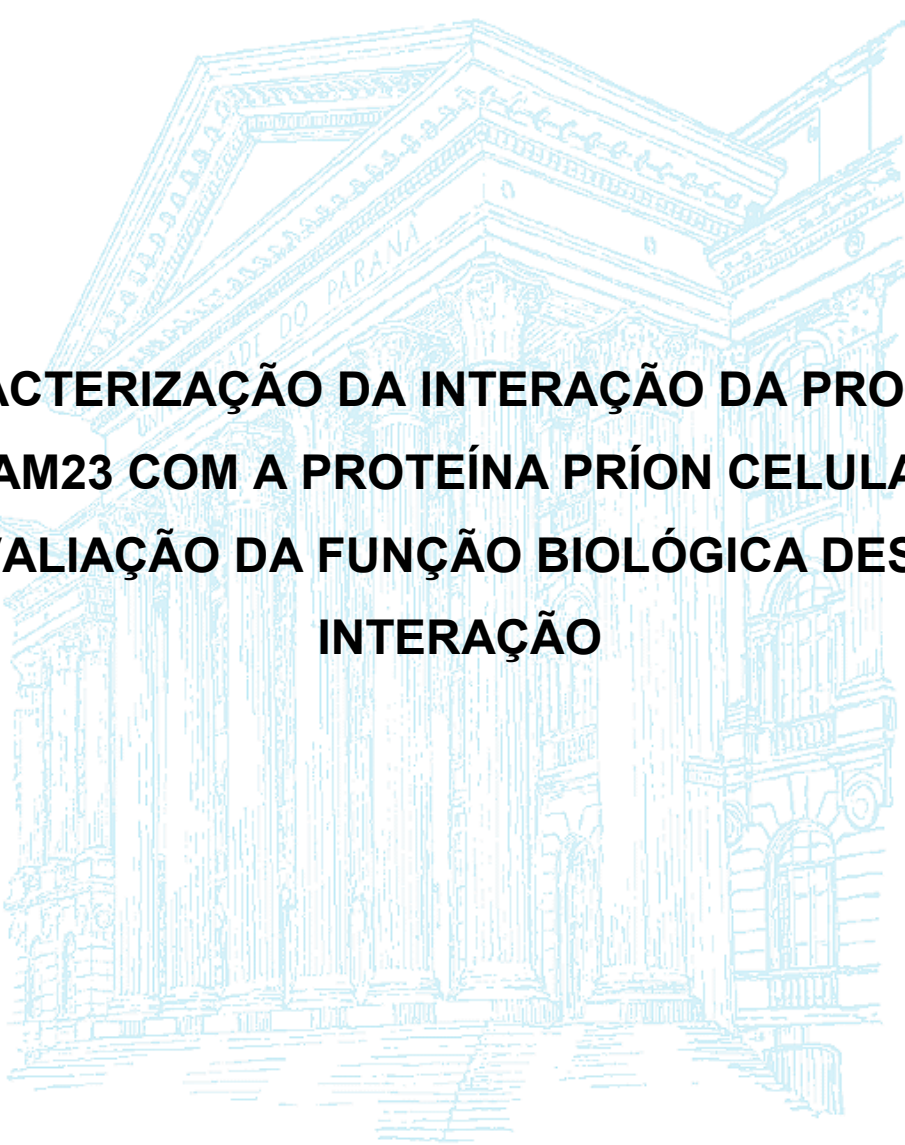


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE DIETRICH MOURA COSTA



**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA
ADAM23 COM A PROTEÍNA PRÍON CELULAR E
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DESTA
INTERAÇÃO**

CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MICHELE DIETRICH MOURA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA
ADAM23 COM A PROTEÍNA PRÍON CELULAR E
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO BIOLÓGICA DESTA
INTERAÇÃO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata.

Co-orientador: Profa. Dra. Adriana F. Mercadante.

CURITIBA

2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Costa, Michele Dietrich Moura

Caracterização da interação da proteína ADAM23 com a proteína príon celular e avaliação da função biológica desta interação. / Michele Dietrich Moura Costa. – Curitiba, 2010.

167 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Co-orientadora: Adriana F. Mercadante

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

1. Proteínas 2. Células – Interação I. Título II. Zanata, Silvio Marques III. Mercadante, Adriana F. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.8

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

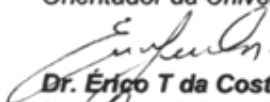
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

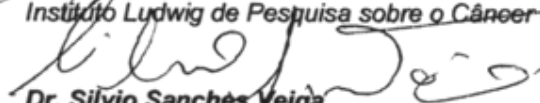
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



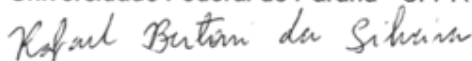
Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador da Universidade Federal do Paraná - UFPR



Dr. Érico T da Costa
Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - SP



Dr. Silvio Sanches Veiga
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Dr. Rafael Bertoni da Silveira
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



Dra. Luciana Chiarini
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

E tendo como suplentes,

Dra. Olga Meire Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Após argüir o(a) doutorando(a) **Michele Dietrich Moura Costa**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Caracterização da interação da proteína ADAM23 com a proteína príon celular e avaliação da função biológica desta interação**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título de Doutora está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.



Curitiba, 05 de agosto de 2010

Sílvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

Aos meus pais João e Sueli por todo amor e incentivo.

Ao meu querido vô Martins (in memoriam) pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida.

*Ao meu Orientador Professor
Sílvia Zanata pelos ensinamentos,
pela amizade e por me apresentar à
ciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente me protegendo e dando forças para continuar.

Aos meus pais, João e Sueli, por todo carinho e incentivo e por nunca me deixarem desistir.

Ao meu orientador, professor Silvio, pela confiança, pelos ensinamentos, pela atenção, incentivo e amizade. E também por me aguentar desde a iniciação científica até hoje!

A minha co-orientadora professora Adriana (carinhosamente Adri) pelos seus ensinamentos, confiança, amizade e por todas à vezes que me consolou com suas palavras amigas.

Ao Sérgio pelo amor e compreensão (mesmos nos fins de semana e feriados de experimentos) e por ouvir falar sobre meus experimentos, mesmo sem entender absolutamente nada.

Aos meus irmãos Rafa e Dani, pelo carinho e por aguentar meu mau humor, principalmente quando os experimentos davam errado.

Aos meus queridos avôs, Lydia e Martins (*in memoriam*), pelo carinho em todos os momentos da minha vida.

A Gis, pela amizade, carinho e ótima companhia.

Ao Luizito, pela amizade e apoio em todos os momentos (inclusive nos experimentos feitos às escondidas) e pelas discussões científicas, em especial as sobre *lipid rafts*.

A Sófi, pela amizade e carinho e pelas discussões científicas sobre PrP^C, integrinas, ensaios de adesão (que nunca se reproduziam), etc.

As minhas filhas científicas Gabi e Carol, pela ajuda e amizade.

A Walzinha por toda ajuda e por estar sempre me fazendo acreditar que depois da tempestade vem a calmaria.

A todos os alunos do lab de Neurobiologia, pelas discussões científicas e não científicas que deixaram os dias mais divertidos.

Aos amigos Tatiana e Daniel, que iniciaram nesta caminhada comigo, pelas divertidas discussões, pela amizade e pelo companheirismo até tarde da noite quando tudo dava errado e tínhamos que começar novamente.

A professora Ida Gubert, por me apresentar ao professor Sílvio para que ele me ensinasse alguns ensaios imunológicos (foi aí que tudo começou...).

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular, em especial a Olga e ao Rafael (que hoje são professores), pela ajuda e empréstimos.

Aos professores Sílvio Sanches Veiga e Edvaldo Trindade, pelo acompanhamento na progressão e pelas idéias e sugestões.

Aos membros da banca, Dr. Sílvio Sanches Veiga; Dra. Luciana B. Chiarini; Dr. Érico T. Costa e Dr. Rafael Bertoni da Silveira, pelas críticas e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho e também para trabalhos futuros.

A CAPES, CNPq, FAPESP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos.

Para descobrir caminhos é necessário sair dos trilhos.

(Albert Einstein)

RESUMO

ADAM23 é uma proteína transmembrana, membro da família ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*), expressa predominantemente no sistema nervoso central tanto no desenvolvimento quanto na fase adulta. Camundongos nocautes para *Adam23* desenvolvem tremores e ataxia e não sobrevivem mais do que duas semanas após o nascimento, sugerindo que ADAM23 possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel fisiológico desta proteína. Interessados nas possíveis funções desempenhadas por ADAM23 no sistema nervoso decidiu-se investigar interações desta proteína com outras moléculas. Foi descrito que ADAM23 está presente nos mesmos micro-domínios de membrana ou na vizinhança onde a proteína príon celular (PrP^C) é encontrada. PrP^C é uma proteína associada à membrana por âncora de glicosilfosfatidilinositol encontrada nos microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos, os *lipid rafts*. PrP^C também é amplamente expresso no sistema nervoso central e está envolvido numa série de doenças neurodegenerativas. Sendo assim, o presente trabalho teve como interesse principal estudar a interação entre ADAM23 e PrP^C e investigar seus possíveis papéis biológicos. Inicialmente, foram produzidas ferramentas necessárias para o estudo de ADAM23. Domínios recombinantes dessa proteína foram obtidos e puderam ser empregados na imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais. Estes últimos não foram obtidos com sucesso. Para contornar o problema da falta de anticorpos específicos anti-ADAM23, células que superexpressavam ADAM23 fusionada à etiqueta de hemaglutinina (HA) foram usadas nos diversos ensaios e, dessa forma, ADAM23 pôde ser marcada com anticorpos anti-HA. Os ensaios de coimunoprecipitação e ligação demonstraram que ADAM23 interage *in vitro* com PrP^C. O ensaio de ligação também sugeriu que esta interação pode ser direta e que o domínio desintegrina possui um sítio potencial de ligação para PrP^C. As análises de amostras de *lipid rafts* de diferentes linhagens celulares que superexpressam ADAM23-HA demonstraram que esta proteína não é uma molécula encontrada nestes microdomínios. No entanto, quando PrP^C foi superexpresso, ADAM23 apresentou um deslocamento para as regiões de *lipid rafts*. Sabendo que estes microdomínios estão envolvidos na endocitose de PrP^C, resolveu-se investigar se a interação com ADAM23 teria algum papel neste processo fisiológico. Os resultados de endocitose de PrP^C mediada por cobre demonstraram que a presença de ADAM23 diminui a endocitose de PrP^C em células HEK 293T. Estes dados sugerem um novo papel biológico para ADAM23 na modulação do tráfego celular de PrP^C.

Palavras-chave: ADAM23. PrP^C. adesão. *lipid rafts*. endocitose. cérebro.

ABSTRACT

ADAM23 is a transmembrane protein, member of ADAMs family, predominantly expressed in the central nervous system. ADAM23 is expressed during initial development and also during adulthood. *Adam23* knockout mice develop shivers and ataxia and die in less than two weeks after birth. These observations suggest that ADAM23 plays an important role in the development and maintenance of the central nervous system. However, the physiological role of ADAM23 remains unclear. In order to elucidate some functions played by ADAM23, we decided to investigate the interactions between this protein and other molecules. Previous studies show that ADAM23 is present in the same membrane microdomains as the cellular prion protein (PrP^C). PrP^C is a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein attached to the plasma membrane. It is encountered on membrane microdomains rich on cholesterol and glycosphingolipid, termed lipid rafts. PrP^C is also broadly expressed in the central nervous system. It has been shown that PrP^C is involved in neurodegenerative diseases. The aim of this work was to study the interaction between ADAM23 and PrP^C and putative biological roles for this interaction. Firstly, it was necessary to produce some specific tools for ADAM23. Recombinant proteins were produced and used to immunize rabbits to obtain polyclonal antibodies. Nevertheless, the animals failed to produce antibodies against ADAM23. To overcome this problem, cells that overexpressed ADAM23 HA tagged were used in the assays. Co-immunoprecipitation and binding assays showed that ADAM23 can interact *in vitro* with PrP^C. Binding assays also suggest that this interaction is direct and that the disintegrin domain of ADAM23 is able to interact with PrP^C. Lipid rafts analysis showed that ADAM23-HA overexpressed by different cells was always found outside the rafts. However, ADAM23 moved to the rafts when PrP^C was overexpressed. Since lipid rafts are involved in PrP^C endocytosis, we decided to analyze whether ADAM23 could participate in PrP^C endocytosis. The copper-induced endocytosis of PrP^C in HEK 293T was decreased when ADAM23 was overexpressed. These findings suggest a novel role for ADAM23 in cellular trafficking modulation of PrP^C.

Key words: ADAM23. PrP^C. adhesion. lipid rafts. endocytosis. brain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA GERAL DAS ADAMS E METALOPROTEASES DE VENENO DE SERPENTE.....	18
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PRP ^C).	30
FIGURA 3 - TESTE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAR AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA.	65
FIGURA 4 - ANÁLISE DO PERFIL DA DUPLA DIGESTÃO COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO USADAS PARA CLONAGEM DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DE ADAM23 HUMANA EM VETOR PGEX2T.	66
FIGURA 5 - EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DAS DIFERENTES CONSTRUÇÕES DE ADAM23 HUMANA EM VETOR PGEX2T.....	67
FIGURA 6 - PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PROVENIENTES DAS DIFERENTES CONSTRUÇÕES DE ADAM23 EM PGEX2T.....	69
FIGURA 7 - <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES FUSIONADAS À GST USANDO O ANTICORPO ANTI-GST	70
FIGURA 8 - PURIFICAÇÃO GST-METALOPROTEASE APÓS SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO PELO DETERGENTE ANIÔNICO SARCOSIL	71
QUADRO 1- PROBABILIDADE TEÓRICA DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADA DOMÍNIO SER INSOLÚVEL QUANDO EXPRESSO NO CITOPLASMA DE <i>E. COLI</i> DE ACORDO COM O INDICADOR WILKINSON/HARRISON MODIFICADO.	72
FIGURA 9 - TESTE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAR AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA OS DOMÍNIOS DESINTEGRINA E REGIÃO RICA EM CISTEÍNA DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA.	73
FIGURA 10 - ANÁLISE DO PERFIL DA DUPLA DIGESTÃO COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO USADAS PARA CLONAGEM DO DOMÍNIO DESINTEGRINA E REGIÃO RICA EM CISTEÍNA DE ADAM23 HUMANA EM VETOR PET28A	74
FIGURA 11 - EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE DIFERENTES COLÔNIAS TRANSFORMADAS COM PET28-DESINTEGRINA+CISTEÍNA	75
FIGURA 12 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ₆ HIS-DESINTEGRINA+CISTEÍNA.	76
FIGURA 13 - ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR DE DIFERENTES LINHAGENS SOBRE DOMÍNIO DESINTEGRINA OU DOMÍNIO DESINTEGRINA + REGIÃO RICA EM CISTEÍNA DE ADAM23.....	78
FIGURA 14 - TESTE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAR O ECTODOMÍNIO DE ADAM23 HUMANA	80
FIGURA 15 - ANÁLISE DO PERFIL DA DIGESTÃO COM A ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO USADA PARA CLONAGEM DO ECTODOMÍNIO COMPLETO E DO ECTODOMÍNIO SEM O PRÓ-DOMÍNIO DE ADAM23 HUMANA EM VETOR PSECTAG2/HYGRO	81
FIGURA 16 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ECTODOMÍNIO DE ADAM23 EM CÉLULAS DE MAMÍFERO HEK 293T	83
FIGURA 17 - TESTE DO SORO IMUNE DOS ANIMAIS R22 E R23 POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	84
FIGURA 18 - TESTE DO SORO DOS ANIMAIS R33 E R35 POR ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPO	85
FIGURA 19 - TESTE DO SORO DOS ANIMAIS R33 E R35 POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	86
FIGURA 20 - TESTE DO SORO DOS ANIMAIS R33 E R35 POR <i>WESTERN BLOTTING</i> USANDO AMOSTRA DE PREPARAÇÃO DE MEMBRANA DE ENCÉFALO	88
FIGURA 21 - ADAM23-HA E PRP ^C SUPEREXPRESSOS EM CÉLULAS HEK 293T PODEM SER CO-IMUNOPRECIPITADOS	90

FIGURA 22 - ADAM23 E PRP ^C PRESENTES NO TECIDO NERVOSO PODEM SER CO-IMUNOPRECIPITADOS.....	91
FIGURA 23 - INTERAÇÃO DIRETA ENTRE GST-ADAM23 DOMÍNIO DESINTEGRINA E ₆ HIS-PRP ^C	92
FIGURA 24 - ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR DA LINHAGEM 435 SELVAGEM (WT) E DOS CLONES <i>KNOCKDOWN</i> PARA ADAM23 (CLONES B E C) SOBRE ₆ HIS-PRP ^C	93
FIGURA 25 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PREPARAÇÃO DE <i>LIPID RAFTS</i> POR FLUTUAÇÃO DOS COMPLEXOS INSOLÚVEIS EM TRITON X-100 EM GRADIENTE DE NYCODENZ.....	95
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS ADAM23-HA E GFP-PRP ^C EXPRESSAS POR HEK 293T EM PREPARAÇÕES DE <i>LIPID RAFTS</i>	97
FIGURA 27 - INFLUÊNCIA DE GFP-PRP ^C NO DESLOCAMENTO DE ADAM23-HA PARA REGIÕES DE <i>LIPID RAFTS</i>	99
FIGURA 28 - LOCALIZAÇÃO DE ADAM23-HA EM LINHAGENS TRANSFECTADAS PERMANENTEMENTE COM PCDNA3.1- <i>ADAM23-HA</i>	100
FIGURA 29 - PAPEL DOS <i>LIPID RAFTS</i> NA INTERAÇÃO DE ADAM23-HA E GFP-PRP ^C	101
FIGURA 30 - VERIFICAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DE GFP-PRP ^C PARA FORA DOS <i>LIPID RAFTS</i> EM CÉLULAS HEK 293T APÓS TRATAMENTO COM COBRE.....	103
FIGURA 31 - PAPEL DE ADAM23 NA ENDOCITOSE DE PRP ^C	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	– aminoácido
ADAM	– <i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
BES	– ácido N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonico
BSA	– <i>bovine serum albumin</i> - albumina sérica bovina
dNTP	– desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	– Dithiothreitol
EDTA	– ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	– <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GFP	– <i>green fluorescent protein</i> – proteína verde fluorescente
GPI	– glicosilfosfatidilinositol
GST	– glutationa S-transferase
HA	– Hemaglutinina
HEPES	– N-[2-hidroxietil]piperazina-N' - [2-etanosulfonato]]
HRP	– <i>horseradish peroxidase</i> – peroxidase de raiz forte
IgG	– Imunoglobulina do tipo G
IMAC	– cromatografia de afinidade à metal imobilizado
IPTG	– isopropil β -D-thiogalactopyranoside
Da	– Dalton
LB	– meio Luria-Bertani
MEM	– meio mínimo essencial
NEM	– N-ethylmaleimide
Ni-NTA	– <i>nickel-nitriloacetic acid</i>
OPD	– o-phenylenediamine
pb	– pares de bases
PBS	– solução salina tamponada com fosfato
PBST	– solução salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20
PCR	– reação em cadeia da polimerase
PMSF	– fluoreto phenylmethanesulfonyl
PrP ^C	– proteína príon celular
PrP ^{SC}	– proteína príon <i>scrapie</i>
RGD	– sequência de aminoácidos arginina, glicina, asparagina
SDS	– dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	–	<i>SDS- polycrylamide gel electroforesis</i>
SFB	–	soro fetal bovino
TAE	–	Tris-acetato EDTA
TBS	–	solução salina tamponada com Tris
TBST	–	solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
Tris	–	tris (hidroximetil) amino metano
UV	–	luz ultravioleta
WB	–	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM)	17
2.1.1 ADAM23	25
2.2 PROTEÍNA PRÍON CELULAR	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 CLONAGEM DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM VETOR DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PGEX-2T	37
3.1.1 Reação de PCR para obtenção das sequências codificadoras (insertos) dos domínios de interesse a serem clonados em vetor pGEX-2T	38
3.1.2 Digestão dos insertos e do vetor pGEX-2T por endonucleases de restrição	39
3.1.3 Reação de ligação insertos/vetor pGEX-2T	39
3.1.4 Preparação de estirpes de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	39
3.1.5 Transformação de estirpes de <i>E. coli</i> eletrocompetentes com os produtos de ligação ...	40
3.1.6 PCR de colônia para verificação de clones positivos	41
3.1.7 Purificação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)	41
3.1.8 Digestão dos clones recombinantes para confirmação da presença dos insertos de interesse	41
3.2 CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO CODIFICANTE PARA OS DOMÍNIOS DESINTEGRINA E REGIÃO RICA EM CISTEÍNA NO VETOR DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PET-28A	42
3.2.1 Reação de PCR para obtenção da sequência codificadora para os domínios desintegrina e cisteína	43
3.2.2 Digestão do inserto e do vetor pET-28a por endonucleases de restrição	43
3.2.3 Reação de ligação inserto/vetor pET-28a	43
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS DE ADAM23 CLONADOS EM VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-2T	44
3.3.1 Análise da expressão das proteínas de interesse em pequena escala	44
3.3.2 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes através da matriz cromatográfica glutathiona sepharose 4B (GE Healthcare)	45
3.3.3 Separação das proteínas fusionadas à GST por SDS-PAGE	46
3.3.4 Análise da purificação das proteínas fusionadas à GST por <i>Western blotting</i> usando o anticorpo anti-GST	46
3.3.5 Protocolos para solubilização de corpos de inclusão	47
3.3.5.1 Diminuição nos níveis de expressão	47

3. 3. 5. 2 Utilização de agente caotrópico durante a lise	47
3. 4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ₆ HIS-DESINTEGRINA+CISTEÍNA (₆ HIS-DES+CIS) CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO PET-28A	48
3. 4. 1 Análise da expressão da proteína de interesse em pequena escala	48
3. 4. 2 Expressão em larga escala e purificação da proteína recombinante ₆ His-desintegrina+cisteína (₆ His-des+cis) por cromatografia de afinidade à metal imobilizado (IMAC)	48
3. 4. 3 Análise da purificação da proteína recombinante ₆ His-des+cis	50
3. 5 CLONAGEM DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM VETOR DE EXPRESSÃO PSEC TAG2/HYGRO A	50
3. 5. 1. Reação de PCR para obtenção das sequências codificadoras (insertos) dos domínios de interesse a serem clonados em vetor pSecTag2/HygroA.....	51
3. 5. 2 Digestão dos insertos e do vetor pSecTag2/HygroA por endonuclease de restrição	51
3. 5. 3 Reação de ligação insertos/vetor pSecTag2/HygroA	52
3. 5. 6 PCR de colônia para verificação de clones positivos.....	52
3. 6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO PSEC TAG2/HYGRO A	53
3. 6. 1 Análise da expressão do ectodomínio de ADAM23	54
3. 6. 2 Método de transfecção por cálcio	54
3. 7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	55
3. 7. 1 Imunização dos animais com a proteína GST-metaloprotease+desintegrina (GST-met+des) provenientes de corpos de inclusão	55
3. 7. 2 Imunização dos animais com a proteína ₆ His-desintegrina+cisteína (₆ His-des+cis).....	55
3. 7. 3 Análise da resposta imune por <i>Western blotting</i>	56
3. 7. 3. 1 Análise da eficiência dos anticorpos no reconhecimento do antígeno recombinante	56
3. 7. 3. 2 Análise da eficiência dos anticorpos no reconhecimento da proteína ADAM23 superexpressa em células HEK 293T	57
3. 7. 3. 3 Análise da presença da proteína ADAM23 no encéfalo de camundongos	57
3. 7. 4 Análise da resposta imune por imunoenensaio de ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	58
3. 8 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR	59
3. 8. 1 Co-imunoprecipitação das proteínas ADAM23 e PrP ^C usando anticorpo anti-PrP ^C	59
3. 8. 2 Ensaio de ligação	60
3. 8. 2 Ensaio de adesão celular.....	60
3. 8. 3 Preparação de microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicosíngolípídeos (<i>lipid rafts</i>)	61
3. 8. 4 Ensaio de endocitose de GFP-PrP ^C mediado por cobre.....	62
4 RESULTADOS.....	64

4. 1 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>E. COLI</i>	64
4. 1. 1 Clonagem, expressão e purificação de diferentes domínios da proteína ADAM23 em sistema pGEX-2T	64
4. 1. 2 Clonagem, expressão e purificação dos domínios desintegrina e cisteína da proteína ADAM23 em sistema pET-28a	73
4. 2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	79
4. 3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA ADAM23	84
4. 4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR	89
5 DISCUSSÃO	106
5. 1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE ADAM23 RECOMBINANTE.....	106
5. 2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA ADAM23.....	114
5. 3 INTERAÇÃO ADAM23/PRP ^C	116
6 CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXO 1: ESQUEMA DA MOLÉCULA ADAM23 E AS REGIÕES CLONADAS NOS VETORES PARA EXPRESSÃO EM <i>E. COLI</i> E EM CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	143
ANEXO 2: QUADRO DESCRITIVO DAS DIFERENTES CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA	144
ANEXO 3: ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	145

1 INTRODUÇÃO

ADAM (**A** Disintegrin and **M**etalloprotease) é uma família de proteínas transmembranas envolvidas em uma variedade de funções biológicas tais como: liberação de fatores de crescimento e citocinas, diferenciação celular, migração e adesão celular e nos processos de fertilização (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Membros da família ADAM executam suas funções através da sua topografia única, contendo um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, região transmembrana e cauda citoplasmática (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

ADAM23 é um membro da família ADAM expresso predominantemente no sistema nervoso central, tanto no desenvolvimento quanto na fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Camundongos nocautes para *Adam23* desenvolvem tremores e ataxia e não sobrevivem mais que duas semanas após o nascimento, sugerindo que esta proteína possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central (MITCHELL *et al.*, 2001). No entanto, pouco se sabe sobre o papel biológico desta proteína. Assim sendo, o presente trabalho teve como interesse principal estudar possíveis papéis biológicos em que esta proteína poderia estar envolvida.

Uma maneira de desenvolver este tipo de estudo é através da análise de parceiros moleculares que possuem funções estabelecidas. Neste contexto, este trabalho buscou encontrar possíveis ligantes para a proteína ADAM23.

A proteína príon celular (PrP^{C}) é uma proteína associada à membrana por âncora de glicosilfosfatidilinositol amplamente expressa no sistema nervoso central estando envolvida numa série de doenças neurodegenerativas (PRUSINER, 1998). Schmitt-Ulms e colaboradores (2004) demonstraram que muitas proteínas envolvidas nos processos de adesão celular e neuritogênese podem ser encontradas nos mesmos microdomínios de membrana ou na vizinhança onde PrP^{C} é encontrado. Dentre estas moléculas, a proteína ADAM23 foi identificada e parece estar na vizinhança de PrP^{C} . Embora ADAM23 e PrP^{C} sejam encontradas nas mesmas regiões da membrana celular (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004), nenhuma interação entre essas duas moléculas havia sido descrita. Sendo assim, o presente trabalho demonstrou uma interação específica entre ADAM 23 PrP^{C} e caracterizou

essa ligação sob diferentes aspectos, na tentativa de elucidar seu possível papel fisiológico.

1.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Produzir ferramentas específicas que proporcionem o estudo de ADAM23 e caracterizar a interação entre esta proteína e a proteína príon celular.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Produzir proteínas recombinantes de ADAM23.
- ✓ Produzir anticorpos policlonais usando como antígeno as proteínas recombinantes.
- ✓ Mostrar a interação *in vitro* entre ADAM23 e a proteína príon celular.
- ✓ Analisar o papel desta interação em eventos de adesão.
- ✓ Analisar o papel desta interação na distribuição de ADAM23 e PrP^C na membrana celular.
- ✓ Analisar o papel de ADAM23 no processo de endocitose de PrP^C.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM)

As ADAMs são proteínas transmembranas do tipo I que possuem uma estrutura comum que inclui pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), domínio transmembrana e cauda citoplasmática (figura 1). O nome ADAM refere-se aos dois domínios potenciais desta família de proteínas: o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina, sendo também denominadas de MDC (**M**etalloprotease/**D**isintegrin/**C**ystein-rich protein). Esta família de proteínas contém as únicas proteínas de superfície que atuam tanto na adesão quanto na proteólise (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

As ADAMs estão envolvidas em diversos processos biológicos normais, tais como interações espermatozóide-óvulo, diferenciação celular, migração celular, crescimento axonal, desenvolvimento muscular e aspectos relacionados à imunidade (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Além dos papéis fisiológicos, estas proteínas estão envolvidas em processos patológicos como no câncer, doenças neurológicas e cardíacas, asma, infecção e inflamação (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; MURPHY, 2008; EDWARDS *et al.*, 2008).

Os primeiros membros identificados dessa família foram as fertilinas α e β , ou ADAM1 e 2 respectivamente. Estas proteínas eram encontradas como um complexo formado por duas subunidades α e β na superfície de espermatozóides de porcos da Índia e estavam envolvidas na fusão espermatozóide-óvulo durante a fecundação. A subunidade α apresentava um domínio potencial de fusão muito semelhante às proteínas virais de fusão. A subunidade β possuía um domínio de ligação, o domínio desintegrina, sendo este domínio relacionado com as proteínas solúveis de veneno de serpente. As duas subunidades apresentavam uma grande similaridade entre si, mas não apresentavam similaridade com outras moléculas de superfície relacionadas com a adesão. Entretanto, estas subunidades apresentavam similaridade com as proteínas solúveis do veneno de serpente (figura 1), as metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs) (BLOBEL *et al.*, 1992; WOLFSBERG *et al.*, 1993).

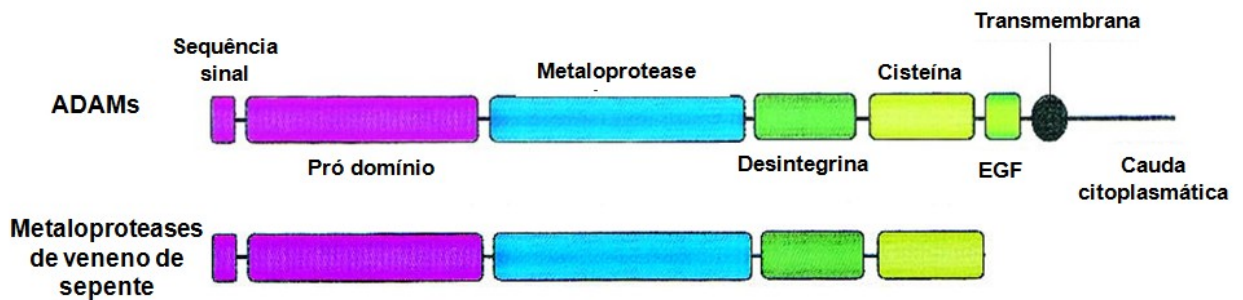


FIGURA 1 - Estrutura geral das ADAMs e metaloproteases de veneno de serpente. Organização dos domínios das proteínas da família ADAM: a parte extracelular contém um pró-domínio N-terminal, seguido pelo domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, a região rica em cisteína e um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF). Segue-se o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática na região C-terminal. As metaloproteases de veneno de serpente apresentam-se estruturadas de maneira semelhante as ADAMs, entretanto, não apresentam o domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, o domínio transmembrana e nem a cauda citoplasmática (adaptado SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Outras proteínas relacionadas às fertilinas foram descobertas em seguida. Primeiro, a proteína meltrina α , ou ADAM12, foi descrita atuando na fusão de mioblastos. Em *Drosophila* foi identificada a Kuzbanian (KUZ), uma metaloprotease-desintegrina que atua na diferenciação neuronal e crescimento axonal. Finalmente, foram descritas duas metaloprotease-desintegrinas que atuam no processo de clivagem de substratos, a ADAM17 (denominada também TACE – TNF α convertase) atuando na clivagem da citocina pró-inflamatória ancorada à membrana TNF α (fator de necrose tumoral α) e KUZ foi demonstrada atuar na clivagem de Notch (revisado por BLOBEL, 1997).

ADAMs são membros da superfamília Metzincina, sendo que esta superfamília está dentro do grande grupo das metaloproteases dependente de zinco. O grupo das metaloprotease dependente de zinco contém três grandes superfamílias: Gluzincina, Metzincina e Aspizincina. A superfamília Metzincina também inclui a família das metaloproteases de matriz (MMP); a família das Adamalinas (metaloproteases solúveis de veneno de serpente)/ ADAMTS (ADAMs com motivo trombospondina)/ ADAM/ Reprolisinas; a família das Astacinas (proteases encontradas desde bactérias até mamíferos) e, a família das Serralinas (fatores de virulência secretados por bactérias Gram-negativas) (GOMIS-RÜTH, 2003).

As ADAMs, as MMPs, ADAMTSs e as metaloproteases e desintegrinas de veneno de serpente possuem uma sequência sinal na região N-terminal que as direciona para a via de secreção. Estas proteínas são então sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

A sequência sinal é seguida pelo pró-domínio, que conserva o domínio metaloprotease das ADAMs inativo. Esse pró-domínio é geralmente removido durante o trânsito pelo Golgi por pró-proteínas convertases do tipo furinas que promovem a clivagem do pró-domínio do resto da proteína em um motivo conservado RX(R/K)R presente entre o pró-domínio e o domínio metaloprotease. A liberação do pró-domínio e a mudança da coordenação de zinco para o domínio metaloprotease convertem o domínio metaloprotease para um estado cataliticamente ativo (LUM *et al.*, 1998; LOECHEL *et al.*, 1999; ROGHANI *et al.*, HOUGAARD *et al.*, 2000; HOWARD *et al.*, 2000; SCHLÖNDORFF *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2002).

Além de manter a latência da atividade metaloprotease, o pró-domínio possui outras funções. Ele pode atuar como chaperona no dobramento correto das ADAMs e também, protegê-las contra a degradação que pode ocorrer na via secretória (MILLA *et al.*, 2006). Estudos mostraram que a remoção do pró-domínio da ADAM17 gera uma protease inativa (MILLA *et al.*, 1999), assim como uma construção de ADAM10 sem o pró-domínio é cataliticamente inativa (ANDERS *et al.*, 2001). Recentemente, Liu e colaboradores (2009) mostraram a importância do pró-domínio no dobramento da ADAM22, um membro da família que não apresenta atividade metaloproteolítica. Estes resultados sugerem que o pró-domínio é necessário não só para inibir a atividade metaloprotease, mas também para promover o dobramento correto das ADAMs.

O domínio metaloprotease encontra-se logo após a região C-terminal do pró-domínio. Este domínio apresenta um sítio ativo com a sequência consenso HEXXHXXGXXHD, sendo que as três histidinas ligam-se ao zinco e o ácido glutâmico atua como base catalítica. Uma metionina conservada situada alguns aminoácidos *downstream* ao sítio catalítico, a chamada *Met-turn*, se insere no cerne da estrutura formada pelo sítio consenso quando ligado ao zinco. O sítio ativo consenso e o *Met-turn* são as duas características da superfamília Metzincina (GOMIS-RÜTH, 2003). O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8-10, 12, 13, 15-

17, 19-21, 24-26, 28, 31 e 33-40 contém os resíduos do sítio ativo, e assim, são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 14, 18, 22, 23, 27, 29-30 e 32 possuem seqüências diferentes neste domínio e, apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não é ativo nestas proteínas, sugerindo que o domínio metaloprotease nessas ADAMs possa ter um papel no dobramento e/ou nas interações com outras proteínas (YANG *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2008).

A atividade catalítica das ADAMs tem sido bem caracterizada, sendo bastante importante na liberação de ectodomínios de proteínas de membrana e proteólise da matriz extracelular. Este tipo de clivagem foi descrito como sendo importante em processos de sinalização, proliferação e diferenciação e em processos patogênicos (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; ALFANDARI *et al.*, 2009). Um membro desta família que tem sido extensamente estudado em termos de atividade proteolítica é a ADAM17 ou TACE. Esta proteína está envolvida na clivagem de uma ampla variedade de pró-proteínas, permitindo que a proteína clivada se torne ativa. A TACE também atua na clivagem de receptores, promovendo a modulação rápida destes receptores em resposta à sua ativação quando o ligante está presente (BLOBEL, 2005). Dentre as moléculas clivadas pela ADAM17 estão: a citocina conhecida como fator de necrose tumoral α (TNF α), a proteína precursora amilóide (APP), o fator de crescimento de transformação α (TGF α), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento epidermal ligante de heparina (HB-EGF), a proteína Notch, o receptor ErbB4, os receptores I e II para TNF, entre outras moléculas (BLOBEL, 2005; EDWARDS *et al.*, 2008; ALFANDARI *et al.*, 2009). Camundongos que possuem o gene *Adam17* com mutação inativando o domínio metaloprotease apresentam problemas na maturação e organização epitelial, mostrando assim, a importância da atividade proteolítica desta molécula (PESCHON *et al.*, 1998).

ADAM10 é outro membro que possui atividade proteolítica e que tem sido bastante estudado. Esta proteína atua na regulação de proteólise intramembrana, a qual é crítica para a sinalização Notch/Delta (EDWARDS *et al.*, 2008). Tanto a ADAM10 quanto a ADAM17 foram descritas atuando no metabolismo da proteína príon celular e da APP promovendo a clivagem destas e liberando-as para o meio extracelular (VINCENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005).

Alfandari e colaboradores (2001) mostraram que a ADAM13 é capaz de atuar na clivagem de fibronectina atuando na remodelagem deste substrato, sugerindo que esta ADAM pode interferir nas interações célula-matriz.

O domínio desintegrina deriva da semelhança das desintegrinas de veneno de serpentes, sendo então denominado de domínio desintegrina-*like*. As desintegrinas de veneno de serpente são pequenas proteínas (50-90 aa) que atuam na inibição da agregação plaquetária. Através do motivo RGD presente no domínio desintegrina, as desintegrinas de veneno de serpente ligam-se às integrinas impedindo que estas se liguem ao fibrinogênio (HUANG, 1998). Embora todas as desintegrinas de veneno de serpentes apresentem o motivo RGD, apenas a ADAM15 humana possui este motivo. As demais ADAMs, com exceção das ADAMs 10 e 17, possuem um motivo consenso CRXXXXXCDXXEXC (WOLFSBERG *et al.*, 1995; KRÄTZSCHMAR *et al.*, 1996; WHITE, 2003). Desta forma, apenas a ADAM15 humana, que tem a sequência RGD conservada, foi demonstrada interagir com as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ de forma dependente de RGD (NATH *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos demonstram que o domínio desintegrina-*like* pode promover a adesão e migração pela ligação com integrinas (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2002; BAX *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; ZIGRINO *et al.*, 2007). Os domínios desintegrina-*like* das ADAMs 1, 2, 3, 9, 12 e 15 ligam a integrina $\alpha9\beta1$ de maneira independente de RGD promovendo a adesão celular (ETO *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2002). O domínio desintegrina-*like* de ADAM23 foi demonstrado promover adesão mediada por $\alpha\beta3$ (CAL *et al.*, 2000). Bax e colaboradores (2004) demonstraram que o domínio desintegrina-*like* de ADAM17 promove adesão dependente de $\alpha5\beta1$. O domínio desintegrina-*like* e a região rica em cisteína de ADAM12 ligam-se a integrina $\alpha7\beta1$ e esta interação promove a adesão celular, entretanto não é observado espraiamento celular (ZHAO *et al.*, 2004). Embora muitos trabalhos demonstrem que domínios desintegrina-*like* recombinantes promovam a adesão, há uma crítica neste modelo. Estudos de cristalografia demonstram que na proteína nativa o domínio desintegrina estaria indisponível para interagir com outras proteínas (TAKEDA *et al.*, 2006; TAKEDA, 2009).

Resultados reportados por Huang e colaboradores (2005) demonstram que distintas ADAMs podem modular tanto positivamente quanto negativamente a migração celular pela interação específica com integrinas. ADAM12 inibe a migração

de células mediada por $\alpha 4\beta 1$, mas não por $\alpha 5\beta 1$ e, a ADAM17 possui o efeito inverso. As ADAMs 19 e 33 inibem a migração mediada pelas integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (HUANG *et al.*, 2005).

O domínio rico em cisteína também possui propriedade adesiva, podendo interagir com outros domínios ricos em cisteínas e promovendo assim, fusão de membranas celulares (WOLFSBERG *et al.*, 1995). O domínio rico em cisteína de ADAM12 foi demonstrado promover adesão através da interação com o sindecam proteoglicano de heparan sulfato, sendo que esta interação resulta no recrutamento de integrinas $\beta 1$ (IBA *et al.*, 2000). Gaultier e colaboradores (2002) demonstram que o domínio desintegrina-*like* mais a região rica em cisteína de ADAM13 podem interagir com fibronectina. Além disso, o domínio rico em cisteína de ADAM13 parece ter um papel importante na função proteolítica sendo essencial nas interações com o substrato (SMITH *et al.*, 2002). Análises de depleção de domínio demonstram a importância do domínio rico em cisteína de ADAM17 na clivagem do receptor II de Interleucina-1 (REDDY *et al.*, 2000).

O domínio transmembrana e a cauda citoplasmática das ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutores de sinal entre o meio extracelular e intracelular via interações célula-célula e célula-matriz extracelular (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; BLOBEL, 2005; EDWARDS *et al.*, 2008).

A cauda citoplasmática das ADAMs pode variar consideravelmente em tamanho e sequência, podendo apresentar desde 11 resíduos, como é o caso da ADAM11, até 231 resíduos, como a ADAM19 (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Muitos membros desta família possuem um ou mais motivos PXXP (motivo rico em prolina) que podem atuar como sítios de ligação de proteínas envolvidas em eventos de sinalização que apresentam o domínio SH3 (domínio de ligação a motivos ricos em prolina). Também podem apresentar resíduos de serina-treonina e/ou tirosina que podem sofrer fosforilação podendo atuar como sítio de ligação para proteínas que possuem o domínio SH2 (domínio de ligação à fosfotirosina) (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008). Isto leva a inferir que os domínios citoplasmáticos podem atuar em eventos de regulação da atividade proteolítica em resposta a eventos intracelulares, bem como podem estar envolvidos em eventos de sinalização intracelular devido a interações com moléculas adesivas ou que atuam como substratos (YANG *et al.*, 2006).

Muitos genes *ADAM* sofrem *splicing* alternativo, o que aumenta consideravelmente o número de variantes destas proteínas. *ADAM12* codifica uma forma longa que apresenta a estrutura canônica da família *ADAM* e codifica uma forma curta que é secretada (GILPIN *et al.*, 1998). Também são encontradas isoformas secretadas das *ADAMs* 8, 11, 15, 23 e 28 (KATAGIRI *et al.*, 1995; FOURIE *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004). Os genes *ADAM15* e *ADAM22* também geram variantes que se diferenciam pelo domínio citoplasmático, o que gera diferentes combinações de motivos de interações com outras proteínas (KLEINO *et al.*, 2007; GÖDDE *et al.*, 2007). Um *splicing* alternativo de *ADAM19* gera uma forma citoplasmática que não apresenta o pró-domínio e os domínios metaloprotease e desintegrina (KURISAKI *et al.*, 2002).

Foram identificadas quarenta proteínas da família *ADAM* com o domínio transmembrana, sendo que trinta e cinco destas foram clonadas e sequenciadas¹. Membros desta família têm sido encontrados em espécies de mamíferos, *Caenorhabditis*, *Xenopus* e *Drosophila*, mas nenhuma proteína *ADAM* foi encontrada em eucariotos unicelulares e em plantas (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008).

A expressão das *ADAMs* pode variar consideravelmente. Em mamíferos muitas *ADAMs* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31 e 32) são exclusivas ou predominantemente expressas em testículos e/ou associadas a estruturas reprodutivas, estando envolvidas na fertilização e espermatogênese, podendo também atuar em outros órgãos. Algumas *ADAMs* possuem uma expressão ampla, como no caso das *ADAMs* 9, 10, 12, 15, 17 e 19. Outras *ADAMs* apresentam expressão tecidual específica: as *ADAMs* 11 e 22 são expressas apenas no sistema nervoso e, a *ADAM23* é predominantemente expressa no tecido nervoso e no coração. A *ADAM8* é expressa principalmente em tipos celulares hematopoéticos (NOVAK, 2004; YANG *et al.*, 2006; GHILARDI *et al.*, 2008).

No sistema nervoso foram detectadas as *ADAMs* 1-3, 8-13, 15, 17, 19, 21-23 e 33, sendo que estas proteínas podem estar relacionadas com o desenvolvimento neural, uma vez que tanto os processos proteolíticos e de adesão celular são essenciais para a manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso central (KARKKAINEN *et al.*, 2000; NOVAK, 2004; YANG *et al.*, 2006).

¹ Table of the *ADAMs*. Disponível em: <http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html>. Acesso em: 10/05/2010.

Tem sido descrito a atuação das ADAMs em diversos processos do desenvolvimento do sistema nervoso. Estas proteínas podem atuar na migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, no crescimento axonal, na sinaptogênese e na mielinização (revisado por NOVAK, 2004; YANG *et al.*, 2006).

Muitos estudos a respeito do papel das ADAMs no sistema nervoso têm focado apenas no papel proteolítico. Moléculas que orientam a migração neuronal durante o desenvolvimento são dependentes da exposição de ectodomínios, sendo que muitas ADAMs podem atuar na proteólise destas moléculas, atuando indiretamente na migração (ALFANDARI *et al.*, 2001). Além disso, muitas moléculas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células nervosas durante o desenvolvimento do sistema nervoso requerem processamento proteolítico, que pode ser mediado por algumas ADAMs (LIEBER *et al.*, 2002; SHIRAKABE *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2004). Foi demonstrado que a ADAM13 de *Xenopus laevis* é capaz de promover a migração de células da crista neural através da remodelagem da matriz extracelular, bem como pela interação com $\beta 1$ integrinas (ALFANDARI *et al.*, 1997; ALFANDARI *et al.*, 2001).

É importante lembrar que as ADAMs que apresentam alta expressão no sistema nervoso são inativas proteoliticamente, sendo elas as ADAMs 11, 22 e 23 (SAGANE *et al.*, 1998; KARKKAINEN *et al.*, 2000; NOVAK, 2004).

Estudos usando animais deficientes nas ADAMs 11, 22 e 23 demonstram a importância destes membros inativos proteoliticamente. Camundongos nocautes para *Adam11* embora sejam viáveis, apresentam deficiência no aprendizado, na coordenação motora e nas respostas nociceptivas (TAKAHASHI *et al.*, 2006 a, b).

Camundongos nocautes para *Adam22* apresentam ataxia e hipomielinização nos nervos periféricos e, morrem logo após o desmame (SAGANE *et al.*, 2005). Os animais nocautes para *Adam23* também apresentam problemas neurológicos tais como tremores e ataxia e morrem logo após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001). Estes dados demonstram que estes três membros da família ADAM apresentam funções importantes no sistema nervoso e que não são redundantes, uma vez que a presença de um dos membros não é capaz de compensar a função da ADAM que está ausente (YANG *et al.*, 2006).

2. 1. 1 ADAM23

ADAM23 (também denominada MDC3) é um membro da família ADAM expressa predominantemente no sistema nervoso central e no coração. Esta ADAM apresenta estrutura típica dos membros da família, no entanto, não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam o sítio ativo para a ligação de zinco (HEXXHXXGXXH), o qual é crítico para a atividade proteolítica (SAGANE *et al.*, 1998). Sendo assim, ADAM23 tem sido descrita como uma molécula potencialmente adesiva, mas sem atividade proteolítica (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

Esta proteína é expressa tanto no encéfalo fetal como no adulto e camundongos nocautes para o gene *Adam23* não são animais viáveis. Estes dados sugerem que ADAM23 possui um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2004).

O gene *ADAM23* humano foi mapeado no cromossomo 2q33 e o gene de camundongo na região central do cromossomo 1, mostrando que este gene ocupa um único *locus* (SAGANE *et al.*, 1999). No entanto, esta proteína apresenta três isoformas que são transcritos variantes do mesmo gene e que também são expressas predominantemente no encéfalo e no coração. Estas isoformas são ADAM23, também designada de ADAM23 α (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM23 β e ADAM23 γ (SUN *et al.*, 2004). ADAM23 β e ADAM23 γ são transcritos finais provenientes da combinação de diferentes éxons, mas provenientes do mesmo *locus* de ADAM23 α . ADAM23 β difere-se de ADAM23 em alguns dos aminoácidos que formam o domínio transmembrana, compartilhando 54% (13 de 24 resíduos) de similaridade neste domínio. ADAM23 γ difere-se de ADAM23 α pela ausência do domínio transmembrana e cauda citoplasmática, o que sugere que esta isoforma é secretada. ADAM23 γ também se diferencia por sua expressão temporal, pois esta isoforma é expressa principalmente em cérebros de embriões e de indivíduos neonatos, excedendo a expressão de ADAM23 α e ADAM23 β , tendo uma diminuição na sua expressão após o nascimento. Este perfil de expressão de ADAM23 γ condiz com o estágio de formação da rede neural, sugerindo que esta isoforma pode ter um papel importante nesta etapa de desenvolvimento (SUN *et al.*, 2004).

Cal e colaboradores (2000) demonstraram o papel adesivo de ADAM23. O domínio desintegrina de ADAM23 proveniente da expressão heteróloga em *E. coli* foi capaz de promover a adesão de neuroblastomas (NB100 e SHSY-5Y) e de astrocitomas (U373 e U87 MG) de maneira similar à fibronectina.

A análise da interação com integrinas mostrou que ADAM23 interage especificamente com integrina $\alpha v \beta 3$ promovendo adesão celular. Uma maior adesão celular foi observada quando células que expressavam funcionalmente a integrina $\alpha v \beta 3$ ($\beta 3$ -CHO-chinese hamster ovary) foram semeadas sobre poços recobertos com o domínio desintegrina de ADAM23. Esta adesão pôde ser bloqueada usando um anticorpo monoclonal anti- $\alpha v \beta 3$ (CAL *et al.*, 2000).

O processo de interação específica entre $\alpha v \beta 3$ e ADAM23 foi descrito como sendo mediado por uma pequena sequência de aminoácidos (AVNECDIT) na alça da desintegrina ADAM23. Neste aspecto, a interação $\alpha v \beta 3$ /ADAM23 mostrou-se independente da presença do motivo RGD (CAL *et al.*, 2000). O motivo RGD tem sido descrito como o principal domínio de reconhecimento pelas integrinas $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$ e $\alpha v \beta 8$ e está presente nas moléculas de matriz extracelular tais como vitronectina e fibronectina (RUOSLAHTI, 2003). No entanto, na família ADAM apenas a ADAM15 humana apresenta o motivo RGD e interage com as integrina $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 5 \beta 1$ de forma dependente deste motivo (NATH *et al.*, 1999).

ADAM23 tem sido descrita como uma proteína expressa predominantemente no sistema nervoso central e coração (SAGANE *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2004; GHILARDI *et al.*, 2008). Com relação à localização e expressão de ADAM23 no encéfalo, foi demonstrada a presença de altos níveis nas células piramidais nas regiões CA1/CA3 do hipocampo e nas células piramidais do córtex cerebral e, em níveis baixos, nos giros denteados do hipocampo. No cerebelo sua expressão concentra-se principalmente nas células de Purkinje e nas células granulares cerebelares (GOLDSMITH *et al.*, 2004; OWUOR *et al.*, 2009). Owuor e colaboradores (2009) verificaram que nas camadas moleculares do hipocampo e cerebelo, onde são encontrados muitos axônios, há uma grande quantidade de ADAM23.

Goldsmith e colaboradores (2004) verificaram por *Western blotting* que nas diferentes regiões do encéfalo (tronco cerebral, cerebelo e córtex) era expresso um antígeno de 70 kDa correspondente a ADAM23 uma vez que, em amostras

provenientes de camundongos nocautes para *Adam23* este antígeno não era detectado. Entretanto, células granulares cerebelares expressam outra forma de ADAM23 com massa de aproximadamente 100 kDa, que corresponde à forma imatura. Essas duas formas da proteína ADAM23 podem ser explicadas pelo processamento do seu pró-domínio por endopeptidases, sendo a forma imatura (100 kDa) não processada e, a forma madura (70 kDa) processada e na qual o pró-domínio está ausente (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Este processo de clivagem do pró-domínio do resto da proteína ocorre normalmente nas ADAMs sendo requisito para gerar a atividade metaloprotease (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Verificou-se que ADAM23 possui papel importante na diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrional) em neurônios bem como na formação de neuritos, o que sugere que esta proteína seja importante tanto em eventos iniciais quanto tardios da diferenciação neuronal (SUN *et al.*, 2007).

Além da integrina $\alpha v \beta 3$, ADAM23 possui outros dois parceiros moleculares identificados recentemente, as proteínas LGI1 (*Leucine rich glioma inactivated 1*) e LGI4. Entretanto, estas proteínas não possuem como receptor único ADAM23, elas também interagem com as ADAM11 e 22 (SAGANE *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009).

Owuor e colaboradores (2009) demonstraram que ADAM23 é o principal receptor para LGI1, pois na ausência de ADAM23, o crescimento de neuritos *in vitro* mediada por LGI1 é bastante diminuído assim como, a arborização dendrítica.

Como descrito anteriormente, animais nocautes para *Adam23* apresentam tremores e ataxia e sobrevivem no máximo 15 dias após o nascimento, o que sugere que a proteína ADAM23 tem um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso (MITCHELL *et al.*, 2001). Owuor e colaboradores (2009) verificaram que os animais nocautes para *Adam23* apresentam ataques convulsivos e entre estes ataques, também ocorrem episódios de ataxia. A epilepsia observada não pôde ser especificada como resultado da malformação cortical dos animais ADAM23^{-/-}, uma vez que estes animais não apresentaram nenhuma mudança na posição das células que expressam ADAM23 e, nenhuma mudança aparente nas camadas corticais. Estes dados sugerem que a patofisiologia da epilepsia parcial autossomal dominante com características auditivas causadas por mutação no gene *LGI1* pode ser devida a uma regulação anormal de LGI1 pela proteína ADAM23 (OWUOR *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos sugerem que a ADAM23 possa estar envolvida nos processos de câncer. Sua expressão é reduzida em linhagens tumorais e em tumores primários de mama e gástricos pelo silenciamento epigenético através da hipermetilação do promotor (COSTA *et al.*, 2003; TAKADA *et al.*, 2005).

Dados reportados por Ghilardi e colaboradores (2008) também mostraram a ausência de expressão gênica de *ADAM23* em linhagens celulares de carcinoma. Entretanto, células endoteliais derivadas de tumores apresentam uma maior expressão de ADAM23 que células endoteliais derivadas de tecido normal. Além disso, uma alta expressão foi verificada nos vasos sanguíneos em meduloblastoma e em tumor de encéfalo maligno. Estes dados relacionados com a alta expressão de ADAM23 em células endoteliais sugerem um papel importante para esta proteína na formação de novos vasos sanguíneos no tumor (GHILARDI *et al.*, 2008).

Recentemente foi demonstrado que ADAM23 atua na modulação negativa da integrina $\alpha\beta3$. Células da linhagem tumoral de mama MDA-MB 435 que tiveram a expressão de ADAM23 bloqueada apresentaram uma maior ativação de $\alpha\beta3$, ativação esta que resultou num maior potencial adesivo e migratório destas células na presença de vitronectina e fibronectina. Tanto a migração quanto a adesão puderam ser bloqueadas usando anticorpos monoclonais para $\alpha\beta3$, confirmando assim que o principal receptor envolvido nestes processos é esta integrina. Além disso, a perda de expressão de ADAM23 favoreceu a retenção de células tumorais no pulmão de camundongos imunodeprimidos. E ainda, o grupo novamente demonstrou que em tumores primários de mama o gene ADAM23 está silenciado por hipermetilação do promotor e, esta hipermetilação pôde ser associada com a alta incidência de metástase e a uma redução geral na sobrevivência dos pacientes (VERBISCK *et al.*, 2009).

2. 2 PROTEÍNA PRÍON CELULAR

O termo *príon* é derivado de *proteinaceous and infectious particle*, que foi descrito como agente causador das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) de natureza infecciosa, genética ou esporádica. Estas doenças são causadas pela conversão da proteína príon celular (PrP^{C}) na sua forma *scrapie* (PrP^{SC}) (PRUSSINER, 1998).

Em humanos o gene *PRNP* está localizado junto com dois outros genes (*PRND* e *PRNT*) na região 12/13 do cromossomo 20, formando o *locus PRNP*. *PRNP* possui dois éxons e a transcrição do segundo éxon codifica a proteína príon celular completa (revisado por MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

A proteína príon celular é uma proteína ancorada na membrana da célula por glicosilfosfatidil-inositol (GPI). A forma madura do PrP^{C} estende-se do resíduo 23 ao 231, uma vez que a sequência sinal para direcionamento ao retículo endoplasmático (resíduos 1-22) e o peptídeo sinal para adição da âncora de GPI (resíduos 231-253) são clivados antes da proteína chegar a superfície celular. A proteína madura possui um domínio amino-terminal (N-terminal) com quatro ou cinco cópias repetidas do octapeptídeo PHGGGWGQ (51-91), seguido de um domínio central composto de uma sequência de resíduos carregados positivamente e um domínio central hidrofóbico (resíduos 106-126, descrito como tendo propriedades neurotóxicas). O último domínio ou domínio globular carboxi-terminal (C-terminal) apresenta-se de forma estruturada contendo três α -hélices e duas folhas β -pregueadas que flanqueiam a primeira α -hélice. Neste domínio globular existem dois sítios de N-glicosilação (via asparagina - Asn, Asn-181 e 197 em humanos e Asn-180 e 196 em camundongos). Uma ponte dissulfeto entre as cisteínas 179 e 214 liga as duas α -hélices C-terminais (PUSINER, 1998; PRUSSINER *et al.*, 1998). Os domínios descritos para PrP^{C} encontram-se esquematizados na figura 2.

Embora praticamente todo PrP^{C} encontrado na célula esteja ligado a membrana plasmática via âncora de GPI, uma pequena porcentagem (menos que 10% do total) pode assumir orientação transmembrana, usando a região hidrofóbica do centro do molécula como região transmembrana e, também pode ser encontrado numa forma solúvel citoplasmática (MA *et al.*, 2002; HARRIS, 2003; STEWART & HARRIS, 2003; AGUZZI & STEELE, 2009).

Devido à ocupação variável dos resíduos asparagina, a proteína príon celular pode ser normalmente encontrada nas suas formas não, mono e di-glicosilada. A glicosilação parece ter um papel importante na conversão da proteína príon celular na sua forma *scrapie* (revisado por ERMONVAL *et al.*, 2003; LAWSON *et al.*, 2005). Foi demonstrado que células que tiveram a N-glicosilação inibida apresentaram uma aceleração na produção de PrP^{SC} (LEHMANN & HARRIS, 1997; KORTH *et al.*, 2000). Além disso, tem sido observado que algumas doenças priônicas apresentam alterações na glicosilação da proteína príon celular (ERMONVAL *et al.*, 2003).

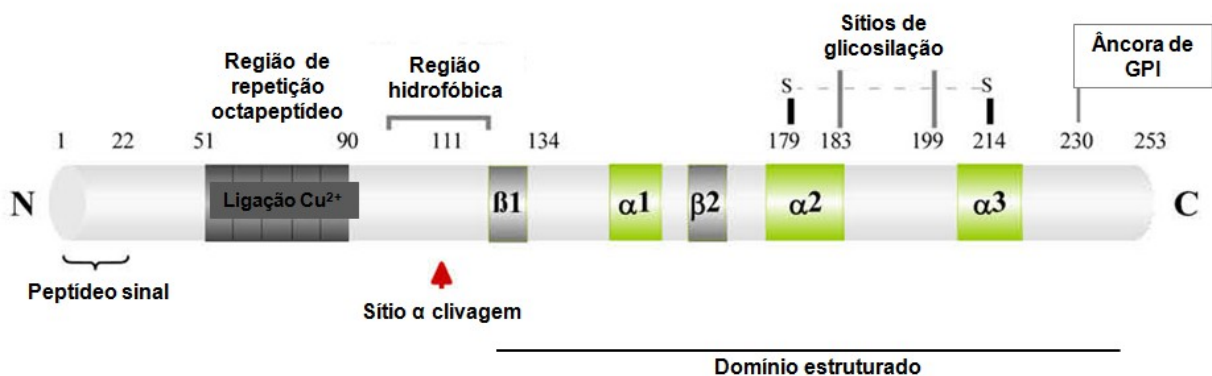


FIGURA 2 - Estrutura da proteína príon celular (PrP^C). A proteína é ancorada à membrana celular por uma âncora de GPI. A sequência sinal para direcionamento à membrana plasmática e o peptídeo sinal para GPI são clivados antes da proteína chegar à superfície celular. A forma madura estende-se do resíduo 23 ao 231, contendo uma região repetitiva de uma sequência octamérica (octapeptídeo), na qual podem ligar íons cobre; uma região hidrofóbica na qual a molécula pode ser clivada (sítio de α clivagem) e dois sítios de N-glicosilação. O domínio estruturado é formado por estruturas α-hélices e folhas β-pregueadas. Uma ponte dissulfeto promove a formação da estrutura tridimensional da proteína (adaptado MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

PrP^C é altamente expresso no sistema nervoso. Entretanto, sua expressão é observada em diversos tecidos, incluindo intestino, rim, fígado, órgãos linfóides entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008).

Na tentativa de melhor entender o papel de PrP^C no sistema nervoso, diferentes camundongos nocautes foram gerados. As primeiras linhagens geradas foram os animais *Prnp*^{0/0} ou Zürich I (BUELER *et al.*, 1992) e *Prnp*^{-/-} ou Edinburg

(MANSON *et al.*, 1994) e nestes animais nenhuma grande alteração no encéfalo foi observada. Os animais subsequentes Nagasaki, Rcm0 e Zürich II apresentaram severa ataxia e degeneração de células de Purkinje em idades avançadas, sendo que esta degeneração foi reparada pela re-introdução de *Prnp* (SAKAGUSHI *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 1999; ROSSI *et al.*, 2001). Recentemente, Le Pichon e colaboradores (2009) mostraram que animais nocautes para *Prnp*, independente da linhagem, apresentam problemas no processamento de informações sensitivas pelo sistema olfatório.

PrP^C pode sofrer endoproteólise entre os resíduos 106 - 126 da região hidrofóbica, promovendo a formação de um fragmento N-terminal solúvel (N1) e a geração de um fragmento associado a membrana chamado C1 (fragmento C-terminal ligado à membrana via GPI). Este tipo de clivagem é denominado de clivagem do tipo α , sendo que este processamento ocorre no encéfalo e em cultura de células (CHEN *et al.*, 1995). Foi descrita a participação direta de duas desintegrinas, ADAM10 e ADAM17 (TACE), na clivagem normal do PrP^C (VINCENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005), bem como a participação indireta da ADAM9, pela modulação que esta exerce sobre ADAM10 (CISSÉ *et al.*, 2005).

Uma forma solúvel de PrP^C pode ser encontrada no fluido cérebro-espinhal e no meio de cultura de células, sendo esta forma proveniente da clivagem da cadeia polipeptídica próximo ao sítio da âncora de GPI (Ser -231) (HOOPER, 2005). Este tipo de clivagem parece ser realizado por um mecanismo dependente de fosfolipases e proteases (PARKIN *et al.*, 2004). Recentemente, Taylor e colaboradores (2009) demonstraram que as ADAMs 9 e 10 também atuam nesta clivagem de PrP^C próxima à âncora de GPI.

Alterações no metabolismo de PrP^C podem levar a uma forma da proteína que é resistente à ação de proteases, insolúvel em detergentes e com tendência a agregação, denominada PrP^{SC} (*scrapie*). Assim como PrP^C, PrP^{SC} também é ligado à membrana via âncora de GPI (PRUSINER, 1998). Esta isoforma anormal não é proveniente de processamento alternativo de RNA mensageiro, uma vez que a proteína príon celular é codificada a partir de uma única sequência aberta de leitura localizada em um único éxon. Enquanto as sequências primárias da forma normal e da *scrapie* são as mesmas, há uma grande diferença nas estruturas secundárias. PrP^C é constituído predominantemente por α -hélices, enquanto que, PrP^{SC} é rico em regiões constituídas por folhas β -pregueadas (revisado por PRUSINER, 1998).

PrP^{SC} é o agente responsável pelas doenças priônicas, também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis, que incluem Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussle-Scheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal em humanos, *scrapie* em ovelhas e cabras e encefalopatias espongiforme bovina (PRUSINER, 1998). Essas doenças são caracterizadas por vacuolização e morte neural, astrogliose e deposição de agregados protéicos (CHESEBRO, 1998). As doenças priônicas são causadas pela conversão da proteína príon celular hospedeira em sua forma *scrapie*. Pode também ocorrer, embora raramente, de maneira espontânea bem como, devido a mutações no gene *PRNP* (PRUSINER, 1998).

Na superfície das células PrP^C e PrP^{SC} são encontrados em microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicosíngolipídeos, denominados *lipid rafts* ou também conhecidos como regiões de membrana resistentes à detergentes (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1997).

Esses microdomínios são formados na membrana pela condensação de esfingolipídeos saturados com moléculas de colesterol, produzindo assim um ambiente lipídico e ordenado (SIMONS & TOOMRE, 2000). Neste ambiente residem algumas proteínas GPI ancoradas, mas excluem a maioria das proteínas transmembranas. Os *lipid rafts* estão envolvidos em processos de sinalização e endocitose (PIKE, 2004).

Embora a âncora de GPI seja um sinal determinante para a associação da proteína príon celular aos *lipid rafts* (TARABOULOS *et al.*, 1995), esta proteína também apresenta na região N-terminal, os aminoácidos 23-90, uma outra sequência sinal para inserção em *rafts* que parece ser mais determinante que a própria âncora de GPI (WALMSLEY *et al.*, 2003).

Foi visto que a associação com os *lipid rafts* ocorre já no início da síntese de PrP^C no retículo endoplasmático, sendo que esta associação é necessária para que haja o enovelamento correto de PrP^C (SARNATTARO *et al.*, 2004).

Muitos trabalhos têm demonstrado que estes microdomínios de membrana estão envolvidos na conversão de PrP^C em PrP^{SC} (TARABOULOS *et al.*, 1995; KANEKO *et al.*, 1997; BARON *et al.*, 2003; BATE *et al.*, 2004). Além de estarem presentes nos mesmos microdomínios de membrana, a depleção de colesterol leva a uma redistribuição de PrP^C para fora dos *rafts* e uma diminuição na formação da forma *scrapie* (TARABOULOS *et al.*, 1995; MANGÉ *et al.*, 2000; BATE *et al.*, 2004.).

Formas recombinantes transmembrana de PrP^C não estão localizados em *lipid rafts* e não servem como substrato para formação de *scrapie* (TARABOULOS *et al.*, 1995).

Usando modelos de membranas sintéticas semelhante à *rafts*, Sanghera e Pinheiro (2002) demonstraram que formas recombinantes de PrP possuem afinidade e ligam-se à lipídeos de membrana de maneira dependente de pH. Formas recombinantes de α -hélices ligam-se aos *rafts* em pH 7,0 e formas de folha β -pregueada ligam-se em pH 5,0 e de maneira mais forte que as formas α -hélices. Este dado é importante uma vez que, a principal diferença entre a forma normal de PrP^C e a forma *scrapie* está na diferença na estrutura secundária, sendo a forma *scrapie* enriquecida de folhas β -pregueada. Formas de folha β -pregueada de PrP ligados à *rafts* induzem um dobramento incorreto de outras moléculas de PrP sem promover distúrbio da bicamada lipídica, mas com alto potencial de fibrilização. Além disso, o fato de ocorrer uma forte ligação de PrP em pH ácido, no qual proteínas apresentam uma maior propensão de estarem incorretamente enoveladas, sugere que mudanças iniciais na estrutura de PrP devem ocorrer nos endossomos (PINHEIRO, 2006).

Tem sido demonstrado que PrP^C é constitutivamente endocitado, sendo que grande parte retorna à superfície celular e apenas uma pequena fração é degradada nos lisossomos (HARRIS, 2003; CAMPANA *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2007; LINDEN *et al.*, 2008). O papel exato da internalização de PrP^C é desconhecido, mas as vias endocíticas de reciclagem são de grande interesse uma vez que elas podem ter um papel importante na conversão de PrP^C em sua forma *scrapie*. Trabalhos sugerem que a conversão deve ocorrer inicialmente na membrana ou ao longo da via endocítica (CAUGHEY & RAYMOND, 1991 a; CAUGHEY *et al.*, 1991 b; BORCHELT *et al.*, 1992; TARABOULOS *et al.*, 1992).

Embora PrP^C seja uma molécula encontrada em *lipid rafts* e, estes microdomínios não se apresentam recobertos por clatrina, muitos trabalhos têm demonstrado que a principal via endocítica de PrP^C é mediada por vesículas recobertas por clatrina (SHYNG *et al.*, 1995; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; SARNATTARO *et al.*, 2009). Sunyach e colaboradores (2003) reportaram que em neuroblastomas e em cultura de neurônios, PrP^C é endocitado rapidamente sendo encontrado em endossomos iniciais provenientes de vesículas recobertas por clatrina. Além disso, outros trabalhos mostram que a endocitose da proteína prion

celular pode ser inibida tanto pelo tratamento com soluções hipertônicas de sacarose que desfazem o arcabouço de clatrina, como por drogas que inibem especificamente a endocitose mediada por clatrina (TAYLOR *et al.*, 2005; SARNATTARO *et al.*, 2009). A região N-terminal de PrP^C, que contém o grupo de resíduos básicos, é crucial para a endocitose mediada por clatrina (SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005).

A endocitose mediada por clatrina de proteínas ancoradas por GPI, como PrP^C, não é usual, uma vez que estas moléculas não apresentam domínio citoplasmático para associar-se diretamente com proteínas adaptadoras e com clatrina (LAKHAN *et al.*, 2009). Além disso, microdomínios de membrana rico em colesterol e glicosíngolípídeos não são recobertos por clatrina (SIMONS & TOOMRE, 2000). Contudo, Sunyach e colaboradores (2003) evidenciaram que PrP^C sai destes microdomínios e entra em regiões da membrana que são fossas recobertas por clatrina. Posteriormente, Taylor e colaboradores (2005) confirmaram que PrP^C pode movimentar-se para fora dos *rafts* e ser endocitado via clatrina. Neste mesmo trabalho, os autores demonstram que a ligação de íons de cobre na região do octapeptídeo promove a movimentação de PrP^C para fora dos *rafts* (TAYLOR *et al.*, 2005). Mesmo com a movimentação de PrP^C para regiões de membrana contendo fossas recobertas por clatrina, ainda faltava um elemento chave para promover sua endocitose mediada por clatrina, que seriam receptores transmembrana que pudessem conectá-lo ao espaço intracelular e promover o recrutamento da maquinaria necessária para este tipo de endocitose. A proteína de 67 kDa receptora de laminina (67 kDa/LR) foi descrita como candidata a receptor transmembrana de PrP^C, sendo responsável por 25-50% da internalização de PrP^C (GAUCZYNSKI *et al.*, 2001). No entanto, neste trabalho foi utilizado PrP^C recombinante solúvel, que fica fora do contexto de *lipid rafts*, e também não foi demonstrada qual a via responsável por esta endocitose. Mais tarde, Taylor e colaboradores (2007) mostraram que a proteína LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related protein 1*), um membro da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade altamente expresso em células neuronais, é o receptor de PrP^C responsável por promover sua endocitose via clatrina.

A endocitose mediada por cavéolas, que são regiões estáveis na membrana celular associadas aos *lipid rafts*, também já foi descrita como sendo um possível mecanismo envolvido no tráfego de PrP^C (VEY *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2003;

WILSON *et al.*, 2007). Em células CHO, PrP^C está co-localizado com caveolina 1, uma das principais proteínas envolvidas na formação de cavéolas. Neste modelo, cavéolas contendo PrP^C endocitado não se intersectam com compartimentos provenientes da endocitose via clatrina, e este PrP^C chega aos endossomos tardios por um via não clássica de endossomos (PETERS *et al.*, 2003).

Recentemente, foi demonstrado que a endocitose de PrP^C em células epiteliais FRT de camundongo pode ocorrer por um mecanismo dependente de colesterol e clatrina (SARNATTARO *et al.*, 2009).

Embora PrP^C e sua forma *scrapie* sejam objetos de extensos estudos, o papel fisiológico de PrP^C ainda permanece obscuro.

Uma série de evidências dá suporte à hipótese de que PrP^C está envolvido no metabolismo do cobre. Esta proteína pode-se ligar ao cobre através de múltiplas repetições octaméricas em sua porção N-terminal estando relacionado às respostas celulares ao estresse oxidativo (BROWN *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 2003). Animais deficientes em PrP^C apresentam uma diminuição de cobre no cérebro e uma menor atividade superóxido dismutase em relação aos animais normais (revisado por BROWN, 2001).

Outras funções para a proteína príon celular têm sido identificadas através da sua interação com outras moléculas. Pela associação com a proteína STI1 (*Stress Inducible Protein-1*), PrP^C promove a ativação de mecanismos neuroprotetores (via cAMP/PKA e Erk) em neurônios de retina que foram induzidos à apoptose por inibidores de síntese protéica (ZANATA *et al.*, 2002; CHIARINI *et al.*, 2002). Foi demonstrado também que esta interação promove a neuritogênese pela ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e neuroproteção pela ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) em cultura de neurônios hipocámpais (LOPES *et al.*, 2005).

Outros dados indicam que a interação de PrP^C e N-CAM promove neuritogênese através da ativação de fyn (SANTUCCIONE *et al.*, 2005).

O potencial adesivo de PrP^C foi demonstrado em células de neuroblastoma (N2a) que superexpressam PrP^C. Essas células apresentam uma alta taxa de agregação quando comparadas com células normais, sendo que esta agregação é inibida por anticorpos anti-PrP^C e também quando as células são tratadas com uma enzima que promove a liberação de moléculas ancoradas à membrana via GPI (enzima fosfolipase C). Esses resultados mostram que a agregação é em grande

parte mediada pela ligação transcelular de PrP^C à alguma molécula receptora ainda desconhecida (MANGÉ *et al.*, 2002). Além disso, foi descrito que PrP^C é um receptor para laminina e esta interação é importante para a adesão neuronal e para a extensão e manutenção de neuritos em culturas de células da linhagem PC12 e neurônio hipocámpais (GRANER *et al.*, 2000).

Com relação à interação com proteínas de matriz, além da laminina, PrP^C também liga-se a vitronectina, mas não liga fibronectina e nem colágeno tipo IV. A interação PrP^C/vitronectina promove o crescimento axonal em neurônios provenientes da raiz do gânglio dorsal. Entretanto, crescimento axonal promovido pela vitronectina continua sendo observado neste mesmo tipo celular proveniente de animais deficientes para PrP^C, resultado que pode ser explicado pelo aumento da atividade da integrina $\alpha\beta 3$ nesses neurônios (HAJJ *et al.*, 2007).

Muitos outros parceiros moleculares tem sido descrito para PrP^C, no entanto, para a maioria deles, ainda não foi identificado qual a relevância biológica (MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

Dados reportados por Schmitt-Ulms e colaboradores (2004) demonstraram que muitas proteínas envolvidas na adesão celular e em neuritogênese estão presentes nas mesmas regiões especializadas de membrana nas quais PrP^C é encontrado. Dentre estas moléculas foi identificada a proteína N-CAM, já descrita como parceiro molecular de PrP^C, e a proteína ADAM23 (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que ADAM23 e PrP^C também podem ser parceiros moleculares, entretanto, nenhuma interação entre ADAM23 e PrP^C havia sido demonstrada até o momento.

Os dados obtidos anteriormente no laboratório de Neurobiologia (COSTA, 2007) e durante o desenvolvimento deste trabalho demonstram a interação *in vitro* entre ADAM23 e PrP^C (COSTA *et al.*, 2009). A descoberta de parceiros moleculares para ADAM23 podem vir elucidar a importância desta proteína em processos fisiológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 CLONAGEM DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM VETOR DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PGEX-2T

Um fragmento gênico contendo 594 pares de bases correspondente à sequência codificadora para o domínio metaloprotease da proteína ADAM23 humana (construção 1, aa 299-496), um fragmento gênico contendo 225 pares de bases correspondente à sequência codificadora para o domínio desintegrina (construção 2, aa 511-585) e um fragmento contendo 861 pares de bases correspondente à sequência codificadora para os domínios supracitados juntos (construção 3, aa 299-585) foram obtidos por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase), a partir de cDNA da molécula inteira, proveniente da construção pcDNA3.1- *ADAM23-HA* (CAL *et al.*, 2000) cedida gentilmente pelo Dr. Santiago Cal (Universidad de Oviedo, Espanha). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram: *forward* 5'-CGGGATCCATGAAATATTTGGAACCTTATGATTG-3' e *reverse* 5'-CGGAATTCTCATGGCCTGTTGAAAAGGC-3' para a construção 1; *forward* 5'-CGGGATCCGAAGCTGGGGAGGAGTGTG-3' e *reverse* 5'-CGGAATTCTCAATGAAGATTTGGTGGGCAC-3' para a construção 2 e, para a construção 3 a combinação do *forward* da construção 1 com o *reverse* da construção 2. Os fragmentos amplificados foram clivados com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e clonados no vetor para expressão heteróloga em *E. coli* pGEX-2T (GE Healthcare).

O vetor pGEX-2T possui a sequência codificadora para a proteína glutathiona S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* 5' montante ao sítio de policlonagem, o que permite a produção da proteína de interesse fusionada na sua região N-terminal à GST. Proteínas fusionadas à GST podem ser facilmente purificadas pelo sistema de afinidade à matriz cromatográfica contendo glutathiona (glutathiona sepharose 4B, GE Healthcare). A expressão protéica neste vetor está sob controle do promotor *tac*, o qual é induzível por isopropil β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, composto análogo à lactose). Além disso, este vetor carrega o gene *lac*^q, cujo produto é uma proteína repressora que liga a região do operador no promotor *tac*, prevenindo assim a expressão protéica até que ocorra a

indução com IPTG. Desta forma, este sistema não requer estirpes de *E. coli* específicas para a expressão.

O vetor pGEX-2T possui o gene para β -lactamase, o que confere resistência ao antibiótico ampicilina, podendo então ser selecionado em meios contendo ampicilina.

Uma figura representativa mostrando os domínios da proteína presentes em cada construção encontra-se em anexo (anexo 1) assim como uma tabela contendo informações adicionais de cada construção (anexo 2).

3. 1. 1. Reação de PCR para obtenção das sequências codificadoras (insertos) dos domínios de interesse a serem clonados em vetor pGEX-2T

Para cada reação de PCR foram misturados 1 nanograma de cDNA molde (pcDNA3.1- *ADAM23*-HA); 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse* adequado para cada construção); 0,4 mM mix dNTP (Fermentas), 2,5 μ l do tampão de reação 10x concentrado (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100 mM KCl; 1% Triton X-100; 1 mg/ml BSA; 20 mM MgSO_4) (Fermentas) e 1 unidade da enzima *Pfu* DNA Polimerase (Fermentas). O volume final da reação (25 μ l) foi completado com água ultrapura autoclavada. O DNA molde foi desnaturado a 94 °C por 3 min e posteriormente submetido a 35 ciclos consecutivos de desnaturação (95 °C por 45 seg), hibridização dos oligonucleotídeos ao DNA (55°C por 45 seg), e extensão da cadeia de DNA (72°C por 3 min). Após os 35 ciclos, um último ciclo de extensão de 10 min a 72°C foi realizado. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0 % sob voltagem constante de 70 V por 30 minutos.

O gel de agarose foi preparado dissolvendo a agarose em tampão TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM EDTA) ao qual foi adicionado 2,5 μ l Brometo de etídio (10 mg/ml) (AMRESCO).

Após a separação eletroforética das amostras, o gel foi visualizado com auxílio de luz ultravioleta e as bandas correspondentes aos insertos foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina para bisturi.

As bandas cortadas foram submetidas ao processo de gel extração usando kit QIAquick gel extraction (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3. 1. 2 Digestão dos insertos e do vetor pGEX-2T por endonucleases de restrição

Os produtos purificados da PCR e o vetor pGEX 2T (8 µg) foram digeridos em tampão R (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA) (Fermentas) com 10 e 15 unidades, respectivamente, da endonuclease de restrição *Bam*HI (Fermentas) em um volume de reação de 50 µl (completado com água ultrapura autoclavada) por 16 horas a 37°C. A digestão foi parada pela inativação da enzima de restrição por aquecimento a 65°C por 20 minutos. Estes produtos foram submetidos a uma nova digestão com 10 e 15 unidades, para os produtos de PCR e para o vetor respectivamente, da endonuclease de restrição *Eco*RI (BioLabs) por 16 horas a 37°C. A digestão foi novamente parada pela inativação da enzima de restrição por aquecimento a 65°C por 20 minutos.

Os fragmentos e o vetor digerido foram submetidos ao processo de purificação por gel extração como descrito acima no item 3.1.1.

3. 1. 3 Reação de ligação insertos/vetor pGEX-2T

As sequências codificadoras amplificadas e o vetor purificado após a digestão foram quantificados por espectrofotometria UV a 260 nm em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) como requisito necessário para preparar a reação de ligação.

Os insertos foram ligados ao vetor pGEX-2T, na relação molar de 5:1 (inserto:plasmídeo) em volume de reação de 10 µl, contendo tampão de ligação (50 mM Tris-HCl, pH7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1mM ATP; 25 µg/ml BSA) e 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (BioLabs). A reação foi incubada por 16 h a 16°C. A reação de ligação foi parada pela inativação da enzima por aquecimento a 65°C por 10 min.

Os produtos da reação de ligação foram usados para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli* (Invitrogen).

3. 1. 4 Preparação de estirpes de *E. coli* eletrocompetentes

As estirpes de *E. coli* foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001). Uma colônia da cepa de interesse crescida em LB/ágar (10 g/l NaCl, 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de peptona, 15 g/l ágar) (sem

antibiótico no caso da estirpe DH5 α) foi inoculada em 5 ml de LB (10 g/l NaCl, 5 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de peptona) e cultivada por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm (pré-cultura).

Uma alíquota de 1 ml da pré-cultura foi utilizada para inocular 100 ml de LB. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até a absorbância 0,4 – 0,5 a 600 nm. Após esse tempo a cultura foi resfriada no gelo por 10 minutos, e as células coletadas por centrifugação a 4000 xg por 15 minutos a 4°C. Então o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 ml de água ultrapura, estéril e gelada. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 100 ml de solução de glicerol 10% (v:v) estéril e gelada. A suspensão celular foi novamente centrifugada a 4000 xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensado em 240 μ l de glicerol 10% estéril e gelado. Alíquotas de 40 μ l desta suspensão bacteriana foram feitas e armazenadas a -80°C.

3. 1. 5 Transformação de estirpes de *E. coli* eletrocompetentes com os produtos de ligação

Alíquotas de bactérias eletrocompetentes (eficiência de transformação de 1×10^9 ufc/ μ g DNA) da estirpe DH5 α de *E. coli* foram retiradas do freezer -80°C e mantidas em gelo. Em cada alíquota de bactéria eletrocompetente foi adicionado 1 μ l de cada produto de ligação descrito no item 3.1.3, ficando as células incubando no gelo durante 1 minuto. Após a incubação, as misturas foram transferidas para cubetas de eletroporação (0,1 cm gap, Bio Rad) e submetidas a uma descarga nominal de 1,8 kV com capacitância de 25 μ F e impedância de 200 Ω (Bio Rad Gene Pulser Xcell). Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 ml de meio LB sem antibiótico em cada cubeta. As suspensões bacterianas foram então transferidas para tubos estéreis de polipropileno de 15 ml e incubados a 37°C sob agitação de 90 rpm por 1 h. Alíquotas de 100 e 900 μ l de cada suspensão celular foram plaqueadas em meio LB/ágar contendo ampicilina (100 μ g/ml, Gibco).

3. 1. 6 PCR de colônia para verificação de clones positivos

As colônias que cresceram em meio sólido contendo antibiótico foram inoculadas em 50 µl de meio LB contendo o antibiótico ampicilina. Esta cultura serviu como fonte de DNA molde para a reação de PCR de colônia.

Para cada reação de PCR foram misturados 1 µl da cultura líquida, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse* adequado para cada construção), 0,2 mM mix dNTP, 0,5 unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) e 1 µl do tampão de reação 10x concentrado para esta enzima (100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% Noidet p40; 200 mM (NH₄)₂SO₄). O volume final da reação (10 µl) foi completado com água ultrapura autoclavada. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Após a separação eletroforética, o gel foi visualizado com auxílio de luz ultravioleta e fotodocumentado em fotodocumentador (ChemiDoc System- Bio Rad).

3. 1. 7 Purificação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)

Os clones recombinantes (positivos na reação de PCR de colônia, item 3.1.6) foram cultivados em 5 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado durante 16 h sob agitação constante a 37°C. Esta cultura foi então centrifugada a 12000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente e os plasmídeos recombinantes foram purificados com o sistema de mini preparação de plasmídeo QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3. 1. 8 Digestão dos clones recombinantes para confirmação da presença dos insertos de interesse

Após a purificação dos plasmídeos provenientes dos clones positivos (item 3.1.7), foi realizada uma digestão nas mesmas condições descritas no item 3.1.2 usando as endonucleases de restrição usadas na clonagem para verificação da liberação dos insertos. Para esta análise foi utilizado aproximadamente 0,1 µg de DNA plasmidial. O material digerido foi analisado em gel de agarose 1%.

3. 2 CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO CODIFICANTE PARA OS DOMÍNIOS DESINTEGRINA E REGIÃO RICA EM CISTEÍNA NO VETOR DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PET-28A

Um fragmento gênico contendo 648 pares de bases correspondente a sequência codificadora para os domínios desintegrina e cisteína da proteína ADAM23 humana (construção 4, aa 511-726) foi obtido por meio de PCR a partir de cDNA da molécula inteira, proveniente da construção pcDNA3.1- *ADAM23-HA* (CAL *et al.*, 2000). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram: *forward* 5'-CGGGATCCGAAGCTGGGGAGGAGTGTG -3' e *reverse* 5'-CCCAAGCTTTCATAGGCACTTCCGATCTAA -3'. O fragmento amplificado foi clivado com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III e clonado no vetor para expressão heteróloga em *E. coli* pET-28a (Novagen) (ver anexos 1 e 2).

O vetor pET-28a carrega a sequência codificadora para etiqueta de 6 histidinas na região 5' montante ao sítio de policlonagem, o que confere uma etiqueta de 6 histidinas na região N-terminal da proteína recombinante. A etiqueta de histidina permite a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal imobilizado.

Genes clonados no sistema pET estão sob forte controle do promotor do bacteriófago T7. Desta maneira, a expressão da proteína recombinante somente é induzida pelo fornecimento de uma fonte de T7 RNA polimerase na célula hospedeira. Então, para que seja possível a expressão da proteína recombinante é necessário o uso de uma estirpe lisogênica do bacteriófago lambda DE3, que possui o gene 1 do bacteriófago T7, cujo produto é a T7 RNA polimerase, sob controle do promotor *lacUV5*. Este promotor é um mutante do promotor *lac*, sendo induzido por IPTG.

O vetor pET-28a gene de resistência à canamicina, o que permite a sua seleção em meios contendo este antibiótico.

3. 2. 1 Reação de PCR para obtenção da sequência codificadora para os domínios desintegrina e cisteína

A reação de PCR para obtenção das sequência codificadora para os domínios desintegrina e cisteína foi realizada nas mesmas condições descritas no item 3.1.1.

3. 2. 2 Digestão do inserto e do vetor pET-28a por endonucleases de restrição

Os produtos purificados da PCR e o vetor pET-28a (4 µg) foram digeridos em tampão R com 10 unidades da endonuclease de restrição *BamHI* (Fermentas) em um volume de reação de 50 µl (completado com água ultrapura autoclavada) por 16 horas a 37°C. A digestão foi parada pela inativação da enzima de restrição por aquecimento a 65°C por 20 minutos. Então este produto foi submetido a uma nova digestão com 10 unidades da endonuclease de restrição *HindIII* (Fermentas) por 16 horas a 37°C. A digestão foi novamente parada pela inativação da enzima de restrição por aquecimento a 65°C por 20 minutos.

Os fragmentos e o vetor digerido foram submetidos ao processo de purificação por gel extração como descrito acima no item 3.1.1.

3. 2. 3 Reação de ligação inserto/vetor pET-28a

A reação de ligação foi realizada como descrita no item 3.1.3.

O produto da reação de ligação foi usado para transformar uma alíquota de bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli* (Invitrogen). Após a recuperação das células, alíquotas de 100 e 900 µl da suspensão celular foram plaqueadas em meio LB/água contendo canamicina (30 µg/ml, Gibco).

Colônias que cresceram em meio sólido foram submetidas à PCR de colônia (descrito no item 3.1.6) e os clones positivos foram crescidos em meio líquido para posterior purificação de plasmídeo em pequena escala (item 3.1.7).

Após a purificação dos plasmídeos provenientes dos clones positivos, foi realizada uma digestão nas mesmas condições descritas no item 3.2.2 para verificação da liberação dos inserto.

Os clones positivos que liberaram o inserto com tamanho esperado foram sequenciados no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, no laboratório de Biologia Molecular e Genômica.

3. 3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIOS DE ADAM23 CLONADOS EM VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-2T

3. 3. 1 Análise da expressão das proteínas de interesse em pequena escala

A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo de *E. coli* foi realizada como descrito por Sambrook *et al.* (2001), a partir da introdução do plasmídeo contendo a sequência codificadora para o domínio de interesse na estirpe de *E. coli* DH5 α (Invitrogen).

Bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α foram transformadas com aproximadamente 25 ng do plasmídeo de interesse por eletroporação. Após a eletroporação, as células foram incubadas durante 1 hora em 1 ml de meio 2XYT (16 g/l de peptona de caseína; 10 g/l de extrato de levedura; 5 g/l de NaCl) a 37°C. Após este tempo, a cultura foi plaqueada em meio sólido (2XYT/ágar) contendo ampicilina na concentração de 100 μ g/ml.

Colônias que cresceram em meio sólido (escolhidas aleatoriamente desde que estivessem isoladas) foram inoculadas em 2 ml de meio 2XYT contendo o antibiótico apropriado e cultivadas durante 16 horas a 37 °C e em agitação constante de 220 rpm. Esta cultura saturada foi diluída 1:100 em 10 ml de meio 2XYT/antibiótico para posterior crescimento a 30° C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm, cada cultura foi dividida em 2 partes, sendo que em uma das duas subculturas foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante e a outra subcultura não recebeu o indutor de expressão. Então, as subculturas foram incubadas a 30°C sob agitação constante por mais quatro horas. Uma alíquota de 2 ml de cada subcultura, a induzida e seu controle não induzido, foi coletada e centrifugada a 4000 xg por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 100 μ l tampão de amostra redutor duas vezes concentrado (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% de SDS; 40% glicerol; 0,2% azul de bromofenol e 200 mM β -

mercaptoetanol) e 20 µl de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE (SAMBROOK *et al.*, 2001) e o gel corado com azul de Coomassie para verificação das colônias de alta expressão.

3. 2. 2 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes através da matriz cromatográfica glutathiona sepharose 4B (GE Healthcare)

Clones com alta taxa de expressão das proteínas recombinantes GST-ADAM23 foram utilizados para a expressão em larga escala.

Um pré-inóculo em 50 ml de meio 2XYT/ampicilina foi feito para cada clone de cada construção, e estes ficaram crescendo por 16 horas a 37°C sob agitação. Após o tempo de crescimento, obedecendo a uma diluição de 1:100, 4 ml de pré inóculo foram adicionados a 400 ml de meio 2XYT com antibiótico e deixadas sob agitação constante a 30°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600 nm, foram induzidas à expressão utilizando 0,1 mM de IPTG e a cultura foi incubada por mais quatro horas.

Após a indução, as culturas foram centrifugadas a 4000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram então descartados completamente e as culturas sedimentadas foram ressuspensas em 20 ml de tampão de PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) acrescido de 1 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich) e 2 mM PMSF (fluoreto phenylmethanesulfonyl) – inibidor de cisteína e serinoproteases (Sigma-Aldrich). O lisado foi incubado em banho de gelo por 15 minutos (para melhor atividade da lisozima) e, posteriormente, submetido à lise mecânica em prensa de French (1000 psi). Logo após foi adicionado aos lisados o detergente Triton-X100 (Sigma-Aldrich) na concentração final de 1%, e estes permaneceram incubando sob agitação a 4°C por 30 minutos. Foi feita então uma etapa de clareamento dos lisados bacterianos através de centrifugação por 30 minutos a 9000 xg. Os sobrenadantes deste clareamento (fração solúvel do lisado) foram filtrados em membrana de 0,45 µm. As frações insolúveis (denominados corpos de inclusão) também foram coletadas para análise.

Um volume de 300 µl da matriz cromatográfica glutathiona sepharose 4B, previamente equilibrada com PBS, foi utilizado para a purificação das proteínas fusionadas à GST. A matriz foi incubada com lisados bacterianos a 4°C por 1 hora sob agitação. Posteriormente as suspensões foram centrifugadas (800 xg) para a

recuperação da matriz e esta lavada três vezes com PBS. As proteínas ligadas na resina foram eluídas com tampão de eluição de glutathione reduzida (10 mM de glutathione reduzida em 50 mM de Tris-HCl pH 8,0) em cinco frações de 500 µl. As frações que continham proteínas eluídas foram combinadas e dialisadas contra um total de 6 litros de PBS, 1 mM PMSF (3 trocas de 2 litros de tampão cada) a 4°C para a retirada da glutathione livre.

3. 3. 3 Separação das proteínas fusionadas à GST por SDS-PAGE

As proteínas fusionadas à GST correspondentes aos diferentes domínios de ADAM23 provenientes da eluição (elutos), juntamente com alíquotas da resina após eluição (resina), da fração do lisado (lisado), da lavagem da resina (lavagem), da fração insolúvel (insolúvel) e das colônias bacterianas não induzidas (NI) e induzidas (I) foram resolvidas por SDS-PAGE.

3. 3. 4 Análise da purificação das proteínas fusionadas à GST por *Western blotting* usando o anticorpo anti-GST

As amostras separadas por SDS – PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocellulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 16 horas sob voltagem de 25 V em tampão de transferência gelado (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). As membranas foram bloqueadas durante duas horas com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-GST (produzido no laboratório de Neurobiologia) na concentração de 1:2000 diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4°C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes de três minutos com TBST e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina de coelho, conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:4000. A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-

radiograma Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) foram exposto à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

3. 3. 5 Protocolos para solubilização de corpos de inclusão

Visto que as proteínas recombinantes GST-metaloprotease e GST-metaloprotease+desintegrina permaneceram na fração insolúvel do lisado bacteriano, ou seja, formaram corpos de inclusão, modificações no protocolo inicial foram realizadas na tentativa de solubilizar estas proteínas.

3. 3. 5. 1 Diminuição nos níveis de expressão

O protocolo para a expressão em larga escala é o mesmo já descrito anteriormente. As modificações realizadas foram: a diminuição na temperatura de crescimento das bactérias de 30°C para 20°C e a diminuição do agente indutor IPTG, cuja concentração inicial era de 0,1 mM e foi modificada para 0,05 mM.

3. 3. 5. 2 Utilização de agente caotrópico durante a lise

Na tentativa de solubilizar os corpos de inclusão utilizou-se o tampão 3 M de uréia (Invitrogen) (3 M uréia; 10 mM Tris-HCl ph 8,0; 150 mM NaCl). Nesta concentração, a uréia promove uma desnaturação parcial da proteína de interesse bem como da proteína de fusão GST permitindo que esta última se ligue à matriz cromatográfica.

Outra tentativa foi utilizar 0,5% do detergente aniônico N-lauril-sarcosil (sarcosil) (Sigma-Aldrich) (0,5% Sarcosil; 10 mM Tris-HCl ph 8,0; 150 mM NaCl).

3. 4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA $_6$ HIS-DESINTEGRINA+CISTEÍNA ($_6$ HIS-DES+CIS) CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO PET-28A

3. 4. 1 Análise da expressão das proteínas de interesse em pequena escala

Bactérias eletrocompetentes da estirpe BL21 Star (DE3) (Invitrogen) foram transformadas com aproximadamente 25 ng do plasmídeo de interesse por eletroporação. Após a eletroporação, as células foram recuperadas e plaqueadas em meio sólido (LB/ágar) contendo antibiótico apropriado (canamicina, 30 µg/ml).

Colônias que cresceram em meio sólido foram escolhidas aleatoriamente e seguiu-se a expressão em pequena escala para análise dos clones com melhor taxa de expressão como descrito no item 3.3.1. As culturas foram induzidas com 1mM de IPTG.

3. 4. 2 Expressão em larga escala e purificação da proteína recombinante $_6$ His-desintegrina+cisteína ($_6$ His-des+cis) por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)

Um clone com alta taxa de expressão da proteína recombinante foi utilizada para a expressão em larga escala. Foi feito um pré-inóculo em 50 ml de meio LB/canamicina que cresceu por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 220 rpm. Após o tempo de crescimento, obedecendo a uma diluição de 1:100, 10 ml de pré-inóculo foram adicionados a 1000 ml de meio LB com antibiótico e deixadas sob agitação constante a 30°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600 nm, foram induzidas à expressão utilizando 1 mM de IPTG. Após 4 horas de indução as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram então descartados completamente e as culturas sedimentadas foram ressuspensas em 20 ml de tampão nativo (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e congeladas a -80° por 16 horas.

A suspensão (células e tampão nativo) foi descongelada e submetida à lise mecânica em prensa de French. Após a lise mecânica, o lisado foi centrifugado por 15 min a 9000 xg a 4°C. O sobrenadante foi então passado para um tubo cônico de 50 ml ao qual se adicionou 800 µl de resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN)

(previamente equilibrada com o tampão de lise nativa) e a fração insolúvel desta centrifugação foi mantida a -80°C para posteriormente ser utilizada para lise desnaturante.

O lisado foi incubado com a resina por 1 hora a 4°C sob agitação constante. Após a incubação, a resina (com as proteínas ligadas) foi separada do restante do lisado por centrifugação em baixa velocidade (800 xg) por 2 minutos. A resina foi lavada 5 vezes com um volume de 15 ml de tampão de lise nativa contendo 40 mM de Imidazol. Após as lavagens, a resina foi ressuspensa em 5 ml de tampão de lise nativa e colocada aos poucos em uma coluna de poliestireno de 2 ml (Pierce) para que a coluna de resina se formasse. Então foi adicionado lentamente tampão de eluição (tampão nativo contendo 250 mM de Imidazol) e alíquotas de 1 ml foram coletadas da coluna, totalizando 15 alíquotas.

A fração insolúvel proveniente da lise nativa foi utilizada para purificar a proteína recombinante que formou corpos de inclusão a partir do protocolo de purificação híbrida (Invitrogen).

A purificação híbrida consistiu na utilização de um agente caotrópico para solubilizar os corpos de inclusão seguida de lavagens usando tampões que promovem o redobrimento da proteína inicialmente desnaturada seguida da eluição da proteína em tampão nativo. Primeiramente, a fração insolúvel proveniente da centrifugação da lise nativa foi solubilizada com 15 ml de tampão contendo 6 M de hidrocloreto de guanidina (6 M Hidrocloreto de Guanidina; 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7,8; 500 mM NaCl) e com auxílio de agulha 21 Gauge. A suspensão foi deixada sob agitação constante por 10 minutos e então centrifugada por 15 minutos a 3000 xg . O sobrenadante desta centrifugação foi colocado em tubo de 50 ml e incubado com 1 ml de resina de Ni-NTA-Agarose (previamente equilibrada com o tampão 6 M de hidrocloreto de guanidina) por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esta incubação, a suspensão foi centrifugada por 1 minuto a 800 xg para retirada do lisado que não ligou na resina. Em seguida a resina foi incubada por 2 minutos com 8 ml de tampão desnaturante (8 M Uréia; 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7,2; 500 mM NaCl) seguida da centrifugação de 1 minuto a 800 xg para retirada deste tampão. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Então, a resina foi incubada 2 vezes de 2 minutos com 8 ml de tampão desnaturante de lavagem (8 M Uréia; 20 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0; 500 mM NaCl). Finalmente, a resina foi incubada 5 vezes de 2 minutos com tampão nativo contendo 20 mM de Imidazol. Após as lavagens, a resina

foi ressuspensa em 5 ml de tampão nativo e colocada aos poucos em uma coluna de poliestireno de 2 ml para que a coluna de resina se formasse. Então foi adicionado lentamente tampão de eluição (tampão nativo contendo 250 mM de Imidazol) e alíquotas de 1 ml foram coletadas da coluna, totalizando 15 alíquotas.

3. 4. 3 Análise da purificação da proteína recombinante $_6\text{His}$ -des+cis

Amostras da proteína purificada por IMAC foram submetidas à SDS-PAGE 12% de acrilamida. Após a separação eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de *Western blotting* como descrito no item 3. 3. 4 com anticorpo anti- $_5\text{His}$ (QIAGEN).

3. 5 CLONAGEM DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM VETOR DE EXPRESSÃO PSEC TAG2/HYGRO

Um fragmento gênico contendo 1881 pares de bases correspondente à sequência codificadora para o ectodomínio (sem a sequência sinal) da proteína ADAM23 humana (construção 5, aa 166-792) foi obtido por meio de PCR a partir de cDNA da molécula inteira, proveniente da construção pcDNA3.1- *ADAM23-HA* (CAL *et al.*, 2000). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram: *forward* 5'-CCCAAGCTTGCTCATACTGAACAATGGTTTG-3' e *reverse* 5'-CCCAAGCTTCCATTGGTGGCACTAGGACCC-3'. Outro fragmento gênico contendo 1530 pares de bases correspondente a sequência codificadora para o ectodomínio sem o pró-domínio de ADAM23 (ectodomínio maduro, construção 6, aa 283-792) também foi obtido por meio de PCR usando o mesmo molde e os oligonucleotídeos iniciadores usados foram: *forward* 5'-CCCAAGCTTGAGAAGGAAGAGAGCAGTGAATC-3' e o mesmo *reverse* descrito acima. Os fragmentos amplificados foram clivados com a endonuclease de restrição *HindIII* clonados no vetor para expressão em células de mamíferos pSecTag2/HygroA (Invitrogen) (ver anexos 1 e 2).

O vetor pSecTag2/HygroA foi projetado para proporcionar altos níveis de expressão, a partir do promotor e reforçador do citomegalovírus humano e, secreção de proteínas em células de mamíferos. A proteína expressa a partir deste vetor está fusionada a sua região N-terminal à sequência guia da cadeia de imunoglobulina κ , o

que promove a secreção da proteína recombinante. Na região C-terminal, a proteína expressa está fusionada ao peptídeo que contém o epítipo *c-myc* e a seis resíduos de histidina sequenciais, permitindo sua detecção e purificação.

O vetor possui o gene de resistência a higromicina B, que permite sua seleção em células de mamíferos e, o gene que codifica β -lactamase, para sua seleção em bactérias por ampicilina.

3. 5. 1. Reação de PCR para obtenção das sequências codificadoras (insertos) dos domínios de interesse a serem clonados em vetor pSecTag2/Hygro A

Para a amplificação da sequência codificadora para o ectodomínio sem o pró-domínio foram misturados 1 nanograma de cDNA molde (pcDNA3.1- *ADAM23*-HA); 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse* adequado para cada construção); 0,48 mM mix dNTP (Fermentas), 2,5 μ l do tampão de reação 10x concentrado (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100 mM KCl; 1% Triton X-100; 1mg/ml BSA; 20 mM MgSO_4) (Fermentas), 2 unidades da enzima *Pfu* DNA Polimerase (Fermentas) e 1,25 μ l de DMSO (Sigma). O volume final da reação (25 μ l) foi completado com água ultrapura autoclavada. O DNA molde foi desnaturado a 95 °C por 3 min e posteriormente submetido a 35 ciclos consecutivos de desnaturação (95 °C por 45 seg), hibridização dos oligonucleotídeos ao DNA (52°C por 45 seg), e extensão da cadeia de DNA (72°C por 5 min). Após os 35 ciclos, um último ciclo de extensão de 10 min a 72°C foi realizado.

Para a amplificação da sequência codificadora para o ectodomínio, a reação de PCR foi realizada como descrito acima, entretanto não foi adicionado DMSO na reação.

O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose e submetido ao processo de gel extração como descrito no item 3.1.1.

3. 5. 2 Digestão dos insertos e do vetor pSecTag2/HygroA por endonuclease de restrição

Os produtos purificados da PCR e o vetor pSecTag2/Hygro (4 μ g) foram digeridos em tampão R (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl_2 ; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA) (Fermentas) com 10 unidades da endonuclease de restrição *HindIII*

(Fermentas) em um volume de reação de 50 µl (completado com água ultrapura autoclavada) por 16 horas a 37°C. A digestão foi parada pela inativação da enzima de restrição por aquecimento a 65°C por 20 minutos. Os fragmentos e o vetor digeridos foram submetidos ao processo de purificação por gel extração como descrito acima no item 3.1.1.

3. 5. 3 Reação de ligação insertos/vetor pSecTag2/HygroA

As sequências codificadoras amplificadas e o vetor purificado após a digestão foram quantificados por espectrofotometria UV a 260 nm em NanoDrop 1000 como requisito necessário para preparar a reação de ligação.

Os insertos foram ligados ao vetor pSecTag2-HygroA, na relação molar de 5:1 (inserto:plasmídeo) em volume de reação de 10 µl, contendo tampão de ligação (50 mM Tris-HCl, pH7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1mM ATP; 25 µg/ml BSA) e 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (BioLabs). A reação foi incubada por 16 h a 16°C. A reação de ligação foi parada pela inativação da enzima por aquecimento a 65°C por 10 min.

Os produtos da reação de ligação foram usados para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli* (Invitrogen).

3. 5. 6 PCR de colônia para verificação de clones positivos

As colônias que cresceram em meio sólido foram inoculadas em 50 µl de meio LB contendo o antibiótico ampicilina. Esta cultura serviu como fonte de DNA molde para a reação de PCR de colônia.

Para cada reação de PCR foram misturados 1 µl da cultura líquida, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* desenhado para região interna da sequência codificadora 5'-GACCGGTGGATTTCAGTGCAG-3' e *reverse* para o sítio BGH do vetor), 0,2 mM mix dNTP, 1µl do tampão de reação 10x concentrado e 0,5 unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase. O volume final da reação (10 µl) foi completado com água ultrapura autoclavada. A análise foi feita em gel de agarose.

Os clones positivos foram crescidos em meio líquido contendo ampicilina para posterior purificação de plasmídeo em pequena escala.

Após a purificação dos plasmídeos provenientes dos clones positivos, foi realizada uma digestão nas mesmas condições descritas no item 3.5.2 para verificação da liberação do inserto.

Os clones positivos que liberaram o inserto com tamanho esperado foram seqüenciados no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo, no laboratório de Biologia Molecular e Genômica.

Os clones que apresentaram sequenciamento adequado foram submetidos à preparação de plasmídeo em larga escala usando o kit QIAGEN Plasmid Maxi Prep (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3. 6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 CLONADA EM VETOR DE EXPRESSÃO PSEC TAG2/HYGRO A

A expressão do ectodomínio de ADAM23 humana foi realizada usando células da linhagem HEK 293T (provenientes de rim embrionário humano) transfectadas com os plasmídeos de interesse pelo método de co-precipitação por fosfato de cálcio.

Após a transfecção, as células foram carenciadas de soro fetal bovino (SFB) e deixadas expressar a proteína de interesse durante diferentes tempos (24h, 48h e 72h). Após o tempo de expressão, o meio foi coletado e as células foram lisadas em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% Deoxicolato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM (*N*-ethylmaleimide) (ambos na concentração final de 1mM), CaCl₂ e MgCl₂ (na concentração final de 1 mM) por 30 minutos em banho de gelo e, então centrifugadas a 19000 xg durante 15 minutos a 4° C para a coleta do extrato celular.

Foi adicionado 1/10 volume de tampão de equilíbrio 10x (1,5 M NaCl; 500 mM Na₂HPO₄ pH 8,0) ao meio coletado. O meio foi incubado com 100 µl de resina Ni-NTA-Agarose (previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio 1x) por 4 horas a 4°C. Após a incubação, a resina foi centrifugada 800 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material que permaneceu ligado na resina foi eluído com tampão de amostra redutor 2x concentrado.

3. 6. 1 Análise da expressão do ectodomínio de ADAM23

Amostras de extrato celular de HEK 293T transfectadas com o ectodomínio de ADAM23 e amostras provenientes da purificação de proteína presente no sobrenadante de células foram submetidas a SDS-PAGE 10% de acrilamida. Após a separação eletroforética, as proteínas do gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de *Western blotting* como descrito no item 3. 3. 4 com anticorpo anti-₅His (QIAGEN).

3. 6. 2 Método de transfecção por cálcio

Células HEK 293T foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial, Cultilab) acrescido de 10% SFB (Cultilab) e 2 mM glutamina (Vetec) e mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C.

As células foram transfectadas com o plasmídeo de interesse por co-precipitação de fosfato de cálcio como previamente descrito (PUSCHEL *et al.*, 1995). Uma alíquota 12 µg do plasmídeo de interesse foi adicionado na superfície de 750 µl de água ultrapura estéril, seguido de 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 1000 µl de solução BBS 2x concentrada (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na₂HPO₄; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8 ml de meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (TPP) contendo células HEK 293T com confluência de aproximadamente 60-70% teve seu meio de cultura retirado e então, adicionado a solução descrita acima. A placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com 5 ml de PBS e adicionado novo meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

3. 7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

A produção de anticorpos foi realizada como descrita por Harlow & Lane (1988) e a análise da resposta imune foi feita por *Western blotting* e ELISA.

3. 7. 1 Imunização dos animais com a proteína GST-metaloprotease+desintegrina (GST-met+des) provenientes de corpos de inclusão

Com o intuito de produzir soro policlonal específico para a proteína ADAM23, coelhos (com peso de 1,2 kg e com 60 dias de idade) da raça neozelandesa foram imunizados (R022 e R023) com aproximadamente 400 µg da proteína GST-met+des que foi previamente separada por SDS-PAGE 10% de acrilamida (a proteína usada para imunizar foi o produto insolúvel após a lise com N-lauril-sarcosil). O gel foi corado com azul de Coomassie, em seguida descorado e lavado com água deionizada 3 vezes por trinta minutos. A banda correspondente à proteína recombinante foi retirada do gel e macerada em PBS, totalizando um volume de 2 ml. A suspensão contendo o antígeno foi inoculada nos coelho em três pontos, dois pontos intramusculares e um ponto subcutâneo (HARLOW & LANE,1988). Três imunizações foram realizadas com intervalos de 21 dias entre elas.

Após 12 dias da terceira imunização foi feita a coleta de sangue a partir da veia marginal auricular. O sangue retirado do animal foi deixado a 37°C por 1 hora e então centrifugado a 4°C, por 7 minutos a 3000 xg para obtenção do soro contendo os anticorpos policlonais anti-ADAM23. O soro foi aliquotado e mantido a -20°C.

Os soros hiperimunes dos animais coletados foram testados por *Western blotting*.

3. 7. 2 Imunização dos animais com a proteína ₆His-desintegrina+cisteína (₆His-des+cis)

A proteína recombinante ₆His-des+cis purificada foi usada para imunizar 2 coelhos da raça neozelandesa (com aproximadamente 60 dias de idade, R033 e R035). As imunizações seguiram da seguinte forma: 1ª imunização usando 400 µg de proteína recombinante em emulsão contendo Adjuvante de Freund's Completo distribuída pela via intramuscular e subcutânea. Mais duas imunizações foram

realizadas com intervalo de 21 dias entre elas, usando 200 µg de proteína recombinante em emulsão contendo Adjuvante de Freund's Incompleto.

Após 12 dias da terceira imunização o sangue dos animais foi coletado. Para a separação do soro hiperimune, o sangue foi deixado a 37°C por 1 hora e então centrifugado por 7 minutos, 3000 xg, a 4°C. Os soros hiperimunes foram testados por ELISA e *Western blotting*.

3. 7. 3 Análise da resposta imune por *Western blotting*

A partir do soro foram feitas análises da eficiência dos anticorpos utilizando ensaio de *Western blotting*. Por este método, os soros foram testados quanto a eficiência de reconhecimento do antígeno recombinante (a proteína recombinante usada para imunizar os animais), bem como para o reconhecimento da proteína ADAM23 superexpressa em células HEK 293T e a proteína endógena presente no tecido nervoso murino.

3. 7. 3. 1 Análise da eficiência dos anticorpos no reconhecimento do antígeno recombinante

A proteína ϵ His-des+cis (1µg/poço) foi submetida à SDS-PAGE 12% de acrilamida. Após a separação eletroforética, a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose e submetida à reação de *Western blotting* usando os soros dos animais (R033 e R035) na diluição de 1: 1000 bem como os soros pré-imunes (coletado dos animais antes das imunizações). A membrana foi bloqueada com TBST-leite por 1 hora à temperatura ambiente. Os soros foram então diluídos em TBST-leite e deixados incubar por 16 horas a 4°C. Após a incubação com os soros, as membranas foram lavadas com TBST (3 ciclos de 5 minutos) e incubadas com anti-IgG de coelho acoplada à HRP (*horseradish peroxidase*) (1: 4000, Sigma).

Os soros dos animais (R022 e R023) imunizados com a proteína GST-met+dis não foram testados por *Western blotting* no reconhecimento da proteína recombinante usada para imunizar devido ao fato de não se ter conseguido quantidades significativas de proteína purificada. Além disso, esta reação não seria um bom indicativo de que os anticorpos presentes no soro reconhecem especificamente a proteína recombinante, pois como a proteína de fusão GST

(glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum*) é muito mais imunogênica e, a probabilidade de existirem anticorpos que reconheçam a proteína de fusão é bem maior que para a proteína ADAM23 recombinante, podendo assim, ocorrer um falso positivo.

3. 7. 3. 2 Análise da eficiência dos anticorpos no reconhecimento da proteína ADAM23 superexpressa em células HEK 293T

Células HEK 293T foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-*ADAM23-HA* ou com o plasmídeo vazio (controle negativo) por co-precipitação de fosfato de cálcio como previamente descrito (3. 6. 2).

Após 48 horas de cultivo, as células transfectadas lisadas em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% Deoxicolato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM (na concentração final de 1 mM) por 30 minutos em banho de gelo e, então centrifugadas a 19000 xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos tiveram sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e foram submetidos à reação de *Western blotting* (3. 7. 3. 1).

Como controle positivo desta reação foi usado no *Western blotting* o anticorpo anti-HA (Zymed, Invitrogen) que reconhece a etiqueta de hemaglutinina (HA) que é expressa fusionada a região carboxi-terminal da molécula ADAM23 codificada pela construção pcDNA3.1-*ADAM23-HA* (CAL *et al.*, 2000).

3. 7. 3. 3 Análise da presença da proteína ADAM23 no encéfalo de camundongos

Extrações de proteínas totais de encéfalo de camundongos adultos, bem como preparações enriquecidas de membrana foram preparadas.

Um encéfalo de camundongo adulto (~40 dias após o nascimento) foi retirado do animal sacrificado por deslocamento cervical e lavado em PBS gelado. Então, o encéfalo foi colocado em tubo de homogeneização e adicionado tampão de lise (mesmo descrito no item 3. 7. 3. 2, um volume 5 vezes maior que o ocupado pelo encéfalo) acrescido de coquetel de inibidores de protease (Complete- Roche). A lise foi realizada por 40 minutos em banho de gelo e a cada 10 minutos um ciclo de maceração com pistilo de vidro (10-15 vezes). Após os 40 minutos de lise, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 19000 xg a 4°C. O sobrenadante foi coletado e

guardado e o sedimento foi passado por um novo ciclo de lise (usando a metade do volume inicial de tampão de lise) seguido de centrifugação. O sobrenadante proveniente deste segundo lisado foi combinado com o primeiro sobrenadante. O extrato teve sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e foi submetido à reação de *Western blotting* como descrito anteriormente (3. 7. 3. 1).

Para a preparação de membrana um encéfalo de camundongo foi lavado com PBS gelado e pesado. O encéfalo foi colocado em tubo de homogeneização e a ele adicionado um volume 5 vezes maior que a massa (considerando que cada mg equivale a um μ l, neste caso o encéfalo pesava 600 mg e adicionou-se 3000 μ l) de tampão de Sacarose (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10% Sacarose e 5 mM EDTA) acrescido de PMSF. A lise foi realizada por 40 minutos em banho de gelo e a cada 10 minutos um ciclo de maceração com pistilo de vidro (10-15 vezes). Após os 40 minutos de lise, o lisado foi centrifugado por 10 minutos a 3000 xg a 4°C. O sobrenadante foi coletado e guardado e o sedimento foi passado por um novo ciclo de lise com o mesmo volume inicial de tampão de sacarose seguido de centrifugação. O sobrenadante proveniente deste segundo lisado foi combinado com o primeiro sobrenadante. Os sobrenadantes combinados foram centrifugados por 1 hora 40000 xg a 4°C. O sedimento desta centrifugação (a preparação de membrana) foi solubilizado com tampão de lise (item 3. 7. 3. 2). A preparação de membrana teve sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) e foi submetido à reação de *Western blotting* (item 3. 7. 3. 1). Como controle positivo desta reação foi usado o anticorpo anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana (COSTA *et al.*, 2003).

3. 7. 4 Análise da resposta imune por imunoensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Uma alíquota de 0,1 μ g da proteína ϵ His-des+cis foi adsorvida aos poços da placa 96 poços (Max Sorb, Nunc) em tampão carbonato pH 9,6 (50 mM Carbonato de sódio) por 16 horas a 4°C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T (PBS acrescido de 0,05% de Tween) e bloqueada com 1% BSA (Sigma-Aldrich) por uma hora a 37°C. Os soros dos animais em diluições de 1/100 até 1/6400 (diluídos em PBS-BSA 0,1%) foram adicionados aos poços (cada diluição foi feita em triplicata). As placas

foram lavadas cinco vezes com PBS-T. Após as lavagens adicionou-se o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho acoplado à HRP (Sigma-Aldrich), que foi incubado por 1 hora a 37°C. Seguiu-se um novo ciclo de lavagens e a reação foi então desenvolvida pela utilização do substrato *o*-phenylenediamine (OPD)/ H₂O₂ e parada com 1M de H₂SO₄. A absorbância foi mensurada a 490 nm e a análise estatística foi feita usando two-way ANOVA (GraphPad Prism software).

3. 8 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR

3. 8. 1 Co-imunoprecipitação das proteínas ADAM23 e PrP^C usando anticorpo anti-PrP^C

Após 48 horas de cultivo, as células transfectadas com pcDNA3.1-PrP^C (sequência que possui o epítipo 3F4 humano) (VINCENT *et al.*, 2000) e pcDNA3.1-ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000) foram lisadas em tampão de lise gelado (50mM Tris-HCL pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% Deoxicolato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases PMSF e NEM (na concentração final de 1 mM), CaCl₂ e MgCl₂ (na concentração final de 1 mM) por 30 minutos em banho de gelo e, então centrifugadas a 19000 xg durante 15 minutos a 4°C. Extratos celulares foram clarificados pela incubação prévia com 40 µl proteína A/G sepharose (GE Bioscience) acrescido de 10 µl de soro normal de camundongo durante 3 horas a 4°C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada durante 5 min 19000 xg a 4°C e metade do sobrenadante obtido foi incubado com 10 µl soro normal de camundongo e a outra metade incubada com 10 µl soro contendo anticorpos anti-PrP^C (produzido no laboratório de Neurobiologia como descrito previamente por ZANATA *et al.*, 2002) durante 16 horas a 4°C. Após este tempo as soluções foram centrifugadas por 3 minutos a 19000 xg para retirada de qualquer material agregado que pudesse interferir nos resultados e então incubadas por mais duas horas com 40 µl proteína A/G sepharose para que ocorresse a ligação do imunocomplexo à matriz sólida. As matrizes contendo os imunocomplexos ligados foram lavadas 5 vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 35 µl tampão redutor para SDS-PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez

minutos e submetido a SDS-PAGE 10% e analisado por *Western blotting* usando os anticorpos anti-PrP^C e anti-HA.

Este mesmo ensaio foi realizado utilizando extrato total de encéfalo e preparação de membrana a partir de encéfalo (descrito no item 3. 7. 3. 3). No entanto, o anticorpo usado para verificar a presença de ADAM23 endógena foi o anticorpo anti-peptídeo disintegrina (COSTA *et al.*, 2003).

Para verificação da importância de *lipid rafts* na interação ADAM23/PrP^C, células transfectadas com pEGFP-PrP^C (LEE *et al.*, 2001, ZANATA *et al.*, 2002) e pcDNA3.1-ADAM23-Ha foram tratadas com 10 mM methyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich) por uma hora a 37°C. Após este tratamento as células foram lisadas e submetidas à imunoprecipitação descrita acima.

3. 8. 2 Ensaio de ligação

Uma alíquota de 1 μ g da proteína GST-desintegrina (GST-des) ou somente a proteína GST (controle negativo), foi imobilizada em placas 96 poços de poliestireno (MaxSorb, Nunc) usando tampão carbonato pH 9,0 por 16 horas a 4°C. A placa foi então lavada 3 vezes com PBS para remoção das proteínas não adsorvidas e os sítios não específicos foram bloqueados com BSA 1% (300 μ l, 2 horas, 37°C). Quantidades crescentes de $_6$ His-PrP^C (0,025 - 0,75 μ g) foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 4°C. Após esta incubação os poços foram lavados com PBS e a quantificação de $_6$ HisPrP^C ligado as proteínas recombinantes foi obtida pela utilização de anticorpos anti-PrP^C (1:4000) (2 horas, 37°C) seguida da revelação com anti-IgG de camundongo acoplado à HRP (1:4000, BD Bioscience) por 1 hora a 37°C. A reação foi desenvolvida pela utilização do substrato OPD/ H₂O₂ e parada com 1M de H₂SO₄. A absorbância foi mensurada a 490 nm. Para cada quantidade de $_6$ HisPrP^C utilizada foram feitas quadruplicadas e a análise estatística foi feita usando Student's *t*-test (GraphPad Prism software).

3. 8. 2 Ensaio de adesão celular

Placas de 96 poços foram tratadas com diferentes concentrações de $_6$ His-des+cis, GST-desintegrina (GST-des), GST, Vitronectina e $_6$ His-PrP^C diluídas em PBS. Após incubação de 16 horas a 4°C, os poços foram lavados para retirar a

proteína não ligada e então bloqueados com 2% de BSA por 2 horas a 37° C. Células das diferentes linhagens foram plaqueadas (10^5 células por poço) e incubadas em meio de cultura (meio usado para cultivar cada célula) sem soro fetal bovino e acrescido de $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ (concentração final de 1 mM) por duas horas a 37°C. Após esta incubação para que ocorresse a adesão, os poços foram lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderidas. As células que permaneceram aderidas foram coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol). O corante foi extraído com solvente apropriado (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância foi mensurada a 650 nm. Para cada proteína testada foram feitas sextuplicatas e a análise estatística foi realizada usando *one-way* ANOVA com Tukey's *post hoc* test (GraphPad Prism software).

3. 8. 3 Preparação de microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicosfingolipídeos (*lipid rafts*)

Os microdomínios ricos em colesterol e glicosfingolipídeos foram preparados segundo Naslavsky e colaboradores (1997) e Keshet e colaboradores (2000).

Um total de $1,8 \times 10^7$ células foram co-transfectadas com 6 µg de plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA e 6 µg de plasmídeo pEGFP-PrP^C ou co-transfectadas com 6 µg de cada um dos plasmídeos descritos acima e 6 µg dos respectivos plasmídeos controles (plasmídeos vazios, pEGFP e pcDNA3.1 respectivamente). As células transfectadas foram submetidas à preparação de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton-X100. As células foram ressuspensas em 700 µl de tampão TNE gelado (150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA e 1% Triton X-100) e deixadas lisar por 30 minutos a 4°C. As partículas insolúveis foram separadas por centrifugação (5 min, 500 xg, 4°C) e o lisado foi separado da porção insolúvel e colocado em tubo de ultracentrífuga. Um volume, igual ao volume do lisado, de solução 70% Nycodenz AG (Axis-Shield) (m:v) foi adicionado e homogeneizado com o lisado. Um gradiente linear de 35-8% de Nycodenz em TNE foi sobreposto ao lisado (200 µl de cada gradiente: 35; 25; 22,5; 20; 18; 15; 12 e 8%). Os tubos foram centrifugados 300000 xg por 4h, 4°C usando o rotor P50S2 (Hitachi). Treze frações de 180 µl foram coletadas a partir do topo até o fundo do tubo. As frações foram analisadas por *Western blotting* usando os anticorpos anti-HA (para verificação de ADAM23-HA), anti-GFP (para detecção de GFP-PrP^C, cedido

gentilmente pelo Instituto Carlos Chagas de Curitiba-PR) e anti-flotilina 1 (Santa Cruz Biotechnology) (detecção de flotilina 1 que é uma proteína marcadora para *lipid rafts*).

Para os ensaios de análise geral da distribuição das proteínas de interesse no gradiente de Nycodenz, foram utilizados 15 µl de cada fração coletada. Nos ensaios de quantificação, as frações correspondentes aos *lipid rafts* (frações 2 – 6) e frações que não correspondem aos microdomínios (frações 9 – 13) foram combinadas e tiveram sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976). Quantidades iguais de proteínas totais (40 µg) foram analisadas por *Western blotting* usando o anticorpo apropriado.

3. 8. 4 Ensaio de endocitose de GFP-PrP^C mediado por cobre

Células HEK 293T transfectadas com pEGFP-PrP^C e pcDNA3 ou pEGFP-PrP^C e pcDNA3.ADAM23-HA foram tratadas previamente com 0,2 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) em solução salina tamponada de Gey's (Sigma-Aldrich) a 4°C por 1 hora. Após a incubação com a biotina as placas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com glicina 50 mM (diluída em Gey's). Posteriormente as células foram incubadas com 500 µM CuSO₄ por 30 minutos a 37°C para indução da endocitose de PrP^C, como descrito por Sumudhu e colaboradores (2001). Após a incubação com o CuSO₄ as células foram tratadas com tripsina/EDTA (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) para remoção das proteínas de superfície e então foram lisadas. Quantidades iguais de extrato protéico foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpos anti-PrP^C como descrito no item 3. 8. 1.

Após a imunoprecipitação, as resinas de proteína A/G sepharose foram lavadas com tampão de lise e o material imunoprecipitado foi eluído com tampão de amostra não redutor e submetido à SDS-PAGE 12% de acrilamida e transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 2% BSA diluído em PBST por 16 horas a 4°C. A membrana foi incubada com ExtrAvidin[®] HRP (Sigma-Aldrich) por 1 hora a temperatura ambiente e então, lavada 5 vezes de 5 minutos com PBST. A reação foi evidenciada usando substrato quimioluminescente.

A quantificação dos *blots* foi realizada usando o software ImageJ e a análise estatística foi feita usando Student's *t*-test (GraphPad Prism software). Três ensaios

independentes foram realizados com a finalidade de quantificar os *blots* e fazer a análise estatística.

4 RESULTADOS

4. 1 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA HETERÓLOGO DE *E. COLI*

4. 1. 1 Clonagem, expressão e purificação de diferentes domínios da proteína ADAM23 em sistema pGEX-2T

Os fragmentos de DNA correspondentes às sequências codificadoras dos domínios metaloprotease, desintegrina de ADAM23 e dos dois domínios combinados foram amplificados de forma adequada através da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos desenhados. De acordo com a figura 3 todos os fragmentos de interesse foram amplificados e as bandas correspondentes estão na altura esperada. Na linha 1 observa-se uma banda um pouco acima de 500 pb, correspondente ao fragmento codificante para o domínio metaloprotease (594 pb) e na linha 2 o controle negativo da reação que consiste numa reação de PCR realizada nas mesmas condições que a amostra da linha 1, mas sem o DNA molde (pcDNA3.1-ADAM23-HA). Na linha 5 uma banda abaixo do marcador de 500 pb pode ser visualizada, correspondente ao fragmento codificante para o domínio desintegrina (225 pb) e na linha 6, o controle negativo desta reação. E na linha 3 observa-se uma fragmento maior do que o presente na linha 1 e que corresponde as sequências codificadoras para o domínio metaloprotease e desintegrina juntos (861 pb) e ao lado, na linha 4 o respectivo controle negativo.

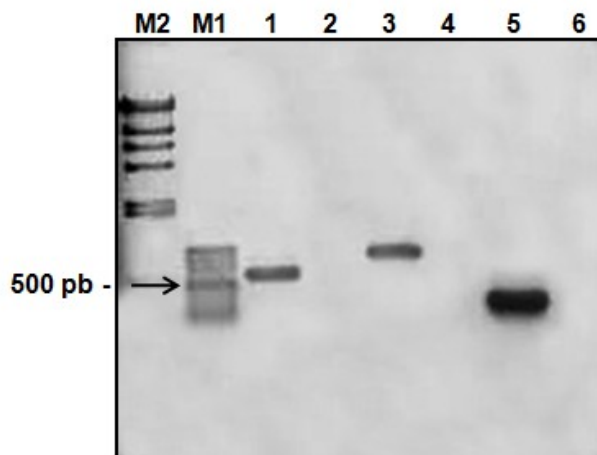


FIGURA 3 - Teste dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificar as sequências codificadoras dos diferentes domínios da proteína ADAM23 humana. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR usando como molde pcDNA3.1-ADAM23-HA. Os fragmentos codificadores para o domínio metaloprotease (linha 1), desintegrina (linha 5) e para os domínios combinados (linha 3) foram amplificados corretamente usando os oligonucleotídeos iniciadores específicos. M1: GeneRuler 100 pb DNA Ladder e M2: marcador Lambda DNA/*Hind*III. A seta indica o marcador de 500 pb no M1.

Esses fragmentos especificamente amplificados foram clonados entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI do vetor pGEX-2T. Após a ligação dos insertos (fragmentos codificantes) ao vetor, os produtos destas reações de ligação foram usados para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α de *E. coli*. Os clones crescidos em meio LB sólido contendo ampicilina (antibiótico para seleção) foram então usados para realização de uma PCR de colônia para verificação dos clones que de fato apresentavam o inserto de interesse (dados não mostrados).

Após a verificação dos clones que apresentavam as sequências codificadoras de interesse, alguns destes clones foram escolhidos aleatoriamente e usados para amplificação e purificação de plasmídeo. Os plasmídeos purificados, correspondentes a cada uma das construções (dos diferentes domínios de ADAM23), foram submetidos à digestão dupla usando as enzimas de restrição empregadas na clonagem para verificação da liberação dos insertos de interesse bem como verificação da manutenção dos sítios de restrição. De acordo com a figura 4 pode-se observar que os insertos de interesse foram liberados e consequentemente, os sítios de restrição foram mantidos.

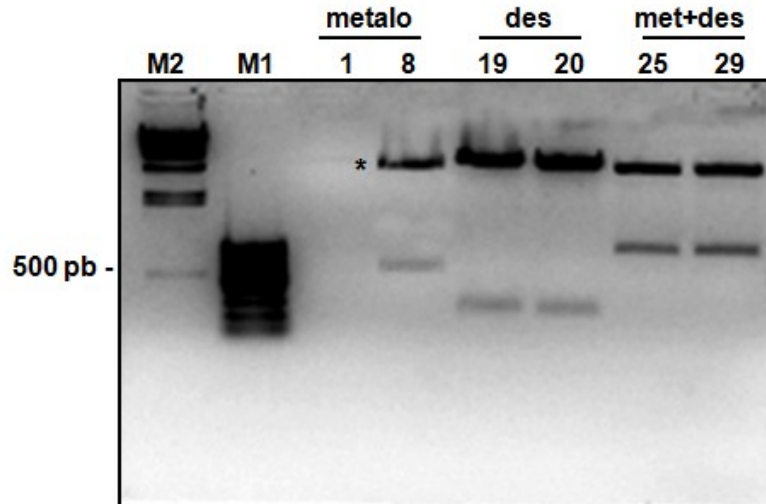


FIGURA 4 - Análise do perfil da dupla digestão com as endonucleases de restrição usadas para clonagem dos diferentes domínios de ADAM23 humana em vetor pGEX2T. Perfil eletroforético da digestão de plasmídeo das colônias escolhidas aleatoriamente de cada uma das construções (colônias 1 e 8 para metaloprotease - metalo; colônias 19 e 20 para desintegrina - des e colônias 25 e 29 para metaloprotease+desintegrina - met+des) com as endonucleases de restrição usadas na clonagem *Bam*HI e *Eco*RI. A banda mais alta marcada com * que aparece em todas as digestões corresponde ao plasmídeo aberto e as bandas abaixo correspondem aos inserts liberados pelas digestões. Não foram observadas bandas na linha 1, indicando que houve problemas na purificação de plasmídeo. M1: GeneRuler 100 pb DNA Ladder e M2: marcador Lambda DNA/*Hind*III.

A partir dos plasmídeos de interesse purificados foi possível iniciar as expressões das proteínas recombinantes em pequena escala. Para as três construções (pGEX-metaloprotease, pGEX-desintegrina e pGEX-metaloprotease+desintegrina) foram feitas expressões usando a estirpe DH5 α de *E. coli*. A análise das expressões foi feita pela avaliação do padrão eletroforético de extratos protéicos de colônias não induzidas e após a indução com 0,1 mM de IPTG por 4 horas a 30°C. Observa-se na figura 5 que todas as construções apresentaram clones que expressavam a proteína de interesse, já que os clones induzidos apresentaram uma banda que era inexistente ou menos intensa nos clones não induzidos. Além disso, estas bandas diferencialmente expressas apresentaram perfil de migração eletroforética ao esperado para cada proteína recombinante (GST-metaloprotease ~48 kDa; GST-desintegrina ~35 kDa e GST-met+desintegrina ~ 58 kDa).

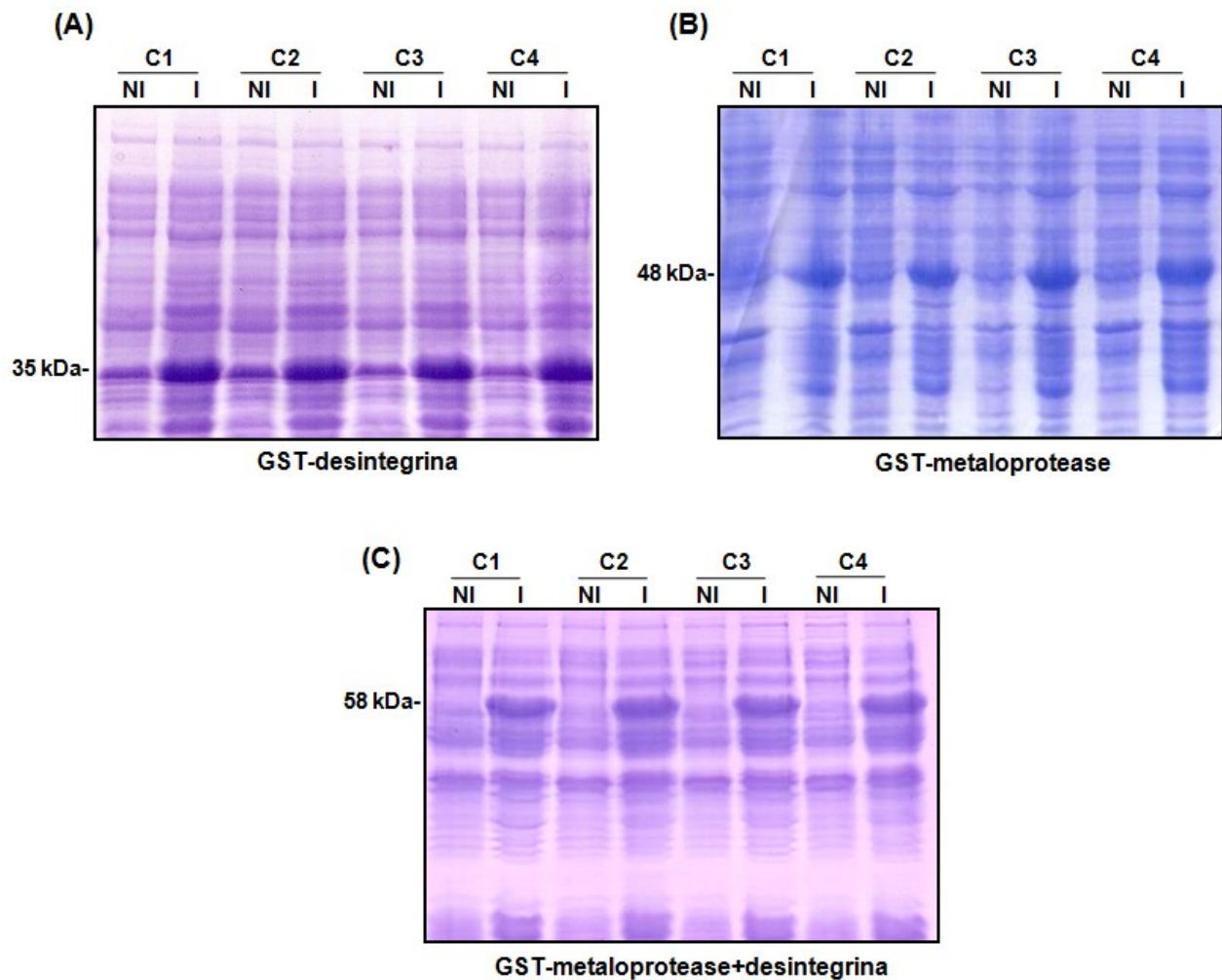


FIGURA 5 - Expressão em pequena escala das diferentes construções de ADAM23 humana em vetor pGEX-2T. (A) SDS-PAGE 10% de amostras provenientes de culturas induzidas com IPTG (I) e não induzidas (NI) de diferentes colônias transformadas (C1, C2, C3 e C4) com pGEX-desintegrina. **(B)** SDS-PAGE 12% de amostras obtidas de diferentes colônias transformadas com pGEX-metaloprotease induzidas (I) e não induzidas (NI). **(C)** SDS-PAGE 12% de amostras obtidas de diferentes colônias transformadas com pGEX-metaloprotease+desintegrina induzidas (I) e não induzidas (NI). Para todas as construções em todas as colônias testadas observa-se a presença de uma banda diferencialmente expressa nas colônias induzidas que não está presente nas culturas não induzidas com IPTG.

Após verificar que todas as colônias estavam expressando as proteínas de interesse, um clone com alto nível de expressão de cada uma das construções foi escolhido para a realização das expressões em larga escala.

As expressões em larga escala foram realizadas nas mesmas condições das expressões em pequena escala. Após a indução das culturas, as células foram sedimentadas por centrifugação e suspensas em PBS acrescido de lisozima e inibidor de protease. Então as suspensões bacterianas foram lisadas em prensa de French e centrifugadas para retirada do material insolúvel. O lisado (fração solúvel obtida após a centrifugação) foi incubado com a resina de glutathiona sepharose 4B e posteriormente o material ligado à resina foi eluído.

A partir desta metodologia de expressão e purificação, apenas o domínio recombinante desintegrina foi purificado com sucesso e com alto rendimento. Embora muita proteína tenha ficado na fração insolúvel do lisado e uma parte não ligou na resina (provavelmente por saturação da resina), uma grande quantidade da proteína foi solubilizada e pôde ser purificada adequadamente (figura 6A).

O domínio metaloprotease e os dois domínios combinados não tiveram uma purificação satisfatória como o domínio desintegrina. Apenas uma pequena quantidade destes domínios pôde ser purificada (figura 6B e 6C) na forma solúvel e, praticamente toda proteína recombinante correspondente a estas duas construções permaneceu na fração insolúvel do lisado. Estas construções provavelmente produzem proteínas que formam corpos de inclusão, não sendo facilmente purificada apenas pela lise mecânica da célula bacteriana. Nestes casos em que a proteína recombinante forma corpos de inclusão, é necessário usar metodologias que evitem a formação de corpos de inclusão, através da diminuição dos níveis de expressão ou realizar procedimentos que solubilizem estes corpos de inclusão após a expressão (SAMBROOK *et al.*, 2001; BURGESS, 2009).

Após a purificação dos domínios recombinantes de ADAM23 e da diálise dos mesmos, foi realizado um ensaio de *Western blotting* usando o anticorpo anti-GST para confirmar que as proteínas provenientes das eluições eram de fato as proteínas recombinantes de interesse fusionadas a GST e que apresentavam a massa molecular esperada (figura 7). Nas amostras de GST-metaloprotease e GST-metaloprotease+desintegrina houve uma contaminação com GST que pode ser produto de degradação destas construções. Isto pode ter ocorrido devida à utilização

da estirpe DH5 α , a qual não é deficiente para proteases, o que pode resultar na proteólise da proteína de fusão (ver GST Gene Fusion System Handbook).

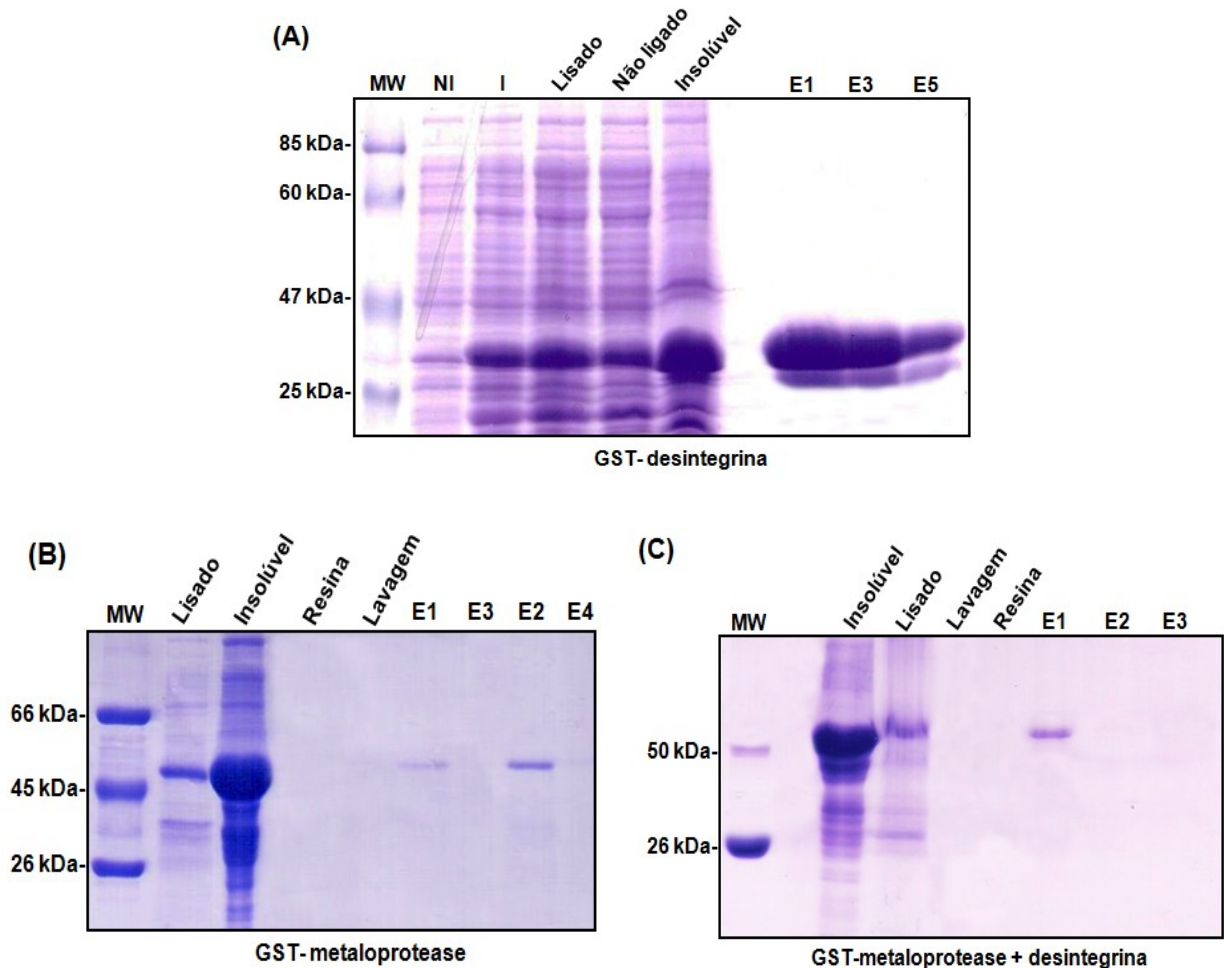


FIGURA 6 - Purificação das proteínas provenientes das diferentes construções de ADAM23 em pGEX-2T. (A) Análise por SDS-PAGE 10% da proteína recombinante GST-desintegrina presente no lisado bacteriano (lisado), na fração após ligação na matriz de afinidade glutathiona sepharose 4B (não ligado), na fração insolúvel (insolúvel) e nos eluatos (E). (B) SDS-PAGE 12% da proteína recombinante GST-metaloprotease presente no lisado bacteriana (lisado); na fração insolúvel (insolúvel); na resina após as eluições (resina), nas amostras provenientes das lavagens (lavagem) e nos eluatos (E). (C) SDS-PAGE 12% da proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina presente nos mesmos tipos amostras analisadas para GST-metaloprotease. MW: marcador de massa molecular.

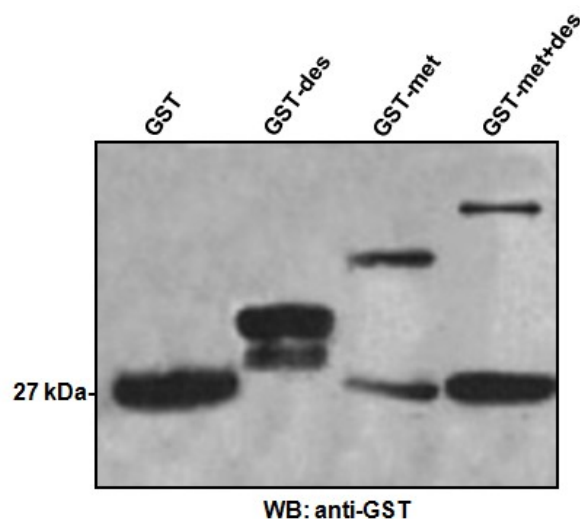


FIGURA 7 - Western blotting das proteínas recombinantes fusionadas à GST usando o anticorpo anti-GST. Os eluatos provenientes das purificações após a diálise para retirada da glutatona livre foram submetidos à reação de *Western blotting* usando o anticorpo anti-GST. O ensaio mostra que todas as proteínas purificadas são possuidoras da proteína de fusão GST e, as massas moleculares condizem com as massas esperadas para cada domínio recombinante de ADAM23 fusionado à GST. GST possui 27 kDa, GST-desintegrina (GST-des) ~35 kDa, GST-metaloprotease (GST-met) ~48 kDa e GST-metaloprotease+desintegrina (GST-met+des) ~58 kDa.

Na tentativa de diminuir os níveis de expressão e assim evitar que as proteínas de interesse formassem corpos de inclusão, algumas modificações no protocolo de expressão foram realizadas, sendo elas a diminuição da temperatura de cultivo durante a expressão de 30°C para 20°C e diminuição do agente indutor (IPTG) de 0,1 mM para 0,05 mM. A purificação prosseguiu como a realizada para o domínio desintegrina. Entretanto, a diminuição nos níveis de expressão não afetou a solubilidade das proteínas de interesse, permanecendo estas nos corpos de inclusão (dados não mostrados). Então, outras metodologias que empregam agentes caotrópicos para solubilizar os corpos de inclusão foram empregadas.

Agentes solubilizadores são comumente usados para dissociar corpos de inclusão, dentre eles estão os agentes caotrópicos hidrocloreto de guanidina, uréia e o detergente aniônico sarcosil. Altas concentrações destes agentes têm sido usadas com sucesso na solubilização de corpos de inclusão (revisado por CLARK 1998). No entanto, como a purificação por cromatografia de afinidade da proteína de fusão GST é dependente de conformação, somente é possível empregar na solubilização o detergente sarcosil e uréia, este último na concentração máxima de 3 M.

Usando como agente solubilizador uréia na concentração de 3 M, nenhuma proteína recombinante foi recuperada da fração insolúvel do lisado (dados não

mostrados), evidenciando que esta concentração de uréia não foi capaz de solubilizar os corpos de inclusão formados por GST-metaloprotease e GST-met+desintegrina.

Uma segunda tentativa de solubilizar os corpos de inclusão foi realizada empregando sarcosil (0,5%). Este detergente aniônico foi capaz de solubilizar parte da proteína recombinante presente nos corpos de inclusão como mostra a figura 8 (linha lisado). Mesmo assim, este agente não promoveu a solubilização total dos corpos de inclusão e muita proteína recombinante permaneceu nestas frações insolúveis (figura 8, linha insolúvel). No entanto, constatou-se que a proteína que foi solubilizada não pôde ser eluída da resina de glutathiona sepharose 4B (figura 8, resina). Isto provavelmente ocorreu porque durante as lavagens que são feitas sem o detergente e, a retirada rápida do agente caotrópico pode ter levado à precipitação da proteína recombinante.

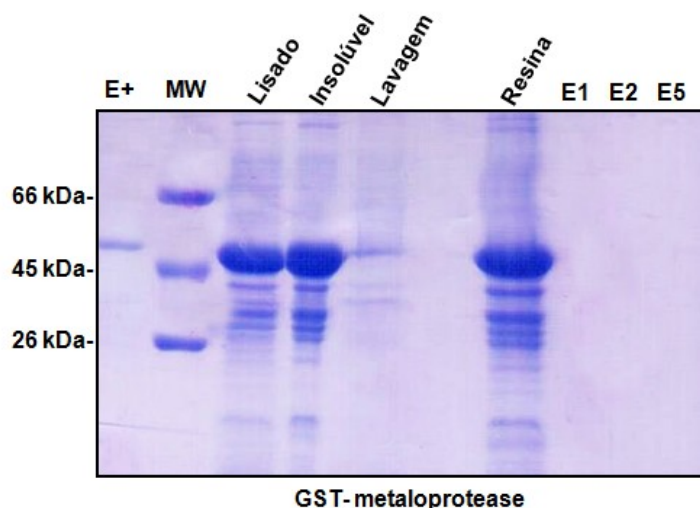


FIGURA 8 - Purificação GST-metaloprotease após solubilização dos corpos de inclusão pelo detergente aniônico sarcosil. Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante GST-metaloprotease presente no lisado bacteriano (lisado) após solubilização com sarcosil, na fração insolúvel (insolúvel), na lavagem (lavagem), na resina após eluição (resina) e nos eluatos (E). Proteína recombinante GST-metaloprotease presente no eluato da purificação descrita para na figura 6B (E+). MW: marcador de massa molecular.

De acordo com estes resultados, apenas a proteína recombinante GST-desintegrina pôde ser purificada de maneira satisfatória (~10 mg de proteína/litro de cultura bacteriana) podendo ser utilizada em ensaios bioquímicos e funcionais. As purificações dos demais domínios recombinantes não tiveram um alto rendimento, apenas uma pequena quantidade de proteína recombinante foi purificada (~ 50 µg

de proteína/litro de cultura bacteriana), não sendo viável sua utilização em ensaios bioquímicos e funcionais.

Dados obtidos anteriormente (COSTA, 2007) demonstraram que nem a expressão dos domínios metaloprotease e desintegrina combinados usando o vetor pET-32 evitou a formação de corpos de inclusão. Esse vetor codifica a proteína de fusão tiorredoxina (*trxA*, *E. coli*), que tem sido descrita como uma das proteínas de fusão que melhor promove a solubilização de quimeras proteicas (DYSON *et al.*, 2004; HAMMARSTROM *et al.*, 2002). Estes resultados e o fato do domínio desintegrina ter sido purificado adequadamente demonstram que o maior problema de insolubilidade é devido à presença do domínio metaloprotease.

Os domínios de ADAM23 que foram clonados neste trabalho tiveram a probabilidade teórica de insolubilidade calculada de acordo com o indicador de Wilkinson/Harrison modificado ². Este indicador tem sido usado na determinação da probabilidade de uma determinada proteína quando expressa no citoplasma de *E. coli* ser insolúvel. O quadro 1 mostra a probabilidade teórica de insolubilidade para cada domínio em separado ou combinados quando expressos no citoplasma de *E. coli*.

Domínio de ADAM23	Indicador de Insolubilidade na ausência de GST	Indicador de Insolubilidade na presença de GST
Metaloprotease	82,10%	71,9%
Desintegrina	22,80%	39,5%
metaloprotease + desintegrina	77,20%	63,6%
rico em cisteína	59,40%	53,1%
desintegrina + rico em cisteína	47,20%	44,3%

QUADRO 1- Probabilidade teórica da sequência de aminoácidos de cada domínio ser insolúvel quando expresso no citoplasma de *E. coli* de acordo com o indicador Wilkinson/Harrison modificado.

² Wilkinson/Harrison index. Disponível em:
< <http://www.biotech.ou.edu>. > Acesso em: 20/02/2009.

4. 1. 2 Clonagem, expressão e purificação dos domínios desintegrina e cisteína da proteína ADAM23 em sistema pET-28a

Um fragmento de DNA correspondente a sequência codificadora para os domínios desintegrina e cisteína foi amplificado adequadamente através da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos desenhados. De acordo com a figura 9 o fragmento de interesse foi amplificado e a banda correspondente está na altura esperada. Na linha 2 observa-se uma banda um pouco acima de 500 pb, correspondente ao fragmento codificante para os domínios desintegrina e cisteína (648 pb) e na linha 1 o controle negativo da reação que consiste numa reação de PCR realizada nas mesmas condições que a amostra 1 mas com o DNA molde (pcDNA3.1ADAM23-HA) ausente.

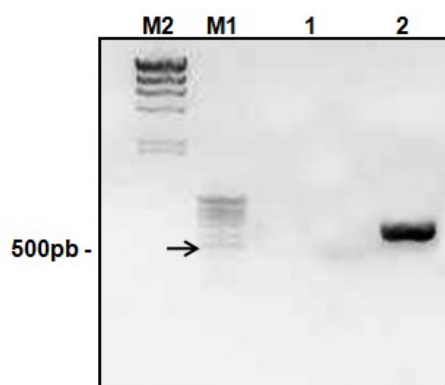


FIGURA 9 - Teste dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificar as sequências codificadoras para os domínios desintegrina e região rica em cisteína da proteína ADAM23 humana. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do produto amplificado por PCR usando como molde pcDNA3.1-ADAM23-HA e os oligonucleotídeos iniciadores específicos. Na linha 2 está o fragmento codificador para o domínio desintegrina e região rica em cisteína usando os oligonucleotídeos iniciadores específicos. M1: GeneRuler 100 pb DNA Ladder e M2: marcador Lambda DNA/*Hind*III. A seta indica o fragmento de 500pb do M1.

Esse fragmento amplificado de maneira específica foi clonado entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III do vetor pET-28a. Após a ligação do inserto (fragmento codificante) ao vetor, o produto desta reação de ligação foi usado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α de *E. coli*. Os clones crescidos em meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina foram então usados para

realização de uma PCR de colônia para verificação dos clones que de fato apresentam o inserto de interesse (dados não mostrados).

Após a verificação dos clones que apresentam a sequência codificadora, alguns clones foram escolhidos aleatoriamente e foram usados para amplificação e purificação de plasmídeo. Estes plasmídeos foram então submetidos à digestão dupla usando as enzimas de restrição usadas na clonagem para verificação da liberação dos insertos de interesse bem como verificação da manutenção dos sítios de restrição. De acordo com a figura 10, pode-se observar que os insertos de interesse foram liberados e conseqüentemente, os sítios de restrição foram mantidos.

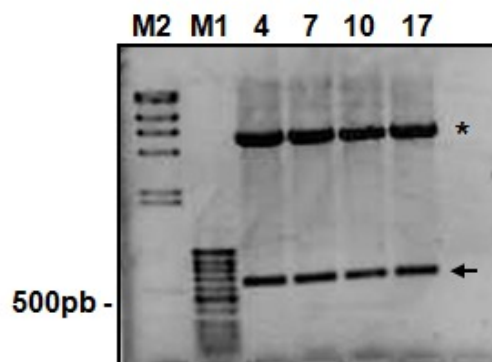


FIGURA 10 - Análise do perfil da dupla digestão com as endonucleases de restrição usadas para clonagem do domínio desintegrina e região rica em cisteína de ADAM23 humana em vetor pET-28a. Perfil eletroforético dos fragmentos de DNA obtidos pela digestão das colônias escolhidas aleatoriamente com as endonucleases de restrição usadas na clonagem *Bam*HI e *Hind*III. A banda mais alta (maior quantidade de pares de bases) que aparece em todas as digestões corresponde ao plasmídeo aberto (indicada com *) e as bandas abaixo (um pouco acima do marcador de 500 pb) indicadas com seta, correspondem ao inserto de 648 pb liberado pela digestão. M1: GeneRuler 100 pb DNA Ladder e M2: marcador Lambda DNA/*Hind*III.

Após o sequenciamento dos clones escolhidos e confirmada a sequência codificadora de interesse, um clone foi escolhido para iniciar os procedimentos de expressão e purificação da proteína ϵ His-desintegrina+cisteína (ϵ His-des+cis).

A expressão da proteína de interesse pelas colônias transformadas foi verificada através do ensaio de expressão em pequena escala (figura 11). Observa-se na figura 11 que nas colônias induzidas com 1 mM de IPTG há uma banda diferencialmente expressa de aproximadamente 30 kDa, provavelmente

correspondente à proteína recombinante de interesse. Uma colônia com alta expressão foi escolhida para a produção da proteína em larga escala.

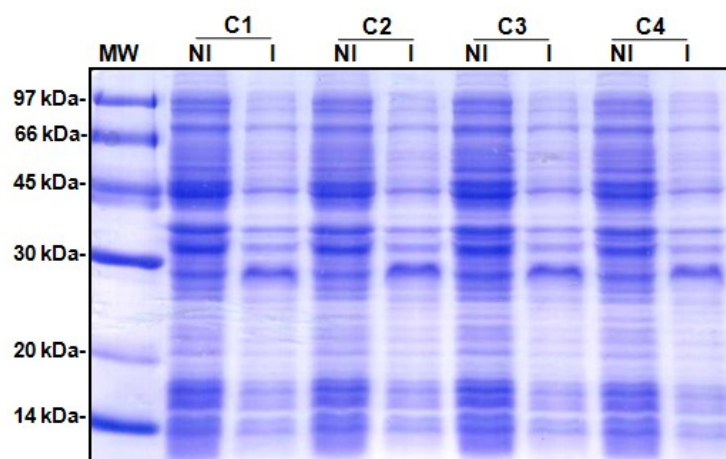


FIGURA 11 - Expressão em pequena escala de diferentes colônias transformadas com pET28-desintegrina+cisteína. SDS-PAGE 12% de amostras provenientes de colônias transformadas com o plasmídeo pET28-desintegrina+cisteína e induzidas com IPTG (I) ou não induzidas (NI). Para todas as colônias testadas observa-se a presença de uma banda de aproximadamente 30 kDa nas amostras das culturas induzidas que não está presente nas amostras de culturas não induzidas.

A expressão em larga escala foi realizada nas mesmas condições da expressão em pequena escala. Após a indução da cultura com 1 mM de IPTG por 4 horas, as células foram sedimentadas por centrifugação e suspendidas em tampão nativo acrescido de inibidor de protease. Então a suspensão bacteriana foi lisada em prensa de French e centrifugada para retirada do material insolúvel. O lisado (fração solúvel obtida após a centrifugação) foi incubado com a resina Ni-NTA Agarose e posteriormente o material ligado à resina foi eluído com tampão nativo contendo imidazol. De acordo com a figura 12A (lise nativa) é possível observar uma banda de aproximadamente 30 kDa correspondente à proteína recombinante de interesse, δ His-des+cis, estava presente nos eluatos. Entretanto, observa-se uma banda logo abaixo da de 30 kDa, que pode ser produto de degradação da proteína purificada e também, uma banda de aproximadamente 70 kDa que provavelmente é o produto de gene bacteriano *dnaK*. A proteína codificada por este gene está relacionada com o envelhecimento de proteínas anormais em *E. coli*, podendo ser co-purificada com a proteína recombinante (BARNEYX & MUJACIC, 2004).

No ensaio de *Western blotting* (figura 12B, lise nativa), a banda de 30 kDa e a banda logo abaixo desta foram reconhecidas pelo anticorpo anti-₅His, confirmando que estas bandas correspondem a proteína recombinante de interesse.

Embora a proteína ₆His-des+cis tenha sido purificada em condições nativas, observa-se na figura 12A que a maior parte da proteína recombinante está presente na fração insolúvel do lisado. Para purificar a proteína que está presente na fração insolúvel do lisado empregou-se o protocolo da lise híbrida a partir da fração insolúvel proveniente da lise nativa.

A fração insolúvel foi solubilizada com tampão desnaturante contendo 6 M de hidrocloreto de guanidina e deixada ligar à resina Ni-NTA Agarose. Então, a proteína que ficou ligada à resina foi submetida a uma sequência de lavagens com tampão contendo uréia e seguida de lavagens com tampão nativo. A eluição foi realizada com imidazol, na presença de tampão nativo. De acordo com a figura 12A, observa-se somente uma banda na altura de 30 kDa nos eluatos provenientes da lise híbrida. Esta banda foi reconhecida pelo anticorpo anti-₅His, confirmando que se trata da proteína recombinante ₆His-des+cis (figura 12B).

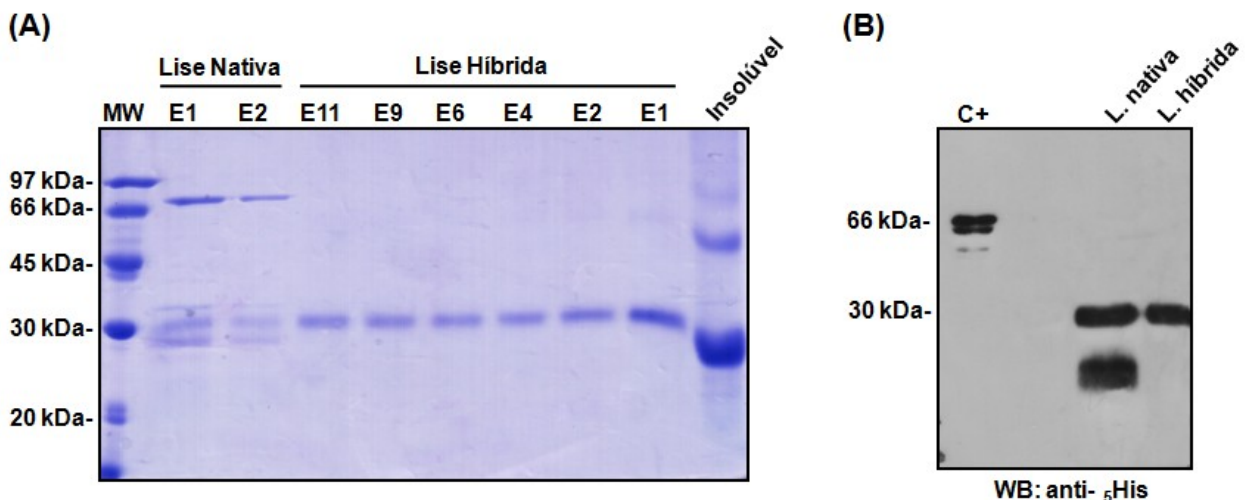
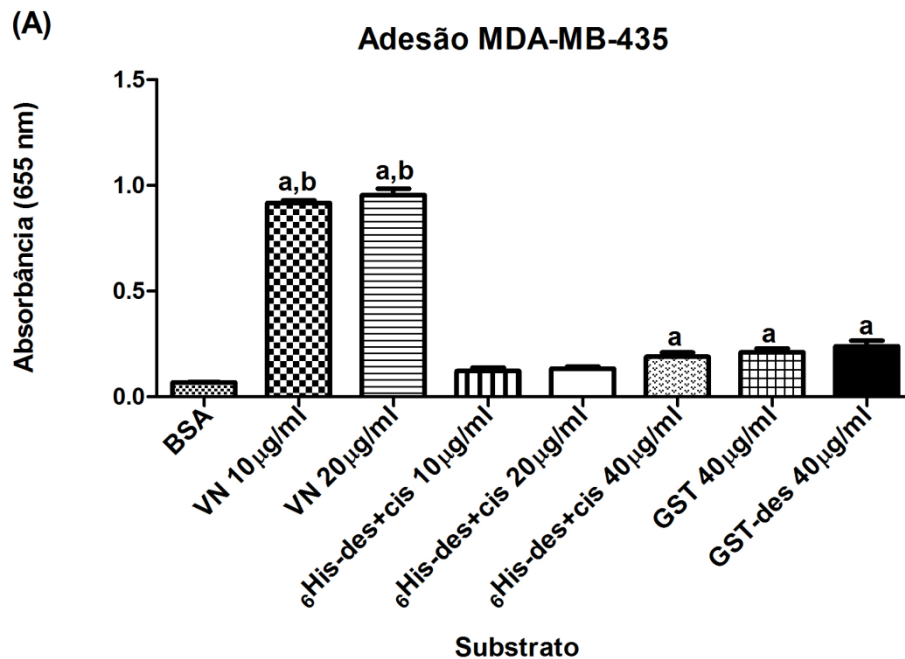


FIGURA 12 - Purificação da proteína recombinante ₆His-desintegrina+cisteína. (A) Análise por SDS-PAGE 12% da proteína recombinante ₆His-desintegrina+cisteína presente nos eluatos provenientes da lise nativa (E1 e E2), da fração insolúvel resultante da lise nativa (insolúvel) e dos eluatos provenientes da lise híbrida (E1, E2, E4, E6, E9, E11). MW: marcador de massa molecular. (B) *Western blotting* dos eluatos provenientes da lise nativa (L. nativa) e da lise híbrida (L. híbrida) usando o anticorpo anti-₅His. O controle positivo da reação (C+) é uma proteína possuidora de etiqueta de seis histidinas com purificação já padronizada.

Segundo Cal e colaboradores (2000) a construção de GST-desintegrina promove adesão de linhagens de neuroblastoma (NB100 e SHSY-5Y) e células CHO que superexpressam integrina $\beta 3$ (CHO- $\beta 3$). Assim, proteínas recombinantes GST-desintegrina e 6 His-des+cis foram usadas em ensaios de adesão para verificar o potencial adesivo destas construções.

Ensaio de adesão celular foram realizados usando linhagens de neuroblastoma murino (N2a, figura 13B) e humano (SHSY-5Y, figura 13C) e a linhagem de tumor de mama MDA-MB-435 que expressa grande quantidade de integrina $\alpha\beta 3$ (FELDING-HABERMANN *et al.*, 2001) (figura 13A). De acordo com os resultados obtidos nestes ensaios nenhuma das construções testadas apresentaram potencial adesivo. Esta ausência de adesão também foi verificada por Goldsmith e colaboradores (2004) que usaram o domínio desintegrina de ADAM23 de rato fusionada à GST.



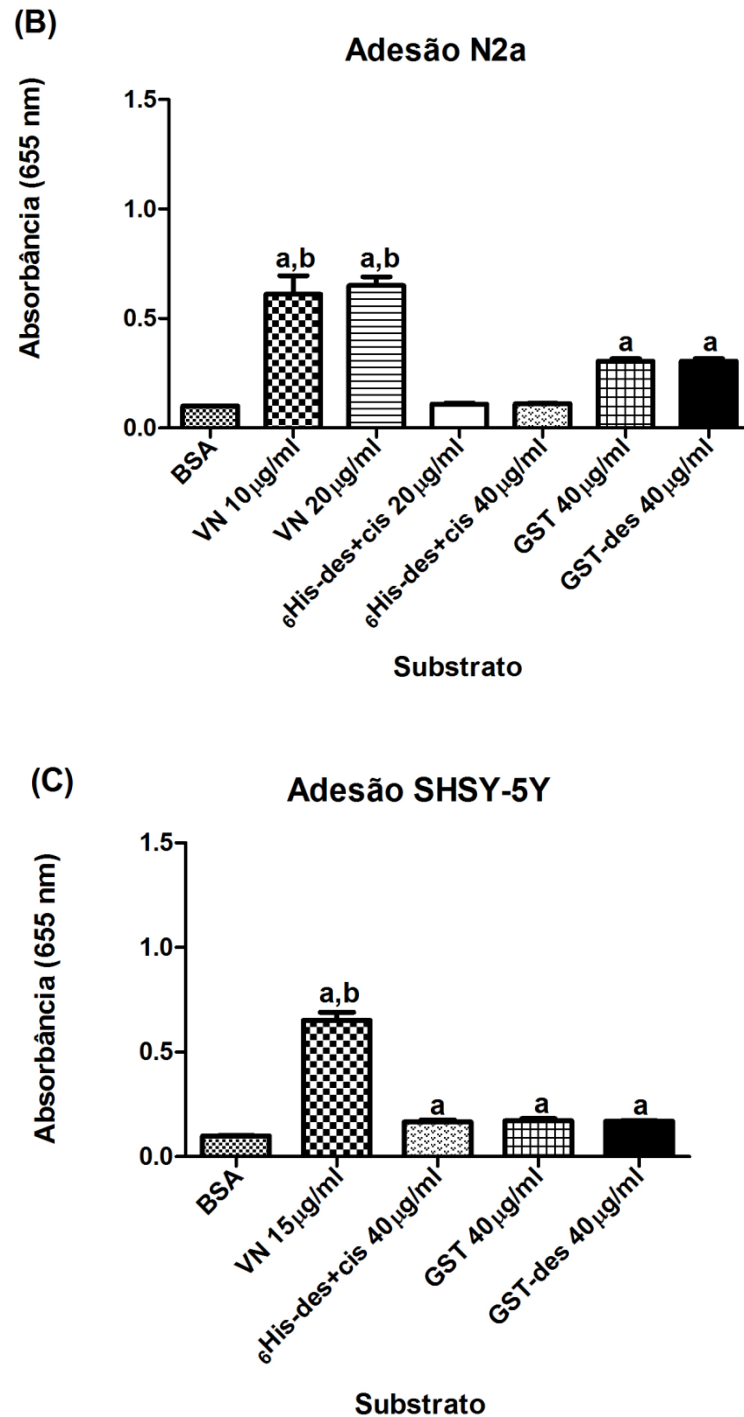


FIGURA 13 - Análise da adesão celular de diferentes linhagens sobre domínio desintegrina ou domínio desintegrina e região rica em cisteína de ADAM23.

Diferentes concentrações de 6 His-des+cis, Vitronectina, GST e GST-desintegrina foram adsorvidas em placas de 96 poços. BSA 2% foi usado como controle negativo. 10^5 Células da linhagem MDA-MB-435 (A), N2a (B) e SHSY-5Y (C) foram plaqueadas em cada poço (totalizando seis poços para cada proteína testada) e incubadas durante duas horas para que ocorresse a adesão. Os poços foram lavados para remoção das células não aderidas. As células que permaneceram aderidas foram coradas e, o corante foi subsequente extraído para mensuração da absorbância. A análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com Tukey's *post hoc* test (GraphPad Prism software). **a** indica $p < 0,05$ com relação ao controle BSA e **b**, $p < 0,05$ com relação a adesão em 6 His-des+cis e GST-des (gráfico representativo de 3 ensaios independentes).

4. 2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Com intuito de obter a proteína ADAM23 dobrada corretamente, resolveu-se fazer duas novas construções. Para estas construções apenas o ectodomínio de ADAM23 foi clonado em vetor pSecTag2/HygroA. Este vetor insere na região 5' da sequência codificadora para a proteína de interesse a sequência sinal para cadeia leve κ de imunoglobulina e desta forma permite a secreção da proteína recombinante de interesse. Além disso, a proteína expressa a partir do vetor pSecTag2/HygroA possui na sua região carboxi-terminal 6 resíduos de histidinas que permitem a detecção e purificação da proteína recombinante. Como esse sistema de expressão proporciona a produção da proteína recombinante de interesse em células de mamífero, isso poderia resolver os problemas de insolubilidade encontrado no sistema heterólogo de *E. coli*.

Um fragmento de DNA correspondente à sequência codificadora para o ectodomínio de ADAM23 (construção 5) e para o ectodomínio maduro (sem pró-domínio, construção 6) foram amplificados adequadamente através da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos desenhados. De acordo com a figura 14A (linha 2) o fragmento de interesse correspondente à sequência codificadora para o ectodomínio foi amplificado e a banda correspondente está na altura esperada (1881pb). Na figura 14B (linha 4) pode-se observar que a sequência codificadora para o ectodomínio sem o pró-domínio também foi amplificado adequadamente e a banda encontra-se na altura esperada (1530 pb).

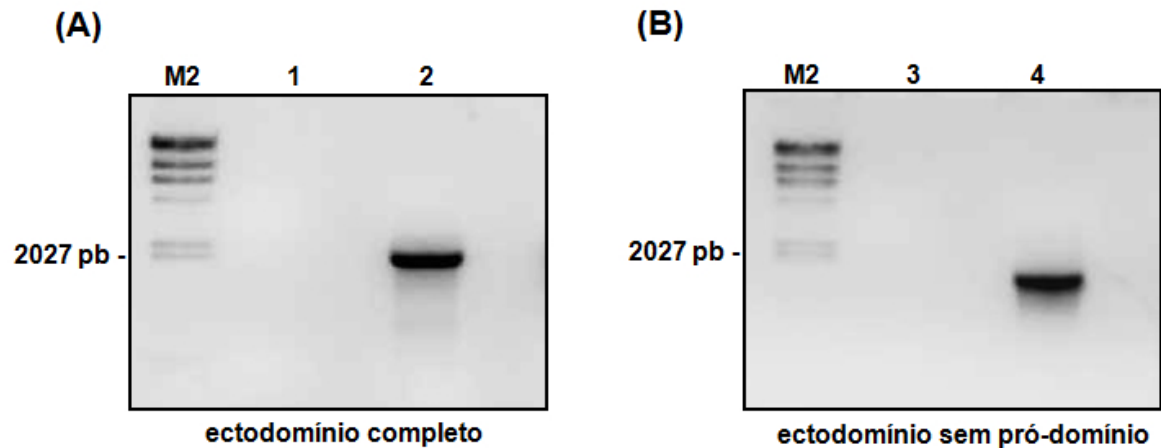


FIGURA 14 - Teste dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificar o ectodomínio de ADAM23 humana. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do produto amplificado por PCR usando como molde pcDNA3.1-ADAM23-HA e os oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar a sequência codificadora para o ectodomínio completo de ADAM23 **(A)** e para o ectodomínio sem o pró-domínio **(B)**. Na linha 2 está o fragmento codificador para o ectodomínio completo e seu respectivo controle negativo na linha 1. Na linha 4 está o fragmento codificador para o ectodomínio sem o pró-domínio e seu respectivo controle negativo na linha 3. M2: marcador Lambda DNA/*HindIII*.

Estes fragmentos amplificados especificamente foram clonados no sítio de restrição *HindIII* do vetor pSecTag2/HygroA. Os insertos foram então submetidos à reação de ligação ao vetor e os produtos destas reações de ligação foram usados para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α de *E. coli*.

Após a verificação dos clones que apresentavam a sequência codificadora pelo método de PCR de colônia, alguns deles foram escolhidos aleatoriamente e foram usados para amplificação e purificação de plasmídeo. Estes plasmídeos purificados foram então submetidos à digestão usando a enzima de restrição usada na clonagem (*HindIII*) para verificação da liberação dos insertos de interesse. De acordo com a figura 15 pode-se observar que os insertos de interesse foram liberados e consequentemente, o sítio de restrição foi mantido.

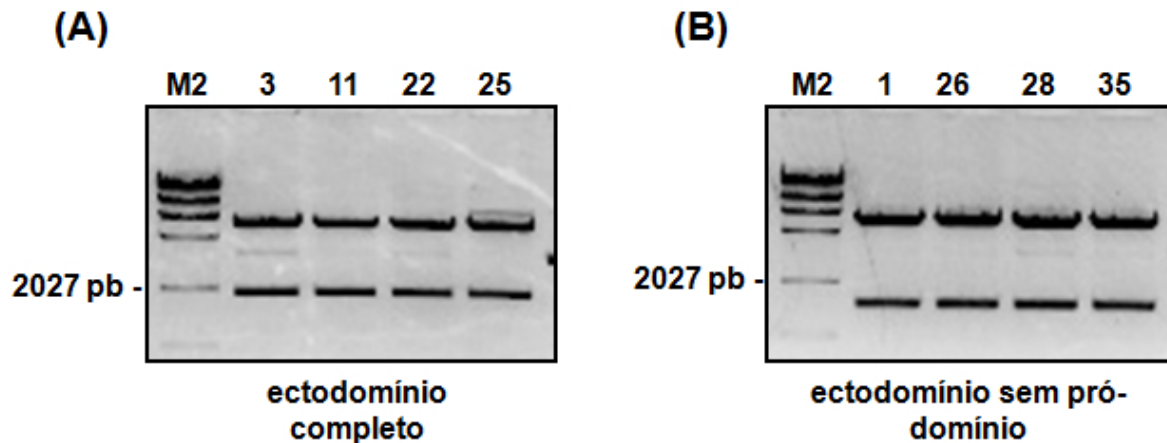


FIGURA 15 - Análise do perfil da digestão com a endonuclease de restrição usada para clonagem do ectodomínio completo e do ectodomínio sem o pró-domínio de ADAM23 humana em vetor pSecTag2/HygroA. Perfil eletroforético da digestão das colônias escolhidas para a construção contendo a sequência codificadora para o ectodomínio completo **(A)** e para o ectodomínio sem o pró-domínio **(B)**. As colônias escolhidas foram submetidas à digestão com a endonuclease de restrição usada na clonagem *HindIII*. A banda mais alta (maior quantidade de pares de bases) que aparece em todas as digestões corresponde ao plasmídeo aberto. As bandas abaixo com migração aproximadamente igual ao marcador de 2027 pb corresponde ao inserto codificante para o ectodomínio **(A)**. As bandas com migração um pouco abaixo ao marcador de 2027 pb corresponde ao inserto codificante para o ectodomínio sem o pró-domínio **(B)**. M2: marcador Lambda DNA/*HindIII*.

Os plasmídeos provenientes dos clones 11 e 22 da construção do ectodomínio completo e dos clones 1 e 28 foram sequenciados no laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. E após o sequenciamento, um plasmídeo de cada construção foi usado para a obtenção de plasmídeo em larga escala.

Células da linhagem HEK 293T foram primeiramente transfectadas com a construção do ectodomínio sem o pró-domínio por co-precipitação de fosfato de cálcio. Após diferentes tempos de expressão, o meio de cultura foi coletado e submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado. As células também foram coletadas e usadas para análise da presença da proteína recombinante no extrato celular.

O material eluído da resina de Ni-NTA Agarose e o extrato celular foram submetidos ao ensaio de *Western blotting* usando o anticorpo anti-₅His.

Para a construção correspondente ao ectodomínio maduro (sem o pró-domínio) não foi possível observar nenhuma proteína possuidora de 6 histidinas no meio de cultura das células. Apenas foi verificada uma banda na altura esperada para o ectodomínio sem o pró-domínio no extrato celular (dados não mostrados).

O mesmo procedimento foi feito com a construção contendo o ectodomínio completo e de acordo com a figura 16A, foi possível verificar que a proteína recombinante foi expressa, mas não foi secretada para o meio de cultura (figura 16A, Meio). No extrato celular (figura 16A, EC) aparecem duas bandas, uma de aproximadamente 60 kDa, que provavelmente corresponde à proteína recombinante madura após a clivagem do pró-domínio por endopeptidases e, outra de massa um pouco maior que corresponde à proteína imatura que não sofreu processamento. A presença do pró-domínio poderia ser importante para a conformação correta da proteína e auxiliar então na sua secreção (LIU *et al.*, 2009), entretanto, neste caso parece que sua presença não melhorou a secreção do ectodomínio para o meio extracelular.

Para verificar se de fato as bandas que aparecem no extrato de células transfectadas com pSecTag2/Hygro-ectodomínio ADAM23 eram específicas, dois controles foram testados. Células foram transfectadas com pSecTag2/HygroA e com pSecTag2/HygroA-PrP^C nas mesmas condições descritas para a transfecção com pSecTag2/HygroA-ectodomínio ADAM23. Amostras de meio de cultura e extrato celular foram analisadas da mesma forma que foi feita a análise da expressão do ectodomínio de ADAM23. Como mostra a figura 16B, as bandas observadas no extrato de células transfectadas com o ectodomínio de ADAM23 não aparecem no extrato de células transfectadas com o vetor vazio e nem no extrato de células transfectadas com o vetor contendo a sequência codificadora para PrP^C. No meio de cultura das células transfectadas com pSecTag2/HygroA-PrP^C foi possível observar a presença de PrP^C secretado, o que confirma a funcionalidade do vetor.

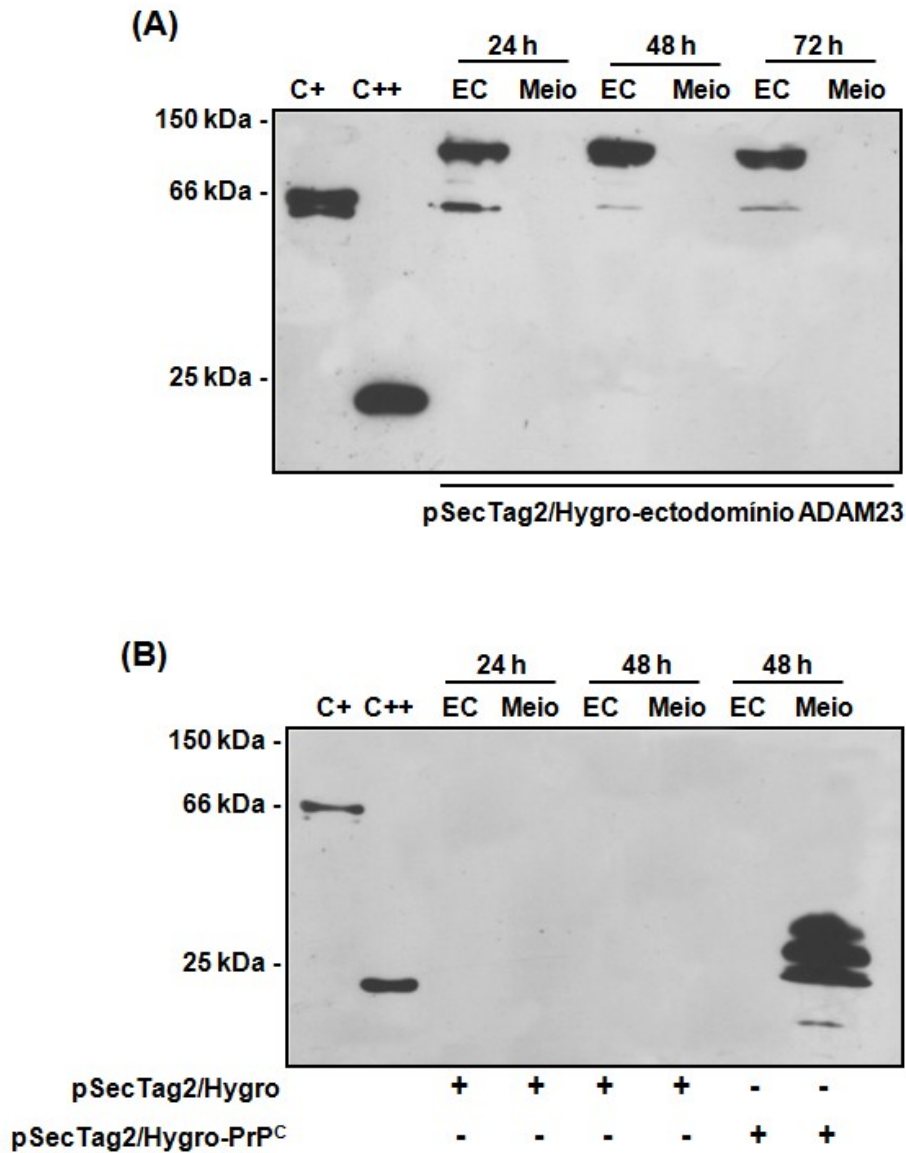


FIGURA 16 - Análise da expressssão do ectodomínio de ADAM23 em células de mamífero HEK 293T. (A) Células transfectadas com pSecTag2/HygroA-ectodomínio ADAM23 tiveram seu meio coletado após diferentes tempos de expressão (conforme indicado - 24h, 48h e 72h) e submetidos à IMAC e com as células foi feito extrato celular. Amostras provenientes da purificação do material contido no meio (Meio) e do extrato celular (EC) foram submetidos à reação de *Western blotting* usando o anticorpo anti-₅His. Verifica-se a presença de bandas reconhecidas especificamente que correspondem ao ectodomínio maduro (banda de massa mais baixa) e ao ectodomínio imaturo (banda de massa mais alta) apenas no extrato celular. (B) Células transfectadas com pSecTag2/HygroA e pSecTag2/HygroA-PrP^C foram analisadas como descrito para pSecTag2/HygroA-ectodomínio ADAM23. Verifica-se que não há nenhuma banda reconhecida no extrato celular (EC) e no meio das células transfectadas com pSecTag2/HygroA-PrP^C foi possível purificar PrP^C secretado (Meio). C+ e C++ são duas proteínas recombinantes que possuem etiqueta de 6 histidinas e que foram usadas como controle positivo da reação de *Western blotting*.

4. 3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA A PROTEÍNA ADAM23

A proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina que ficou nos corpos de inclusão após a lise com sarcosil teve sua concentração estimada pela comparação com quantidades conhecidas de BSA aplicadas em gel de poliacrilamida (dados não mostrados). Os corpos de inclusão contendo a proteína recombinante foram submetidos à SDS-PAGE e a banda correspondente a GST-metaloprotease+desintegrina foi cortada do gel e utilizada para imunizar dois coelhos da raça neozelandesa. Após a terceira imunização, os soros dos animais foram coletados e testados por *Western blotting* usando extrato de células HEK 293T transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA.

Conforme mostra a figura 17, os anticorpos presentes nos soros dos animais R22 e R23 imunizados com a banda correspondente à GST-metaloprotease+desintegrina não reconheceram a proteína superexpressa em células HEK 293T, a qual foi confirmada ter sido expressa adequadamente nessas células pela reação positiva com o anticorpo comercial anti-HA (controle positivo).

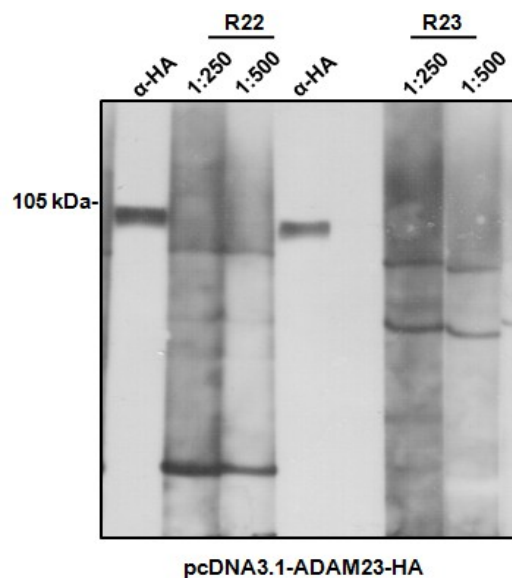


FIGURA 17 - Teste do soro imune dos animais R22 e R23 por *Western blotting*. 80 µg de extrato celular da linhagem HEK 293T transfectada com pcDNA3-ADAM23-HA foram resolvidos por SDS-PAGE 10% e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os soros dos animais imunizados (R22 e R23) na diluição de 1: 250 e 1: 500. O anticorpo comercial anti-HA (diluição 1: 1000) foi empregado como controle positivo. A membrana foi então incubada com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho acoplado à HRP. Observa-se que a proteína ADAM23-HA foi devidamente expressa pelas células sendo reconhecida pelo anticorpo anti-HA. No entanto, os anticorpos presentes no soro dos animais não reconhecem a proteína expressa pela linhagem HEK 293T.

Outra tentativa de produzir anticorpos que reconheçam a proteína ADAM23 foi realizada usando a proteína $\text{}^6\text{His-des+cis}$ purificada pela metodologia da lise híbrida que apresentou um alto grau de pureza (figura 12). Após a terceira imunização dos animais os soros foram testados e titulados por ELISA, usando como antígeno a própria proteína recombinante $\text{}^6\text{His-des+cis}$ (figura 18). De acordo com o resultado do ELISA observa-se que os anticorpos presentes no soro tanto do animal R33 quanto do animal R35 reconhecem a proteína recombinante. Nenhuma reação foi observada quando se empregou o soro pré-imune destes animais. Como controle positivo da reação foi utilizado o anticorpo anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana (COSTA *et al.*, 2003) que reconhece de maneira específica a proteína recombinante $\text{}^6\text{His-des+cis}$.

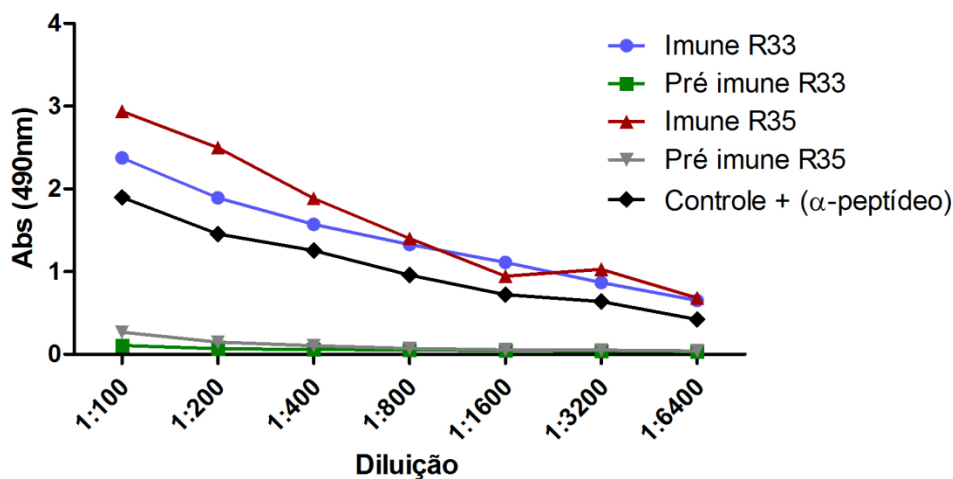


FIGURA 18 - Teste do soro dos animais R33 e R35 por ELISA de captura de anticorpo. Uma alíquota de 0,1 μg de proteína recombinante $\text{}^6\text{His-des+cis}$ foi adsorvida em cada poço. Após a adsorção, os poços foram lavados e bloqueados com BSA. Então, o soro de cada animal assim como seu respectivo soro pré-imune foi submetido à diluição seriada iniciando na diluição de 1: 100 até chegar em 1: 6400. Absorbância foi lida em 490 nm. Observa-se uma alta absorbância proveniente da reação dos anticorpos provenientes do soro imune dos coelhos R33 e R35 assim como do controle positivo da reação. Reações não observadas quando empregado o soro pré-imune dos coelhos.

Após a confirmação de que os soros reconhecem a proteína recombinante no ensaio de ELISA, estes soros foram testados por *Western blotting* usando a proteína recombinante e extratos de células HEK 293T transfectadas com pcDNA3.1ADAM23-HA ou com o vetor vazio. A figura 19 mostra que os anticorpos presentes nos soros dos animais R33 e R35 reconhecem a proteína recombinante (figura 19A) bem como a proteína superexpressa por células HEK 293T (figura 19B). Entretanto, também ocorreu o reconhecimento de outros antígenos presentes no extrato de HEK 293T, antígenos reconhecidos também por anticorpos presentes no soro pré-imune destes animais.

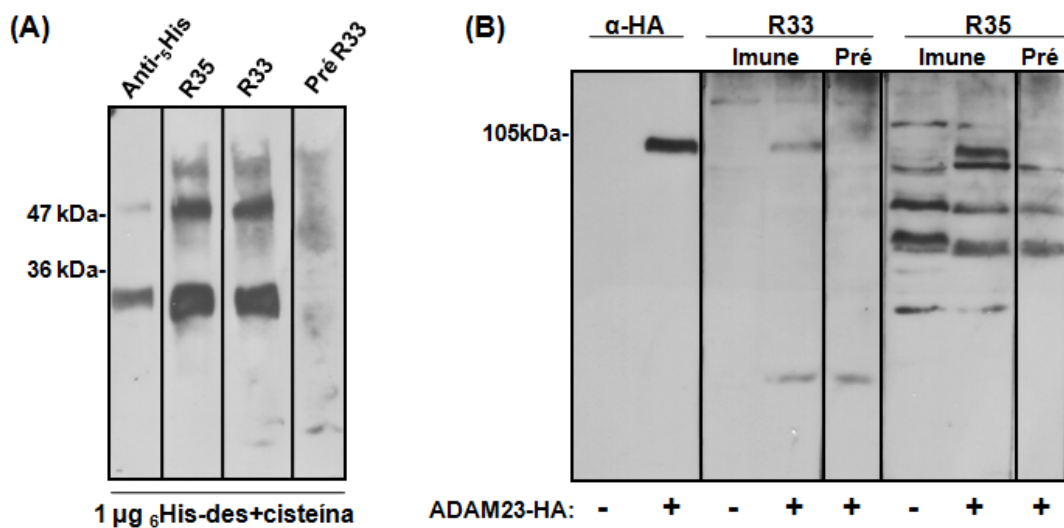


FIGURA 19 - Teste do soro dos animais R33 e R35 por *Western blotting*. (A) 1 μ g de proteína recombinante foi resolvido por SDS-PAGE 12% e eletrotransferido para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os soros dos animais imunizados (R33 e R35) na diluição de 1: 500. Foi usado soro pré-imune do coelho R33 como controle negativo da reação e o anticorpo monoclonal anti- γ His foi empregado para o controle positivo. (B) 80 μ g de extrato celular da linhagem HEK 293T transfectada (ADAM23-HA +) ou não (ADAM23-HA -) com pcDNA3-ADAM23-HA foram resolvidos por SDS-PAGE 10% e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os soros dos animais imunizados (R33 e R35) na diluição de 1:500. O soro pré-imune dos animais foi empregado como controle negativo da reação e o anticorpo anti-HA foi usado como controle positivo.

Os soros também foram testados por *Western blotting* usando extrato total de encéfalo de camundongo. Como os anticorpos produzidos são policlonais e existe uma identidade de 93,5% entre a sequência humana e a murina (baseado no alinhamento de sequências múltiplas - ClustalW) estes anticorpos provavelmente reconheceriam o antígeno expresso em tecido nervoso murino.

No entanto, usando como amostra extrato total de encéfalo de camundongo não foi possível verificar nenhuma reação na altura esperada para proteína ADAM23 (aproximadamente 90 kDa para a forma imatura) (dados não mostrados).

Como no experimento acima descrito foi usado extrato total, poderia ser que neste tipo de amostra existisse uma quantidade muito pequena de ADAM23, não sendo possível a detecção pelos anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados. Então, na tentativa de enriquecer a quantidade da proteína de interesse na amostra de tecido nervoso, realizou-se uma preparação de membrana total a partir de encéfalo de camundongo. Neste tipo de preparação há um enriquecimento de proteínas de membrana, podendo assim haver uma quantidade maior da proteína ADAM23.

Usando este tipo de metodologia, observa-se na figura 20 que há quantidades da proteína ADAM23 detectáveis na preparação de membrana de encéfalo que foi evidenciada pela reação do controle positivo da reação de *Western blotting*, o anticorpo anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana (COSTA *et al.*, 2003). Entretanto nenhuma banda na altura esperada é reconhecida pelos anticorpos presentes nos soros dos animais R33 e R35. Contudo, foi possível observar que os anticorpos presentes tanto no soro imune quanto no soro pré-imune reagem com antígenos inespecíficos presentes na amostra analisada.

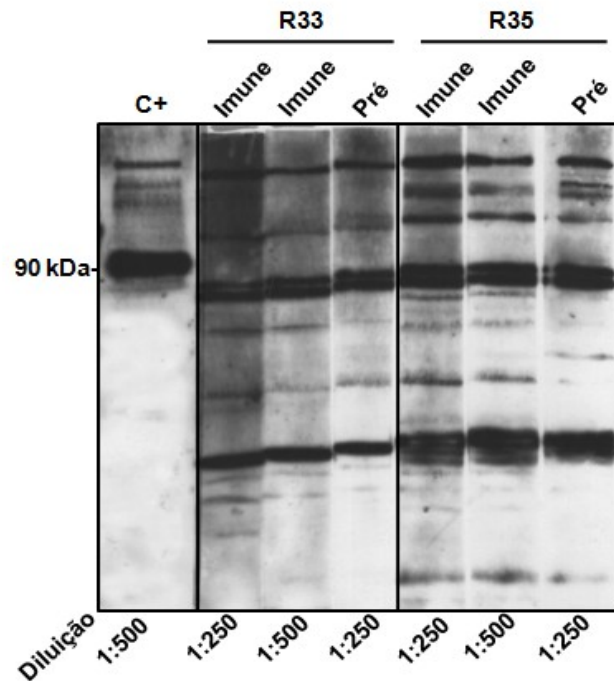


FIGURA 20 - Teste do soro dos animais R33 e R35 por *Western blotting* usando amostra de preparação de membrana de encéfalo. 80 µg de preparação de membrana de encéfalo foram resolvidos por SDS-PAGE 10% e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os soros imune e pré-imune dos animais R33 e R35 nas diluições de 1: 250 e 1: 500. Como controle positivo da reação foi usado o anticorpo anti-peptídeo desintegrina de ADAM23 humana. Observa-se que há quantidades significativas da proteína ADAM23 endógena nesta preparação que foi devidamente reconhecida pelo anticorpo usado como controle positivo. No entanto, quando empregado os soros dos animais imunizados nenhuma banda correspondente a ADAM23 foi observada. Somente bandas inespecíficas reconhecidas pelos anticorpos presente tanto nos soros imunes como nos soros pré-imunes puderam ser observadas.

Os resultados mostrados aqui demonstram a grande dificuldade em produzir anticorpos que reconheçam especificamente a proteína ADAM23.

Em resumo, os resultados até aqui apresentados indicam que, apesar de várias tentativas, houve dificuldades em se obter quantidades significativas da proteína ADAM23 pura e solúvel em sistemas heterólogos. Como será visto adiante, o domínio recombinante GST-desintegrina, o único que foi produzido com sucesso, foi usado em ensaios de ligação *in vitro* e mostrou-se útil na identificação de uma interação direta entre ADAM23 e PrP^C. Apesar da falta de ferramentas, a investigação da interação entre ADAM23 e PrP^C continuou através da utilização de metodologias que dispensavam o uso de ADAM23 recombinante pura e solúvel, como os ensaios de co-immunoprecipitação (ver resultados adiante). A dificuldade em se obter anticorpos específicos anti-ADAM23 também pôde ser contornada através

da expressão dessa proteína com uma etiqueta C-terminal de Hemaglutinina (HA) em células de mamífero e o uso de anticorpo anti-HA (disponível comercialmente).

4. 4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ADAM23 E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR

Utilizando a metodologia de perfusão transcardíaca tempo-controlado para manutenção das interações protéicas que ocorrem em tecidos complexos tais como o encéfalo, Schmitt-Ulms e colaboradores (2004) descreveram mais de 20 proteínas que residem na vizinhança dos micro-ambientes onde PrP^C é encontrado. Dentre estas proteínas, a proteína ADAM23 foi encontrada na vizinhança de PrP^C. Embora este trabalho tenha mostrado que ADAM23 e PrP^C estão localizadas no mesmo micro-ambiente da membrana celular, nenhuma interação direta ou indireta entre essas duas proteínas havia sido demonstrada. Resultados anteriores do nosso grupo (COSTA, 2007) evidenciaram parcialmente a existência da interação *in vitro* entre ADAM23 e PrP^C.

Estes resultados foram obtidos através da co-immunoprecipitação de ADAM23-HA a partir da imunoprecipitação de GFP-PrP^C, ambas as proteínas presentes no extrato protéico de células HEK 293T co-transfectadas com os vetores de expressão pEGFP-PrP^C e pcDNA3.1-ADAM23-HA. Além disso, ensaios de *pull-down* mostraram que tanto GFP-PrP^C superexpresso por HEK 293T quanto PrP^C endógeno presente no tecido nervoso podem interagir *in vitro* com a proteína recombinante ₆His-ADAM23 murina (domínios metaloprotease e desintegrina).

Com intuito de confirmar os resultados obtidos previamente (COSTA, 2007), ensaios de co-immunoprecipitação foram realizados usando outra construção para expressão de PrP^C em células de mamífero sem a proteína de fusão GFP. Extratos protéicos provenientes de células co-transfectadas com os vetores de expressão pcDNA3.1PrP^C e pcDNA3.1 ADAM23-HA (figura 21, Input) foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos policlonais que reconhecem a proteína príon celular. As proteínas presentes nos imunocomplexos foram eluídas da matriz sólida de proteínas A/G sepharose e analisadas por *Western blotting* usando os anticorpos anti-HA e anti-PrP^C. O resultado mostra que ADAM23-HA foi recuperada das proteínas A/G sepharose incubadas com extrato celular contendo anticorpos anti-

PrP^C (figura 21, IP), reação evidenciada usando o anticorpo anti-HA que reconhece uma banda de aproximadamente 100 kDa correspondente à proteína ADAM23-HA (figura 21, painel superior). No entanto esta reação não foi observada quando o extrato celular foi incubado com soro normal de camundongo. Esta mesma membrana foi reagida com anticorpo anti-PrP^C, confirmando a presença de PrP^C imunoprecipitado (banda de aproximadamente 35 kDa, fig. 21, painel inferior) na mesma amostra em que ADAM23-HA foi recuperada. Isso indica que é necessário que PrP^C seja imunoprecipitado para então se obter ADAM23.

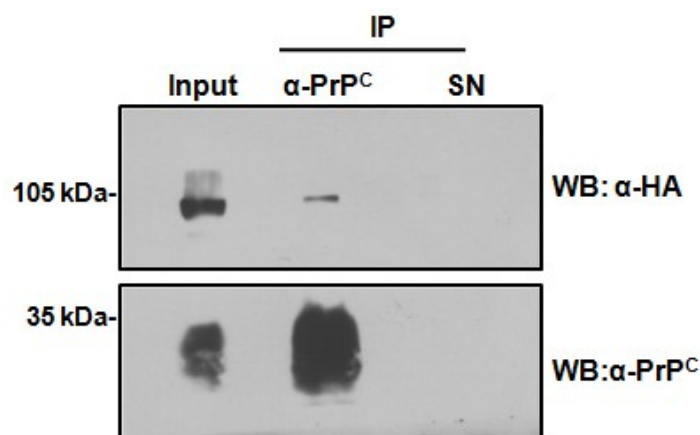


FIGURA 21 - ADAM23-HA e PrP^C superexpressos em células HEK 293T podem ser co-imunoprecipitados. Extratos de células HEK 293T co-transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e pcDNA3.1-PrP^C (Input) foram separados por SDS-PAGE para verificar a eficiência da transfecção, a qual foi confirmada pela reação de *Western blotting* (Input). O lisado celular foi submetido à reação de imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-PrP^C ou soro normal de camundongo não imunizado (SN, controle negativo). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por *Western blotting* com anti-HA (painel superior). A mesma membrana foi reagida com anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que PrP^C foi imunoprecipitado durante a reação.

Demonstrada a interação *in vitro* a partir das proteínas superexpressas em células HEK 293T, resolveu-se investigar se esta interação era também observada a partir das proteínas ADAM23 e PrP^C presentes no tecido nervoso.

Foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação a partir de amostras de extrato total de encéfalo de camundongo submetidas à imunoprecipitação com anticorpos anti-PrP^C. Como mostra a reação de *Western blotting* usando anticorpo anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana (COSTA *et al.*, 2003), uma banda na altura correspondente à molécula imatura de ADAM23 murina (aproximadamente 90 kDa) foi reconhecida pelo anticorpo no material imunoprecipitado com anti-PrP^C

(figura 22). Nenhuma banda correspondente foi reconhecida pelo anticorpo no material imunoprecipitado somente com soro normal de camundongo (SN, controle negativo da reação). A mesma membrana foi reagida com anti-PrP^C para confirmar que PrP^C foi imunoprecipitado especificamente.

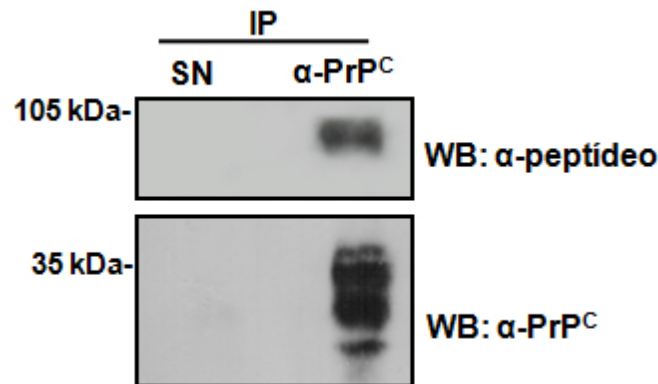


FIGURA 22 - ADAM23 e PrP^C presentes no tecido nervoso podem ser co-imunoprecipitados. Extrato total de encéfalo de camundongo foi submetido à reação de imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-PrP^C ou soro normal de camundongo (SN, controle negativo). As proteínas imunoprecipitadas foram analisadas por *Western blotting* com o anticorpo anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana (painel superior). A mesma membrana foi reagida com anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que PrP^C foi imunoprecipitado durante a reação.

Estes resultados mais uma vez demonstram uma interação específica *in vitro* entre ADAM23 e PrP^C. Entretanto, eles não são capazes de mostrar se esta interação é direta ou é indireta (mediada por outras moléculas), pois as metodologias utilizadas até agora (co-imunoprecipitação e *pull-down* com extratos protéicos) não excluem a possibilidade desta interação ser dependente de outras moléculas.

Para investigar se a interação poderia ocorrer diretamente entre ADAM23 e PrP^C realizou-se o ensaio de ligação, no qual apenas proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas (⁶His-PrP^C e GST-desintegrina). Neste ensaio, a proteína recombinante GST-desintegrina (GST-des) foi previamente adsorvida em placas de 96 poços, seguida do bloqueio com BSA. Posteriormente, foram adicionadas quantidades crescentes de ⁶His-PrP^C (0,025 - 0,750 µg) nos poços onde havia GST-desintegrina imobilizada ou apenas GST (controle negativo). Após a incubação de 16 horas seguiu-se com a reação usando anticorpos anti-PrP^C para detectar ⁶His-PrP^C que foi capaz de ligar-se as proteínas previamente adsorvidas. Como mostra a

figura 23, ${}^6\text{His-PrP}^{\text{C}}$ liga-se à GST-desintegrina de maneira específica e direta. Levando em consideração que neste ensaio apenas usou-se o domínio desintegrina de ADAM23, pode-se inferir que este domínio deve ser o responsável pela interação. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de haver outros domínios que também podem interagir com ${}^6\text{His-PrP}^{\text{C}}$.

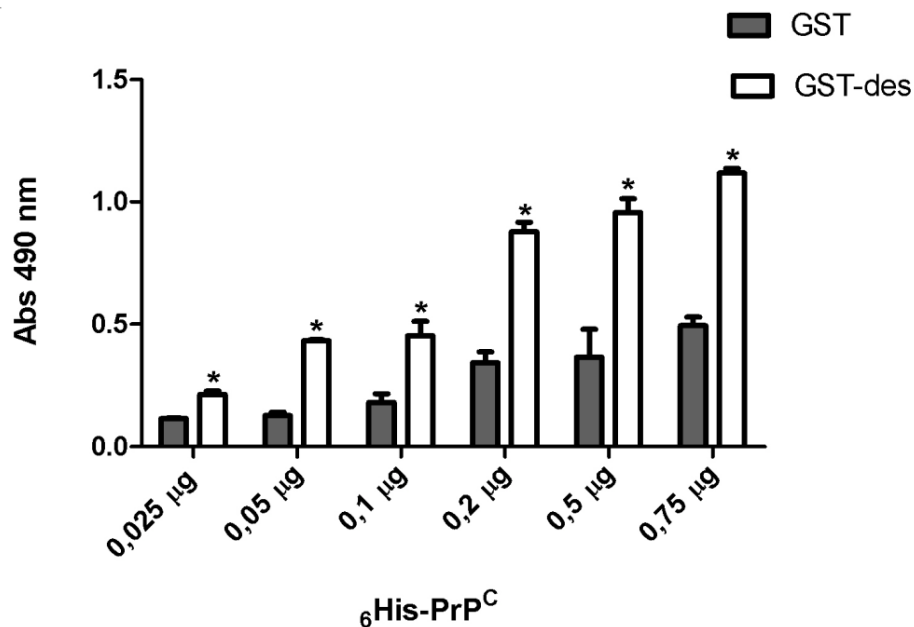


FIGURA 23 - Interação direta entre GST-ADAM23 domínio desintegrina e ${}^6\text{His-PrP}^{\text{C}}$. Ensaio de ligação no qual diferentes concentrações de ${}^6\text{His-PrP}^{\text{C}}$ foram incubada sobre GST-ADAM23 domínio desintegrina (GST-des) ou somente GST (controle negativo). A análise de ${}^6\text{His-PrP}^{\text{C}}$ ligado foi feita usando o anticorpo anti-PrP^C seguida da reação com anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase e a absorbância foi mensurada à 490 nm. * diferença significativa com relação ao controle negativo $p < 0.01$, Student's *t-test* (gráfico representativo de 6 ensaios independentes).

Estes resultados juntamente com os dados já apresentados na dissertação de mestrado (COSTA, 2007) caracterizam a interação *in vitro* entre ADAM23 e PrP^C, possibilitando a publicação destes resultados (COSTA *et al.*, 2009).

Com a caracterização da interação ADAM23/PrP^C demonstrada, o próximo passo foi verificar qual seria o significado biológico desta associação protéica.

O domínio desintegrina das ADAMs tem sido descrito como responsável pelas interações proteína-proteína e tendo como principais parceiros as integrinas. Levando em consideração que estas interações atuam na regulação da adesão celular (SEALS & COURTNEIDGE, 2004; YANG *et al.*, 2006; ROCKS *et al.*, 2008), resolveu-se observar o papel da interação ADAM23/PrP^C neste fenômeno biológico.

Para verificar o papel desta interação na adesão celular, foram utilizadas algumas ferramentas como a proteína recombinante $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ e células da linhagem MDA-MB-435 *knockdown* para ADAM23 (VERBISCK *et al.* 2009). Ensaios foram realizados usando $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ como molécula adesiva. Foi possível observar que a adesão sobre $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ dos clones que são *knockdown* para ADAM23 (clones B e C) é diminuída em relação ao tipo selvagem (WT) (figura 24).

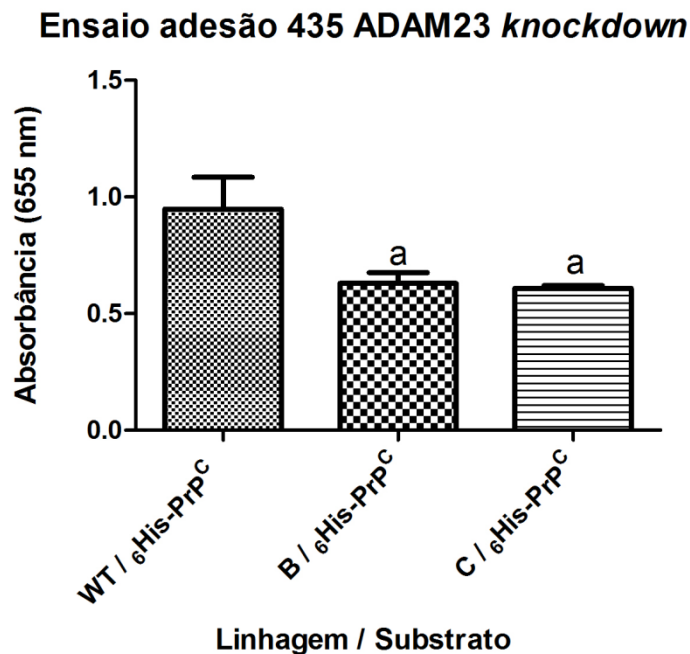


FIGURA 24 - Análise da adesão celular da linhagem 435 selvagem (WT) e dos clones *knockdown* para ADAM23 (clones B e C) sobre $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$. 10^5 células de cada linhagem foram plaqueadas em poços previamente tratados com $20\ \mu\text{g}$ de $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ (totalizando seis poços para cada linhagem) e incubadas durante duas horas para que ocorresse a adesão. Os poços foram lavados para remoção das células não aderidas. As células que permaneceram aderidas foram coradas e, o corante foi subsequente extraído para mensuração da absorvância. Observa-se que a adesão sobre $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ dos clones que não expressam ADAM23 (clones B e C) é diminuída em relação ao tipo selvagem (WT). A análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com Tukey's *post hoc* test (GraphPad Prism software). a indica $p < 0,05$ com relação à linhagem selvagem (WT) (gráfico representativo de 4 ensaios independentes).

Este resultado sugere que a interação ADAM23/PrP^C possa atuar na modulação de processos de adesão. Para investigar melhor o papel desta interação neste tipo de função biológica seriam necessárias outras ferramentas, dentre as quais anticorpos anti-ADAM23 que reconheçam este antígeno na sua forma nativa, forma esta encontrada quando células estão estruturalmente intactas e viáveis. Infelizmente, o grupo ainda não dispõe deste reagente.

Assim sendo, outras abordagens para verificar a função da interação entre ADAM23 e PrP^C foram conduzidas.

Sabendo que PrP^C é uma molécula residente de *lipid rafts* (revisado por HOOPER *et al.*, 2008) e ADAM23 está na vizinhança dos microdomínios onde se encontra PrP^C (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004), resolveu-se verificar o padrão de localização desta moléculas em preparações de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton-X100 em gradiente de Nycodenz (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000).

Nesta metodologia para preparação de *lipid rafts*, os microdomínios ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos que são insolúveis em Triton X-100 são encontrados nas frações de menor densidade de Nycodenz (retiradas no topo do tubo de ultracentrifugação) e as demais regiões de membrana que são solúveis em Triton X-100 e a fração citoplasmática encontram-se nas frações de maior densidade do gradiente (retiradas sequencialmente em direção ao fundo do tubo).

Primeiramente, realizou-se a padronização desta metodologia usando encéfalo de camundongo (como descrito por NASLAVSKY *et al.*, 1997 e KESHET *et al.*, 2000) e células da linhagem HEK 293T transfectadas com pEGFP-PrP^C. De acordo com a figura 25, a padronização de preparação de *lipid rafts* foi bem sucedida. Tanto proteína príon celular endógena quanto a quimera protéica GFP-PrP^C foram encontradas nas frações de menor densidade de Nycodenz, que correspondem aos *lipid rafts*, como já descrito por vários grupos (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000; SARNATTARO *et al.*, 2009).

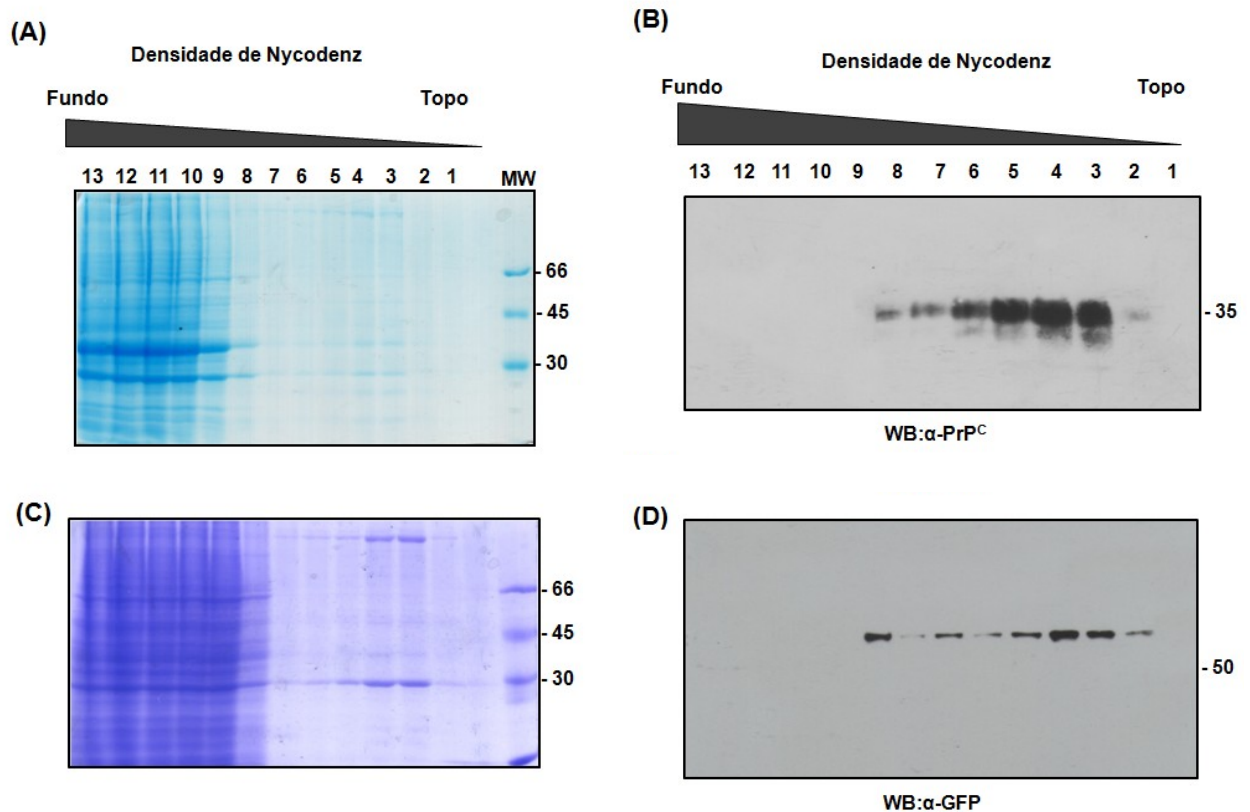


FIGURA 25 - Padronização da técnica de preparação de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton X-100 em gradiente de Nycodenz. (A e B)

Um encéfalo de camundongo foi submetido à preparação de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton-X100. O tecido foi dissociado em tampão TNE gelado. Um gradiente linear de 35-8% de Nycodenz foi sobreposto ao lisado. Os tubos foram centrifugados 300000 xg por 4h a 4°C. Treze frações foram coletadas a partir do topo até o fundo do tubo. **(A)** O perfil eletroforético de cada uma das 13 frações foi analisado por SDS-PAGE 10%. **(B)** As frações foram analisadas por *Western blotting* usando o anticorpo anti-PrP^C. **(C e D)** Células HEK 293T transfectadas com pEGFP-PrP^C foram submetidas à preparação de *lipid rafts*. **(C)** O perfil eletroforético de cada uma das 13 frações foi analisado por SDS-PAGE 10%. **(D)** As frações foram analisadas por *Western blotting* usando o anticorpo anti-GFP. PrP^C foi encontrado nas frações de menor densidade de Nycodenz que correspondem aos *lipid rafts* tanto na amostra de encéfalo como nas células transfectadas.

Após a padronização da separação de *lipid rafts* realizada em nosso laboratório, iniciou-se uma investigação para determinar se a interação ADAM23/PrP^C tinha alguma relação na distribuição das mesmas na membrana celular. Para isso, células da linhagem HEK 293T foram transfectadas com os plasmídeos de interesse (conforme mostra a figura 26A). Após 48 horas da transfecção, as células foram submetidas à preparação de *lipid rafts* e as treze frações coletadas de cada amostra das diferentes transfecções foram analisadas por *Western blotting* (figura 26A).

Quando as células foram co-transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e com o plasmídeo controle pEGFP (condição 1), ADAM23-HA somente pôde ser detectada nas frações de maior densidade de Nycodenz, correspondentes às frações solúveis em Triton X-100, ou seja, as frações que não correspondem aos *lipid rafts* (painel a, anti-HA). A proteína GFP (painel c, anti-GFP) também foi detectada nas mesmas frações de ADAM23-HA. No painel b, observa-se que a preparação foi realizada adequadamente pela marcação de flotilina 1 (anti-flotilina 1), que é uma molécula residente de *lipid rafts* (LANGHORST *et al.*, 2005) e neste ensaio foi usada como controle das preparações.

Células co-transfectadas com pcDNA3.1 e pEGFP-PrP^C (condição 2) tiveram GFP-PrP^C detectado apenas nas frações de menor densidade de Nycodenz, indicando sua presença em *lipid rafts* (painel d, anti-GFP).

Quando as células foram co-transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C (condição 3), observa-se que ADAM23-HA está presente tanto nas frações solúveis em Triton X-100, bem como nas frações insolúveis em Triton X-100, que correspondem às frações com menor densidade de Nycodenz e são caracterizadas como frações de *lipid rafts* (painel d, anti-HA). Como controle desta preparação mais uma vez utilizou-se a marcação de flotilina 1 (painel g) que se manteve igual na preparação proveniente de células transfectadas somente com pcDNA3.1-ADAM23-HA. Neste caso, o próprio GFP-PrP^C também pode ser considerado como marcador de *lipid rafts* (painel f).

De acordo com a figura 26B, observa-se que a quantidade total de ADAM23-HA é mantida nas duas condições transfecções (condição 1 e 3), evidenciando que a presença de GFP-PrP^C não aumenta a expressão dessa molécula, apesar de alterar a sua distribuição na membrana celular (fig. 26A).

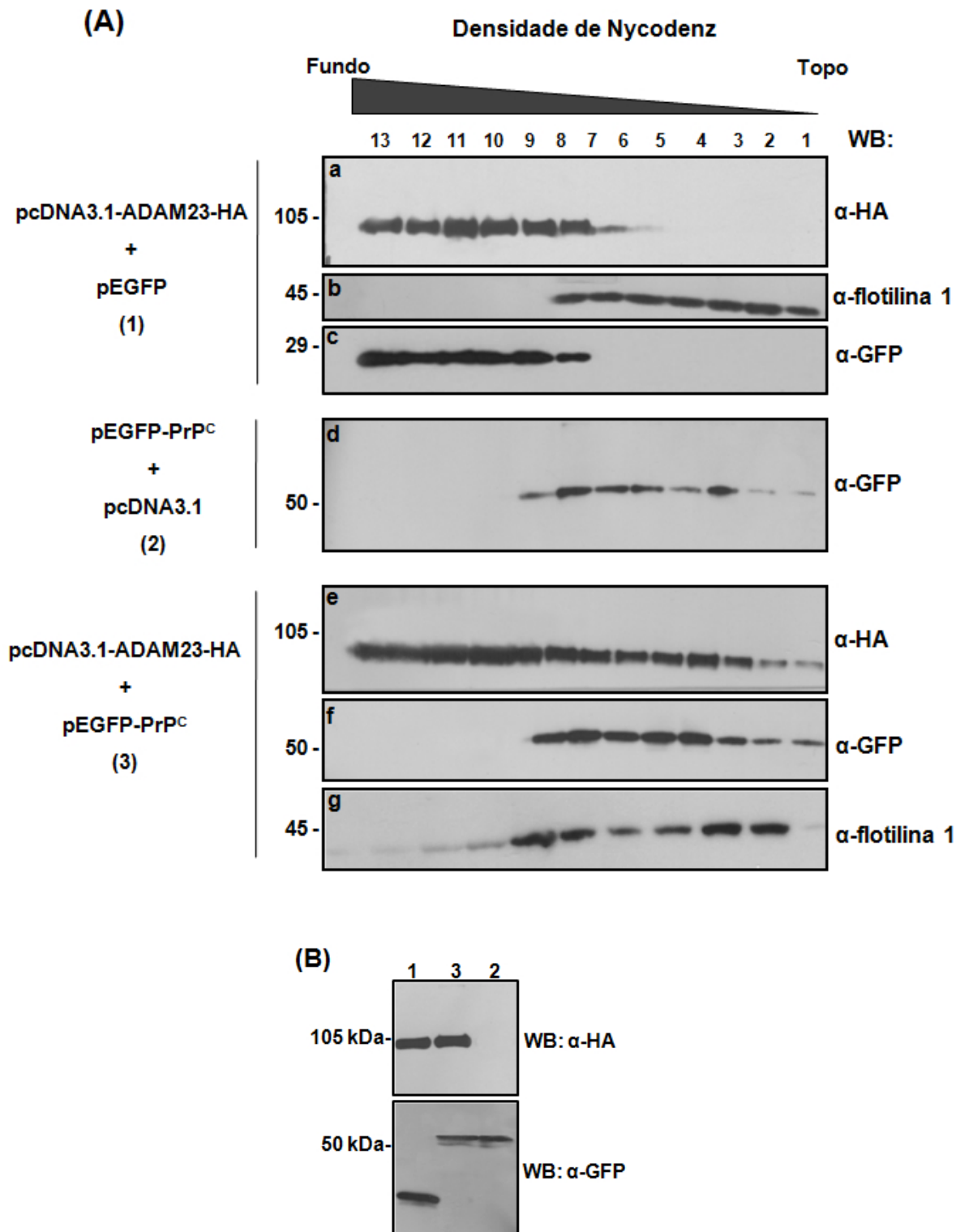


FIGURA 26 - Avaliação da distribuição das proteínas ADAM23-HA e GFP-PrP^C expressas por HEK 293T em preparações de *lipid rafts*. (A) Células HEK 293T foram co-transfectadas com os plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP (condição 1) (painéis a, b e c) ou com os plasmídeo pEGFP-PrP^C e pcDNA3.1 (condição 2) (painel d) ou co-transfectadas com os plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C (condição 3) (painéis e, f e g). As células transfectadas foram submetidas à preparação de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton-X100 em gradiente de Nycodenz. As frações coletadas foram analisadas por *Western blotting*. ADAM23-HA, quando na presença de GFP, foi encontrada nas frações de alta densidade do

gradiente que estão mais para o fundo do tubo e que correspondem às frações solúveis em Triton-X100 (painel **a**, anti-HA). GFP foi encontrado nas mesmas frações que ADAM23-HA (painel **b**, anti GFP). GFP-PrP^C e flotilina 1 foram detectadas nas frações de baixa densidade do gradiente, correspondentes as regiões insolúveis em Triton-X100 ou, frações de *lipid rafts* (painéis **d** e **f**, anti-GFP e painéis **b** e **g**, anti-flotilina 1). Quando as células foram co-transfectadas com pEGFP-PrP^C e pcDNA-ADAM23-HA observa-se um deslocamento de ADAM23-HA para as regiões de *rafts* (painel **e**, anti-HA). No entanto, o padrão de flotilina foi mantido (painel **g**, anti-flotilina 1). Nesta condição GFP-PrP^C permanece nas regiões de *rafts* (painel **f**, anti- GFP). **(B)** 80 µg de extrato total de células submetidas às transfecções descritas acima foram reagidas com anti-HA e anti-GFP em ensaio de *Western blotting*. Verifica-se que a quantidade total de ADAM23-HA é igual nas duas condições (1 e 3), assim como, a quantidade de GFP-PrP^C também se mantém nas duas condições (2 e 3).

Para quantificar ADAM23-HA presente nos *lipids rafts*, amostras provenientes de células transfectadas pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C ou com o plasmídeo controle pEGFP foram separadas em frações de *lipid rafts* (figura 27A, frações 2 a 6) e frações não *lipid rafts* (figura 27 B, frações 9 a 13) e destas combinações foram aplicados no gel 25 µl de cada amostra (aproximadamente 40 µg de proteína de cada condição). ADAM23-HA foi detectada usando o anticorpo anti-HA (painéis superiores) e GFP-PrP^C detectado com o anticorpo anti-GFP (painéis inferiores). De acordo com a figura 27, ADAM23-HA foi principalmente detectada nas frações correspondentes aos *lipid rafts* quando GFP-PrP^C também era expresso (figura 27A, A23+GFP-PrP^C). Uma pequena quantidade de ADAM23-HA também foi detectada nas preparações provenientes das células que expressam somente GFP. Entretanto, nas células que expressam GFP-PrP^C a quantidade de ADAM23-HA foi aumentada em aproximadamente 50% com relação às células que somente expressavam GFP (figura 27A, gráfico). No entanto, a quantidade de flotilina 1 se manteve em ambas as condições. Quando se comparam as quantidades de ADAM23-HA nas frações que não correspondem aos *lipid rafts*, observa-se que não existe diferença entre as quantidades de ADAM23-HA detectáveis (figura 27B, gráfico).

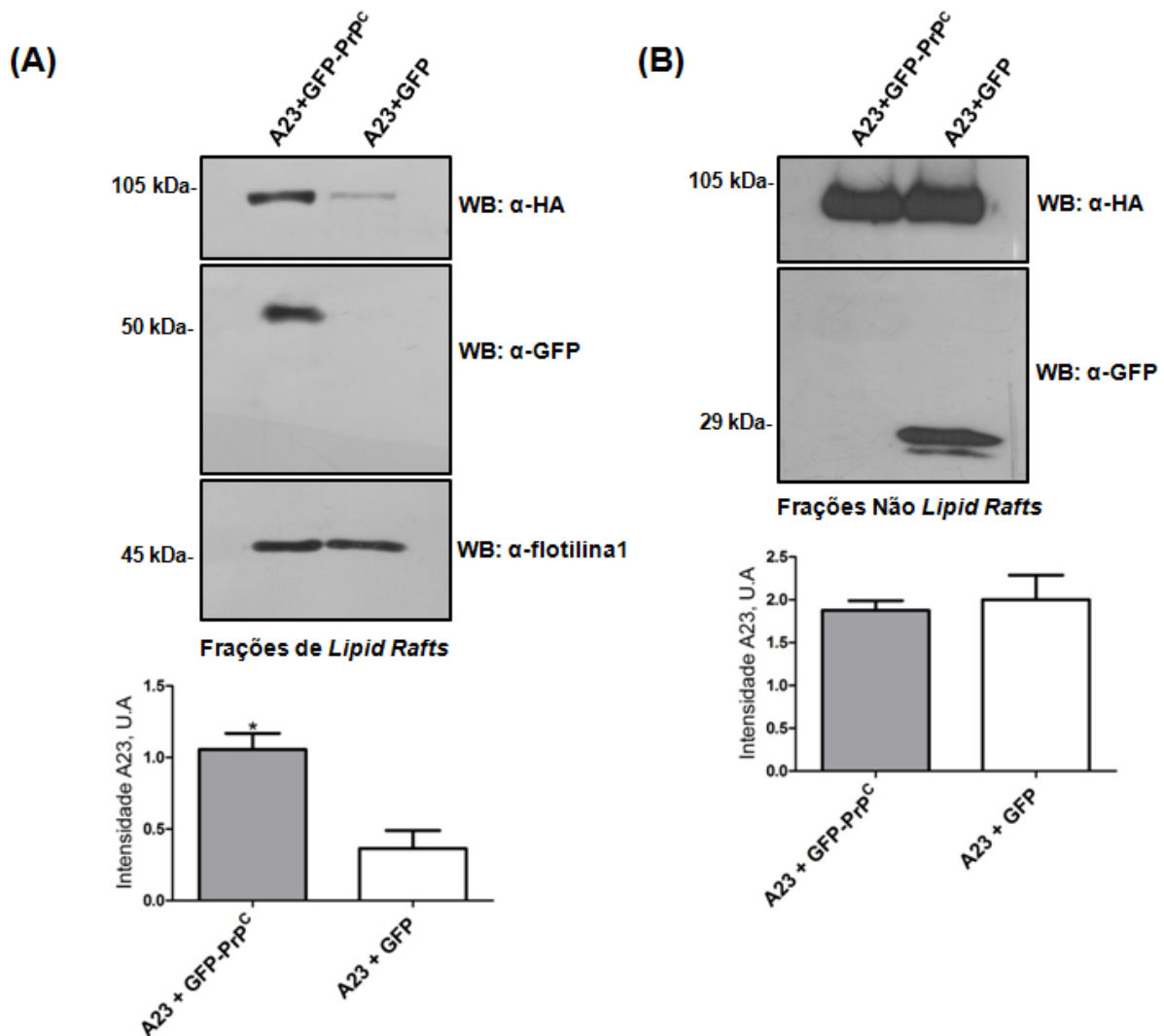


FIGURA 27 - Influência de GFP-PrP^C no deslocamento de ADAM23-HA para regiões de *lipid rafts*. (A) Amostras correspondentes às frações de *lipid rafts* e de (B) *não rafts* das condições descritas na figura 26 foram analisadas por *Western blotting* com anti-HA e as bandas foram densitometradas usando programa ImageJ. Observa-se um aumento de aproximadamente 50% de ADAM23-HA na amostra de *rafts* quando GFP-PrP^C está presente (gráfico da esquerda). A reação foi normalizada pela detecção de flotilina 1 que não apresenta diferença nas amostras de *rafts* analisadas. Não há diferenças de quantidade de ADAM23-HA nas frações que não correspondem a *lipid rafts* (gráfico da direita). * diferença significativa com relação ao controle transfectado somente com o vetor pEGFP $p < 0.01$, Student's *t*-test.

Outras linhagens (HeLa e MDA-MB-435) que superexpressavam ADAM23-HA decorrente de transfecção estável com o plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foram submetidas a mesma preparação de *lipid rafts* usada para células HEK 293T. Nestas linhagens observa-se que ADAM23-HA mantém sua distribuição em frações de maior densidade de Nycodenz (figura 28), assim como ocorria com as células HEK 293T transfectadas transientemente com o mesmo plasmídeo.

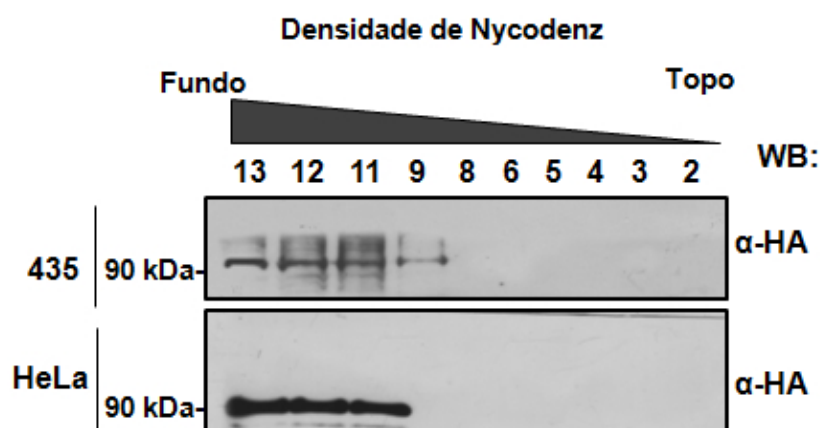


FIGURA 28 - Localização de ADAM23-HA em linhagens transfectadas permanentemente com pcDNA3.1-ADAM23-HA. Células da linhagem 435 e HeLa transfectadas permanentemente apresentam como padrão de localização de ADAM23-HA regiões que não correspondem aos *lipid rafts*.

Estes resultados sugerem que ADAM23 parece migrar para regiões de *lipid rafts* na presença de PrP^C superexpresso. Assim, o papel dos *lipid rafts* na interação destas duas proteínas foi sequencialmente investigado.

Na tentativa de verificar se os *lipid rafts* eram cruciais para a manutenção da interação ADAM23/PrP^C em células HEK 293T, ensaios de co-immunoprecipitação foram realizados empregando-se células tratadas com methyl-β-cyclodextrin, um reagente que promove a depleção de colesterol e conseqüentemente, dissociação dos *lipid rafts* (TAYLOR *et al.*, 2005; TELLIER *et al.*, 2006). Neste ensaio, células co-transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C foram tratadas ou não com methyl-β-cyclodextrin e os extratos protéicos submetidos à reação de imunoprecipitação com anticorpos anti-PrP^C.

De acordo com a figura 29A, ADAM23-HA foi co-immunoprecipitada a partir da imunoprecipitação de GFP-PrP^C tanto na amostra que foi submetida à depleção de colesterol pelo tratamento com methyl-β-cyclodextrin (+ MβCD), como na amostra que não foi submetida a este procedimento (- MβCD). A eficiência do tratamento com a droga pode ser observada pela distribuição de GFP-PrP^C fora dos *lipid rafts* nas amostras provenientes de células tratadas com methyl-β-cyclodextrin (figura 29B).

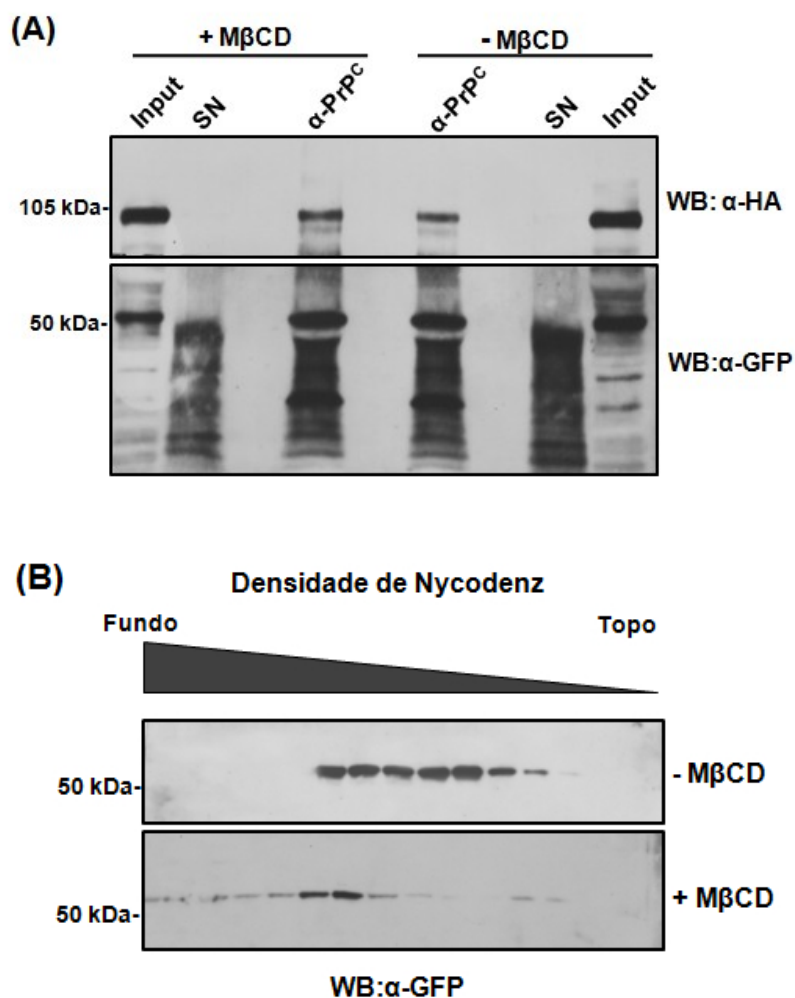


FIGURA 29 - Papel dos *lipid rafts* na interação de ADAM23-HA e GFP-PrP^C. (A) Células HEK 293T co-transfectadas com ADAM23-HA e GFP-PrP^C (Input) foram tratadas com methyl-β-cyclodextrin (+MβCD) ou não (-MβCD). Após o tratamento, as células foram lisadas e os extratos celulares submetidos à imunoprecipitação com anti-PrP^C (α-PrP^C). Amostras imunoprecipitadas foram reagidas com os anticorpos anti-HA (painel superior) e anti-GFP (painel inferior). Observa-se que ocorreu a co-imunoprecipitação de ADAM23-HA independente do tratamento com MβCD. Nenhuma reação inespecífica foi observada nos extratos imunoprecipitados com soro normal de camundongo (SN). (B) Preparação de *lipid rafts* a partir das amostras tratadas ou não com MβCD. Observa-se que o tratamento com MβCD foi eficaz na desorganização de *lipid rafts* e nestas amostras GFP-PrP^C é encontrado nas frações de maior densidade do gradiente.

Com este resultado conclui-se que a interação ADAM23/PrP^C observada não é dependente dos microdomínios de membrana, os *lipid rafts*. Assim, resolveu-se investigar outras possíveis funções para esta interação.

A figura 26 mostra que além de ADAM23-HA movimentar-se para as regiões de *lipid rafts* na presença de GFP-PrP^C também existe uma diferença na quantidade de GFP-PrP^C detectável nos *lipids rafts* quando ADAM23-HA também é expressa na mesma célula.

PrP^C é descrito como uma molécula residente de *lipid rafts* (revisado por HOOPER *et al.*, 2008). Dados reportados por Taylor e colaboradores (2005) demonstram que PrP^C superexpresso em neuroblastoma humano SHSY-5Y é endocitado via clatrina quando ligado ao íon cobre, embora PrP^C seja uma molécula de *lipid rafts*. Uma possível hipótese para explicar este fato é proposta por Hooper e colaboradores (2008). De acordo com esta hipótese, PrP^C seria uma molécula que localiza-se na região de transição de regiões entre *lipid rafts* e não *rafts*, sendo mantido nos *rafts* pela interação com outra molécula residente destes domínios. Quando ligado ao cobre, PrP^C mudaria sua conformação e deixaria de interagir com a proteína que o mantém nos *lipid rafst*, sendo deslocado para regiões de não *rafts* e então, seria endocitado via clatrina (HOOPER *et al.*, 2008).

A primeira hipótese que surgiu foi a possibilidade de ADAM23 não permitir a saída de PrP^C dos *rafts* evitando que ele seja endocitado pela via endocítica dependente de clatrina. Sendo assim, primeiramente verificou-se se em células HEK 293T era possível identificar esta movimentação de GFP-PrP^C após o tratamento com cobre. Após a transfecção com GFP-PrP^C, células HEK 293T foram submetidas ao tratamento com 500 µM CuSO₄ por 30 minutos a 37°C e, em seguida foi realizada a preparação de *lipid rafts*. De acordo com a figura 30, o tratamento com cobre não foi eficiente na movimentação de GFP-PrP^C para fora dos microdomínios. Assim, essa metodologia não pôde ser empregada para verificar o papel de ADAM23 em modular a saída de PrP^C dos *rafts*.

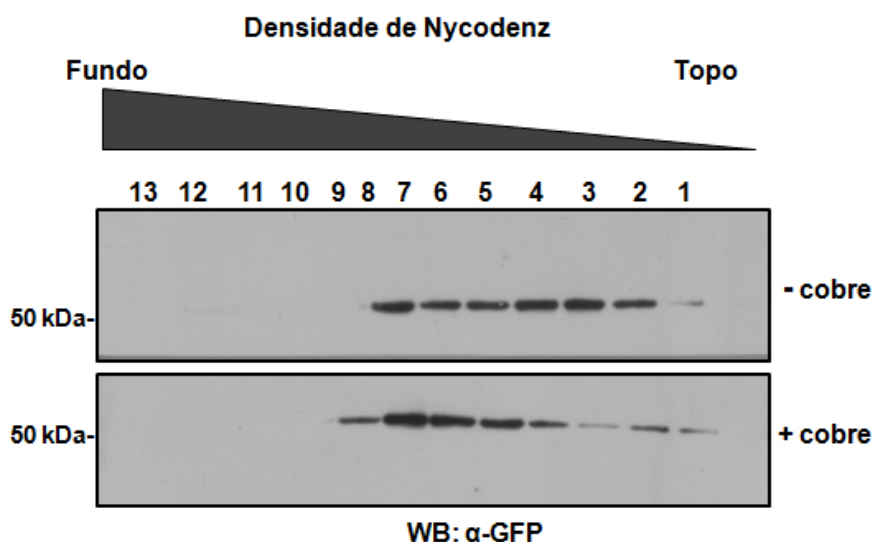


FIGURA 30 - Verificação da movimentação de GFP-PrP^C para fora dos *lipid rafts* em células HEK 293T após tratamento com cobre. Células HEK 293T transfectadas com GFP-PrP^C foram tratadas com cobre (+ cobre) ou não (- cobre). Em seguida as células foram submetidas à preparação de *lipid rafts*. Todas as amostras provenientes das preparações foram reagidas com anticorpo anti-GFP. Verifica-se que as células que foram tratadas com cobre não apresentaram movimentação de GFP-PrP^C para fora dos *lipid rafts*.

Como o ensaio descrito acima não alterou a distribuição de PrP^C na membrana de células HEK 293T, outro ensaio foi empregado para testar a hipótese da regulação de ADAM23 no tráfego de GFP-PrP^C. Células HEK 293T co-transfectadas com pEGFP-PrP^C e pCDNA3.1 ou pEGFP-PrP^C e pCDNA3.1-ADAM23-HA tiveram suas proteínas de superfície marcadas com biotina através do tratamento com Sulfo-NHS-LC-Biotin por 1 hora a 4°C (essa temperatura foi usada para evitar a endocitose de moléculas biotiniladas). Posteriormente as células foram incubadas com 500 μM CuSO₄ por 30 minutos a 37°C para que ocorresse a endocitose de PrP^C como descrito por Sumudhu e colaboradores (2001). Após a incubação com o CuSO₄, as células foram tratadas com tripsina/EDTA para remoção das proteínas de superfície que não foram internalizadas e então as células foram lisadas. Quantidades iguais de extrato protéico foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpos anti-PrP^C. Para visualização apenas do PrP^C que foi biotinilado (*i.e.* endocitado) a membrana foi reagida com extravidina-HRP, que liga-se especificamente à biotina (figura 31).

De acordo com a figura 31A, o tratamento com cobre foi eficiente para promover a endocitose de GFP-PrP^C (banda de aproximadamente 60 kDa). Além disso, observa-se que a linhagem HEK 293T expressa endogenamente PrP^C (banda visualizada na altura de aproximadamente 35 kDa) e que este PrP^C endógeno também é endocitado na presença de íons cobre.

A figura 31B mostra que as células que expressam ADAM23-HA pode ser observada uma redução na taxa de endocitose de GFP-PrP^C e de PrP^C endógeno.

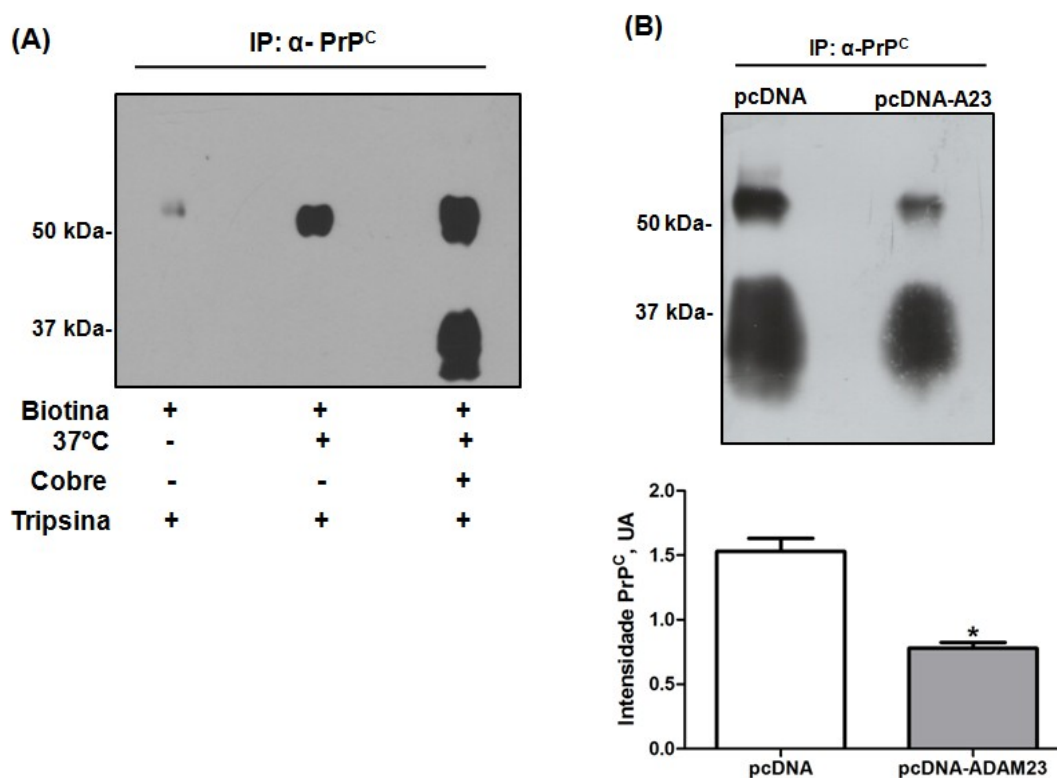


FIGURA 31 - Papel de ADAM23 na endocitose de PrP^C. (A) Células HEK 293T transfectadas com GFP-PrP^C foram tratadas com biotina, íons cobre e tripsina conforme indicado na figura. Após estes tratamentos, foi feito extrato das células submetidas às diferentes condições, seguida da imunoprecipitação com anti-PrP^C. A membrana foi reagida com extravidina-HRP, evidenciando somente proteínas marcadas com biotina e endocitadas. Verifica-se que o tratamento com cobre promoveu a endocitose de PrP^C. (B) Células co-transfectadas com GFP-PrP^C e ADAM23-HA (pcDNA-ADAM23-HA) ou com o vetor vazio (pcDNA) foram submetidas ao procedimento de endocitose mediada por cobre e seguida da imunoprecipitação com anti-PrP^C. Observa-se que nas células transfectadas com ADAM23-HA a endocitose de GFP-PrP^C e PrP^C endógeno é diminuída quando comparada com células que não expressam ADAM23-HA. As bandas correspondentes a GFP-PrP^C e PrP^C endógeno foram densitometradas usando programa ImageJ. (blotting representativo de 3 ensaios independentes, * diferença significativa com relação ao controle transfectado somente com o vetor pcDNA3.1 p < 0.01, Student's *t*-test).

Os resultados aqui apresentados sugerem a participação de ADAM23 no tráfego de moléculas, em particular a proteína príon celular. Sendo assim, novas perspectivas podem ser abordadas no que diz respeito às funções biológicas atribuídas à proteína ADAM23.

5 DISCUSSÃO

5. 1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE ADAM23 RECOMBINANTE

Para que fosse possível investigar a interação entre ADAM23 e PrP^C e o papel biológico desta interação, foco do presente trabalho, foi preciso produzir ferramentas que possibilitassem este estudo. Como não estão disponíveis anticorpos comerciais para a ADAM23, uma das ferramentas importantes para o desenvolvimento deste trabalho, foi necessária a produção dos mesmos. Para isso, primeiramente houve necessidade de produzir uma proteína recombinante ADAM23, que seria então utilizada em imunizações e também poderia ser empregadas em ensaios bioquímicos e funcionais. Durante o desenvolvimento deste trabalho diversas construções da proteína ADAM23 foram feitas com a finalidade de resolver problemas de expressão e purificação encontrados.

Inicialmente escolheu-se o sistema pGEX para expressão heteróloga em *E. coli*. Neste sistema a proteína de interesse apresenta-se fusionada a proteína glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* que possui massa de 27 kDa e que liga-se com alta afinidade e de maneira reversível a matrizes de afinidade contendo glutathione. Além disso, este sistema de fusão também pode favorecer a solubilidade da proteína recombinante de interesse (SAMBROOK *et al.*, 2001; HAMMARSTROM *et al.*, 2002).

A partir da inserção do fragmento de DNA que codifica para o domínio metaloprotease (construção 1) da proteína ADAM23 humana, do fragmento que codifica para o domínio desintegrina (construção 2) e do fragmento que codifica os dois domínios citados (construção 3) no vetor de expressão pGEX-2T, iniciaram-se as expressões e purificações das proteínas recombinantes em sistema pGEX. De acordo com a figura 5, observa-se que todas as construções foram expressas adequadamente utilizando a estirpe de *E. coli* DH5 α .

A purificação destas proteínas foi inicialmente realizada seguindo o protocolo para lise nativa já estabelecido para este tipo de vetor (ver GST Gene Fusion System Handbook). De acordo com a figura 6, somente a purificação da proteína GST-desintegrina foi bem sucedida e grandes quantidades de proteína recombinante puderam ser obtidas (~ 10 mg/ litro de cultura) e com um alto grau de pureza. As proteínas GST-metaloprotease e GST-metaloprotease+desintegrina não

puderam ser purificadas com o mesmo rendimento que a construção GST-desintegrina, isto porque essas duas construções formam corpos de inclusão e são encontradas na fração insolúvel do lisado (figura 6B e 6C), não sendo recuperadas apenas pela lise mecânica ou pela utilização de detergentes não iônicos como o Triton X-100. Embora a fusão à GST seja usada para promover a solubilização das proteínas recombinantes, muitas vezes a solubilidade desejada não é alcançada e as proteínas recombinantes fusionadas à GST acabam por formar os corpos de inclusão.

O mecanismo exato pelo qual se formam os corpos de inclusão não é totalmente conhecido e deve variar de acordo com diferentes proteínas-alvo e com as condições de expressão. Sabe-se que estas estruturas são consequência dos altos níveis de expressão e ausência de um dobramento correto que levam a exposição de regiões hidrofóbicas e formação de agregados insolúveis. Estas estruturas são normalmente formadas durante a expressão de genes heterólogos, principalmente de mamíferos e de vírus (RUDOLPH & LILIE, 1996; BARNEYX & MUJACIC, 2004; VENTURA & VILLAVERDE, 2006).

Análises de proteômica mostram que os corpos de inclusão são bastante homogêneos e são formados quase que exclusivamente (aproximadamente 90%) pelo produto recombinante (VENTURA & VILLAVERDE, 2006). Assim sendo, a expressão de proteínas recombinantes como corpos de inclusão pode em alguns casos ser vantajoso, pois permite que uma grande quantidade da proteína de interesse produzida na bactéria fique protegida da degradação proteolítica. Entretanto, proteínas que formam corpos de inclusão na maioria das vezes não apresentam atividade biológica e necessitam de métodos elaborados de solubilização, purificação e redobramento para que a proteína possa ser recuperada com a atividade biológica esperada (CLARK, 1998; BARNEYX & MUJACIC, 2004; SINGH & PANDA, 2005; VENTURA & VILLAVERDE, 2006).

Sabendo que a formação de corpos de inclusão é consequência dos altos níveis de expressão, a primeira tentativa de se obter as proteínas de interesse na forma solúvel foi introduzir alterações no protocolo original de expressão. A diminuição dos níveis de expressão pela diminuição da concentração do agente indutor e da temperatura das culturas durante a indução são modificações que muitas vezes resolvem o problema de insolubilidade (RUDOLPH & LILIE, 1996; BARNEYX & MUJACIC, 2004; VERA *et al.*, 2006; BURGEES, 2009). Algumas

modificações no protocolo de expressão foram então realizadas, sendo elas a diminuição da temperatura de expressão de 30°C para 20°C e diminuição da concentração do agente indutor (IPTG) de 0,1 mM para 0,05 mM. Entretanto, a diminuição nos níveis de expressão não afetou na solubilidade das proteínas de interesse, permanecendo estas nos corpos de inclusão (dados não mostrados).

A próxima tentativa foi usar metodologias de solubilização para recuperar as proteínas presentes nos corpos de inclusão. No caso de proteínas fusionadas à GST, onde a purificação pela matriz cromatográfica glutathiona sepharose 4B é dependente de conformação, concentrações altas de determinados agentes caotrópicos usados com êxito para solubilizar corpos de inclusão tais como hidrocloreto de guanidina (6 M) e uréia (8 M) não seriam compatíveis com a purificação. Entretanto, alguns trabalhos mostram que uréia quando usada na concentração de 3 M pode promover alguma solubilização e manter algum tipo de conformação, assim como o detergente aniônico sarcosil (CLARK, 1998; FRANGIONI & NEEL, 1993; TSUMOTO *et al.*, 2003, BURGEES, 2009).

Nas purificações em que foram utilizadas o agente solubilizador uréia na concentração de 3 M, nenhuma proteína recombinante foi recuperada da fração insolúvel do lisado (dados não mostrados), evidenciando que esta baixa concentração de uréia não foi capaz de solubilizar os corpos de inclusão formados por GST-metaloprotease e GST-met+desintegrina.

Uma segunda tentativa de solubilizar os corpos de inclusão foi realizada empregando-se sarcosil. Este detergente aniônico foi capaz de solubilizar parte da proteína recombinante presente nos corpos de inclusão como mostra a figura 8. No entanto, constatou-se que a proteína não pôde ser eluída da resina de glutathiona sepharose 4B. Como as lavagens foram realizadas na ausência do sarcosil é possível que tenha ocorrido à precipitação da proteína recombinante pela retirada drástica do agente caotrópico. Frangioni e Neel (1993) discutem que algumas proteínas após terem sido solubilizadas com sarcosil falharam ao serem eluídas da matriz de glutathiona sepharose. A resposta para a não eluição destas proteínas estaria no fato delas formarem interações hidrofóbicas inespecíficas, o que impediria a eluição pela glutathiona livre.

Outras possibilidades poderiam ser empregadas para melhorar a solubilidade da proteína de interesse. Uma delas seria a co-expressão de uma combinação de chaperonas dos complexos DnaK (DnaK/DnaJ/GrpE), GroEL (GroEL/GroES) e ClpB

que atuam nos corpos de inclusão favorecendo a desagregação de complexos de proteínas (RINAS *et al.*, 2007; HAACKE *et al.*, 2009). Outra possibilidade seria mudar o sistema de proteína de fusão. Outras proteínas de fusão tais como Trx (thiorredoxina), NusA e MBP (proteína ligante de maltose) têm sido empregadas com sucesso promovendo uma maior solubilização das proteínas a elas fusionadas (HAMMARSTROM *et al.*, 2002; DYSON *et al.*, 2004). Alguns trabalhos mostram que a fusão a SUMO (*small ubiquitin modifying protein*) pode melhorar consideravelmente a solubilidade da proteína recombinante. Além disso, SUMO é facilmente clivada da proteína de interesse o que em muitos casos não ocorre com outras proteínas de fusão (BUTT *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010).

Resultados anteriores já haviam mostrado que o emprego de outra proteína de fusão, no caso Trx, não favoreceu a solubilidade dos domínios metaloprotease e desintegrina murina clonados em pET-32a (COSTA, 2007).

Análises realizadas com auxílio de um programa que calcula a probabilidade de uma proteína ser insolúvel quando expressa no citoplasma de *E. coli* (indicador de Wilkinson/Harrison) mostraram que o domínio metaloprotease apresenta uma alta probabilidade de ser insolúvel quando expresso nesse sistema (Quadro 1). Além disso, o domínio metaloprotease apresenta mais de 5 grupos de três ou mais aminoácidos hidrofóbicos adjacentes ou muito próximos, sendo esta uma característica que tem sido correlacionada com a insolubilidade de proteínas recombinantes expressas em *E. coli* (DYSON *et al.*, 2004). Já os domínios desintegrina e rico em cisteína não apresentam probabilidade tão alta de serem insolúveis em *E. coli* quanto o domínio metaloprotease. Além disso, uma análise na sequência de aminoácidos desses outros domínios demonstrou que existem poucas regiões de aminoácidos hidrofóbicos agrupados.

Sendo o domínio metaloprotease o maior responsável pela insolubilidade da proteína, resolveu-se então fazer uma construção sem este domínio e usando outro vetor de expressão.

A utilização do pGEX tinha como intuito auxiliar na solubilização das proteínas recombinantes de interesse, entretanto, isso não ocorreu para as proteínas GST-metaloprotease e GST-met+desintegrina. Além disso, não se obteve sucesso na clivagem da proteína de fusão GST.

A proteína de fusão GST é uma molécula relativamente grande (27 kDa) se comparada aos domínios clonados de ADAM23 e, como será discutido mais adiante,

acabou interferindo nos ensaios de adesão. As imunizações também foram prejudicadas provavelmente pela sua alta imunogenicidade. Sendo assim, o vetor pET-28a foi escolhido para a clonagem do fragmento correspondente à sequência codificadora do domínio desintegrina e região rica em cisteína de ADAM23. O vetor pET-28a insere apenas seis histidinas sequenciais na região amino-terminal da proteína recombinante, o que não interfere tanto quanto o GST nos ensaios de adesão e nas imunizações.

Muitos trabalhos descritos para diferentes membros da família ADAM usam construções para expressão em *E. coli* que, em geral, apresentam apenas a sequência codificadora para o domínio desintegrina e são expressos em sistema de fusão com GST (ETO *et al.*, 2000; TOMCZUK *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2005). No entanto, a presença do domínio rico em cisteína poderia favorecer em ensaios de interação proteína-proteína, pois neste domínio está a região descrita como região de alta variabilidade (HVR) que poderia ser responsável por interações com integrinas e promover assim a adesão (TAKEDA *et al.*, 2006; TAKEDA, 2009).

A partir da inserção do fragmento codificador para os domínios desintegrina e região rica em cisteína no vetor pET-28a iniciou-se a expressão desta proteína recombinante. De acordo com a figura da expressão em pequena escala (figura 11) observa-se que a proteína recombinante foi expressa adequadamente usando a estirpe BL21 Star (DE3). Então, prosseguiu-se com a expressão em larga escala seguida da purificação em condições nativas. Como mostra a figura 12 (lise nativa), a proteína de interesse pôde ser purificada em condições nativas, embora a maior parte da proteína recombinante tenha formado corpos de inclusão (figura 12, insolúvel). No entanto, outras proteínas foram co-purificadas na lise nativa juntamente com a proteína de interesse. Em especial, uma proteína de aproximadamente 70 kDa foi purificada em grande quantidade quando comparada com a proteína de interesse. Esta proteína contaminante co-purificada deve ser a DnaK, uma proteína pertencente a um dos complexos de chaperonas de *E. coli* e que liga-se a cadeia polipeptídica nascente para auxiliar no redobramento (BARNEYX & MUJACIC, 2004; VENTURA & VILLAVARDE, 2006). Desta forma, esta metodologia de purificação nativa não foi adequada, uma vez que, além do rendimento não ter sido satisfatório, as proteínas contaminantes poderiam interferir nas imunizações e nos ensaios bioquímicos e biológicos.

Para resolver este problema, uma nova metodologia chamada de lise híbrida foi empregada. A fração insolúvel obtida a partir da purificação nativa foi submetida à solubilização com 6 M de hidrocloreto de guanidina. Como o sistema de 6 histidinas não depende de conformação para que ocorra a ligação na resina Ni-NTA Agarose, concentrações altas de agentes caotrópicos podem ser utilizadas. A ligação à coluna cromatográfica procedeu-se com a proteína solubilizada em tampão desnaturante. Após a ligação da proteína à resina, foram realizadas lavagens com uréia, seguida por lavagens com tampão nativo (sem nenhum agente caotrópico). Então, a proteína foi eluída em tampão nativo. Esta metodologia foi eficiente tanto com relação à solubilização, quanto à pureza da proteína recombinante purificada (figura 12, lise híbrida). A proteína recombinante ϵ His-desintegrina+cisteína pôde ser utilizada em imunizações e também em ensaios biológicos.

Cal e colaboradores (2000) descrevem a proteína ADAM23 como uma molécula de adesão celular e que o domínio desintegrina fusionado à GST e expresso em sistema heterólogo de *E. coli* promove a adesão de células de linhagem de neuroblastoma humano. Sendo assim, uma forma de saber se a proteína recombinante purificada estaria funcionalmente ativa seria utilizá-la em ensaios de adesão.

De acordo com os ensaios de adesão realizados com as proteínas GST-desintegrina e ϵ His-des+cis (figura 13), não houve adesão específica de nenhuma das linhagens testadas sobre as proteínas recombinantes. Tanto as linhagens de neuroblastoma N2a e SHSY-5Y quanto a linhagem de tumor de mama MDA-MB-435, que apresenta alta expressão da integrina $\alpha\beta 3$ e sendo esta integrina descrita por Cal e colaboradores (2000) como ligante de ADAM23, falharam ao aderir em GST-desintegrina e ϵ His-des+cis.

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar este fato. Primeiro, a construção do domínio desintegrina fusionada à GST poderia não ter um alto potencial adesivo devido ao fato da proteína de fusão GST (27 kDa) apresentar uma massa 3 vezes maior que o domínio desintegrina (~ 9 kDa). Esta característica poderia contribuir para uma maior exposição do GST aos receptores de superfície das células, em detrimento ao domínio desintegrina.

De fato, Eto e colaboradores (2000) utilizaram o domínio desintegrina das ADAMs 12 e 15 expressos em sistema de fusão à GST para promover a adesão assim como, Tomczuk e colaboradores (2003) utilizaram o domínio desintegrina das

ADAMs 2, 3 e 9 expressos no mesmo sistema. No entanto, nestes trabalhos a proteína de fusão foi clivada do domínio desintegrina e então, somente o domínio desintegrina foi usado nos ensaios de adesão.

Cal e colaboradores (2000) usaram o domínio desintegrina de ADAM23 humana fusionado à GST, construção bastante semelhante à usada neste trabalho, e tiveram sucesso na adesão de linhagens de neuroblastoma NB100 e SHSY-5Y, mesmo sem promover a clivagem de GST. Goldsmith e colaboradores (2004) comentam em seu trabalho que usando uma construção do domínio desintegrina de ADAM23 de rato também fusionada à GST não conseguiram verificar nenhuma adesão.

Mais curioso ainda foi o fato de ϵ His-desintegrina+cisteína não promover adesão. Esta construção diferente de GST-desintegrina não apresenta uma proteína de fusão grande como GST, mas apenas uma cauda de 6 histinas. Além disso, esta proteína recombinante apresenta a região rica em cisteína que é descrita como provável região de interação com integrinas, segundo Takeda e colaboradores (2006). Neste caso, uma explicação plausível seria um dobramento incorreto da proteína recombinante ligada à coluna Ni-NTA-Agarose durante a retirada do agente caotrópico. Este dobramento incorreto levaria à exposição de regiões que normalmente estariam escondidas assim como, poderia esconder sítios importantes para ligação aos receptores de superfície, impedindo assim um reconhecimento por estes receptores e, conseqüente, a adesão celular.

Huang e colaboradores (2005) demonstram que a interação de determinadas ADAMs com diferentes integrinas podem inibir a migração. A expressão de ADAM12 leva a uma inibição da migração mediada por $\alpha 4\beta 1$. Já a ADAM17 inibe a migração mediada pela integrina $\alpha 5\beta 1$ e as ADAMs 19 e 33 inibem a migração mediada por ambas integrinas. Recentemente, Verbisck e colaboradores (2009) mostraram que ADAM23 regula negativamente a adesão e a migração mediada por $\alpha v\beta 3$. Desta forma, pode-se esperar que ADAM23 não promova a adesão e sim, seja responsável pela regulação deste evento biológico que é dependente de várias moléculas.

Na tentativa de se obter uma proteína corretamente enovelada, com formação correta de suas pontes dissulfeto e apresentado glicosilação adequada, resolveu-se produzir construções de proteína ADAM23 recombinante que pudessem ser

expressas em sistema de mamífero e assim, resolver os problemas até agora encontrados pela utilização de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*.

Como tínhamos disponível o vetor pSecTag2/HygroA, que insere na região 5' da sequência codificadora para a proteína de interesse um peptídeo sinal para cadeia κ de imunoglobulina e desta forma promove a secreção da proteína recombinante de interesse, resolveu-se produzir duas construções da proteína ADAM23 para expressão em célula de mamífero.

Esta construção secretada também seria de grande importância para estudar possíveis papéis da isoforma γ ADAM23, que é sugerida como uma isoforma secretada (SUN *et al.*, 2004), mas que até o momento não há trabalhos que sugerem função para esta isoforma.

A partir da inserção do fragmento codificador para o ectodomínio da proteína ADAM23 humana e do fragmento codificador para o ectodomínio sem o pró-peptídeo (ectodomínio maduro) no vetor pSecTag2/HygroA realizaram-se as expressões em células HEK 293T. Inicialmente, as células foram transfectadas por precipitação de fosfato de cálcio com a construção correspondente ao ectodomínio sem o pró-domínio da proteína ADAM23 humana. Tempos diferentes de expressão foram realizados: 24, 48 e 72 horas. O meio de cultura foi coletado e incubado com a resina Ni-NTA e as células coletadas foram submetidas à preparação de extrato total para análise. A partir desta expressão observou-se que nenhuma proteína possuidora da etiqueta de 6 histidinas foi purificada dos meios de HEK 293T transfectadas com pSecTag2/HygroA-ectodomínio sem pró-domínio. No extrato celular foi possível observar bandas com massa molecular esperada para esta construção e que não aparecem nos controles, sugerindo ser a proteína recombinante de interesse que por algum motivo não foi secretada (dados não mostrados).

Liu e colaboradores (2009) descrevem que uma construção do ectodomínio de ADAM22 sem o pró-domínio não foi expressa adequadamente em células de inseto. Contudo, a construção que apresenta o ectodomínio completo é expressa e secretada pelas células, sugerindo que o pró-domínio é necessário para que a proteína seja expressa corretamente.

Assim, uma nova tentativa foi feita usando a construção pSecTag2/HygroA-ectodomínio completo. Como nesta construção o pró-domínio está presente era esperado que ocorresse a secreção da proteína recombinante para o meio de

cultura. Entretanto, como pode ser observado na figura 16A, a proteína recombinante mesmo na presença do pró-domínio, continuou retida na célula. Como a expressão da proteína de interesse está ocorrendo, uma possibilidade seria fazer a purificação desta proteína a partir do extrato celular e não do meio de cultura.

5. 2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ESPECÍFICOS PARA ADAM23

Anticorpos são normalmente empregados como reagentes específicos na identificação de moléculas em misturas complexas de antígenos. Quanto aos epítomos reconhecidos pelos anticorpos, estes podem ser lineares ou conformacionais. No caso de epítomos conformacionais, nem sempre os mesmos estarão espacialmente disponíveis após a introdução de condições desnaturantes no ambiente em que o antígeno se encontra (HARLOW & LANE, 1988).

O anticorpo anti-peptídeo usado em alguns ensaios deste trabalho reage com um epítomo específico do domínio desintegrina de ADAM23 humana (COSTA *et al.*, 2003). Entretanto, este anticorpo não reconhece a proteína na sua forma nativa e se liga a ADAM23 apenas em ensaios de *Western blotting*, nos quais a proteína de interesse encontra-se desnaturada.

A inexistência de anticorpos policlonais comerciais disponíveis para ADAM23 motivou o grupo na produção deste importante reagente. Na tentativa de se obter anticorpos que reconheçam a forma nativa de ADAM23, a imunização de coelhos com diferentes proteínas recombinantes foi realizada.

Primeiramente, dois coelhos foram imunizados com amostras de GST-metaloprotease+desintegrina provenientes da purificação de corpos de inclusão após o uso de sarcosil. Os corpos de inclusão resultantes da adição de sarcosil mostraram-se menos contaminados com proteínas de *E. coli*, além do que 90% da sua composição é a proteína recombinante superexpressa na bactéria (VENTURA & VILLAVERDE, 2006). Assim, esta seria uma alternativa interessante para proceder com as imunizações, mesmo não sendo possível obter a proteína recombinante de interesse na forma solúvel. Infelizmente, os animais imunizados não apresentaram uma resposta imune adequada contra a proteína ADAM23, resultado que pode ser observado na figura 17. Conforme mostra a figura 17, os anticorpos presentes no soro dos animais imunizados não foram capazes de reconhecer a proteína ADAM23-

HA superexpressa por células HEK 293T. Esse resultado pode ser explicado pela presença de algumas proteínas de *E. coli* nos corpos de inclusão (aproximadamente 10% da composição dos corpos de inclusão; VENTURA & VILLAVERDE, 2006), sendo que estas poucas proteínas bacterianas endógenas poderiam ser muito mais imunogênicas que a proteína de interesse (domínio desintegrina e metaloprotease). Outro fator que poderia contribuir muito para a ineficiência da resposta imune contra a proteína recombinante de interesse é a presença da proteína de fusão GST. A proteína GST possui aproximadamente a mesma massa molecular que os domínios metaloprotease e desintegrina juntos e, esta característica sugere que haja uma competição por imunogenicidade quando este antígeno (GST-metaloprotease+desintegrina) é utilizado em desafios imunes. Provavelmente a proteína GST de *S. japonicum* deve ter sido muito mais imunogênica que o restante da proteína recombinante ADAM23 (mamífero), o que poderia levar ao direcionamento da resposta imune humoral do animal apenas para esta porção do antígeno.

Outra tentativa foi realizar as imunizações com a proteína recombinante $_6$ His-desintegrina+cisteína. Este antígeno possui apenas uma etiqueta de seis histidinas que não é tão imunogênica quanto o GST e, além disso, esta proteína foi purificada adequadamente através da lise híbrida e não apresentou presença de proteínas bacteriana contaminantes.

Os animais imunizados com esta proteína aparentemente responderam ao antígeno, pois nos ensaios de ELISA e *Western blotting* usando a proteína recombinante e o soro imune dos animais foi possível verificar reações específicas (figuras 18 e 19A). Quando os soros imunes foram testados por *Western blotting* quanto ao reconhecimento da proteína ADAM23-HA superexpressa por células HEK 293T, houve reconhecimento da proteína ADAM23 pelos anticorpos presentes no soro imune dos dois coelhos. Entretanto, bandas inespecíficas foram reconhecidas tanto por anticorpos presentes no soro imune quanto por anticorpos presentes no soro pré-imune dos animais (figura 19B).

No teste dos soros por *Western blotting* usando extrato protéico de encéfalo de camundongo, foi possível observar que os anticorpos presentes no soro imune dos animais não foram eficientes no reconhecimento da proteína ADAM23 endógena presente nesse tecido, nem mesmo quando as amostras foram enriquecidas com proteínas de membrana por fracionamento celular (figura 20). E ainda, inúmeras

bandas inespecíficas foram novamente evidenciadas tanto pelo soro imune quanto o respectivo controle negativo. Embora a amostra de tecido nervoso seja de camundongo e a proteína usada para imunizar seja humana, isso não explicaria o não reconhecimento da proteína ADAM23 endógena, uma vez que, o anticorpo anti-peptídeo deintegrina de ADAM23 humana utilizado como controle positivo reconheceu a proteína endógena. Além disso, como já mencionado, a proteína ADAM23 é muito conservada entre humanos e camundongos apresentando 93,5% de identidade entre as sequências.

Talvez, o fato da proteína ADAM23 ser bastante conservada faça com que ela apresente uma baixa imunogenicidade. Além disso, a proteína ADAM23 não é restrita ao sistema nervoso, tendo sido verificada uma alta expressão no tecido cardíaco (GHILARDI *et al.*, 2008), o que dificultaria ainda mais a produção de anticorpos.

Uma possibilidade de minimizar o problema de conservação aminoacídica seria imunizar galinhas (*Gallus gallus*), pois as sequências humana e de galinha apresentam uma identidade de 80% que é provavelmente menor que a identidade da sequência entre humano e coelhos (a sequência de coelho ainda não foi depositada nos bancos de dados).

5. 3 INTERAÇÃO ADAM23/PRP^C

Schmitt-Ulms e colaboradores (2004) descreveram mais de 20 proteínas que residem na vizinhança dos micro-ambientes onde PrP^C é encontrado. Grande parte das proteínas identificadas atua em processos de adesão e crescimento de neuritos e, dentre estas proteína envolvidas em adesão, foi identificada a proteína ADAM23. Embora este trabalho tenha sugerido que proteína ADAM23 e a proteína PrP^C possam estar localizadas no mesmo micro-ambiente da membrana celular, nenhuma interação direta ou indireta entre essas duas proteínas havia sido demonstrada detalhadamente.

A interação de PrP^C com membros da família ADAM tem sido descrita, sendo ADAM10 e ADAM17 dois membros da família que atuam no metabolismo normal PrP^C promovendo sua clivagem e liberação da membrana celular (VINCENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2009). Os resultados aqui

descritos (COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2009) descrevem a interação *in vitro* e em condições padronizadas entre PrP^C e ADAM23, bem como sugerem uma função biológica para esta interação.

De acordo com o resultado mostrado na figura 21, ADAM23-HA super-expressa por células HEK 293T pode ser co-imunoprecipitada com PrP^C, quando são usados anticorpos que reconhecem a proteína príon celular. Estes resultados mostram que estas duas moléculas podem estar interagindo de forma direta ou indireta *in vitro*. Sabendo que ADAM23 é predominantemente expressa no tecido nervoso (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004; GHILARDI *et al.*, 2008) assim como PrP^C (LINDEN *et al.*, 2008), era de grande importância saber se esta interação poderia ocorrer neste tecido.

Para verificar se a interação poderia ser observada com as proteínas naturalmente presentes no tecido nervoso, um ensaio de co-imunoprecipitação utilizando amostras de encéfalo de camundongo foi realizado. Como mostra a figura 22 usando anticorpos anti-PrP^C foi possível co-imunoprecipitar ADAM23 (painel superior, anti-peptídeo desintegrina ADAM23 humana). Assim, este ensaio além de confirmar dados anteriores que mostram a interação *in vitro* destas moléculas sugere que esta interação pode ter um papel fisiológico no tecido nervoso, local de ampla expressão das duas moléculas em questão.

Até o momento, a interação *in vitro* ADAM23/PrP^C foi demonstrada através ensaios de co-imunoprecipitação e *pull-down* (COSTA, 2007). Entretanto, estes ensaios não permitem afirmar que a interação entre as duas proteínas ocorre de maneira direta ou se esta interação depende de outros parceiros moleculares, pois nestes tipos de metodologias é possível manter em parte o ambiente natural no qual são encontradas proteínas, assim como, é possível manter complexos protéicos (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004).

Para verificar se a interação observada poderia ser direta ou não, ensaios de ligação empregando proteínas recombinantes foram realizados. Como mostra a figura 23, através do ensaio de ligação a interação *in vitro* entre ADAM23 e PrP^C foi novamente demonstrada. Levando em consideração que neste tipo de ensaio apenas foram utilizadas proteínas recombinantes, este resultado sugere que a interação entre estas duas proteínas é direta e, sendo o domínio desintegrina um domínio potencial de ligação para PrP^C. O domínio desintegrina de ADAM23 tem sido demonstrado como ligante de integrina $\alpha\beta 3$ (CAL *et al.*, 2000 e VERBISCK *et*

al., 2009). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de outros domínios de ADAM23 interagirem com PrP^C. Estudos futuros deverão averiguar se outros domínios de ADAM23 também podem interagir com PrP^C.

ADAM23 e PrP^C são proteínas N-glicosiladas (GOLDSMITH *et al.*, 2004; LAWSON *et al.*, 2005). A N-glicosilação é uma modificação pós-traducional de grande importância na modulação de processos de interação célula-célula, célula-matriz, sendo também importante em processos de enovelamento de proteínas e controle de qualidade de proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático (VARKI, 1993; HELENIUS & AEBI, 2004). Além disso, é descrito que alterações na glicosilação de PrP^C podem gerar uma proteína com propriedades *scrapie* (ERMONVAL *et al.*, 2003; LAWSON *et al.*, 2005). Mesmo tendo a glicosilação papéis importantes na fisiologia de proteínas, os ensaios de ligação demonstram que este tipo de modificação pós-traducional não é necessária para que ocorra a interação entre ADAM23 e PrP^C. Nestes ensaios foram utilizadas proteínas recombinantes produzidas em sistema heterólogo de *E. coli*, no qual não ocorre N-glicosilação de proteínas. Este ensaio na verdade confirma resultados obtidos anteriormente que mostram que ADAM23-HA e GFP-PrP^C podem ser co-imunoprecipitadas mesmo quando a N-glicosilação é totalmente bloqueada por tunicamicina (COSTA, 2007).

Mesmo com a existência da ligação direta entre ADAM23 e PrP^C, é bastante provável que fisiologicamente esta interação faça parte de um complexo de moléculas que podem interagir umas com as outras. Neste contexto, outra proteína que poderia ser uma boa candidata a estar neste complexo seria a integrina $\alpha\beta3$. Sabe-se que ADAM23 interage com a integrina $\alpha\beta3$ promovendo a adesão de neuroblastomas (CAL *et al.*, 2000). Recentemente esta interação foi demonstrada na linhagem de tumor de mama MDA-MB-435, sendo que neste tipo celular ADAM23 modula negativamente a ativação de $\alpha\beta3$ (VERBISCK *et al.*, 2009). Interessantemente, PrP^C também parece modular negativamente esta mesma integrina (HAJJ *et al.*, 2007; MURAS *et al.*, 2009). Além do mais, dados reportados por HAJJ e colaboradores (2007) mostraram que, embora PrP^C e integrinas participem do crescimento axonal, o bloqueio de PrP^C inibe completamente o crescimento axonal mediado por vitronectina, sugerindo que PrP^C faz parte de um complexo protéico. Finalmente, levando em consideração que PrP^C é uma molécula GPI ancorada e ADAM23 possui apenas uma pequena cauda citosólica com 18 aminoácidos, sendo que ambas não possuem elementos estruturais para transdução

de sinal, a hipótese de um complexo protéico no qual integrinas estejam presentes parece ser pertinente.

Todos estes resultados sobre a caracterização bioquímica da interação ADAM23/ PrP^C foram publicados recentemente (COSTA *et al.*, 2009). Caracterizada a interação *in vitro* de ADAM23 e PrP^C, o próximo passo foi verificar qual significado biológico poderia ter esta interação.

Através da identificação de parceiros moleculares de PrP^C muitas funções tem sido atribuídas a essa proteína. Santucci e colaboradores (2005) demonstraram que a interação *in vitro* entre PrP^C e N-CAM promove o crescimento de neuritos. Estudos demonstraram que a interação entre PrP^C e laminina, assim como a interação com ST11, promove neuritogênese (GRANER *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2005). Nesse sentido, um caminho para identificar os papéis biológicos de ADAM23 seria através da identificação de seus parceiros moleculares. Sabendo que ADAM23 é essencial para o desenvolvimento, pois animais deficientes para o gene *Adam23* não sobrevivem mais do que duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001) a interação descrita neste trabalho abre caminhos para o entendimento do papel fisiológico de ADAM23.

Membros da família ADAM têm sido amplamente descritos como atuantes na adesão e migração celular através da interação com integrinas (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; TOMCZUK *et al.*, 2003; BAX *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; ZIGRINO *et al.*, 2007).

ADAM23 é descrita como uma molécula envolvida na adesão uma vez que, não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam sítio ativo para a ligação de zinco (HEXXHXXGXXH), o qual é crítico para a atividade proteolítica (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000). Assim sendo, ADAM23 não poderia atuar diretamente na clivagem de PrP^C como as ADAMs 10 e 17 fazem (VINCENT *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2009).

O papel do PrP^C no mecanismo de adesão celular também foi demonstrado através de sua interação com as proteínas de matriz laminina e vitronectina (GRANER *et al.*, 2000; HAJJ *et al.*, 2007) e também na adesão célula-célula na linhagem de neuroblastoma murino (N2A) (MANGÉ *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrada a acumulação de PrP^C em adesões focais regulando a formação de filopódios e lamelipódios (SCHROCK *et al.*, 2009).

Com base nestes dados da literatura referente ao papel adesivo destas duas moléculas, resolveu-se investigar a possível atuação conjunta destas duas proteínas em processos de adesão celular e assim verificar um possível papel biológico para a interação em questão.

Como discutido no item 5. 1, as proteínas recombinantes contendo o domínio desintegrina e região rica em cisteína de ADAM23 produzidas durante a execução do projeto não foram capazes de promover a adesão das diferentes linhagens celulares testadas. Então, não foi possível verificar a adesão neste contexto em que a proteína recombinante atua como molécula adesiva, metodologia geralmente empregada nos trabalhos com membros da família ADAM (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; TOMCZUK *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2005).

Contudo, havia outras ferramentas disponíveis para usar em ensaios de adesão tais como, a proteína recombinante $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ e células da linhagem 435 *knockdown* para ADAM23 (VERBISCK *et al.*, 2009). O ensaio mostrado na figura 24 demonstra que a adesão sobre $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ dos clones que são *knockdown* para ADAM23 (clones B e C) é diminuída em relação ao tipo selvagem (WT). Estes resultados sugerem que na presença de PrP^{C} , a ausência de ADAM23 leva a uma diminuição na adesão. Além disso, este ensaio sugere que a interação ADAM23/ PrP^{C} seja em *trans*, uma vez que este tipo de ensaio mimetiza um modelo de interação em *trans*.

Como no momento faltam ferramentas importantes, como anticorpos e proteínas recombinantes, para avaliar o papel da interação ADAM23/ PrP^{C} na adesão celular, a questão da adesão permanece em aberto. Adicionalmente, resultados obtidos em ensaios de adesão com diversas linhagens celulares (dados não mostrados) demonstraram que $_{6}\text{His-PrP}^{\text{C}}$ apresenta um potencial adesivo bastante expressivo que merece também ser investigado.

Como não foi possível aprofundar os experimentos para verificar o papel da interação ADAM23/ PrP^{C} na adesão celular por falta de reagentes, resolveu-se investigar outros possíveis papéis biológicos para interação.

PrP tem sido descrito como uma proteína residente de microdomínios de membrana ricos em glicosfingolípídeos e colesterol e que são insolúveis em detergentes não iônicos, conhecidos como *lipid rafts* ou balsas lipídicas de membrana, sendo encontradas nestes microdomínios tanto sua forma normal quanto a forma patogênica *scrapie* (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996;

NASLAVSKY *et al.*, 1997; revisado por HOOPER *et al.*, 2008). Estes microdomínios ricos em colesterol e glicosfingolípídeos têm cada vez mais despertado o interesse de pesquisadores já que estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como a entrada de vírus e toxinas, sinalização celular e no tráfego de proteínas e lipídeos (PIKE, 2006).

Muitos trabalhos discutem o papel dos *rafts* na conversão de PrP^C em PrP^{SC} (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; KANEKO *et al.*, 1997; BATE *et al.*, 2004; SARNATTARO *et al.*, 2004; revisado por PINHEIRO, 2006 e HOOPER *et al.*, 2008). Em contrapartida, pouquíssimos trabalhos discutem o papel dos *rafts* no metabolismo das ADAMs.

Foi descrito que ADAM17 atua na clivagem de colágeno XVII em queratinócitos da linhagem HaCaT e na linhagem renal símia COS-7. Esta clivagem ocorre fora dos *rafts*, sendo necessária a saída do colágeno XVII dos *rafts* para ser processado por ADAM17, que por sua vez é encontrada fora destes microdomínios nestas linhagens (ZIMINA *et al.*, 2005). Contraditoriamente, Tellier e colaboradores (2006) demonstram em várias linhagens celulares, inclusive em COS-7 e alguns tecidos de camundongo que a forma madura de ADAM17 é principalmente encontrada nos microdomínios ricos em colesterol e esfingolípídeos e seu processamento por furina ocorre nestes locais, onde também é verificada a atividade proteolítica de ADAM17. Levando em consideração que PrP^C é encontrado em *rafts*, faz mais sentido que ADAM17 também esteja presente nestes microdomínios, já que certos dados indicam que ela está envolvida na clivagem normal de PrP^C (VINCENT *et al.*, 2001).

Entretanto, ADAM 10, outro membro da família ADAM envolvida tanto na clivagem α de PrP^C como na da proteína precursora amiloidogênica, é descrita como uma proteína que não é encontrada nos *rafts* (KOJRO *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2009).

Levando em consideração o grande interesse com relação à PrP^C no que diz respeito aos *lipid raft*s e os poucos trabalhos publicados que mostram membros da família ADAM nestes microdomínios, resolveu-se investigar se a interação ADAM23/PrP^C teria alguma relação na distribuição das mesmas na membrana celular.

Inicialmente foi necessário padronizar a metodologia de preparação de *lipid raft*s como descrito previamente (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000).

Esta preparação é baseada na flutuação de complexos insolúveis a 4°C em detergentes não iônicos, tais como o Triton X-100, em um gradiente de Nycodenz ou sacarose. As amostras recolhidas nas frações de menor densidade correspondem às frações insolúveis em Triton X-100 e que são consideradas como *lipid rafts*. Embora este tipo de metodologia seja amplamente aplicado em estudos de proteínas que fazem parte destes microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicoesfingolípídeos, existem algumas críticas. A metodologia em questão pode ser considerada como artificial uma vez que o conceito de flutuação de membranas insolúveis em detergente a 4°C não pode ser aplicado para células vivas. Mesmo assim, esta técnica é a mais empregada na identificação de proteínas pertencentes à *lipid rafts* (revisado PIKE, 2004; LINGWOOD & SIMONS, 2009).

No que diz respeito à PrP, esta técnica está muito bem descrita. Ainda, dados reportados por Naslavsky e colaboradores (1997) demonstram que a presença de PrP^C nas regiões de menor concentração do gradiente não se deve a sua associação espontânea às estruturas insolúveis formadas durante a lise com Triton X-100, mas sim por estar presente nestes complexos insolúveis antes mesmo da extração com o detergente. Desta forma, a principal crítica relacionada a este tipo de metodologia, baseada no fato do detergente Triton X-100 induzir a segregação de componentes da bicamada camada lipídica dependendo de suas propriedades físicas formando estruturas que não correspondem à estrutura inicial da membrana celular (MUNRO, 2003), não pode ser aplicada à proteína príon celular.

No laboratório de Neurobiologia optou-se por usar a metodologia de flutuação de complexos insolúveis em gradiente de Nycodenz e não de sacarose, pois a utilização de Nycodenz permite que o equilíbrio de densidade seja atingido com apenas 4 horas de centrifugação ao invés das 18 horas necessárias para atingir o equilíbrio na presença de sacarose (NASLAVSKI *et al.*, 1997). De acordo com a figura 25, a partir da preparação de *lipid rafts* pela metodologia de flutuação em gradiente de Nycodenz de membranas insolúveis em Triton X-100 a 4°C usando como amostras encéfalo de camundongo e células HEK 293T que superexpressam GFP-PrP^C, foi possível observar PrP^C somente nas frações de menor densidade de Nycodenz, correspondentes aos *lipid rafts*. Dessa forma, esse dado confirmou resultados de trabalhos anteriores que utilizaram a mesma técnica (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000;).

Feita a padronização de preparação de *lipid rafts*, foi possível iniciar a verificação da distribuição de ADAM23 e PrP^C nesses domínios preparados a partir de células HEK 293T transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C.

Como mostra a figura 26A, quando células foram transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e o plasmídeo pEGFP (controle para GFP-PrP^C, condição 1), ADAM23-HA foi encontrada nas frações de maior densidade do gradiente que correspondem a proteínas solúveis em Triton X-100 (figura 26A, painel a). Nestas frações são de fato encontradas proteínas transmembrana que não fazem parte dos microdomínios ricos em colesterol e glicosíngolipídeos e também proteínas citoplasmáticas. Neste caso, GFP expresso atuou como controle de frações que não correspondem a *lipid rafts* (figura 26A, painel c). Contudo, é possível observar que este resultado não é artefato de uma preparação inadequada uma vez que a proteína marcadora para *lipid rafts*, flotilina 1, foi encontrada nas frações de menor densidade do gradiente (figura 26 A, painel b).

Este resultado mostra pela primeira vez que ADAM23 encontra-se fora de *rafts*, ao menos nas linhagens celulares usadas neste trabalho (HEK 293T, HeLa, MDA-MB-435).

Quando células foram transfectadas com pEGFP-PrP^C e o plasmídeo controle pcDNA3.1 (controle para ADAM23, condição 2), GFP-PrP^C foi detectado nas frações de menor densidade do gradiente que correspondem aos *lipid rafts* (figura 26A, painel d), como já era esperado.

O resultado mais surpreendente foi encontrar ADAM23-HA nas regiões de *lipid rafts* quando células HEK 293T foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C (condição 3) (figura 26A, painel e). Nesta situação em que PrP^C está superexpresso, parece ocorrer um deslocamento de ADAM23 para *lipid rafts*. Em contrapartida, quando a quantidade total de ADAM23 foi comparada, verificou-se que não existia diferença no total de ADAM23-HA (figura 26B, linhas 1 e 2), sugerindo que pode estar ocorrendo o deslocamento de ADAM23 que está fora de *rafts* para estes microdomínios. Levando em consideração que a interação ADAM23/PrP^C foi verificada (figuras 21 a 23; COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2009), faz sentido ADAM23 estar nos mesmos microdomínios onde PrP^C é encontrado.

A movimentação de proteínas entre regiões *rafts* e não *rafts* na membrana tem sido descrita. PrP^C é uma molécula que apresenta este tipo de movimentação, para que ocorra sua endocitose mediada por clatrina, é preciso que PrP^C saia das regiões de *rafts*, uma vez que este tipo de endocitose não ocorre em regiões de *rafts* (SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005). Foi demonstrado que integrina $\beta 1$ é recrutada rapidamente para *lipid rafts* após indução com IGF-I (SALANI *et al.*, 2009). Além disso, o recrutamento de proteínas por PrP^C para regiões de *lipid rafts* já foi descrita. N-CAM é recrutada para regiões de *rafts* por PrP^C promovendo o aumento do crescimento de neuritos (SANTUCCIONE *et al.*, 2005).

Para verificar se o deslocamento de ADAM23 estava sendo de fato promovido pela superexpressão de PrP^C, outras linhagens (HeLa e MDA-MB-435) que superexpressavam ADAM23-HA devido à transfecção estável com o plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foram submetidas a mesma preparação de *lipid rafts* usada para células HEK 293T. Nestas linhagens observa-se que ADAM23-HA mantém sua distribuição em frações de maior densidade de Nycodenz (figura 28), assim como ocorria com as células HEK 293T transfectadas transientemente com o mesmo plasmídeo e o plasmídeo pEGFP. Estes resultados sugerem que ADAM23 não é uma molécula residente de *lipid rafts* e que seu deslocamento para estas regiões se deve a interações protéicas com moléculas de *rafts*, neste caso PrP^C.

Sabe-se que além da âncora de GPI que é um determinante *para lipid rafts* (TARABOULOS *et al.*, 1995), PrP^C possui mais uma região importante na determinação de sua associação aos *rafts* que é a região N-terminal 23-90 (WALMSLEY *et al.*, 2003). Esta região N-terminal poderia ser a responsável pela interação com ADAM23 levando-a para estes microdomínios. Para verificar esta possibilidade, seria necessário testar mutantes para esta região N-terminal e verificar se ocorre a interação de PrP^C com ADAM23 e se estes tipos de mutantes seriam capazes de deslocar ADAM23 para regiões de *lipid rafts*. Como no momento o laboratório de Neurobiologia não dispõe de tais mutantes, ainda não foi possível testar esta hipótese.

O próximo passo foi verificar se a interação ADAM23-HA/GFP-PrP^C observada inicialmente por co-immunoprecipitação de células HEK 293T transfectadas (COSTA *et al.*, 2009) era dependente destes micro-domínios. Para testar o papel dos *lipid rafts* nesta interação foi realizado um ensaio de co-immunoprecipitação usando células transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA e pEGFP-PrP^C que foram

ou não tratadas com methyl- β -cyclodextrin. Este agente é utilizado para promover a redução de colesterol e desta forma promover o desaparecimento dos *lipid rafts* (TAYLOR *et al.*, 2005; TELLIER *et al.*, 2006). De acordo com a figura 29A, a interação ADAM23-HA/GFP-PrP^C é independente de *lipid raft*. Embora a movimentação da ADAM23 seja observada em células HEK 293T na presença de PrP^C e, este fato leve-nos a inferir que a interação destas duas moléculas seja dependente destes microdomínios, não foi nenhuma surpresa que a interação observada fosse independente de *rafts*, pois o resultado observado no ensaio de ligação (figura 23) sugere que a interação é independente de qualquer fator exógeno às duas moléculas.

A figura 29B mostra também que o tratamento com methyl- β -cyclodextrin foi eficiente no desaparecimento dos *lipid rafts* na linhagem HEK 293T e ainda, esta figura mostra que este tratamento levou a uma diminuição de GFP-PrP^C. Esta diminuição poderia ser explicada pelo fato de agentes que promovem o desaparecimento de *rafts*, tais como o usado neste ensaio, favorecem a clivagem de PrP^C da membrana celular para o meio de cultura mediada por fosfolipases (PARKIN *et al.*, 2004).

Mesmo que a interação ADAM23/PrP^C não seja dependente dos *lipid rafts*, ainda havia a curiosidade de saber qual era o motivo da movimentação de ADAM23 para estes microdomínios na presença de PrP^C.

Observando com um pouco mais de atenção a figura 26A, percebe-se que a quantidade detectável de PrP^C presente nos *lipid rafts* é maior quando ADAM23 está presente. Este fato somado à movimentação de ADAM23 na presença de PrP^C sugere que ADAM23 possa ter um papel no metabolismo de PrP^C atuando no seu processo de endocitose.

Existe um grande interesse no entendimento dos mecanismos que controlam a endocitose de PrP^C uma vez que, a conversão de PrP^C na sua forma anormal *scrapie* deve ocorrer na membrana celular e/ou durante seu processo de internalização (CAUGHEY *et al.*, 1991; BORCHELT *et al.*, 1992; TARABOULOS *et al.*, 1992; revisado por CAMPANA *et al.*, 2005).

No que diz respeito aos mecanismos de endocitose de PrP^C, diversas vias já foram descritas. PrP^C pode ser endocitado via cavéolas ou domínios semelhante a cavéolas, corroborando com o fato de que muitos *rafts* de membrana estarem associados à caveolina (VEY *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2003). Também tem sido

muito descrita a endocitose de PrP^C via clatrina, embora PrP^C seja uma molécula *lipid rafts* e nestas regiões é comum a formação de cavéolas e não de vesículas recobertas por clatrina (SHYNG *et al.*, 1995; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.* 2005, SARNATARO *et al.*, 2009). A endocitose de PrP^C via clatrina é de fato bastante importante uma vez que células neuronais não expressam caveolina (PARTON & SIMONS, 2007). Recentemente, Sarnattaro e colaboradores (2009) demonstraram que em células epiteliais FRT a endocitose de PrP^C ocorre de uma maneira dependente tanto de colesterol quanto de clatrina, que de alguma forma está associada a *lipid rafts*.

Dados reportados por Taylor e colaboradores (2005) mostraram que, na linhagem de neuroblastoma SHSY-5Y, a endocitose de PrP^C mediada por cobre ocorre via clatrina. Neste trabalho, é mostrado que PrP^C, na presença de cobre, movimenta-se para fora das regiões de *lipid rafts* e então é endocitado via clatrina. Embora a presença de cobre não seja determinante para a endocitose via clatrina, e sim a região polibásica N-terminal, a ligação ao cobre é necessária para que PrP^C saia dos *rafts* (TAYLOR *et al.*, 2005).

Levando em consideração estes dados e os resultados de movimentação de ADAM23 para os *lipid rafts* e a maior detecção de PrP^C nestes microdomínios na presença de ADAM23, surgiu o interesse de verificar se ADAM23 evitaria a movimentação de PrP^C para fora dos *rafts* na presença de cobre, evitando assim a sua endocitose via clatrina.

Para testar esta hipótese, foi necessário primeiro verificar se usando a linhagem HEK 293T, GFP-PrP^C movimentaria-se para fora dos *rafts* na presença de cobre. Então células HEK 293T transfectadas com GFP-PrP^C foram tratadas por CuSO₄. Após o tratamento as células foram submetidas à preparação de *lipid rafts*. De acordo com a figura 30, este tratamento com cobre não promoveu a saída de GFP-PrP^C dos *rafts*. Como GFP-PrP^C apresenta a mesma localização que a proteína endógena e também responde igualmente ao cobre (LEE *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2002), a presença de proteína GFP não responderia pela ausência de movimentação do GFP-PrP^C. Talvez o mecanismo de movimentação observado por Taylor e colaboradores (2005) em neuroblastoma não funcione para as células usadas nesse trabalho, HEK 293T. Tem sido descrito que diferentes tipos celulares apresentam diferentes mecanismos para endocitose de PrP^C (PETERS *et al.*, 2003; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; SARNATTARO *et al.*, 2009). Como a

idéia era continuar o trabalho usando células HEK 293T, resolveu-se investigar apenas a endocitose de PrP^C independentemente de sua movimentação nos domínios de *raft* e da via endocítica envolvida.

Inicialmente foi preciso padronizar uma metodologia para verificar a endocitose de PrP^C. O procedimento foi realizado como descrito por Pauly & Harris (1998) e Sumudhu e colaboradores (2001). Células HEK 293T transfectadas com GFP-PrP^C foram tratadas com biotina para marcação das proteínas de superfície e em seguida tratadas com cobre a 37°C, para indução da endocitose. As células foram então tratadas com tripsina para remoção das proteínas de superfície e submetidas ao procedimento de preparação de extrato celular, no qual somente estariam proteínas de superfície (marcadas com biotina) que foram endocitadas. De acordo com a figura 31A, a endocitose de GFP-PrP^C foi observada em maior escala quando células foram tratadas com cobre a 37°C, e em menor escala quando foram deixadas a 37°C na ausência do íon divalente. A endocitose de PrP^C biotinilado a 37°C na ausência de cobre é usada por Sarnattaro e colaboradores (2009). Outros grupos também demonstram que a endocitose de PrP^C não requer necessariamente a adição desse íon (SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005). No entanto, como o tratamento com cobre a 37°C promoveu uma endocitose de PrP^C mais evidente quando comparada às células que apenas foram incubadas a 37°C, e como este tratamento realmente favorece a endocitose de GFP-PrP^C (LEE *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2002) optou-se por utilizar a metodologia do tratamento com cobre nos ensaios seguintes.

Padronizada a metodologia de endocitose, passou-se para os ensaios que iriam verificar se a presença de ADAM23 teria alguma participação no processo de endocitose de GFP-PrP^C. Quando o ensaio de endocitose foi realizado na presença de ADAM23-HA, observa-se que a quantidade de GFP-PrP^C foi diminuída quando comparada quando somente as células haviam sido transfectadas com pcDNA3.1 (figura 31B). A endocitose de GFP-PrP^C foi diminuída em aproximadamente 50% na presença de ADAM23-HA (figura 31B, gráfico). Este resultado sugere que a interação observada ADAM23/PrP^C tenha um papel importante no tráfego de PrP^C. Diferente da proteína transmembrana LRP1 (receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado à proteína 1), que promove a endocitose de PrP^C (TAYLOR *et al.*, 2007) via clatrina, ADAM23 atua de maneira contrária, evitando a endocitose de PrP^C. Entretanto, ainda não é possível afirmar qual é a via envolvida

na endocitose da proteína príon celular na presença de ADAM23. Como nas células HEK 293T o GFP-PrP^C não foi sensível a movimentação para fora dos *rafts* na presença de cobre, e sem a saída de GFP-PrP^C para fora destes microdomínios parece não ser possível a endocitose via clatrina (TAYLOR *et al.*, 2005), talvez a interação com ADAM23 não atue na via endocítica mediada por clatrina. Os resultados recentes de Sarnattaro e colaboradores (2009) não podem ser desprezados neste contexto, pois mostram que em células epiteliais FRT a proteína clatrina parece estar associada de alguma forma aos *rafts*, não sendo então necessária a saída do PrP^C destes microdomínios para haver endocitose mediada via clatrina.

Com certeza, os próximos passos deverão investigar qual é a via envolvida no processo endocitose quando ADAM23 está presente.

Foi reportado que a associação com o receptor 37kDa/67kDa de laminina favorece a acumulação de PrP^{SC} (LEUCHT *et al.*, 2003). Recentemente, Taylor e colaboradores (2009) demonstraram que PrP^C pode interagir com o proteoglicano de heparan sulfato, glicam-1, e esta interação parece favorecer a conversão de PrP^C em sua isoforma *scrapie*.

Levando em consideração o fato do tráfego e a localização em *lipid rafts* de PrP^C estar envolvido na sua conversão em *scrapie* bem como a existência de parceiros moleculares que parecem favorecer esta conversão, a interação de PrP^C com ADAM23 descrita neste trabalho também pode estar envolvida nesta conversão favorecendo-a ou não. Alguns trabalhos discutem que a permanência de PrP^C nos *lipid rafts* favorece a conversão na sua forma *scrapie* (revisado por HOOPER *et al.*, 2008) e, nesse contexto, ADAM23 poderia favorecer a conversão de PrP^C na sua forma patogênica. Entretanto, outros trabalho discutem o que a conversão de PrP^C na sua forma *scrapie* ocorreria durante sua endocitose (revisado por CAMPANA *et al.*, 2005). Assim, ADAM23 atuaria de maneira contrária, evitando a endocitose de PrP^C e sua possível conversão durante a via endocítica. Outros experimentos ainda precisam ser realizados para elucidar essas questões, que abrem novas perspectivas no estudo do tráfego de PrP^C, sendo ADAM23 um novo parceiro envolvido nesse mecanismo. Nesse sentido, ADAM23 poderia ser um alvo no desenvolvimento de terapias para doenças causadas por príons.

Além disso, estes resultados também abrem novas perspectivas para o entendimento do papel biológico de ADAM23, pois até o momento os trabalhos

estão focados apenas no seu potencial papel adesivo. Trabalhos futuros deverão averiguar a maneira exata pela qual ADAM23 atua na regulação do tráfego de PrP^C, assim como, a possibilidade desta proteína atuar na regulação da via endocítica de outras moléculas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Proteínas recombinantes de ADAM23 foram obtidas a partir da expressão em sistema heterólogo de *E. coli*, entretanto algumas construções não puderam ser produzidas em quantidades significativas e solúveis por formarem corpos de inclusão.
- ✓ As proteínas recombinantes ϵ His-desintegrina+cisteína e GST-desintegrina, produzidas em quantidades significativas, não promoveram a adesão das linhagens celulares testadas.
- ✓ O ectodomínio recombinante de ADAM23 foi expresso em células da linhagem HEK 293T, mas não foi secretado para o meio de cultura.
- ✓ Não foi possível obter anticorpos policlonais específicos para ADAM23 endógena.
- ✓ Os ensaios de co-imunoprecipitação e ligação demonstraram que as proteínas ADAM23 e PrP^C interagem *in vitro*.
- ✓ O ensaio de ligação sugere que esta interação é direta e mediada pelo domínio desintegrina de ADAM23.
- ✓ ϵ His-PrP^C promoveu adesão na linhagem MDA-MB 435 e esta adesão foi diminuída quando foram usadas células *knockdown* para ADAM23.
- ✓ ADAM23 não é encontrada nos domínios de membrana ricos em colesterol, os *lipid rafts*. Entretanto, quando ADAM23 foi expressa juntamente com PrP^C, ocorreu um deslocamento de ADAM23 para esses microdomínios.
- ✓ A interação entre ADAM23 e PrP^C não é dependente dos *lipid rafts*.
- ✓ ADAM23 diminuiu a endocitose de PrP^C mediada por cobre em células HEK 293T.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUZZI, A. & STEELE, A.D. Prion topology and toxicity. **Cell**. v. 137, p. 994-996, 2009.
- ALFANDARI, D.; MCCUSKER, C.; COUSIN, H. ADAM function in embryogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 29, p. 153-163, 2009.
- ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; SMITH, K.; WHITE, J.M.; DARRIBÉRE, T.; DeSIMONE, D.W. *Xenopus* ADAM13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. **Current Biology**. v. 11, p. 918-930, 2001.
- ALFANDARI, D.; WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M.; DESIMONE, D.W. ADAM13: A Novel ADAM Expressed in Somitic Mesoderm and Neural Crest Cells during *Xenopus laevis* Development. **Developmental Biology**, v. 182, p. 314-330, 1997.
- AMERSHAN BIOSCIENCE. **GST Gene Fusion System Handbook**. Edition AA. Disponível em: <[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/5F8EEA77C1D191D0C1257628001CDE42/\\$file/18115758.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/5F8EEA77C1D191D0C1257628001CDE42/$file/18115758.pdf)>. Acesso em: 19/04/2010
- ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLTZ, F. regulation of the α secretase ADAM10 its prodomain and proprotein convertase. **FASEB Journal**. v. 15, p. 1837-1839, 2001.
- BARNEYX, F. & MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**. v. 22, n. 11, p. 1399-1408, 2004.
- BARON, G.S & CAUGHEY, B. Effect of Glycosylphosphatidylinositol Anchor-dependent and -independent Prion Protein Association with Model Raft Membranes on Conversion to the Protease-resistant Isoform. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 14883-14892, 2003.
- BATE, C.; SALMONA, M.; DIOMEDE, L.; WILLIAMS, A. Squalestatin Cures Prion-infected Neurons and Protects Against Prion Neurotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 14983-14990, 2004.
- BAX, D.V.; MESSENT, A.J.; TART, J.; HOANG, M.VAN; KOTT, J.; MACIEWICZ, R.A.; HUMPHRIES, J. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and ADAM17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 22377-86, 2004.
- BLOBEL, C.P. ADAMS: key components in EGFR signaling and development. **Nature**. v. 6, p. 32-42, 2005.
- BLOBEL, C.P. Metalloprotease-Disintegrins:Links to Cell Adhesion and Cleavage of TNF α and Notch. **Cell**. v. 90, p. 589-592, 1997.
- BLOBEL, C.P.; WOLFSBERG, T.G.; TURCK, C.W.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**. v. 356, p. 248-252, 1992.
- BORCHELT, D.R.; TARABOULOS, A.; PRUSINER, S. B. Evidence for Synthesis of Scrapie Prion Proteins Endocytic Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p. 16188-16199, 1992.
- BROWN, D. R. Prion and prejudice: normal protein and synapse review. **TRENDS in Neurosciences**. v. 24, p. 85, 2001.
- BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P.E.; KRUCK, T.; BOHLEN, A.V.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D.; KRETZSCHMAR, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature**. v. 390, p. 684-687, 1997.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** v. 356, p. 577-582, 1992.

BURGESS, R. R. Refolding of Solubilized Inclusion Body proteins. **Methods in Enzymology**. Elsevier Inc, 2009, v.463, p. 259-282.

BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**. v. 43, p. 1-9, 2005.

CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/ MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha v\beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.

CAMPANA, V.; SARNATARO, D.; ZURZOLO, C. The highways and byways of prion protein trafficking. **TRENDS in Cell Biology**. v. 15, p.102-104, 2005.

CAUGHEY, B. & RAYMOND, G.J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266, P. 18217-23, 1991 a.

CAUGHEY, B.; RAYMOND, G.J.; ERNST, D.; RACE, R.E. N-Terminal Truncation of the Scrapie-Associated Form of PrP by Lysosomal Protease(s): Implications Regarding the Site of Conversion of PrP to the Protease-Resistant State. **Journal of Virology**. v. 65, p. 6597-6603, 1991 b.

CHEN, S. G.; TELOW, D. B.; PARCHI, P.; TELLER, J. K., GAMBETTI, P.; AUTILIO-GAMBETTI, L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p.19173-19180, 1995.

CHESEBRO, B. Prion diseases: BSE and prions uncertainties about the agent. **Science**. v.279, p. 42-43, 1998.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **The EMBO Journal**. v. 21, 3317-3326, 2002.

CISSÉ, M. A.; SUNYACH, C.; LEFRANC-JULLIEN, S.; POSTINA, R.; VICENT, B.; CHECLER, F. The Disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 40624-40631, 2005.

CLARK, E. B. Refolding of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, p. 157-163, 1998.

COSTA, M.D.M.; PALUDO, K.S.; KLASSEN, G.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; MARTINS, V.R.; CAMARGO, A.A.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**. v. 461, p. 16-20, 2009.

COSTA, M.D.M. **Expressão e purificação da proteína recombinante $_{6}$ His-ADAM23 e caracterização da sua interação com a proteína príon celular**. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

COSTA, F.F; VERBISCK, N.V; SALIM, A.C; IERARDI, D.F; PIRES, L.C; SASAHARA, R.M; SOGAYAR, M.C; ZANATA, S.M; MACKAY, A; O'HARE, M; SOARES, F; SIMPSON, A.J; CAMARGO, A.A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 1481-1488, 2003.

CUI, T.; DANIELS, M.; WONG, B.S.; LI, R.; SY, M.; SASSOON.; BROWN, D. R. Mapping the functional domain of the prion protein. **European Journal of Biochemistry**. v. 270, p. 3368-3376, 2003.

DYSON, M.R.; SHADBOLT, S.P.; VINCENT, K.J.; RAJIKAL PERERA, R.L.; MCCAFFERTY, J. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. **BMC Biotechnology**. v. 4, n. 32, 2004.

EDWARDS, D.R.; HANDSLEY, M.M.; PENNINGTON, C.J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 29, p. 258-289, 2008.

ERMONVAL, M.; MOUILLET-RICHARD, S.; CODOGNO, P.; KELLERMANN, O.; BOTTI, J. Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. **Biochimie**. v. 85, p. 33-45, 2003.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; KUPRIYANOV, S.; LIU, H.Z.; PUZON-McLAUGHLIN, W.; ZHANG, X.P.; SHEPPARD, D.; ENGVALL, E.; TAKADA, Y. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin $\alpha 9 \beta 1$: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 17804-17810, 2002.

ETO, K.; PUZON-McLAUGHLIN, W.; SHEPPARD, D.; SEHARA-FUJISAWA, A.; ZHANG, X.; TAKADA, Y. RGD-independent binding of integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM12 and 15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 34922-30, 2000.

FELDING-HABERMANN, B.; O'TOOLE, T.E.; SMITH, J.W.; FRANSVEA, E.; RUGGERI, Z.M.; GINSBERG, M.H.; HUGHES, P.E.; PAMPORI, N.; SHATTIL, S.J.; SAVENI, A.; MUELLE, B.M. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 98, p. 1853-1858, 2001.

FOURIE, A.M.; COLES, F.; MORENO, V.; KARISSON, L. Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrate and in ectodomain cleavage of CD 23. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 30469-30477, 2000.

FRANGIONI, J. V. & NEEL, B. G. Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. **Analytical Biochemistry**. v. 210, p. 179-187, 1993.

GAUCZYNSKI S.; PEYRIN, J.M.; HAĀK, S.; LEUCHT, C.; HUNDT, C.; RIEGER, R.; KRASEMANN, S.; DESLYS, J.P.; DORMONT, D.; LASMÉZAS, C.I.; WEISS, S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **The EMBO Journal**. v. 20, p. 5863-5875, 2001.

GAULTIER, A.; COUSIN, H.; DARRIBERE, T.; ALFANDARI, D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 23336-23344, 2002.

GHILARDI, C.; CHIORINO, G.; DOSSI, R.; NAGY, Z.; GIAVAZZI, R.; BANI, M.R. Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **BMC Genomics**. v. 9, n. 201, 2008.

GILPIN, B.J.; LOECHEL, F.; MATTEI, M.G.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. A novel secreted form of human ADAM12 (meltrin α) provokes myogenesis in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 157-166, 1998.

GÖDDE, N.J.; D'ABACO, G.M.; PARADISO, L.; NOVAK, U. Differential coding potential of ADAM22 mRNAs. **Gene**. v. 403, p. 80-88.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v.78, p. 647-658, 2004.

GOMIS-RÜTH, F.X. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**. v. 24, p.157-202, 2003.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S. M.; MARTINS, V. R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminina and mediates neuritogenesis. **Molecular Brain Research**. v.76, p. 85-92, 2000.

HAACKE, A.; FENDRICH, G.; RAMAGE, P.; GEISER, M. Chaperone over-expression in Escherichia coli: Apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates. **Protein expression and Purification**. v. 64, p. 185-193, 2009.

HAJJ, G. M., LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; SANTOS, T.G.; RIBEIRO, K.C.B.; JULIANO, M.A.; JACCHIERI, S.G.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R. Integrins compensate PrPc interaction with vitronectin to support axonal growth. **Journal of Cell Science**. v. 120, p. 1915-1926, 2007.

HAMMARSTRON, M.; HELLGREN, N.; BERG, S. V.; BERGLUND, H. HARD, T. Rapid screening for improved solubility of a small human proteins produced as fusion proteins in E. coli. **Protein Science**. v. 11, n. 2, p. 313-321, 2002.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1998.

HARRIS, B.; PEREIRA, I.; PARKIN, E. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the precursor protein. **Brain Research**. v. 1296, p. 203-215, 2009.

HARRIS, D.A. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. **British Medical Bulletin**. v. 66, p. 71-85, 2003.

HELENIUS, A. & AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annual Review of Biochemistry**. v. 73, p. 1915-1926, 2004.

HOOPER, N.M.; TAYLOR, D.R.; WATT, N.T. Mechanism of metal-mediated endocytosis of the prion protein. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1272-76, 2008.

HOOPER, N.M. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. **Biochemical Society Transactions**. v. 33, p. 335-338, 2005.

HOUGAARD, S.; LOECHEL, F.; XU, X.; TAJIMA, R.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Trafficking of human ADAM12-L: Retention in the trans-Golgi network. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 275, p. 261-267, 2000.

HOWARD, L.; MACIEWICZ, R.A.; BLOBEL, C.P. Cloning and characterization of ADAM28: Evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. **The Biochemical Journal**. v. 348, p. 21-27, 2000.

HUANG, J.; BRIDGES, L.C.; WHITE, J.M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. **Molecular Biology of the Cell**. v. 16, p. 4982-91, 2005.

HUANG, T.F. What have snakes taught us about integrins? **Cellular and Molecular Life Science**. v. 54, p. 27-40, 1998.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; FRÖHLICH, C.; LOECHEL, F.; ZOLKIEWSKA, A.; ISHIGURO, K.; TETSUHITO, K.; LIU, W.; LANGFORD, J.K.; SANDERSON, R.D. The Cysteine-rich Domain of Human ADAM 12 Supports Cell Adhesion Through Syndecans and Triggers Signaling Events that Lead to β 1 Integrin-dependent Cell Spreading. **The Journal of Cell Biology**. v. 149, p. 1143-1155, 2000.

KANEKO, K.; VEY, M.; SCOTT, M.; PILKUHN, S.; FRED E. COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 94, p. 2333-2338, 1997.

KANG, T.; ZHAO, Y.G.; PEI, D.; SUCIC, J.F.; SANG, Q.X. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 25583-25591, 2002.

KÄRKKÄINEN, L.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.P. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 15, p. 547-560, 2000.

KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M.; NAKAMURA, Y. Human metalloprotease/disintegrin (MDC) gene: Exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenetics and Cell Genetics**. v. 68, p. 39-44, 1995.

KESHET, G.I.; BAR-PELED, O.; YAFFE, D.; NUDEL, U.; GABIZON, R. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. **Journal of Neurochemistry**. V. 75, p. 1889-1897, 2000.

KLEINO, I.; ORTIZ, R.M.; HUOVILLA, A.P. ADAM15 gene structure and differential alternative exons use in human tissues. **BMC Molecular Biology**. v. 8, n. 90, 2007.

KOJRO, E.; GIMPL, G.; LAMMICH, S.; MARZ, W.; FAHRENHOLZ, F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha secretase ADAM10. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 98, p. 5815-5820, 2001.

KORTH, C.; KANEKO, K.; PRUSINER, S. Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with prion strains. **The Journal of General Virology**. v. 81, p. 2555-2563, 2000.

KRÄTZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C.P. Metargidin: Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequence. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 4593-4596, 1996.

KURISAKI, T.; WAKATSUKI, S.; SEHARA-FUJISAWA, A. Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. **FEBS Letters**. v. 532, n. 3, p. 419-422, 2002.

LAFFONT-PROUST, I.; FAUCHEUX, B.A.; HÄSSIG, R.; SAZDOVITCH, V.; SIMON, S.; GRASSI, J.; HAUW, J.; MOYA, K.L.; HAĪK, S. the N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. **FEBS Letters**. v. 579, p. 6333-6337, 2005.

LAKHAN, S.E.; SABHARANJAK, S.; DE, A. Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Journal of Biomedical Science**. v. 16, n. 93, 2009.

LANGHORST, M.F.; REUTER, A.; STUERMER, C.A.O. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, p. 2228-2240, 2005.

LAWSON, V.A.; COLLINS, S.J.; MASTERS, C.L.; HILL, C.L. Prion glycosylation. **Journal of Neurochemistry**. v. 93, p. 793-801, 2005.

LE PICHON, C.E.; VALLEY, M.T.; POLYMERIDOU, M.; CHESLER, A.T.; SAGDULLAEV, B.T.; AGUZZI, A.; FIRESTEIN, S. Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. **Nature Neuroscience**. v. 12, n. 1, p. 60-69, 2009.

LEE., K.S., MAGALHÃES, A.C., ZANATA, S.M., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R., PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 79, p. 79-87, 2001.

LEHMANN, S. & HARRIS, D.A. Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 21479-21487, 1997.

- LEUCHT, C.; SIMONEAU, S.; REY, C.; VANA, K.; RIEGER, R.; LASMÉZAS, C.I.; WEISS, S. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrPSc propagation in scrapie-infected neuronal cells. **The EMBO Journal**. v. 4, p. 290-295, 2003.
- LIEBER, T.; KIDD, S.; YOUNG, MW. Kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. **Genes & Development**. v. 16, p. 209-221, 2002.
- LINDEN, R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R.R. Physiology of Prion Protein. **Physiological Reviews**. v. 88, p. 673-728, 2008.
- LINGWOOD, D. & SIMONS, K. Lipid Rafts As Membrane-Organizing Principle. **Science**. v. 327, 46-50, 2009.
- LIU, H.; SHIM, A. H. R.; HE, X. Structural Characterization of the Ectodomain of a Disintegrin and Metalloproteinase-22 (ADAM22), a Neural Adhesion Receptor Instead of Metalloproteinase. **The Journal of Biological Chemistry**. v.284, p. 29077-29086, 2009.
- LOECHEL, F.; OVERGAARD, M.T.; OXVIG, C.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Regulation of human ADAM12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 13427-13433, 1999.
- LOPES, M. H.; HAJJ, G.N.M.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R.M.P.S.; RIBEIRO, K. C. B.; BRENTANI, R.R.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **The Journal of Neuroscience**. v.25, p. 11330-11339, 2005.
- LUM, L.; REID, M.S.; BLOBEL, C.P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 26236-26247, 1998.
- MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. **Science**. v. 298, p. 1781-1785, 2002.
- MAGALHÃES, A.C.; SILVA, J.A.; LEE, K.S.; MARTINS, V.R.; PRADO, V.F.; FERGUSON, S.S.G.; GOMEZ, M.V.; BRENTANI, R.R.; PRADO, M.A.M. Endocytic Intermediates Involved with the Intracellular Trafficking of a Fluorescent Cellular Prion Protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, p.33311-33318, 2002.
- MANGÉ, A., MILHAVET, O., UMLAUF, D., HARRIS, D., LEHMANN, S. PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. **FEBS Letters** v. 514, p.159-162, 2002.
- MANGÉ, A.; NISHIDA, N.; MILHAVET, O.; MCMAHON, H.E.M.; CASANOVA, D.; LEHMANN, S. Amphotericin B Inhibits the Generation of the Scrapie Isoform of the Prion Protein in Infected Cultures. **Journal of Virology**. v. 74, p. 3135-3140, 2000.
- MANSON, J.C.; CLARKE, A.R.; McBRIDE, P.A.; McCONNELL, I.; HOPE, J. Prp gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. **Neurodegeneration**. v. 3, p. 331-340, 1994.
- MEHRPOUR, M. & CODOGNO, P. Prion protein: From physiology to cancer biology. **Cancer Letters**. v. 290, p. 1-23, 2010.
- MILLA, M.E.; GONZALES, P.E.; LEONARD, J.D. The TACE Zymogen: Re-Examining the role of cysteine switch. **Cell Biochemistry and Biophysics**. v.44, p. 342-348, 2006.
- MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L. *et al.* Specific sequence elements are required for expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.30563-30570, 1999.
- MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERTZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.;

WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M. SKARNES, W.C. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**. v. 28, p. 241-249, 2001.

MOORE, R.C.; LEE, I.Y.; SILVERMAN, G.L.; HARRISON, P.M.; STROME, R.; HEINRICH, C.; KARUNARATNE, A.; PASTERNAK, S.H.; CHISHTI, M.A.; LIANG, Y.; MASTRANGELO, P.; WANG, K.; SMIT, A.F.; KATAMINE, S.; CARLSON, G.A.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B.; MELTON, D.W.; TREMBLAY, P.; HOOD, L.E.; WESTAWAY, D. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **Journal of Molecular Biology**. v. 292, p. 797-817, 1999.

MUNRO, S.; Lipid Rafts:Elusive or Illusive? **Cell**. v. 115, p. 377-388, 2003.

MURAS, A.G.; HAJJ, G.N.M.; RIBEIRO, K.B.; NOMIZO, R.; NONOGAKI, S.; CHAMMAS, R.; MARTINS, V.R. Prion protein ablation increases cellular agragtion and embolization contributing to mechanisms of metastasis. **International Journal of Cancer**. v. 125, p. 1523-1531, 2009.

MURPHY, G. The ADAMs: signaling scissors in the tumor microenvironment. **Nature Reviews**. v. 8, p. 929-941, 2008.

NASLAVSKY, N.; STEIN, R.; YANAI, A.; FRIEDLANDER, G.; TARABOULOS, A. Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. **The Journal of Biological Chemistry**. v.272, p. 6324-6331, 1997.

NATH, D.; SLOCOMBE, P.M.; STEPHENS, P.E.; WARN, A.; HUTCHINSON, G.R.; YAMADA, K.M.; DOCHERTY, A.J.; MURPHY, G. Interaction of metargidin (ADAM-15) with $\alpha\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins on different haemopoietic cells. **Journal of Cell Science**. v. 112, p. 579-587, 1999.

NICOLAS, O.; GAVÍN, R.; DEL RIO, J. A. New insights into cellular prion protein (PrP^C) functions: the “ying and yang” of relevant protein. **Brain Research Reviews**. v. 61, p. 170-181, 2009.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**. v.11, p. 227-235, 2004.

OWUOR, K.; HAREL, N.Y.; ENGLOT, D.C.; HISAMA, F.; BLUMENFELD, H.; STRITTMATTER, S.M. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 42, n. 4, p. 448-457, 2009.

PARKIN, E.T; WATT, N.T.; TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. Dual Mechanisms for Shedding of the Cellular Prion Protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 11170–11178, 2004.

PARTON, R. & SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nature Reviews**. v. 8, p. 185-194, 2007.

PAULY, P.C. & HARRIS, D.A. Cooper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. . **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 33107-33110, 1998.

PESCHON, J.J.; SLACK, J.L; REDDY, P.; STOCKING, K.L.; SUNNARBORG, S.W.;LEE, D.C.; RUSSEL, W.E.; CASTNER, B.J.; JOHNSON, R.S.; FITZNER, J.N.; BOYCE, R.W.; NELSON, N.; KOZLOSKY, C.J.; WOLFSON, M.F.; RAUCH, C.T.; CERRETI, D.P.; PAXTON, R.J.; MARCH, C.J.; BLACK, R.A. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**. v. 282, p. 1281-1284, 1998.

PETERS, P.J.; MIRONOV, A.J.R.; PERETZ, D.; VAN DONSELAAR, E.; LECLERC, E.; ERPEL, S.; DEARMOND, S.J.; BURTON, D.R.; WILLIAMSON, R.A.; VEY, M.; PRUSINER, S.B. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **The Journal of Cell Biology**. v. 162, p. 703-717, 2003.

PIKE, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. **Journal of Lipid Research**. v. 47, p. 1597-1598, 2006.

PIKE, L. J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. **Biochemistry Journal**. v. 378, p. 281-292, 2004.

- PINHEIRO, T.J.T. The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prion. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 141, p.66-71, 2006.
- PRUSINER, S.B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 13363-13383, 1998.
- PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DeARMOND, S.J. & COHEN, F.E. Prion protein biology. **Cell**. v. 93, p. 337-348, 1998.
- REDDY, P.; SLACK, J.L.; DAVIS, R.; CERRETI, D.P.; KOZLOSKY, C.J.; BLANTON, R.A.; SHOWS, D.; PESCHON, J.J.; BLACK, R.A. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**.v. 275, p. 14608-14614, 2000.
- RINAS, U.; HOFFMANN, F.; BETKU, E.; ESTAP'É, D.; MARTEN, S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated *in vivo* inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 127, p. 244-257, 2007.
- ROCKS, N.; PAULISSEN, G.; EL HOUR, M.; QUESADA, F.; CRAHAY, C.; GUEDERS, M.; FOIDART, J.M.; NOEL, A.; CATALDO, D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinase in câncer. **Biochimie**. v. 90, p. 369-379, 2009.
- ROGHANI, M.; BECHERER, J.D.; MOSS, M.L.; ATHERTON, R.E.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; ARRIBAS, J.; BLACKBURN, R.K.; WESKAMP, G.; TEMPST, P.; BLOBEL, C.P. Metalloprotease-disintegrin MCD9: Intracellular maturation and catalytic activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 3531-3540, 1999.
- ROSSI, D.; COZZIO, A.; FLECHSIG, E.; KLEIN, M.A.; RULICKE, T.; AGUZZI, A.; WEISSMANN, C. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. **The EMBO Journal**. v. 20, p. 694-702, 2001.
- RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**. v. 10, n. 1, p. 49-56, 1996.
- RUOSLAHTI, E. The RGD story: a personal account. **Matrix Biology**. v. 22, p. 459-465, 2003.
- SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H.; LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 6, p. 387-396, 2008.
- SAGANE, K.; HAYAKAWA, K.; KAI, J.; HIROHASHI, T.; TAKAHASHI, E.; MIYAMOTO, N.; INO, M.; OKI, T.; YAMAZAKI, K.; NAGASU, T. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. **BMC Neuroscience**. v. 6, n. 1, 2005.
- SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**. v.236, p. 79-86, 1999.
- SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochemistry Journal**. v. 334, p. 93-98, 1998.
- SAKAGUCHI, S.; KATAMINE, S.; NISHIDA, N.; MORIUCHI, R.; SHIGEMATSU, K.; SUGIMOTO, T.; NAKATAMI, A. *et al.* Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrPc gene. **Nature**. 380: 528-531, 1996.
- SALANI, B.; BRIATORE, L.; CONTINI, P.; PASSALACQUA, M.; MELLONI, E.; PAGGI, A.; CORDERA, R.; MAGGI, D. IGF-I induced rapid recruitment of integrin β 1 to lipid rafts is caveolin-1 dependent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 380, p. 489-492, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA, 2001, 3 v.

SANGHERA, N. & PINHEIRO, T.J.T. Binding of Prion Protein to Lipid Membranes and Implications for Prion Conversion. **Journal of Molecular Biology**. v. 315, p. 1241-1256, 2002.

SANTUCCIONE, A., SYTNYK, V., LESHCHYNS'KA, I., SCHACHNER, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{l^yn} and enhance neurite outgrowth. **The Journal of Cell Biology**. v. 169, p. 341-354, 2005.

SARNATARO, D.; CAPUTO, A.; CASANOVA, P.; PURI, C.; PALADINO, S.; TIVODAR, S.S.; CAMPANA, V.; TACCHETTI, C.; ZURZOLO, C. Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells. **PLoS One**. v. 4, n. 6, 2009.

SARNATARO, D.; CAMPANA, V.; PALADINO, S.; STORNAIUOLO, M.; NITSCH, L.; ZURZOLO, C. PrPC Association with Lipid Rafts in the Early Secretory Pathway Stabilizes Its Cellular Conformation. **Molecular Biology of the Cell**. v. 15, p. 4031-4042, 2004.

SCHLONDORFF, J.; BECHERER, J.D.; BLOBEL, C.P. Intracellular maturation and localization of the tumor necrosis factor α convertase (TACE). **The Biochemical Journal**. v. 347, p. 131-138, 2000.

SCHMITT-ULMS, G.; KIRK, H.; LIU, J.; COWDREY, C.; YANG, J.; DeARNOND, S.J.; COHEN, F.G.; PRUSINER, S.B.; BALDWIN, M.A. Time controlled transcatheter perfusion cross-linking for the study of proteins interaction in complex tissues. **Nature Biotechnology**. v. 22, p. 724-731, 2004.

SCHROCK, Y.; SOLIS, G.P.; STUERMER, C.A.O. Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrPC). **FEBS Letters**. v. 583, p. 389-393, 2009.

SEALS, D.F. & COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins functions. **Genes & Development**, v. 17, p. 7-30, 2003.

SHIRAKABE, K.; WAKATSUKI, S.; KURISAKI, T. FUJISAWA-SEHARA, A. Roles of Meltrin beta/ADAM19 in processing of neuregulin. **The Journal of Biological Chemistry**.v. 276, p. 9352-9358, 2001.

SHYNG, S.L.; MOULDER, K.L.; LESKO, A.; HARRIS, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p. 14793-800, 1995.

SIMONS, K. & TOOMRE, D. Lipid Rafts and Signal transduction. **Nature Reviews**. v. 1, p. 31-40, 2000.

SINGH, S. M. & PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

SMITH, K.M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J.M.; DeSIMONE, D. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function *in vivo*. **The Journal of Cell Biology**. v.159, p. 893-902, 2002.

STEWART, R.S. & HARRIS, D.A. Mutational Analysis of Topological Determinants in Prion Protein (PrP) and Measurement of Transmembrane and Cytosolic PrP during Prion Infection. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 45960-45968, 2003.

SUMUDHU, W.; PERERA, S.; HOOPER, N.M. Ablation of metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. **Current Biology**. v. 11, p. 519-523, 2001.

SUN, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; TAO, J.; WANG, C.; JING, N.; WU, C.; DENG, K.; QIAO, S. ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochemical Research**. v. 32 (7), p. 1217-1223, 2007.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. 2004). Two novel isoforms of *ADAM23* expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**. v. 325, p. 171-178, 2004.

SUNYACH, C.; JEN, A.; DENG, J.; FITZGERALD, K.T.; FROBERT, Y.; GRASSI, J.; MCCAFFREY, M.W.; MORRIS, R. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **The EMBO Journal**. v. 22, p. 3591-3601, 2003.

TAKADA, H.; IMOTO, I.; TSUDA, H.; NAKANISHI, Y.; ICHIKURA, T.; MOCHIZUKI, H.; MITSUFUJI, S.; HOSODA, F.; HIROHASHI, S.; OHKI, M.; INAZAWA, J. *ADAM23*, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**. v. 24, p. 8051-8060, 2005.

TAKAHASHI, E.; SAGANE, K.; NAGASU, T.; KUROMITSU, J. Altered nociceptive response in *ADAM11*-deficient mice. **Brain Research**. v. 1097, p. 39-42, 2006 a.

TAKAHASHI, E.; SAGANE, K.; OKI, T.; YAMAZAKI, K.; NAGASU, T.; KUROMITSU, J. Deficits in spatial learning and motor coordination in *ADAM11*-deficient mice. **BMC Neuroscience**. v. 7, n. 19, 2006 b.

TAKEDA, S. Three-dimensional domain architecture of the *ADAM* family proteinases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 20, p. 146-152, 2009.

TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H.; ARAKI, S. Crystal structure of *VAP-1* reveal *ADAMs'* MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **The EMBO Journal**. v. 25, p. 2388-2396, 2006.

TARABOULOS, A.; RAEBER, A.J.; BORCHELT, D.R.; SERBAN, D.; PRUSINER, S.B. Synthesis and Trafficking of Prion Proteins in Cultured Cells. **Molecular Biology of the Cell**. v. 3, p. 851-863, 1992.

TARABOULOS, A.; SCOTT, M.; SEMENOV, A.; AVRAHAM, D.; LASZLO, L.; PRUSINER, S.B. Targeting Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform. **The Journal of Cell Biology**. v. 129, p. 121-132, 1995.

TAYLOR, D.R.; PARKIN, E.T.; COCKLIN, S.L.; AULT, J.R.; ASHCROFT, A.E.; TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. Role of *ADAMs* in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p. 22590-22600, 2009.

TAYLOR, D.R.; HOOPER, N.M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (*LRP1*) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. **The Biochemical Journal**. v. 402, p. 17-23, 2007.

TAYLOR, D.V.; WATT, N.T.; PERERA, W.S.S.; HOOPER, N.M. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its cooper-stimulated, clatrin-dependent endocytosis. **Journal of Cell Science**. v. 118 (21), p. 5141-5153, 2005.

TELLIER, E.; CANAULT, M.; REBSOMEN, L.; BONARDO, B.; JUHAN-VAGUE, I.; NALBONE, G.; PEIRETTI, F. The shedding activity of *ADAM17* is sequestered in lipid rafts. **Experimental Cell Research**. v. 312, p. 3969-3980, 2006.

TOMCZUK, M.; TAKAHASHI, Y.; HUANG, J.; MURASE, S.; MISTRETTA, M.; KLAFFKY, E.; SUTHERLAND, A.; BOLLING, L.; COONROD, S.; MARCINKIEWICZ, C.; SHEPPARD, D.; STEPP, M.; WHITE, J.M. Role of multiple β 1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of *ADAMs2* and 3. **Experimental Cell Research**, v. 290, p. 68-81, 2003.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**. v. 8, p. 1-8, 2003.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of theories are correct. **Glycobiology** v. 3, p. 97-130, 1993.

VENTURA, S & VILLAVERDE, A. Proteins quality in bacterial inclusion bodies. **TRENDS in Biotechnology**. v.24, p. 179-185, 2006.

VERA, A.; GONZA'LEZ-MONTALBA'N, N.; ARI'S, A.; VILLAVERDE, A. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 96, n. 6, p. 1101-1105, 2006.

VERBISCK, N.V.; COSTA, E.T.; COSTA, F.F.; CAVALHER, F.P.; COSTA, M.D.M.; MURAS, A.; PAIXÃO, V.A.; MOURA, R.; GRANATO, M.F.; IERARDI, D.F.; MACHADO, T.; MELO, F.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; LIMA, W.C.C.; MACIEL, M.S.; CARVALHO, A.L.; SOARES, F. F.; ZANATA, S.M.; SOGAYAR, M.C.; CHAMMAS, R.; CAMARGO, A.A. ADAM23 negatively modulates $\alpha\beta 3$ integrin activation during metastasis. **Cancer Research**. v. 69 (13), p. 5546-52, 2009.

VEY, M.; PILKUHN, S.; WILLE, H.; NIXON, R.; DEARMOND, S.J.; SMART, E.J.; ANDERSON, R.G.W.; ALBERT TARABOULOS, A.; PRUSINER, S.B. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 93, p. 14945-14949, 1996.

VINCENT, B.; PAITEL, E.; SAFTIG, P.; FROBERT, Y.; HARTMANN, D.; De STROPPER, B.; GRASSI, J.; LOPEZ-PEREZ, E.; CHECLER, F. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 37743-37746, 2001.

WALMSLEY, A.R.; ZENG, F.; HOOPER, N.M. The N-terminal Region of the Prion Protein Ectodomain Contains a Lipid Raft Targeting Determinant. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 37241-37248, 2003.

WANG, H.; XIAO, Y.; FU, L.; ZHAO, H.; ZHANG, H.; WAN, X.; QIN, Y.; HUANG, Y.; GAO, H.; LI, X. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**. v.10, n. 14, 2010.

WHITE, J.M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 598-606, 2003.

WILSON, R.; BATE, C.; BOSHUIZEN, R.; WILLIAMS, A.; BREWER, J. Squalestatin alters the intracellular trafficking of a neurotoxic prion peptide. **BMC Neuroscience**. v. 8, n. 99, 2007.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**. v. 131, p. 275-278, 1995.

WOLFSBERG, T.G.; BAZAN, J.J.; BLOBEL, C.P.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional and evolutionary implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 90, p. 10783-10787, 1993.

YANG, P.; BAKER, K.A.; HAGG, T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development plasticity and repair. **Progress in Neurobiology** v. 79, p. 73-94, 2006.

ZANATA, S.M., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., HAJJ, G.N.M., CHIARINI, L.B., NOMIZO, R., FREITAS, A.R.O., CABRAL, A.L.B., LEE, K.S., JULIANO, M.A., OLIVEIRA, E., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**. v.21, p. 3317-3326, 2002.

ZHAO, Z.; GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J.; CHEUVRONT, T.; YI, H.; VON DER MARK, H.; VON DER MARK, K.; KAUFMAN, S.J.; ZOLKIEWSKA, A. Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin $\alpha 7 \beta 1$. **Experimental Cell Research**. v. 298, p. 28-37, 2004.

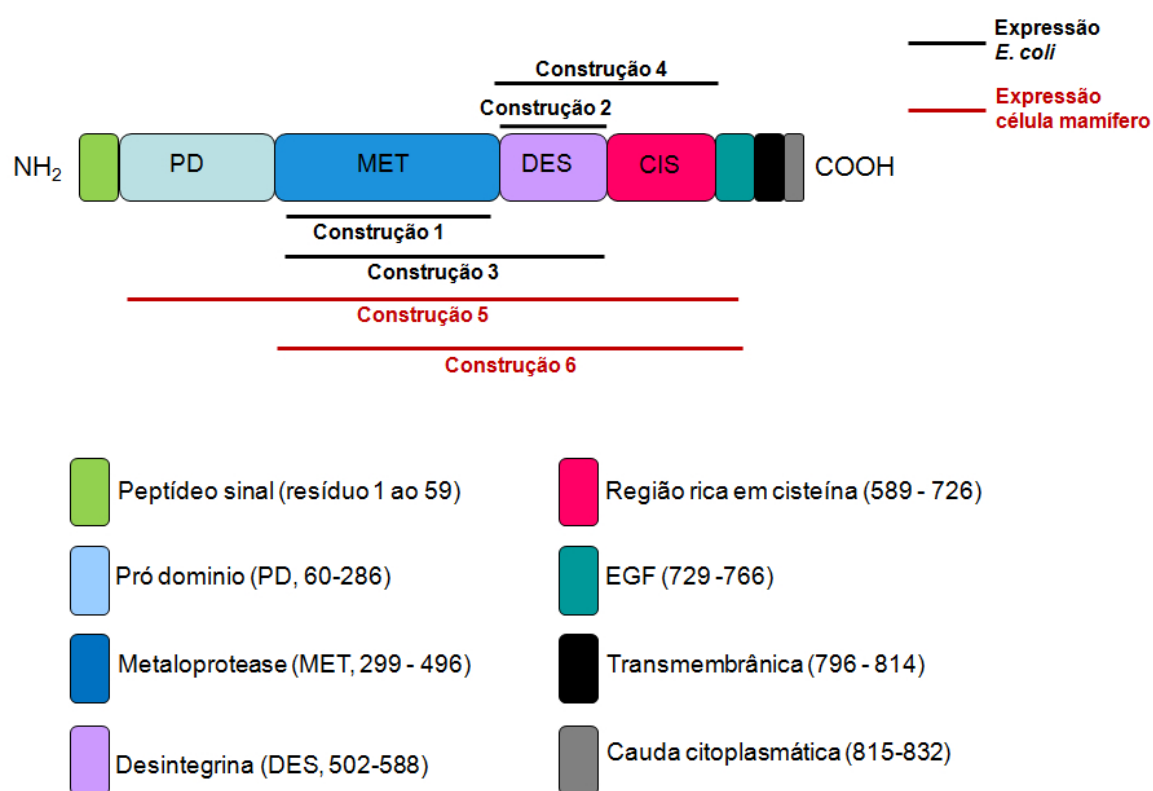
ZHENG, Y.; SATTIG, P.; HARTMANN, D.; BLOBEL, C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 42898-42906, 2004.

ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; FOX, J.W.; LÖFFEK, S.; SCHILD, A.; NISCHT, R.; MAUCH, C. Role of ADAM-9 Disintegrin-Cysteine-rich Domains in Human Keratinocyte Migration. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 42, p. 30785-30793, 2007.

ZIMINA, H.P.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; FRANZKE, C. Shedding of Collagen XVII Ectodomain Depends on Plasma Membrane Microenvironment. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 34019-34025, 2005.

ANEXO 1: Esquema da molécula ADAM23 e as regiões clonadas nos vetores para expressão em *E. coli* e em células de mamífero.

Figura esquemática da proteína ADAM23, mostrando o início e término de cada região da proteína. Para melhor entendimento estão indicados o início e término de cada construção usada neste trabalho para expressar a proteína ADAM23 recombinante humana.



ANEXO 2: Quadro descritivo das diferentes construções da proteína ADAM23 humana.

O quadro mostra a quantidade de pares de bases de cada sequência codificadora, o número de aminoácidos codificado por cada sequência, a posição do aminoácido inicial e o final de cada sequência e a massa molecular aproximada de cada construção levando em consideração a proteína de fusão ou etiqueta.

Construção (vetor + domínio)	Nº de pares de bases	Nº de aminoácidos	Região de aa na proteína ADAM23	MW aproximada
1. pGEX-metaloprotease	594 pb	199 aa	299 ao 496	48 kDa
2. pGEX-desintegrina	225 pb	75 aa	511 ao 585	35 kDa
3. pGEX-met + desintegrina	861 pb	287 aa	299 ao 585	58 kDa
4. pET28-desintegrina + cisteína	648 pb	216 aa	511 ao 726	28 kDa
5. pSecTag2/Hygro-ectodominio completo	1881 pb	627 aa	166 ao 792	75 kDa
6. pSecTag2/Hygro ectodominio maduro	1530 pb	510 aa	283 ao 792	62 kDa

ANEXO 3: Artigos publicados durante o Doutorado.

Artigo 1: Artigo referente aos resultados obtidos durante o Mestrado e Doutorado.

COSTA, M.D.M.; PALUDO, K.S.; KLASSEN, G.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; MARTINS, V.R.; CAMARGO, A.A.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**. v. 461, p. 16-20, 2009.

Artigo 2: Artigo em colaboração com a Dra. Anamaria A. Camargo, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo.

VERBISCK, N.V.; COSTA, E.T.; COSTA, F.F.; CAVALHER, F.P.; COSTA, M.D.M.; MURAS, A.; PAIXÃO, V.A.; MOURA, R.; GRANATO, M.F.; IERARDI, D.F.; MACHADO, T.; MELO, F.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; LIMA, W.C.C.; MACIEL, M.S.; CARVALHO, A.L.; SOARES, F. F.; ZANATA, S.M.; SOGAYAR, M.C.; CHAMMAS, R.; CAMARGO, A.A. ADAM23 negatively modulates $\alpha\beta3$ integrin activation during metastasis. **Cancer Research**. v. 69 (13), p. 5546-52, 2009.

Artigo 3: Artigo em colaboração com o Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Departamento de Biologia Celular, UFPR.

COSTA, D.D.; NETO, F.F.; COSTA, M.D.M.; MORAIS, R.N.; GARCIA, J.R.E.; ESQUIVEL, B.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 151, p. 248-257, 2010.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein

Michele D.M. Costa^{a,b}, Katia S. Paludo^b, Giseli Klassen^a, Marilene H. Lopes^c, Adriana F. Mercadante^a, Vilma R. Martins^c, Anamaria A. Camargo^c, Lia S. Nakao^a, Silvio M. Zanata^{a,*}

^a Department of Basic Pathology, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^c Ludwig Institute for Cancer Research – São Paulo Branch, Hospital Alemão Oswaldo Cruz, 01323-903 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2009

Received in revised form 11 May 2009

Accepted 20 May 2009

Keywords:

Disintegrin

Metalloprotease

ADAM23

Cellular prion protein

Prions

Glycosylation

ABSTRACT

ADAMs are transmembrane proteins implicated in several biological functions, including cytokine and growth factor shedding, fertilization, muscle and nervous system development. Here, we show for the first time that ADAM23, which is predominantly expressed in the central nervous system, co-localizes with cellular prion protein (PrP^C) at plasma membrane of mouse hippocampal neurons and neuroblastoma cells. Co-immunoprecipitation and pull-down assay showed a physical interaction between ADAM23 and both recombinant and endogenous PrP^C. Glycosylation seems to be not relevant to the observed interaction since both ADAM23 and PrP^C recombinant proteins expressed in bacteria or extracted from eukaryotic cells treated with tunicamycin are still able to bind each other. *In vitro* binding assays also suggested that the disintegrin domain of ADAM23 is able to interact directly with PrP^C. Taken together, these findings point out PrP^C as a novel molecular partner for ADAM23 in the nervous systems.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

ADAM (a disintegrin and metalloprotease) proteins are a large family of type I transmembrane glycoproteins implicated in a wide variety of biological functions that includes cytokine and growth factor shedding, muscle development and fertilization [23]. Within the nervous system, ADAM family has been suggested to play important roles in development, proliferation, migration, differentiation and survival of various cells, as well as axonal growth and myelination [26]. Members of the ADAM family exert their cellular function through a unique topographic organization containing metalloprotease, integrin-binding, cysteine-rich, epidermal growth factor (EGF)-like, transmembrane and cytoplasmic domains [25]. One important role of the ADAMs is related to their metalloprotease activity. A well-known example is ADAM17, which is the major enzyme responsible for transforming growth factor alpha (TGF α) shedding from the TGF α -precursor [3]. Another important role of the ADAMs relates to cellular adhesive function, attributed to the presence of both disintegrin and cysteine-rich domains. The disintegrin domain of mouse ADAM1 and ADAM2, which are sperm surface glycoproteins, are critical for murine fertilization [23].

ADAM23 is predominantly expressed in the central nervous system (CNS) during development and adulthood [9,20]. Mice devoid of ADAM23 develop severe tremors and ataxia and die soon after birth, suggesting its importance in CNS development and maintenance [17]. The biological roles of ADAM23, however are still unclear. It is predicted to act mainly through its disintegrin domain, due to the inactivity of its metalloprotease domain [5,20]. It has been proposed that human ADAM23 interacts *in vitro* with the α v β 3 integrin promoting cell adhesion through the disintegrin domain [5]. Understanding the physiological role of ADAM23 requires information about its cellular ligands. To date, only α v β 3 and LG11/LG14 [19] have been described as ADAM23 molecular partners. Interestingly, it was reported that α v β 3 integrin activity and expression is upregulated in dorsal root ganglia neurons from cellular prion protein (PrP^C)-null mice [11].

PrP^C is a ubiquitous sialoglycoprotein widely expressed in the brain and involved in several fatal neurodegenerative diseases [15]. PrP^C processing involves a non-amyloidogenic cleavage pathway, resulting in soluble peptides shedding from cell surface [13]. The involvement of the ADAMs superfamily members in PrP^C processing is already known. PrP^C is subjected to normal processing by both ADAM10 and ADAM17, leading to the production of a fragment called N1 [24]. Recently, an indirect participation of ADAM9 in the physiological production of N1 was evidenced, likely by the modulation of ADAM10 activity [6]. Using a screening methodology to determine protein partners at the cell plasma membrane, Schmitt-

* Corresponding author at: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, PO Box 19031, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

Tel.: +55 41 33611760; fax: +55 41 32662042.

E-mail address: smzanata@ufpr.br (S.M. Zanata).

Ulms et al. [22] identified a set of proteins located at PrP^C vicinity and ADAM23 was found among them. Here, we specifically address the question whether ADAM23 directly interacts with PrP^C and if such interaction is glycosylation-independent, similar to other PrP^C ligands [10,11,27].

A 873-bp fragment of mouse *adam23* cDNA (GenBank no. NT_039201) corresponding to the disintegrin and metalloprotease (aa 297–587) domains was amplified by PCR with the primers forward 5'GGGGTACCTATTTGGAGCTTATGATTGTT and reverse 5'CCCAAGCTTCAATAGCCATCTGTATTATG. It was cleaved with *KpnI* and *HindIII* and cloned into a pET32 vector (Novagen). Mouse recombinant $_6$ His-ADAM23_{297–587} was expressed in BL21 (DE3) *Escherichia coli* heterologous system and purified by immobilized-metal affinity chromatography under denaturing conditions.

Anti-ADAM23 serum was obtained by immunizing rabbits with recombinant $_6$ His-ADAM23_{297–587} and antibody specificity was evaluated against recombinant and mouse brain antigens through immunoblotting and indirect immunofluorescence assays. For double indirect immunofluorescence, human (SH-SY5Y) and murine (Neuro2a) neuroblastoma cells were cultured as suggested by ATCC. Mouse (BALB/c) hippocampal neurons were obtained as previously described [10]. Cells were plated on poly-L-lysine (5 μ g/mL) pre-coated glass coverslips. Cultured cells were fixed with 2% paraformaldehyde (20 min, room temperature) and subsequently washed with PBS. Non-specific sites were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS (1 h, RT). Cells were incubated with polyclonal mouse anti-PrP^C [14,27] (1:200) and polyclonal rabbit anti-ADAM23 (1:100) antibodies diluted in 1% BSA in PBS (16 h, 4 °C). The reaction was followed by incubation with anti-mouse IgG-Texas-Red (1:800, Molecular Probes) and anti-rabbit IgG-Alexa 488 (1:800, Molecular Probes) for 1 h at room temperature. Images of immunolabeled cells were acquired with a Zeiss Axiophot fluorescence or Nikon microscope coupled with confocal

system (Bio-Rad). Images were processed with Adobe Photoshop software (Adobe Systems).

His-tag pull-down assays were done using $_6$ His-ADAM23_{297–587} immobilized on Ni-NTA-agarose beads. For this procedure, 293T (human embryonic kidney) cells were transfected by calcium phosphate co-precipitation with either pEGFP-PrP^C or pEGFP [27]. After 48 h in culture, cells were lysed by 1% NP40 and 1% Triton X-100 in PBS supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche). Equal amounts of protein extracts from 293T cells expressing GFP or GFP-PrP^C were incubated with $_6$ His-ADAM23_{297–587} immobilized on Ni-NTA-agarose beads (2 h, 4 °C). After several washes, bound material was eluted with Laemmli sample buffer, resolved by a 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using polyclonal anti-PrP^C, monoclonal anti-pentaHis antibodies (Qia-gen) and anti-GFP antibody (Zymed). Reaction was developed using a chemiluminescent substrate (WestPico, Pierce). The same assay was done using a fraction of mouse brain homogenate precipitated with 30% ammonium sulfate saturation as PrP^C source, and bound material was analyzed by immunoblotting employing anti-PrP^C polyclonal antibody.

For co-immunoprecipitation assays, 293T cells were co-transfected as described above with pEGFP-PrP^C and pcDNA3-ADAM23-HA [5]. Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.5% NP40 and 0.2% sodium deoxycholate plus complete protease inhibitor cocktail. Lysates were pre-cleared with mouse non-immune serum mixed with protein A/G-sepharose (GE Healthcare) and immunoprecipitated as previously described using anti-PrP^C antibody [14,27]. Beads were washed with lysis buffer and bound proteins analyzed by immunoblotting with anti-HA (Zymed) and anti-PrP^C antibodies as described above. For glycosylation inhibition, 293T cells were co-transfected with pcDNA3-ADAM23-HA and pEGFP-PrP^C and treated with tunicamycin (Sigma) as described in Biswas et al. [2]. Extracts from treated and non-treated cells were used in the co-immunoprecipitation assay as described

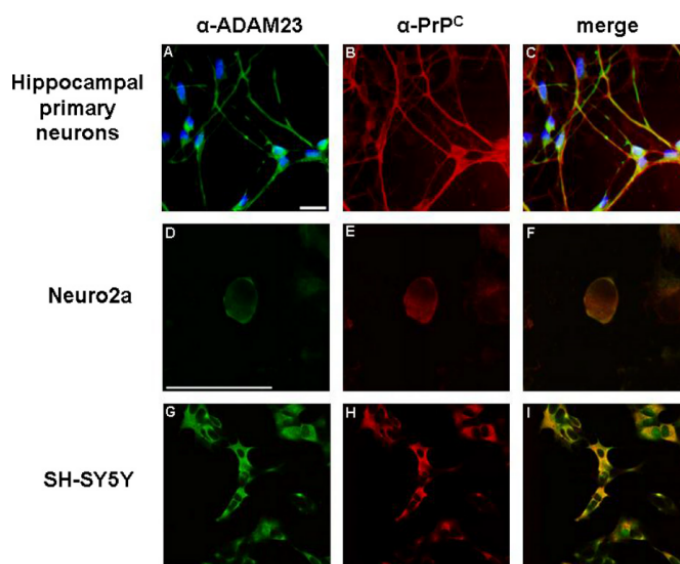


Fig. 1. ADAM23 co-localizes with PrP^C on cell surface. Cultured hippocampal neurons from E16 mice (A–C), Neuro2a (D–F) and SH-SY5Y cells (G–I) were immunostained for ADAM23 (green, A, D and G) and PrP^C (red, B, E and H). Cell nuclei were labeled with DAPI (blue, A). Hippocampal neurons show extensive co-localization of both proteins in the cell body and processes (merge, C). The co-localization was also observed on cell surface (merge, F) and at the perinuclear region and cell body (merge, I). Scale bar represents 50 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

above. To investigate the interaction between endogenous proteins, co-immunoprecipitation was done using brain extracts as a source of both PrP^C and ADAM23. The procedure was done as described above for co-transfected 293T cells. Bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-ADAM23 and anti-PrP^C antibodies.

PCR was used to amplify a 225-pb fragment of human *adam23* gene corresponding to disintegrin domain (aa 511–585), with the primers forward 5'CGGGATCCGAAGCTGGGGAGGAGTGTG and reverse 5'CGGAATTCATGAAGATTTGGTGGGCAC, using as template pCDNA3-ADAM23-HA vector, kindly provided by Cal and colleagues [5]. This fragment was cleaved with *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzymes and cloned into a pGEX-2T (GE Healthcare). Human recombinant ADAM23 (GST-disintegrin domain) was expressed in BL21 (DE3) *E. coli* heterologous system. GST fusion proteins were purified from bacterial lysates by affinity chromatography using glutathione-sepharose (GE Healthcare).

All animal experiments in this study were monitored by the Committee for Animal Experimentation in the Setor de Ciências Biológicas—Universidade Federal do Paraná.

Binding assays were performed absorbing 1 µg of GST-ADAM23 disintegrin domain (GST-ADD) or GST alone in 96-well polystyrene plates (NUNC) at 4 °C for 16 h. Non-specific sites were blocked with 1% BSA (2 h, room temperature). Increasing amounts of ⁶His-PrP^C (0.025–0.75 µg) were added to the wells and incubated for 16 h at 4 °C. After several washes with PBS, bound ⁶His-PrP^C was detected using anti-PrP^C (1:4000) (2 h, room temperature). Wells were extensively washed with PBS and secondary antibody coupled to HRP (horseradish peroxidase) was applied (1:4000, BD

Bioscience) for 1 h at 37 °C. Reaction was subsequently developed using o-phenylenediamine/H₂O₂ substrate and stopped with 1 M H₂SO₄. The absorbance was measured at 490 nm. Statistical analysis was done using Student's *t*-test (GraphPad Prism software). A *p* < 0.01 was considered statistically significant.

ADAM23, a type I transmembrane protein, is a member of the ADAM family with a high expression in nervous system [8,9,20]. PrP^C, a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored molecule [15], is also located at extracellular cell surface [14] and has a ubiquitous distribution. The involvement of the ADAMs superfamily members in PrP^C processing is already known [6,24]. Since ADAM23 shares functional behavior with other ADAMs and its expression pattern is mainly concentrated in the nervous system [8,9,20], we hypothesized whether ADAM23 could be a good candidate to interact with PrP^C.

Expression of these two proteins was analyzed by immunofluorescence microscopy in mouse primary hippocampal neurons (Fig. 1A–C), mouse neuroblastoma cells Neuro2a (Fig. 1D–F) and human neuroblastoma cell lineage SH-SY5Y (Fig. 1G–I). Our result (Fig. 1) confirms previously published data that neural cells express PrP^C [10,14] as well as ADAM23 [5,9]. In addition, ADAM23 and PrP^C co-localization (Fig. 1, merge) at the cell surface and at perinuclear region further corroborates with the putative interaction between these proteins in cellular microenvironments. PrP^C accumulation at perinuclear region has been described in SN56 septal neuron cell line [14] and is associated with the protein internalization mediated by Cu²⁺ ions. However, there is no evidence about ADAM23 trafficking or endocytic cycle. A previous study has suggested that both molecules could be present in the same extracellular microenvi-

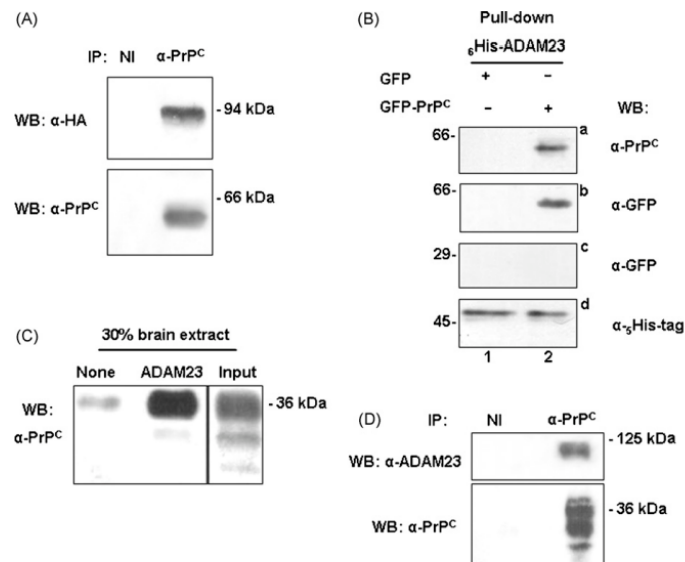


Fig. 2. Interaction between ADAM23 and PrP^C. (A) Protein extracts of 293T co-transfected with pcDNA3-ADAM23-HA and pEGFP-PrP^C were immunoprecipitated (IP) with anti-PrP^C antibody or non-immune serum (NI, negative control). Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting (WB) with anti-HA (upper panel) antibody. The same membrane was re-probed with anti-PrP^C antibody (lower panel) to confirm that GFP-PrP^C was precipitated during IP-reaction. (B) ⁶His-ADAM23₂₉₇₋₅₈₇ pull-down assays were performed with lysates of 293T cells transfected with the expression vectors pEGFP-PrP^C or pEGFP. Lysates were incubated with equal amounts of ⁶His-ADAM23₂₉₇₋₅₈₇ bound to Ni-NTA-agarose beads (panel d, anti-⁶His-tag). Bound proteins were analyzed using anti-PrP^C (panel a), anti-GFP (panels b and c). GFP-PrP^C specifically bound to ⁶His-ADAM23₂₉₇₋₅₈₇ bound to Ni-NTA-agarose beads (ADAM23) or Ni-NTA-agarose beads alone (none). Pull-down proteins were analyzed employing anti-PrP^C antibody. The mature di-glycosylated isoform of PrP^C from mouse brain was enriched after incubation with ADAM23 beads. (C) Mouse brain proteins were incubated with ⁶His-ADAM23₂₉₇₋₅₈₇ bound to Ni-NTA-agarose beads (ADAM23) or Ni-NTA-agarose beads alone (none). Pull-down proteins were analyzed employing anti-PrP^C antibody. (D) Mouse brain extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-PrP^C antibody or non-immune serum (NI, negative control). Immunoprecipitated proteins were analyzed using anti-ADAM23 (upper panel). The same membrane was re-probed with anti-PrP^C (lower panel) to attest PrP^C immunoprecipitation.

ronment [22], but no evidences of co-localization or direct binding of both molecules has been reported.

In order to show a specific interaction between ADAM23 and PrP^C, co-immunoprecipitation assays were done. Protein extracts of 293T cells co-transfected with pEGFP-PrP^C and pcDNA3-ADAM23-HA expression vectors were incubated with anti-PrP^C antibody followed by immunoprecipitation (IP). The blotting reaction of the immunoprecipitated material with anti-HA antibody revealed a band of 94 kDa corresponding to the full-length HA-tagged ADAM23 (Fig. 2A, upper panel). No band was observed when non-immune serum was employed in the immunoprecipitation reaction (Fig. 2A, NI). The same membrane was re-probed with anti-PrP^C antibody (Fig. 2A, lower panel) to confirm that GFP-PrP^C was precipitated during IP-reaction.

Pull-down assays also confirmed that ADAM23 interacts with both recombinant and endogenous PrP^C. 293T cells were transfected with GFP-PrP^C or GFP expression vectors and protein extracts were incubated with ϵ His-ADAM23_{297–587} (metalloprotease and disintegrin domains) bound to agarose beads. Western blotting results showed that GFP-PrP^C was recovered from beads, attested by the detection of a 60 kDa band when probed with anti-PrP^C (Fig. 2B, panel a) and with anti-GFP (Fig. 2B, panel b) antibodies. No reaction was observed when the GFP (control) extract was employed (Fig. 2B, lane 1, panel c) or when GFP-PrP^C extract was incubated with agarose beads alone (data not shown). Anti- ϵ His-tag confirmed an equal recombinant ϵ His-ADAM23_{297–587} protein loading on agarose beads (Fig. 2B, panel d, lanes 1 and 2). This result strengthens co-precipitation findings (Fig. 2A) and suggests that ADAM23 metalloprotease and disintegrin domains are relevant to ADAM23–PrP^C interaction. It is important to note that, at the cell surface, GFP-PrP^C, similar to the PrP^C endogenously expressed [1,14], is conformationally functional, being able to interact with other protein partners, such as STI1 [27].

Similar pull-down experiments were carried out with mouse whole brain extracts to verify if endogenous PrP^C could bind ADAM23. Fig. 2C shows that PrP^C is strongly enriched and recovered from ϵ His-ADAM23_{297–587} pre-loaded beads. A faint binding of PrP^C to agarose beads alone was also detected. However, this residual PrP^C binding to Ni²⁺ beads is not surprising since the PrP^C affinity to divalent transition metals has been previously described [4].

These results showed for the first time that ADAM23 can interact with PrP^C (Fig. 2B and C) from two different sources, 293T cells expressing a recombinant GFP-PrP^C fusion protein and mouse brain protein homogenate. Further, these findings suggest that the PrP^C binding site within ADAM23 is located at metalloprotease and disintegrin domains.

Finally, we investigated whether endogenous ADAM23 could interact with endogenous PrP^C. Then, whole brain extracts were incubated with anti-PrP^C antibody followed by immunoprecipitation (IP). The blotting reaction of the immunoprecipitated material with anti-ADAM23 revealed a band corresponding to the full-length ADAM23 (Fig. 2D, upper panel). The same membrane was re-probed with anti-PrP^C antibody (Fig. 2D, lower panel). This result suggests that both endogenous PrP^C and ADAM23 are able to bind each other and strengthen the *in vivo* occurrence of such interaction.

Since ADAM23 and PrP^C are both glycosylated proteins, we decided to investigate if this post-translational modification was involved with ADAM23–PrP^C interaction. To test this possibility we performed co-immunoprecipitation assays with protein extracts from transfected 293T cells treated with tunicamycin, which is known to block glycosylation during protein synthesis. After tunicamycin treatment, both ADAM23 and PrP^C were synthesized as lighter bands when compared with controls (data not shown). Immunoprecipitation assays employing proteins from transfected cells in which glycosylation was blocked with tunicamycin revealed

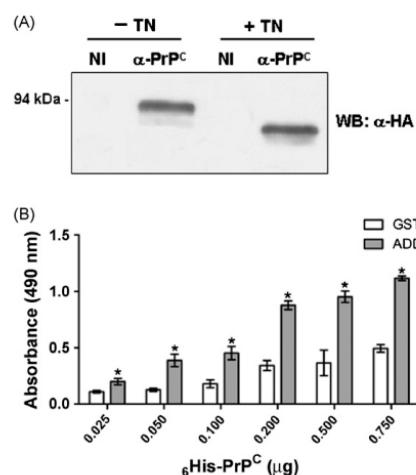


Fig. 3. ADAM23–PrP^C interaction is direct and glycosylation-independent. (A) 293T cells were co-transfected with pcDNA3-ADAM23-HA and pEGFP-PrP^C in the presence or absence of tunicamycin (TN). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-PrP^C antibody or non-immune serum (NI). Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting with anti-HA antibody. Immunoblotting showed that both glycosylated and non-glycosylated PrP^C isoforms were able to interact with full-length ADAM23-HA tagged. (B) Binding assays in which increasing amounts of ϵ His-PrP^C were incubated over GST–ADD (GST–ADAM23 disintegrin domain, grey bar) or only GST (negative control, white bar). Bound ϵ His-PrP^C was analyzed using anti-PrP^C. Results are representative of six independent experiments (*p* < 0.01 when compared with the negative control, Student's *t*-test).

that ADAM23 to PrP^C binding does not depend on sugar moieties (Fig. 3A).

N-glycosylation has been involved with protein folding, protection against proteolytic cleavage and quality control of newly synthesized glycoproteins in the endoplasmic reticulum [12]. It was recently described the functional role of N-glycosylation in bovine ADAM10 [7], a proteolytic active member of ADAM family. In this member, the four putative sites for glycation were blocked by site-directed mutagenesis and the mutations in metalloprotease and disintegrin domains resulted in protein retention at endoplasmic reticulum and/or decreased enzymatic activity [7].

A PROSITE (www.expasy.org.ch) search for potential N-glycosylation (N-X-S/T, X \neq Pro) in mouse ADAM23 revealed eight putative sites, four located in the pro-domain (N71, N92, N97 and N260), two in the disintegrin (N544 and N545) and two in the Cys-rich/EGF (N661 and N729) domains. Since enzymatic activity is not predicted for ADAM23 [20], glycation may account for other functions, distinct from proteolytic activity maintenance observed for ADAM10. Based on our results, this post-translational modification seems not to be involved in the ADAM23/PrP^C interaction. However, we cannot exclude that such glycation could be related with protein complex-stability or correct traffic/docking.

To further characterize the ADAM23–PrP^C interaction we performed binding assays of purified recombinant full-length PrP^C (ϵ His-tagged) to both immobilized GST–disintegrin domain of ADAM23 and GST protein alone. Fig. 3B provides evidence for the capacity of ADAM23 to bind PrP^C in a specific manner. At least for the disintegrin domain, this result suggests that ADAM23 is able to interact directly with PrP^C, independently of both glycosylation and other assistant molecules.

In ADAMs, the disintegrin domain has been described as mediator of protein–protein interaction, including integrins as a principal molecular partner [23]. ADAM23 seems to bind the

$\alpha\text{v}\beta 3$ integrin through the putative disintegrin loop containing the sequence AVNECDIT to promote cell adhesion [5]. Interestingly, this sequence lacks any RGD motif, which is commonly involved with integrins–ligand binding and function [18]. If PrP^C and $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin compete for the same binding site for ADAM23 or if there are distinct sites for molecular coupling, is not established at this time.

Since both PrP^C and $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin bind the same functional domain of ADAM23, we could speculate that both interactions could be involved in related functions, such as cell adhesion. Moreover, the involvement of PrP^C in cell–cell [16] and cell–matrix adhesion [10] has been already proposed. However, it was not established if PrP^C-mediated adhesion depends or not on integrins and/or if ADAM23 could modulate cell adhesion in the PrP^C context.

It is important to note that two other members of ADAM's family, ADAM11 and ADAM22, share similar sequences in the ectodomain with ADAM23 [21] and are also expressed in the CNS. Moreover, it was recently demonstrated that ADAM22, 23 and 11 bind the same ligands, the leucine-rich glioma inactivated (LGI) proteins, LGI1 and LGI4 [19]. Therefore, it is reasonable to consider that PrP^C could also be a common ligand for such related ADAMs.

Taken together, these results point out PrP^C as a novel molecular partner for ADAM23; however further investigation is required to determine the biological role and relevance of this specific interaction.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAPESP, Fundação CAPES-PROCAD, Fundação Araucária, FINEP and Institutos do Milênio–Redoxoma. MDMC is supported by CAPES fellowship. Authors thank Dr. Marisa G. Medeiros (IQ–Universidade de São Paulo) for the SH-SY5Y cells and Dr. Santiago Cal (Universidad de Oviedo, Spain) for the pcDNA-ADAM23-HA expression vector. This paper is dedicated to Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, who founded and directed the São Paulo Branch of Ludwig Institute for Cancer Research for 22 years.

References

- [1] S. Barmada, P. Piccardo, K. Yamaguchi, B. Ghetti, D.A. Harris, GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice, *Neurobiol. Dis.* 16 (2004) 527–537.
- [2] S. Biswas, J.P. Langeveld, D. Tipper, S. Lu, Intracellular accumulation of a 46 kDa species of mouse prion protein as a result of loss of glycosylation in cultured mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 153–161.
- [3] R.A. Black, Tumor necrosis factor- α converting enzyme, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 1–5.
- [4] D.R. Brown, Copper and prion disease, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 165–173.
- [5] S. Cal, J.M. Freije, J.M. Lopez, Y. Takada, C. Lopez-Otin, ADAM23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 1457–1469.
- [6] M.A. Cisse, C. Sunyach, S. Lefranc-Jullien, R. Postina, B. Vincent, F. Checler, The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40624–40631.
- [7] C. Escrivente, V.A. Morais, S. Keller, C.M. Soares, P. Altevogt, J. Costa, Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 905–913.
- [8] C. Ghilardi, G. Chiorino, R. Dossi, Z. Nagy, R. Giavazzi, M. Bani, Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium, *BMC Genomics* 9 (2008) 201.
- [9] A.P. Goldsmith, S.J. Gossage, C. French-Constant, ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons, *J. Neurosci. Res.* 78 (2004) 647–658.
- [10] E. Graner, A.F. Mercadante, S.M. Zanata, O.V. Forlenza, A.L. Cabral, S.S. Veiga, M.A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V.R. Martins, R.R. Brentani, Cellular prion protein binds laminin and mediates neurite outgrowth, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76 (2000) 85–92.
- [11] G.N. Hajj, M.H. Lopes, A.F. Mercadante, S.S. Veiga, R.B. da Silveira, T.G. Santos, K.C. Ribeiro, M.A. Juliano, S.G. Jacchieri, S.M. Zanata, V.R. Martins, Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1915–1926.
- [12] A. Helenius, M. Aebi, Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 1019–1049.
- [13] N.M. Hooper, Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 325–338.
- [14] K.S. Lee, A.C. Magalhaes, S.M. Zanata, R.R. Brentani, V.R. Martins, M.A. Prado, Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells, *J. Neurochem.* 79 (2001) 79–87.
- [15] R. Linden, V.R. Martins, M.A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, R.R. Brentani, Physiology of the prion protein, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 673–728.
- [16] A. Mange, O. Milhaved, D. Umlauf, D. Harris, S. Lehmann, PrP^C-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells, *FEBS Lett.* 514 (2002) 159–162.
- [17] K.J. Mitchell, K.I. Pinson, O.G. Kelly, J. Brennan, J. Zupcic, P. Scherz, P.A. Leighton, L.V. Goodrich, X. Lu, B.J. Avery, P. Tate, K. Dill, E. Pangilinan, P. Wakenight, M. Tessier-Lavigne, W.C. Skarnes, Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development, *Nat. Genet.* 28 (2001) 241–249.
- [18] E. Ruoslahti, The RGD story: a personal account, *Matrix Biol.* 22 (2003) 459–465.
- [19] K. Sagane, Y. Ishihama, H. Sugimoto, LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11, *Int. J. Biol. Sci.* 4 (2008) 387–396.
- [20] K. Sagane, Y. Ohya, Y. Hasegawa, I. Tanaka, Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain, *Biochem. J.* 334 (1998) 93–98.
- [21] K. Sagane, K. Yamazaki, Y. Mizui, I. Tanaka, Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23, *Gene* 236 (1999) 79–86.
- [22] G. Schmitt-Ulms, K. Hansen, J. Liu, C. Cowdrey, J. Yang, S.J. DeArmond, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.A. Baldwin, Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 724–731.
- [23] D.F. Seals, S.A. Courtneidge, The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* 17 (2003) 7–30.
- [24] B. Vincent, E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, F. Checler, The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37743–37746.
- [25] T.G. Wolfsberg, P.D. Straight, R.L. Gerena, A.P. Huovila, P. Primakoff, D.G. Myles, J.M. White, ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain, *Dev. Biol.* 169 (1995) 378–383.
- [26] P. Yang, K.A. Baker, T. Hagg, The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair, *Prog. Neurobiol.* 79 (2006) 73–94.
- [27] S.M. Zanata, M.H. Lopes, A.F. Mercadante, G.N. Hajj, L.B. Chiarini, R. Nomizo, A.R. Freitas, A.L. Cabral, K.S. Lee, M.A. Juliano, E. de Oliveira, S.G. Jacchieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R.R. Brentani, V.R. Martins, Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection, *EMBO J.* 21 (2002) 3307–3316.

Research Article

ADAM23 Negatively Modulates $\alpha_v\beta_3$ Integrin Activation during Metastasis

Newton V. Verbiseck,¹ Érico T. Costa,¹ Fabrício F. Costa,¹ Felícia P. Cavalher,¹ Michele D.M. Costa,³ Angelita Muras,² Valéria A. Paixão,¹ Ricardo Moura,¹ Mariana F. Granato,¹ Daniela F. Ierardi,¹ Tamara Machado,¹ Fabiana Melo,³ Karina B. Ribeiro,⁴ Isabela W. Cunha,⁴ Vladimir C.C. Lima,⁴ Maria do Socorro Maciel,⁴ André L. Carvalho,⁴ Fernando F. Soares,⁴ Silvio Zanata,⁵ Mari C. Sogayar,² Roger Chammas,³ and Anamaria A. Camargo¹

¹Laboratory of Molecular Biology and Genomics, Ludwig Institute for Cancer Research; ²Biochemistry Department, Chemistry Institute, and ³Radiology Department, Faculty of Medicine, University of São Paulo; ⁴A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil and ⁵Pathology Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Abstract

The *ADAM23* gene is frequently silenced in different types of tumors, and, in breast tumors, silencing is correlated with tumor progression, suggesting that it might be associated with the acquisition of a metastatic phenotype. ADAM23 exerts its function mainly through the disintegrin domain, because its metalloprotease domain is inactive. Analysis of ADAM23 binding to integrins has revealed a specific interaction with $\alpha_v\beta_3$ integrin mediated by the disintegrin domain. Altered expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin has been observed in different types of tumors, and expression of this integrin in the activated form has been shown to promote metastasis formation. Here, we investigated the possibility that interaction between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin might negatively modulate $\alpha_v\beta_3$ activation during metastatic progression. ADAM23 expression was knocked down using short hairpin RNA in the MDA-MB-435 cell line, which has been extensively used as a model for $\alpha_v\beta_3$ integrin activation. Ablation of ADAM23 enhanced $\alpha_v\beta_3$ integrin activation by at least 2- to 4-fold and ADAM23 knockdown cells showed enhanced migration and adhesion to classic $\alpha_v\beta_3$ integrin ligands. Ablation of ADAM23 expression also enhanced pulmonary tumor cell arrest in immunodeficient mice. To complement our findings with clinical evidence, we showed that silencing of *ADAM23* gene by DNA promoter hypermethylation in a collection of 94 primary breast tumors was significantly associated with lower distant metastases-free and disease-specific survivals and was an independent prognostic factor for poor disease outcome. Our results strongly support a functional role of ADAM23 during metastatic progression by negatively modulating $\alpha_v\beta_3$ integrin activation. [Cancer Res 2009;69(13):5546-52]

Introduction

Integrins are membrane-spanning heterodimers composed of α and β subunits, both of which having a large extracellular domain,

a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail (1). Many integrins are expressed with their extracellular domains in a default low-affinity ligand-binding state (nonactive state; ref. 2). However, in response to cellular stimulation, the conformation of these receptors is changed in a process often termed integrin activation (3).

Changes in integrin expression level and activation state have been extensively documented in tumor cells and are thought to contribute to neoplastic progression (4). Altered expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin has been detected in different types of tumors, including breast (5, 6), prostate (7), ovary (8), melanomas (9, 10), and gliomas (11), and this expression has been correlated with an aggressive phenotype and metastatic dissemination. Moreover, expression of activated, but not nonactivated, $\alpha_v\beta_3$ integrin in the MDA-MB-435 cell line strongly promotes metastasis formation by enhancing the interaction between circulating tumor cells and platelets and promoting tumor cell arrest in the vasculature (12, 13).

The ADAMs (a disintegrin and metalloprotease domain) constitute a family of type I transmembrane glycoproteins with a common structural organization, which includes a metalloprotease and disintegrin domain (14-16). The disintegrin domain of ADAM proteins is ~ 90 amino acids long and is named for its presence in the snake venom metalloproteases, where it is involved in binding to integrins present on the surface of platelets, thereby blocking platelet aggregation (14, 15). Recent reports analyzing ADAM-integrin interaction in a cellular context indicate that ADAM proteins negatively modulate integrin-mediated cell proliferation, adhesion, and migration in patterns dictated, in part, by the integrin binding profiles of their disintegrin domains (17-20).

ADAM23 exhibits the typical structure of ADAM family members, although its metalloprotease domain is inactive (21). Analysis of ADAM23 binding to integrins has revealed a specific interaction with $\alpha_v\beta_3$ mediated by the disintegrin domain (22). The *ADAM23* gene is frequently silenced in breast (23), gastric (24), pancreatic (25), and head and neck (26) tumors as well as in gliomas (27). In breast tumors, we showed that the *ADAM23* gene is frequently silenced by promoter hypermethylation and that primary breast tumors in more advanced stages show a higher degree of DNA methylation, suggesting that silencing of *ADAM23* might be associated with the acquisition of a metastatic phenotype (23).

Here, we investigated the possibility that interaction between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ might negatively modulate $\alpha_v\beta_3$ integrin

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

N.V. Verbiseck and E.T. Costa contributed equally to this work.

Requests for reprints: Anamaria A. Camargo, Ludwig Institute for Cancer Research at Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Rua João Julião 245, 01323-903 São Paulo SP, Brazil. Phone: 55-11-33883248; Fax: 55-11-35490475; E-mail: anamaria@ludwig.org.br.

©2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2976

activation during metastatic progression. According to our hypothesis, loss of ADAM23 expression, frequently observed in advanced tumors, would promote $\alpha_v\beta_3$ activation and contribute to the acquisition of a metastatic phenotype by enhancing cell migration and adhesion mediated by $\alpha_v\beta_3$ integrin activation. Our results strongly support a functional role of ADAM23 during metastatic progression by negatively modulating $\alpha_v\beta_3$ integrin activation and suggest that silencing of the *ADAM23* gene in primary breast tumors can be used as a complementary marker for metastasis risk assessment.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture. MDA-MB-435 cell line was obtained from the American Type Culture Collection and grown at 37°C, under 5% CO₂, using RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab) and 1% L-glutamine (Sigma).

Proteins, peptides, and antibodies. Vitronectin and fibronectin were purified from human plasma of healthy donors. Peptides (Multiple Peptide Systems) were RGD-containing (KPQVTRGDVFTMPE) and control (AEEELCSGKPFDAF). Experiments were done with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-specific monoclonal antibodies BV4 (Abcam), LM609 (Chemicon), and 23C6 (Santa Cruz Biotechnology), with a conformational sensitive anti- β_3 monoclonal antibody AP5 (GTI Diagnostics) and with normal mouse IgG (Sigma). Antibodies against β_1 integrin (JB1A; Chemicon) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (PIF6; Chemicon) were also used in control experiments.

GST pull-down assay. Cells were lysed in PBS containing 100 mmol/L *n*-octyl- β -D-glucopyranoside, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L NEM, and 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0). Lysates were cleared by centrifugation and aliquots containing 500 μ g protein were incubated for 2 h at 4°C with Sepharose beads covalently linked with recombinant GST or ADAM23 disintegrin-GST (22). Beads carrying bound proteins were recovered by centrifugation, washed with lysis buffer, suspended in sample buffer [100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, and 0.2% bromophenol blue], and loaded on 6% SDS-PAGE gels. Integrin subunits were detected with polyclonal antibodies specific for β_3 or β_1 .

Generation of short hairpin RNAs. A plasmid vector-based strategy was used to suppress ADAM23 expression. Short hairpin RNA (shRNA) constructs were designed targeting ADAM23 (GenBank NM_003812) coding regions 692 to 710 nucleotides (shRNA-04) and 1,717 to 1,735 nucleotides (shRNA-25). Pairs of complementary oligonucleotides (Operon) were annealed and ligated into the *Sal* I and *Xba* I restriction sites of the pAVU6+27 vector as described (28). Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and clones were selected with 1 mg/mL G418 (Promega).

Reverse transcription-PCR. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was done with 2 μ g DNA-free RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). ADAM23 and GAPDH expressions were analyzed by PCR as described previously (23).

Flow cytometry. Cells (5×10^5) were incubated on ice for 45 min with the primary antibody at the indicated concentrations diluted in HBSS buffer with 0.5% bovine serum albumin and either 1.3 mmol/L CaCl₂ or 500 μ mol/L MnCl₂. After incubation with the Alexa 488-linked anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes; 1:500) for 30 min on ice, cells were washed and suspended in 0.5 mL HBSS before analysis on a FACSCalibur cytometer using the Cell Quest software (Becton Dickinson).

Migration assay. Haptotactic migration assays were done in Transwell (Corning) plates with 8 μ m polycarbonate filters coated with 12.5 μ g/mL vitronectin for 2 h at 37°C and blocked with 2.5% bovine serum albumin in RPMI 1640. Cells were seeded in serum-free RPMI 1640 in duplicate (10^5 per well) and allowed to migrate for 18 h at 37°C and 5% CO₂. The top side of the filters was scraped with cotton swabs, fixed, and stained with 0.1% crystal violet. Cells were counted at $\times 100$ magnification in 20 different optical fields. For inhibition studies, cells were incubated at 4°C for 30 min with the monoclonal antibodies (10 μ g/mL).

Adhesion assay. Cell adhesion was done in 48-well plates (Costar) coated with different amounts of purified human vitronectin or fibronectin for 2 h at 37°C and blocked with 2.5% bovine serum albumin (Sigma) for 1 h at 37°C. Cells were plated at 2×10^5 per well. After 90 min at 37°C, nonadherent cells were washed and removed, and remaining adherent cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature and stained with 0.1% crystal violet. Quantification of adhesion was carried out using a light microscope with a coupled DP-70 camera (Olympus) at $\times 200$ magnification and cell counting of 20 different optical fields. For inhibition studies, cells were pretreated for 20 min at room temperature with antibodies (10 μ g/mL) or synthetic peptides and adhesion was evaluated on 2 μ g/mL vitronectin by counting cells at $\times 100$ magnification as described above.

Pulmonary cell arrest. The *in vivo* tumor cell arrest assay was done by injecting 2×10^6 cells in the lateral tail vein of 9-week-old female CB-17/SCID mice (CEMIB-UNICAMP) and chasing human DNA in the lungs 4 h later by quantitative real-time PCR as described previously (29). *Alu* sequences, as tracer of human tumoral DNA, and the mouse cellular prion (*PrP^c*) gene, as endogenous control, were analyzed by the absolute quantification method. Lung DNA was amplified in the presence of SYBR Green PCR Master Mix and analyzed using the 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems). All experiments with mice were conducted according to ethic standards and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Antonio Prudente Foundation. Statistical analysis employed one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test using the GraphPad Prism software.

Tumor samples and patients. Ninety-four ductal invasive breast tumors were obtained from patients treated consecutively at the Hospital do Cancer A.C. Camargo from 1998 to 2001. Tumor samples were collected after informed consent and the institution's ethics committee approved the study. Median age at the time of diagnosis was 59.2 years and the median follow-up time was 78.2 months. Of the 94 patients analyzed, 20 developed distant metastases and 15 died during the follow-up period.

DNA methylation analysis. DNA was subjected to sodium bisulfite treatment using the "CpG Modification Kit" (Intergen, Serologicals). Aberrant DNA methylation was determined by the methylation-specific PCR (30). Methylation-specific PCR primers for region 1 were designed within a region comprising 22 CpG dinucleotides located -1,025 to -549 bp from the transcription start site. Primer sequences and amplification conditions are available upon request. Methylation-specific PCR primers and amplification conditions for region 2 were described previously (24). χ^2 test or Fisher's exact test was used to examine the association between ADAM23 hypermethylation and clinicopathologic parameters. Disease-specific survival (from the date of initial diagnosis until death due to breast cancer or date of the last follow-up) and distant metastases-free survival (from the date of initial diagnosis until the date of diagnosis of metastases or date of the last follow-up) curves were calculated with Kaplan-Meier method. Log-rank test was used to assess statistical differences between groups. Multivariate analysis was carried out using Cox proportional hazards model (stepwise forward selection). All variables presenting $P < 0.20$ on the univariate analysis were selected for building a multiple model. For all tests, type I error (α) was established as 0.05 and results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Interaction between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ negatively modulates $\alpha_v\beta_3$ integrin activation. The MDA-MB-435 cell line was selected to investigate whether ADAM23/ $\alpha_v\beta_3$ interaction negatively modulates integrin activation, because this cell line expresses high levels of this integrin and has been extensively used as a model for $\alpha_v\beta_3$ activation (12, 13). Physical interactions between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin were originally described in neuroblastoma and astrocytoma human cell lines (22). To confirm that this interaction is also occurring in MDA-MB-435 cells, we used the disintegrin domain of the ADAM23 protein fused to GST to

pull-down $\alpha_v\beta_3$ integrin from MDA-MB-435 lysates. A band corresponding to β_3 integrin (90-100 kDa) was detected in extracts from beads containing ADAM23 disintegrin-GST but not in those derived from beads containing GST alone (Supplementary Fig. S1). Because $\alpha_v\beta_3$ is the only β_3 integrin expressed in MDA-MB-435 cells, these results confirm the physical association between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin in this cell line.

ADAM23 expression was then knocked down in the MDA-MB-435 cell line using shRNA and integrin activation was then measured by flow cytometry using a monoclonal antibody, which specifically recognizes $\alpha_v\beta_3$ integrin in the activated state. The MDA-MB-435 cell line was transfected with two different hairpin RNA constructs (shRNA-04 and shRNA-25) and stable clones for each construction were selected. Significant reduction of ADAM23 mRNA expression was observed for different clones transfected with the two different constructs when compared with the parental MDA-MB-435 cell line and with cells transfected with an empty vector (Fig. 1A). The morphology and growth rate of the two clones (shRNA-04 and shRNA-25) studied herein presented no differences that could be correlated with ADAM23 expression level and remained phenotypically stable in relation to ADAM23 expression (Supplementary Fig. S2).

Integrin activation was then measured by flow cytometry using the AP5 monoclonal antibody, which, in normal extracellular calcium levels, specifically recognizes $\alpha_v\beta_3$ integrin in the activated state. As a positive control for integrin activation, ADAM23-positive and knockdown cells were incubated with Mn^{2+} , a global integrin activator, before flow cytometry analysis. The LM609 monoclonal antibody, which recognizes $\alpha_v\beta_3$ in both conformational states, was also used to evaluate whether ADAM23 knockdown could also interfere with $\alpha_v\beta_3$ expression levels. Flow cytometry analysis using LM609 and AP5 antibodies showed that ADAM23 knockdown cells display equivalent amounts of $\alpha_v\beta_3$ integrin at the cell surface, when compared with the parental cell line or with cell lines transfected with the empty vector, but have higher levels of activated $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 1B and C). Interestingly, the Mn^{2+} effect on integrin activation was more pronounced in the ADAM23 knockdown clones. Taken together, these results confirm our hypothesis that interaction between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ negatively modulates $\alpha_v\beta_3$ integrin activation.

Loss of ADAM23 expression promotes $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated cell migration. Activation of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the MDA-MB-435 model has been shown to enhance tumor cell motility, causing a drastic increase in metastatic activity (13). We next determined whether $\alpha_v\beta_3$ activation in the ADAM23 knockdown cells was correlated with increased migration using haptotactic migration assays in which the bottom of the membrane was coated with vitronectin, a classic $\alpha_v\beta_3$ ligand. Ablation of the ADAM23 promoted a 4-fold increase in cell migration (Fig. 2A and B). Enhanced migration of ADAM23 knockdown cells was significantly inhibited by an adhesion-blocking monoclonal antibody (23C6) specific to $\alpha_v\beta_3$ integrin, confirming that enhanced migration is primarily mediated by this receptor (Fig. 2A and B). Similar results were also observed when fibronectin, another classic $\alpha_v\beta_3$ ligand, was used to coat the membrane (data not shown).

Loss of ADAM23 expression enhances $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated cell adhesion. Because integrin activation is known to enhance cell adhesion to specific substrates by regulating ligand affinity, we next evaluated stationary adhesion of ADAM23 knockdown cells to vitronectin. ADAM23 knockdown cells adhered to vitronectin more efficiently than the parental cell line or cells

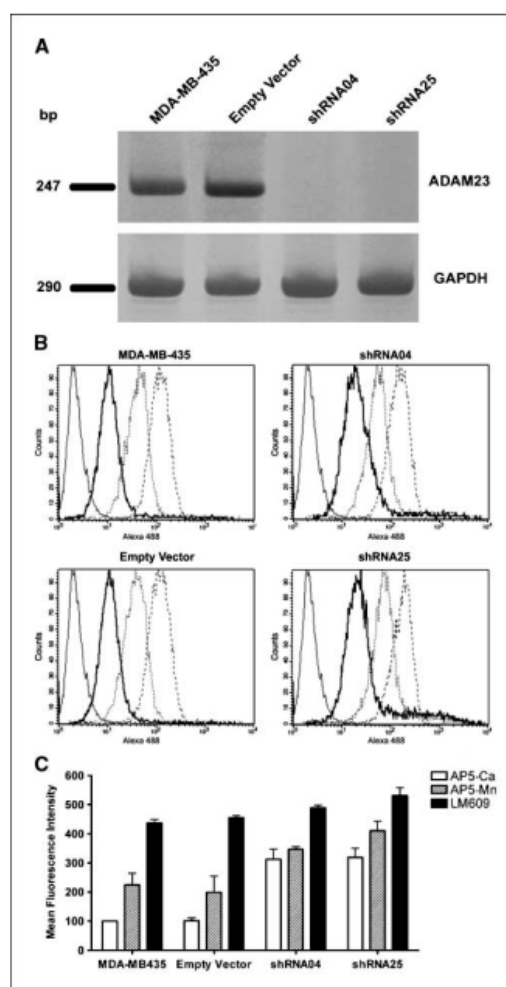


Figure 1. Knockdown of ADAM23 expression favors $\alpha_v\beta_3$ integrin activation. **A**, ADAM23 knockdown efficiency was evaluated by real-time PCR in two independent clones transfected with shRNA constructs (shRNA04 and shRNA25) targeting different regions of the ADAM23 mRNA. MDA-MB-435 parental cells and cells transfected with empty vector were used as positive controls for ADAM23 mRNA expression. **B**, flow cytometry analysis using the monoclonal antibody AP5 in normal extracellular calcium levels (AP5-Ca; thick lines), the monoclonal antibody LM609 (dotted lines), and irrelevant IgG (thin lines) as negative control. Incubations with AP5 in the presence of Mn^{2+} (AP5-Mn; dashed lines) were used as control for integrin activation. X axis, mean fluorescence intensity; Y axis, number of fluorescence-positive cells. **C**, quantification of the flow cytometry analysis. Median \pm SD fluorescence intensity of three independent experiments.

transfected with an empty vector (Fig. 3A). The difference in the efficiency of adhesion between the cells was particularly evident at lower vitronectin concentrations, suggesting that ADAM23 knockdown cells display a higher avidity for vitronectin. Adhesion of ADAM23 knockdown cells was significantly inhibited by RGD peptides (Fig. 3B) and by an adhesion-blocking anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin

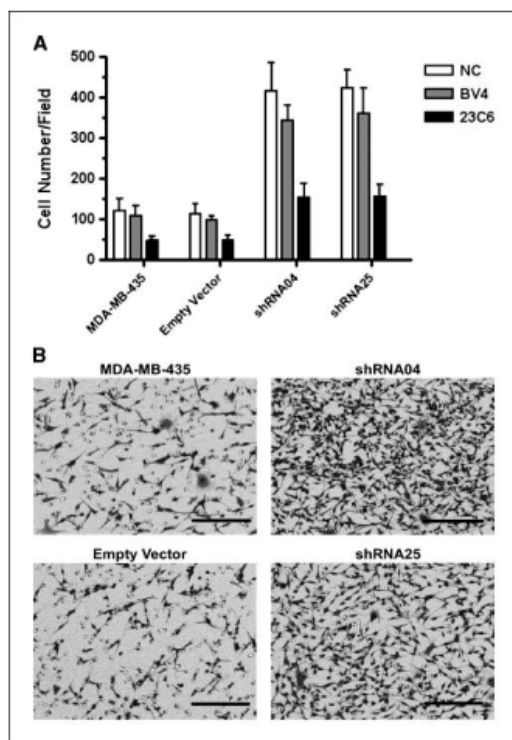


Figure 2. Knockdown of ADAM23 expression promotes $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated cell migration. **A**, migration toward vitronectin was analyzed for ADAM23 knockdown clones (shRNA04 and shRNA25) and MDA-MB-435 cells transfected or not with empty vector. Treatment with the anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin function-blocking monoclonal antibody 23C6 significantly inhibited the cell motility. Migration inhibition was not observed when cells were incubated with the anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody BV4 without function-blocking activity. NC, no antibody condition. Mean \pm SD of two independent experiments. **B**, representative fields of the experiment in **A**. Bar, 200 μ m.

antibody (LM609; Fig. 3C), confirming that enhanced adhesion of ADAM23 knockdown cells is primarily mediated by $\alpha_v\beta_3$ integrin. Similar results were also observed for fibronectin (data not shown).

Loss of ADAM23 expression favors tumor cell arrest in the lungs of immunocompromised mice. Integrin-mediated binding of tumor cells to platelets represents an efficient mechanism for tumor cell arrest in the bloodstream and is a prerequisite for their extravasation. The activated, but not the nonactivated, state of $\alpha_v\beta_3$ integrin has been shown to enhance the interaction between tumor cells and platelets, promoting emboli formation and tumor cell arrest within the vasculature. Because integrin activation is enhanced in the absence of ADAM23, one would expect ADAM23 knockdown to present enhanced interaction with platelets and, as a consequence, to be more efficiently arrested in the bloodstream. To verify whether ADAM23 knockdown clones were more efficiently arrested in the bloodstream, ADAM23 knockdown cells and controls were injected into the lateral tail vein of immunocompromised mice. Tumor cell arrest was then indirectly quantified by real-time PCR detection of human specific Alu

sequences (29) in the lungs of these animals 4 h after injection (Fig. 4). The number of ADAM23 knockdown cells arrested in the lungs of the immunocompromised mice was significantly higher than that of the control cell lines, indirectly showing that loss of ADAM23 expression enhances tumor cell aggregation with platelets and arrest in secondary organs during circulation.

ADAM23 silencing by promoter hypermethylation in primary breast tumors is associated with the development of distant metastases and a worse disease outcome. We have shown previously that the ADAM23 gene is frequently silenced by promoter hypermethylation in advanced-stage primary breast

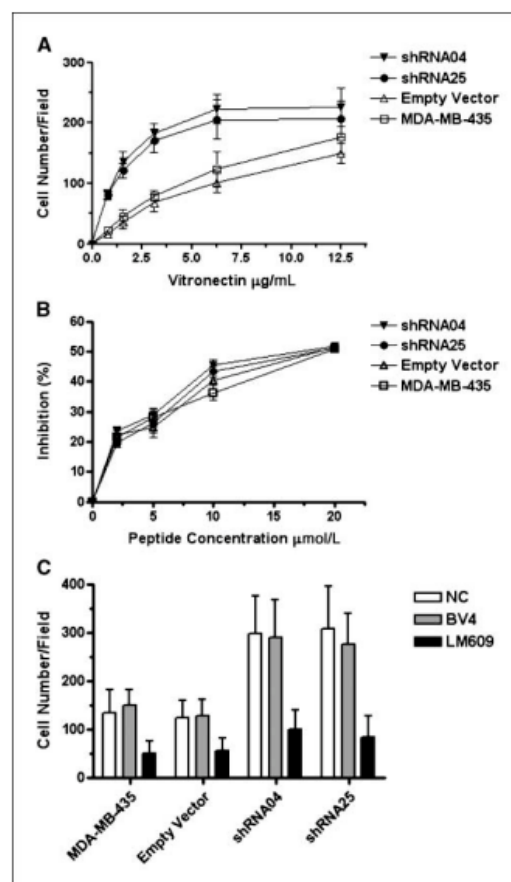


Figure 3. Knockdown of ADAM23 expression enhances $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated cell adhesion. **A**, stationary adhesion to increasing quantities of vitronectin of ADAM23 knockdown clones (shRNA04 and shRNA25) and MDA-MB-435 parental cells transfected or not with empty vector. Mean \pm SD of two experiments. **B**, adhesion to vitronectin (2 μ g/mL) is specifically inhibited by RGD peptide irrespective of ADAM23 expression. Percent \pm SD inhibition of two experiments. **C**, adhesion to vitronectin (2 μ g/mL) is specifically inhibited by the anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody LM609 with function-blocking activity. Cells incubated with the anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody BV4 without function-blocking activity and cells incubated in the absence of antibodies (NC) were used as controls. Mean \pm SD of two experiments.

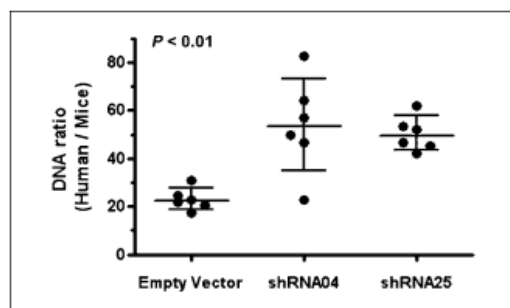


Figure 4. Knockdown of *ADAM23* expression favors tumor cell arrest *in vivo*. Tumor cell arrest in the lungs of immunocompromised mice ($n = 6$) after lateral tail vein injection with *ADAM23* knockdown clones (shRNA04 and shRNA25) and MDA-MB-435 cells transfected with empty vector. Arrested tumor cells were indirectly quantified 4 h after injection by real-time PCR detection of human specific Alu sequences normalized to the detection of a single-copy mouse gene. Median \pm interquartile range of a representative experiment. DNA ratio is significantly higher in *ADAM23* silenced cells ($P < 0.01$, ANOVA statistics test).

tumors (23). If loss of *ADAM23* expression promotes $\alpha_v\beta_3$ activation, which, in turn, confers metastatic potential to tumor cells, one would expect silencing of *ADAM23* gene in primary breast tumors to be associated with the development of metastasis. To address this issue, and to complement our functional analysis with clinical observations, the methylation status of two CpG islands (regions 1 and 2) located at the upstream regulatory region of the *ADAM23* gene was determined by methylation-specific PCR in 94 primary breast tumors. Hypermethylation was observed in 29 (30.9%) tumors for region 1 and in 14 (14.9%) tumors for region 2. A total of 8 (8.5%) tumors presented hypermethylation in both regions.

We then investigated the association between *ADAM23* hypermethylation and well-established clinicopathologic parameters used for breast cancer. As shown in Supplementary Table S1, *ADAM23* hypermethylation within region 2 was associated with tumor size ($P = 0.030$), the number of positive lymph nodes ($P = 0.039$), and p53 protein overexpression ($P = 0.011$). No statistically significant association was observed for region 1.

Kaplan-Meier analysis was then used to estimate the relationship between silencing of *ADAM23* gene by promoter hypermethylation, development of metastasis, and disease outcome. The 5-year distant metastases-free survival of patients with tumors harboring *ADAM23* gene hypermethylation in both regions was significantly shorter than that of patients with a single hypermethylated region or with an unmethylated tumor (37.5% versus 74.1% versus 91.0%, respectively; $P < 0.001$; Fig. 5A). Similarly, patients with primary tumors exhibiting *ADAM23* gene hypermethylation in both regions had a shorter 5-year disease-specific survival when compared with patients with a single methylated region or with an unmethylated tumor (50.0% versus 92.4% versus 93.1% respectively; $P < 0.001$; Fig. 5B).

A multivariate analysis was then done to determine whether *ADAM23* gene hypermethylation was an independent factor in predicting patient outcome. All variables presenting $P < 0.20$ on the univariate analysis (Supplementary Table S2), including the use of adjuvant chemotherapy and hormonal therapy, were selected to build the multiple model. The number of positive lymph nodes,

the use of tamoxifen, and *ADAM23* gene hypermethylation were considered as independent prognostic factors for distant metastases-free and disease-specific survival. Patients with hypermethylation in both regions of the *ADAM23* gene regulatory sequence had a higher risk of developing distant metastases [hazard ratio (HR), 8.84; 95% confidence interval (95% CI), 2.31-33.76; $P = 0.001$] than patients with a single methylated region (HR, 6.53; 95% CI, 2.07-20.57; $P = 0.001$) or with an unmethylated tumor (reference group; Table 1). Similarly, patients with hypermethylation in both regions of the *ADAM23* gene upstream regulatory sequence had a higher risk of dying from the disease (HR, 9.97; 95% CI, 1.96-50.61; $P = 0.006$) than patients with a single methylated region (HR, 2.30; 95% CI, 0.52-10.07; $P = 0.270$) or with an unmethylated tumor (reference group; Table 1). These results suggest that, in breast cancer patients, silencing of the *ADAM23* gene by promoter hypermethylation can be used as a complementary marker for metastasis risk assessment.

Discussion

The disintegrin domain of ADAM proteins can bind to various integrins via a short amino acid sequence that is functionally equivalent to the classic RGD motif present in many extracellular

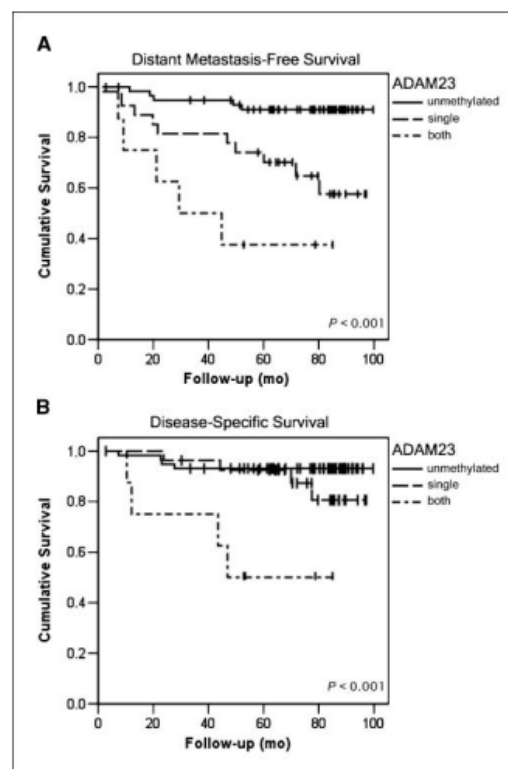


Figure 5. Survival curves according to *ADAM23* methylation status. A, distant metastases-free survival. B, disease-specific survival.

Table 1. Multivariate analysis of distant metastases-free and disease-specific survival

Variables	Distant metastases-free survival		Disease-specific survival	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Positive lymph nodes				
0	1.0 (reference)		1.0 (reference)	
1-3	12.65 (2.84-56.28)	0.001	26.66 (2.80-254.08)	0.004
≥4	14.37 (3.75-55.08)	<0.001	16.56 (1.91-143.74)	0.011
Tamoxifen				
Absent	1.0 (reference)		1.0 (reference)	
Present	0.14 (0.05-0.39)	<0.001	0.05 (0.01-0.28)	0.001
ADAM23				
Unmethylated	1.0 (reference)		1.0 (reference)	
Single methylated region	6.53 (2.07-20.57)	0.001	2.30 (0.52-10.07)	0.270
Both methylated regions	8.84 (2.31-33.76)	0.001	9.97 (1.96-50.61)	0.006

NOTE: Adjusted HR with 95% CI for distant metastases-free and disease-specific survival.

matrix proteins. Recent reports indicate that ADAM proteins negatively modulate integrin-mediated cell proliferation, adhesion, and migration in patterns dictated, in part, by the integrin binding profiles of their disintegrin domains (17-20).

There are many reports showing that members of the ADAM family are differentially expressed in human tumors and are frequently associated with tumor progression and poor disease outcome (31, 32); however, until recently, these studies were not accompanied by functional analyses (33-35). Here, we provide additional evidence for the involvement of ADAM family members in metastatic progression. Using the MDA-MB-435 cell line, we show that interaction of ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin in this cell line negatively modulates integrin activation. To our knowledge, this is the first report suggesting the involvement of an ADAM family member in the modulation of integrin activation in tumors.

The MDA-MB-435 cell line was selected for our studies because it expresses high levels of ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin and has been extensively used as a model for $\alpha_v\beta_3$ activation. Additional breast tumor cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, and SKBR3) were screened for concomitant expression $\alpha_v\beta_3$ and ADAM23, but we were unable to find a cell line with such characteristics. These results are not unexpected and are in agreement with the data presented in this article, which show that loss of ADAM23 expression favors metastatic dissemination by enhancing the activation of $\alpha_v\beta_3$ integrin expressed in metastatic cells. $\alpha_v\beta_3$ integrin is not expressed in normal mammary epithelium and aberrant expression of this integrin in its activated form is frequently observed in metastatic tumors. On the contrary, ADAM23 is expressed in normal breast tissue and is frequently silenced in metastatic tumors. Thus, the concomitant expression of ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin is not expected to occur very frequently in breast tumors.

Integrin activation primarily involves conformational changes in the extracellular domain of the $\alpha\beta$ heterodimer that modulates receptor affinity to different substrates (2). Integrin activation also involves facilitation of lateral diffusion and/or clustering of heterodimers into membrane microdomains, which modulate receptor avidity and endocytosis (2). Based on our results, we envisage two possible mechanisms by which anchorage of ADAM23

protein at the cell surface would negatively modulate integrin activation. First, interaction between ADAM23 and $\alpha_v\beta_3$ integrin would keep the integrin in the nonactivated form by inhibiting conformational changes in the extracellular domain of the $\alpha\beta$ heterodimer that modulates receptor affinity to different substrates. In the second mechanism, interaction with ADAM23 would affect lateral diffusion and/or clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrin into membrane microdomains, which would in turn modulate receptor avidity and endocytosis. Here, we provide solid evidence that the absence of ADAM23 protein at the cell surface allows conformational changes in the integrin structure leading to its activation. The effect of ADAM23 on integrin activation is particularly evident when cells are incubated with Mn^{2+} . $\alpha_v\beta_3$ integrin present at the surface of ADAM23 knockdown cells seems to be more prone to activation than integrin present at the surface of MDA-MB-435 cells. However, these mechanisms are not mutually exclusive, and at this point, we cannot exclude the possibility that ADAM23 is also regulating integrin clustering and endocytosis.

There is some specificity in the binding of ADAM proteins to integrins, although our understanding of the binding specificity and overlap between the different ADAM family members is limited at present (16). Analysis of ADAM23 binding to integrins has revealed a specific interaction with $\alpha_v\beta_3$ integrin mediated by the disintegrin domain (22); however, a systematic analysis of ADAM23 binding to other integrins is not available at present. As shown in Figs. 2 and 3C, residual migration and adhesion of ADAM23 knockdown cells is observed after incubation with an adhesion-blocking monoclonal antibody specific to $\alpha_v\beta_3$ integrin, suggesting that ADAM23 might also be modulating other integrins. Adhesion of MDA-MB-435 cells to vitronectin is predominantly mediated by $\alpha_v\beta_3$ integrin, but other α_v integrins, such as $\alpha_v\beta_5$ integrin, also contribute. To address a possible role of ADAM23 in modulating $\alpha_v\beta_5$ integrin activity, adhesion to vitronectin was done in the presence of a combination of anti- $\alpha_v\beta_3$ and anti- $\alpha_v\beta_5$ blocking antibodies. As shown in Supplementary Fig. S3, adhesion of ADAM23 knockdown cells to vitronectin was completely abolished in the presence of both antibodies, suggesting that the modulatory effect of ADAM23 is not restricted to $\alpha_v\beta_3$ integrin and should be further explored.

We have also shown that silencing of the *ADAM23* gene by promoter hypermethylation in primary breast tumors is significantly associated with a higher incidence of metastasis and reduced overall survival. Because we were unable to address $\alpha_v\beta_3$ integrin expression and activation in the *ADAM23* hypermethylated tumor samples, we cannot exclude the possibility that the poor prognosis observed for these patients could be associated to additional mechanisms other than $\alpha_v\beta_3$ integrin activation.

The risk of developing metastatic disease in breast cancer patients is currently estimated by the number of positive lymph nodes and tumor size complemented by information on tumor grade, steroid hormone receptor status, and c-erbB2 overexpression (36). However, lymph node information and tumor size are insufficient to accurately assess individual risk, as 20% to 30% of women with node-negative breast cancer still develop metastatic disease (37). The identification of prognostic biomarkers to guide patient treatment is clearly needed (38), and ideally, these biomarkers should be highly specific and sensitive and reflect the

presence of tumor-specific alterations functionally related to the acquisition of metastatic potential. We have herein shown that *ADAM23* gene hypermethylation in primary breast tumors is exactly such a marker for assessing the risk of metastasis for breast cancer patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 8/6/08; revised 4/22/09; accepted 4/23/09; published OnlineFirst 6/23/09.

Grant support: FAPESP (04/09088-9). This work was conducted under the auspices of the Hilton Ludwig Cancer Metastasis Initiative.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Drs. David R. Engelke, Vilma R. Martins, and Santiago Cal for providing plasmid pAVU6+27, RGD peptides, and *ADAM23* disintegrin-GST, respectively, and Drs. Sandro de Souza and Sarah White for critical reading of this article.

References

- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
- Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 2002;158:833-9.
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:816-26.
- Mizejewski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med (New York, NY)* 1999;222:124-38.
- Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin $\alpha_v\beta_3$ expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:127-35.
- Pignatelli M, Cardillo MR, Hanby A, Stamp GW. Integrins and their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: loss of polarization in poorly differentiated tumors. *Hum Pathol* 1992;23:1159-66.
- Cooper CB, Chay CH, Pienta KJ. The role of $\alpha(v)\beta(3)$ in prostate cancer progression. *Neoplasia* 2002;4:191-4.
- Carreiras F, Denoux Y, Staedel C, Lehmann M, Sichel F, Gauduchon P. Expression and localization of α_v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996;62:260-7.
- Albelda SM, Mette SA, Elder DE, et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β_3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; 50:6757-64.
- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, et al. Clinical significance of $\alpha(v)\beta_3$ integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997;57:1554-60.
- Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* 1995;57:143-53.
- Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1853-8.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin $\alpha_v\beta_3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9482-7.
- Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17:7-30.
- White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:598-606.
- Yang P, Baker KA, Hagg T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog Neurobiol* 2006;79:73-94.
- Huang J, Bridges LC, White JM. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol Biol Cell* 2005;16:4982-91.
- Kawaguchi N, Sundberg C, Kveiborg M, et al. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating β_1 integrin function. *J Cell Sci* 2003; 116:3893-904.
- Mazzocca A, Coppari R, De Franco R, et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2005; 65:4728-38.
- Nath D, Slocombe PM, Webster A, Stephens PE, Docherty AJ, Murphy G. Meltrin γ (ADAM-9) mediates cellular adhesion through $\alpha(6)\beta(1)$ integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *J Cell Sci* 2000;113:2319-28.
- Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J* 1998;334:93-8.
- Cal S, Freije JM, Lopez JM, Takada Y, Lopez-Otin C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha_v\beta_3$ integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2000;11:1457-69.
- Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene* 2004;23:1481-8.
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 2005;24:8051-60.
- Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, et al. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 2004;23:8705-10.
- Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173:31-7.
- Costa FF, Colin C, Shinjo SM, et al. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. *Neurosci Lett* 2005;380:260-4.
- Paul CP, Good PD, Winer L, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:505-8.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR—an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:571-82.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
- Arribas J, Béch-Serra JJ, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:57-68.
- Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 2007;98:621-8.
- Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, et al. Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res* 2004;64: 4190-6.
- Peduto L, Reuter VE, Sehara-Fujisawa A, Shaffer DR, Scher HI, Blobel CP. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene* 2006;25: 5462-6.
- Najaj AJ, Day KC, Day ML. ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res* 2008;68:1092-9.
- Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Oncologie* 2003;26:438-45.
- Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:11-25.
- Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Semin Oncol* 2001; 28:53-67.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*

D.D. Moura Costa ^a, F. Filipak Neto ^a, M.D.M. Costa ^b, R.N. Morais ^c, J.R.E. Garcia ^d,
B.M. Esquivel ^d, C.A. Oliveira Ribeiro ^{a,*}

^a Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^d Estação de Piscicultura Panamá, Paulo Lopes, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2009

Received in revised form 1 November 2009

Accepted 2 November 2009

Available online 6 November 2009

Keywords:

Biomarkers

Endocrine disruptors

Rhamdia quelen

17- β -estradiol

ABSTRACT

This study investigated the effects of different doses of 17- β -estradiol (E_2) in *Rhamdia quelen*. Groups of males exposed to different doses of E_2 (0.1 mg kg⁻¹, 1 mg kg⁻¹ and 10 mg kg⁻¹) were compared with non-exposed male and female fish groups. Among the considered biomarkers, no significant differences were observed for micronuclei test, reduced glutathione concentration and lipid peroxidation. All E_2 -treated individuals had decreased glutathione S-transferase activity. Increased catalase and superoxide dismutase activities, increased vitellogenin expression and decreased metallothionein concentration were observed in males treated with the highest dose. Liver of all test groups showed necrotic areas, but cytoplasm vacuolization was again found only in the individuals exposed to highest dose. E_2 causes deleterious hepatic effects to *R. quelen*, and vitellogenin expression, catalase and superoxide dismutase activity and metallothionein concentration represent appropriate biomarkers for studying E_2 effects. Additionally, the response of some biomarkers was similar in males exposed to E_2 and unexposed females, and therefore exposure to endocrine disruptors may cause consequences for fish populations.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, the potential hazardous effects that hormone-like chemicals have on wildlife and human populations still constitute a challenge to environmental studies. According to Colborn (1998) these chemicals mimic endogenous hormones or inhibit their activity, modulating the endocrine system. As such, many organic compounds introduced into the environment by human activity can disrupt the endocrine system of animals, including fish (Lyle et al., 1997), reptiles (Guillette, 2000), birds (Berg et al., 1998) and mammals (Brouwer et al., 1989).

Estrogens are a group of steroid hormones that can act as endocrine disruptors when present in non-physiological sex-dependent concentrations, and data about the effects of these compounds on vertebrates are still controversy. Laboratorial experiments support that some endocrine disruptors are able to cause breast and testicular cancer, cryotichidism and decreased sperm production (Witorsch, 2002). However, a study case released by National Research Council and American Council of Safety and Health concluded that a

consistent link between environmental pollutants and endocrine disruption in vertebrates, particularly humans, is not supported by the epidemiologic data. Therefore one need of ecotoxicology is to investigate this issue, since endocrine disruptors can impair the reproduction and other physiological parameters of natural populations of organisms.

The 17- β -estradiol (E_2) reaches aquatic environments through domestic effluents (Gagné et al., 2005), livestock waste (Ying et al., 2002) and agriculture runoff (Céspedes et al., 2004), and it has been increasingly reported as a potent environmental contaminant (Ying et al., 2002; Imai et al., 2005; Dorabawila and Gupta, 2005). The most important source of estrogens in aquatic ecosystems is domestic effluents because this kind of drain has higher concentrations of E_2 coming from human and veterinary medicines. Estrogens like E_2 are highly potent even at low concentrations. However, endocrine changes may be particularly important at sublethal doses as they constitute early responses to disturbances, preceding the onset of pathology and mortality.

The increasing number of studies suggesting adverse effects of endocrine disruptors for wildlife species (Kavlock et al., 1996; Campbell and Hutchinson, 1998) urged for studies of screening and detecting disturbances related to exposure (EMWAT, 1997; EDSTAC, 2000). A biomarker is a cellular, molecular, genetic or physiologic response altered in an organism or population in response to a

* Corresponding author. Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico - Curitiba - PR, - PO Box 19031 - 81531990, Brasil. Fax: +55 41 3361 1756.

E-mail address: dani_coxa@hotmail.com (M.D.M. Costa).

chemical stressor. The most obvious biomarkers for endocrine disruption involve assessment of reproductive processes. However, the endocrine system is complex, involving processes that operate at several levels of biological organization and this complexity is frequently underappreciated and oversimplified by the evaluation of only reproductive and developmental abnormalities, leading to skewed conclusions about the cause of certain adverse effects. Because of this, several biomarkers must be used for a more realistic evaluation of the effects of endocrine disruptors.

Depending on the exposure dose, estrogens potentially alter hepatic-somatic index in males, reduce egg production in females, induce vitellogenesis in males and juveniles, decrease overall fish fertility (Mills et al., 2001; Kang et al., 2002), and disrupt non-reproductive endocrine events. For instance, genotoxic (Liehr, 2000; Joosten et al., 2004) and morphological effects in target organs such as liver (Warner, 1994) as well as disturbance on the cellular redox milieu (Maria et al., 2007) were reported for E₂. These disturbances results, in some part, from increased production of reactive oxygen species (ROS), impairment of antioxidant defense systems or both. Antioxidant defense systems usually respond to increases of ROS, protecting cells against insults to macromolecules. Then, the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) are important biomarkers for investigating the cellular redox milieu. Similarly to these antioxidant enzymes, glutathione S-transferase (GST) usually helps protecting cells against chemical insults and GST participates in phase II detoxication reactions, conjugating glutathione (GSH) to chemicals. Not least important, metallothioneins can protect from metal and nonmetal-induced oxidative stress caused by pro-oxidants chemicals (Boelsterli, 2007). However, if the aforementioned defense systems and many others are not able to degrade or scavenge chemical stressors, damage to biomolecules may ensue. Particularly, the integrity of the membrane lipids and DNA can be affected, impairing essential processes for the functioning and survival of cells, then being implicated with several vertebrate diseases.

Fishes are rich in unsaturated membrane lipids, the most susceptible lipids to oxidant damage, and directly exposed to estrogenic compounds such E₂ derived mainly from sewage effluents. *Rhamdia quelen* (jundiá) is a freshwater fish that was chosen as biological model to investigate the E₂ effects because of its omnivorous diet feeding on sediment where lipophilic compounds such as E₂ adsorb. In addition, the species is widely spread in South America from Argentina to Mexico, and is intensively cultured in fish farms for human feeding (Gomes et al., 2000). The sexual maturity is reached within one year and mature fishes are sexually dimorphic.

The aim of the current study was to induce vitellogenin expression by 17- β -estradiol in male *R. quelen* and verify its dose-dependent physiological effects using biomarkers that cover the cellular redox milieu (CAT, SOD, GST and GPx enzymes, GSH and metallothionein content), DNA (nuclear abnormalities) and lipid (lipid peroxidation) damages and morphological hepatic alterations (liver histology and hepatic-somatic index).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

17- β -estradiol, Paraplast, Bradford reagent, trichloroacetic acid, xylol orange, chloroform, HCl, bovine serum albumin, tris-HCl and hydrogen peroxide 30% were purchase from Sigma-Aldrich (MO, USA). Canola oil was from Cargill S.A., Brazil. β -Mercaptoethanol and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were from Fluka (MO, USA). Ethanol, formol and acetic acid were purchased from Merck (North American, S.A.). Xylocaine was obtained from Cristalia Laboratories (SP, BR). Hematoxylin, eosin, giemsa and ethylenediamine tetraacetic

acid (EDTA) were purchased from VETEC (Duque Caxias, RJ, BR). Glutathione-S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), chlorodinitro benzene (CDNB), 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), glutathione reductase (GR), nitroblue tetrazolium (NBT), butylated hydroxytoluene (BHT), and ammonium ferrous sulfate were from Acros Organics (Geel, Belgium). Coomassie brilliant blue, nitrocellulose membrane, non-fat dry milk were obtained from Bio-Rad Laboratories (CA, USA). Polyclonal rabbit anti-sea bream vitellogenin was from Biosense Laboratories (Bergen, Norway) and the antibody peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG was from Gaithersburg (MD, USA). Pierce chemiluminescent kit was purchased from Pierce (IL, USA).

2.2. Experimental design

Forty mature males (29.5 cm \pm 2.2, 411.28 g \pm 9.6) and ten mature females (25.6 cm \pm 3.1, 333.8 g \pm 12.6) of *R. quelen*, all one year old, were obtained from a fish farm (Piscicultura Panama, Santa Catarina State - Brazil). The tested doses (0.1, 1 and 10 mg E₂ kg⁻¹) have been reported to have experimental physiological effects in other studies using fishes on estrogenic effects after intraperitoneal injection of E₂ (Carrera et al., 2007; Pait and Nelson, 2003; Zaroogian et al., 2001). For exposure, 17- β -estradiol was dissolved in canola oil and five experimental groups (10 fish each) were established: female (FC) were not injected with 17- β -estradiol or canola oil; male control group (MC) were injected only with canola oil; and the remaining three groups were intraperitoneally injected with the estrogen at doses of 0.1, 1, or 10 mg E₂ kg⁻¹. Sampling was performed 17 days after injection, because this period had been previously reported as being necessary for vitellogenin induction (Carrera et al., 2007; Pait and Nelson, 2003). After 17 days, fishes were anesthetized with xylocaine (2%) and blood was collected from animals still alive as described by Silversand et al. (1993). Blood was mixed with the anti-proteolytic PMSF (phenyl-methyl-sulfonyl fluoride – 10 mM) diluted in saline solution (NaCl at 0.9%), and centrifuged at 3000 g for 30 min and 4 °C to obtain the plasma, which was stored at –75 °C. Blood smears on glass slides were used for posterior analyses of nuclear alterations. After blood sampling, fish were killed by surgical incision between the first vertebra and skull, and liver samples were collected and frozen (–75 °C, for biochemical analyses) or fixed in Alfac solution (for histological analysis).

2.3. Biometry

Intact fishes and livers were weighted for determining the hepatic-somatic index (HSI) through the equation: HSI = liver mass \times 100 \times (body mass)⁻¹.

2.4. Liver histological aspects

For light microscopy, samples of liver tissue were preserved in ALFAC-fixative solution (ethanol, formaldehyde and glacial acetic acid) for 16 h, dehydrated in graded series of ethanol and xylene, and embedded in Paraplast resin (Sigma®). Sections of 5 μ m thick were obtained, stained with hematoxylin/eosin and observed under the Leica® DME light microscope. A qualitative analysis was performed, considering the presence or absence of alterations.

2.5. Micronucleus test

Micronucleus test (MNT) was performed through the visualization and counting of two thousand peripheral erythrocytes stained with Giemsa per fish. The identification of nuclear morphological alterations and the statistical analysis was performed according to Carrasco et al. (1990).

2.6. Biochemical assays

For GST (EC 2.5.1.18), CAT (EC 1.11.1.6), GPx (EC 1.11.1.9), GSH and lipid peroxidation analyses, 0.4 g of liver were homogenized in 1.0 mL of phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and centrifuged at 9000g for 30 min at 4 °C. Then, the supernatant (S9 fraction) was transferred to 2 mL tubes and frozen at -75 °C; prior to the assays samples were thawed on ice and supernatants were diluted by addition of ice-cold PBS in a volume that varied according to the assay's requirement (see dilution ratio on specific assays). For metallothionein, 0.2 g of liver were homogenized in 1.0 mL of 20 mM Tris-HCl, 500 mM sucrose, pH 8.6, centrifuged at 15,000 g for 30 min, 4 °C and the supernatant after centrifugation was immediately utilized for the assay.

2.6.1. Protein content

Total protein content was quantified following Bradford (1976). A volume of 10 µL of supernatant (diluted 1:20–50) and 250 µL of Bradford reagent (Sigma®) were placed in a 96-well microplate and absorbance was measured at 620 nm. Protein content was calculated through comparison with a standard curve of bovine serum albumin.

2.6.2. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD (EC 1.15.1.1) activity was measured by inhibition of the reduction of nitrobluetetrazolium (NBT) caused by $O_2^{\bullet-}$ generated by hydroxylamine in alkaline solution (Crouch et al., 1981). Thawed supernatant was diluted (1:10), mixed with pure ethanol (4:1) and centrifuged at 12,000 g for 20 min and 4 °C. Then, 20 µL of the resulting new supernatant and 70 µL of solution containing 286 µM NBT chloride and 0.05 mM EDTA were mixed in a 96-well microplate. The reaction was initiated through addition of 110 µL of 67 mM hydroxylamine chloride in 182 mM sodium carbonate (pH 10.2). The absorbance was measured immediately after hydroxylamine addition and after 1 h at 560 nm. The "blank" was determined by replacing sample supernatants with PBS and ethanol (ethanol at 25%). One unit of SOD was defined as the enzymatic activity able to inhibit the reduction of NBT to 50% of the blank rate.

2.6.3. Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed spectrophotometrically in S9 fraction measuring H_2O_2 consumption (Aebi, 1984). Supernatant (20 µL, diluted 1:10) was mixed with reaction medium (980 µL of 20 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-base, 0.25 mM EDTA, pH 8.0, at 25 °C) in a quartz cuvette and H_2O_2 absorbance decrease was immediately measured at 240 nm for 40 s in intervals of 1 s; blanks consisted of reaction medium and PBS. The first interval of 30 s ($r^2 > 0.99$) was used to calculate the enzyme activity, using the molar extinction coefficient for H_2O_2 of $40 M^{-1} cm^{-1}$.

2.6.4. Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was measured using reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrates (Keen et al., 1976). Supernatant (20 µL, diluted 1:10) was placed in 96-well microplate, immediately followed by reaction medium (180 µL, 1.5 mM GSH, 2.0 mM CDNB, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5). Absorbance increase was immediately measured at 340 nm for 2 min in intervals of 12 s. Blanks consisted of reaction medium and PBS. GST activity was determined at the first interval of 1 min ($r^2 > 0.99$) with the molar extinction coefficient for CDNB of $9.6 mM^{-1} cm^{-1}$.

2.6.5. Reduced glutathione (GSH) measurement

GSH was measured on supernatant after protein precipitation by 10% trichloroacetic acid and centrifugation at 1000g for 15 min and 4 °C. Supernatant (50 µL, undiluted) and 230 µL of Tris (0.4 M, pH 8.9) were placed in a 96-well microplate, followed by addition of 20 µL of 2.5 mM DTNB in 25% methanol. Absorbance was determined at

415 nm and GSH concentration was calculated by comparison with the standard curve for GSH (Sedlak and Lindsay, 1968). Blanks consisted of PBS instead of samples.

2.6.6. Glutathione peroxidase (GPx) measurement

GPx activity was measured based on the decrease of absorbance of NADPH at 340 nm, encouraged by the reduction of GSSG, catalyzed by GR, in the presence of NAPH (Sies et al., 1979). A volume of 10 µL of supernatant (diluted 1:10) and 130 µL reaction medium (0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, 3.08 mM sodium azide, 0.308 mM NADPH, 3.08 GSH and $1.54 U mL^{-1}$ Glutathione reductase) were placed in 96-well microplate. After 2 min, 60 µL of hydrogen peroxide solution (5 mM hydrogen peroxide in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) were added. The absorbance decrease was immediately measured for 2 min, at intervals of 10 s. Samples were replaced by PBS in the blanks. GPx activity was determined at the first interval of 1 min ($r^2 > 0.99$) using the molar extinction coefficient for NAPH $6.22 mM^{-1} cm^{-1}$.

2.6.7. Lipid peroxidation (LPO) measurement

LPO was measured by ferrous oxidation-xylenol (FOX) assay (Jiang et al., 1992). A volume of 200 µL of supernatant (not diluted) and 1400 µL of reaction solution (0.1 mM xylenol orange, 25 mM H_2SO_4 , 4.0 mM butylated hydroxytoluene (BHT) and 0.25 mM ammonium ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot NH_4$) in pure methanol) were mixed in 2 mL tubes. The tube's content was mixed once every 3 min by inversion during 20 min. Then, tubes were centrifuged at 9000g for 10 min, and 300 µL of supernatant was carefully added to a 96-well microplate. Blank was prepared by replacing the supernatant with PBS. Absorbance was measured at 570 nm and hydroperoxides concentration was determined using the apparent molar extinction coefficient for H_2O_2 and cumene hydroperoxide of $4.3 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$.

2.6.8. Metallothionein measurement

Metallothionein (MT) was quantified according to Viarengo et al. (1997). After homogenization and centrifugation (see Section 2.6), 50 µL of supernatant was stored (for protein quantification) and 300 µL of it was transferred to another tube. To the tubes containing 300 µL of supernatant, 342 µL of solution 1 (318 µL ethanol and 24 µL chloroform, at -20 °C) were added and the tube contents were mixed. After centrifugation (6000 g, 10 min, 0 °C), 490 µL of this new supernatant and 1502 µL of solution 2 (32 µL HCl and 1470 µL ethanol, at -20 °C) was added and mixed in a second new tube; the tubes were kept in the freezer (-20 °C) for 1 h. Then, tubes were centrifuged one more time (6000 g, 10 min, 0 °C) and supernatant was carefully removed and discarded. Precipitated proteins were suspended and mixed with 1000 µL of solution 3 (870 µL ethanol, 10 µL chloroform and 120 µL of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)), and tubes were centrifuged (6000 g, 10 min, 0 °C). Supernatant was discarded and precipitated proteins were suspended in 50 µL of 250 mM NaCl; after mixing, 50 µL of the solution containing 4 mM EDTA and 1 M HCl was added (blank was prepared in a separate tube where the solution of NaCl and EDTA-HCl were both added). Finally, 1000 µL of Ellman's reagent (0.43 mM DTNB and 2 M NaCl in 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) was added to all tubes and mixed; tubes were centrifuged for the last time (3000g, 5 min, 0 °C) and 300 µL from these final supernatants were added to a 96-well microplate. Absorbances were measured at 412 nm and a standard curve of GSH mixed with Ellman's reagent was used as reference to determine thiol groups (SH) content. We used the metallothionein thiol content of mussel (30%) to estimate the metallothionein content of *R. quelen* (Viarengo et al., 1997).

2.7. Measurement of plasma estradiol

For 17- β -estradiol measurements individual or within group pooled plasma samples (when individual sample volume was below 400 µL) were extracted in diethyl ether (1:4; v:v). The ether fraction was poured

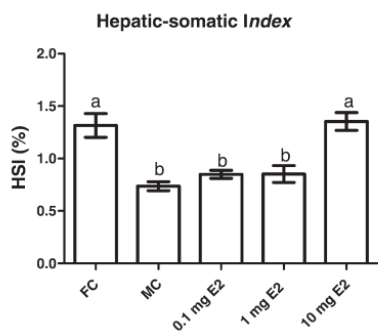


Fig. 1. Hepatic-somatic index. FC: non-exposed females; MC: non-exposed male; 0.1 mg E₂: male exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹; 1.0 mg E₂: male exposed to 1.0 mg E₂ kg⁻¹; 10 mg E₂: male exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹. Different letters (i.e. a, b) indicate differences ($P < 0.05$) among groups.

off into clean glass tubes and evaporated in a fume hood. Extracts were reconstituted in 200 μ L assay buffer (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA; pH 7.0) and analyzed by enzyme immunoassay using a polyclonal anti-17 β -estradiol antibody (R 0008/1:12,000 dilution) and HRP-conjugate (1:200,000) obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA). Serial dilutions of pooled plasma extracts produced displacement curve parallel to those of standards ($r^2 = 0.96$; $F = 0.000253838$, $DFn = 1$ $DFd = 13$, $p = 0.9875$). Samples were measured in a single run with an intra-assay coefficient of variation of 3.73% and results are expressed in ng/mL.

2.8. SDS PAGE and Western blot analysis

A volume of 100 μ g of total plasma protein was resolved by 8% SDS-PAGE (Mini Protean II, BioRad®). Proteins from two identical gels were either stained with Coomassie brilliant blue or transferred to nitrocellulose membrane in order to perform the Western blot. The Western

blot was initiated by rehydrating the membrane in the blocking solution (5% of non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) with 0.5% Tween-20 (TTBS)). The membrane was then probed for Vg with commercial rabbit anti-sea bream vitellogenin polyclonal antibodies (1:500, Biosense, Norway) in blocking solution. Bound antibodies were detected with goat anti-rabbit antibodies coupled to HRP (Horseradish peroxidase 1:4000, Sigma). The reaction was developed using the Pierce chemiluminescent kit (Chemiluminescent super signal, Pierce).

2.9. Statistical analysis

For the biochemical assays, statistical analyses were performed using Prism software and differences among controls and exposed groups were tested by one-way ANOVA followed by Tukey test when appropriate. For the evaluation of the frequency of nuclear morphological abnormalities, the comparisons among the groups were performed through Kruskal–Wallis test (Carrasco et al., 1990). Results with $p < 0.05$ or least were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Hepatic-somatic index

According to the hepatic-somatic index, male and female control groups were different, as well as male control and 10 mg E₂ kg⁻¹ male exposed group. In both, an increase of hepatic-somatic index occurred in comparison with male control group (Fig. 1). No differences among male control group and both 0.1 and 1 mg E₂ kg⁻¹ exposed groups (Fig. 1) were observed, while the 10 mg E₂ kg⁻¹ exposed group presented an increased hepatic-somatic index in comparison to the other two exposed groups (0.1 and 1 mg E₂ kg⁻¹).

3.2. Liver histology

General liver structure differed between the controls groups: the hepatocytes of female present an intense cytoplasm “vacuolization” (Fig. 2 A), that was not observed in male control group (Fig. 2 B). The

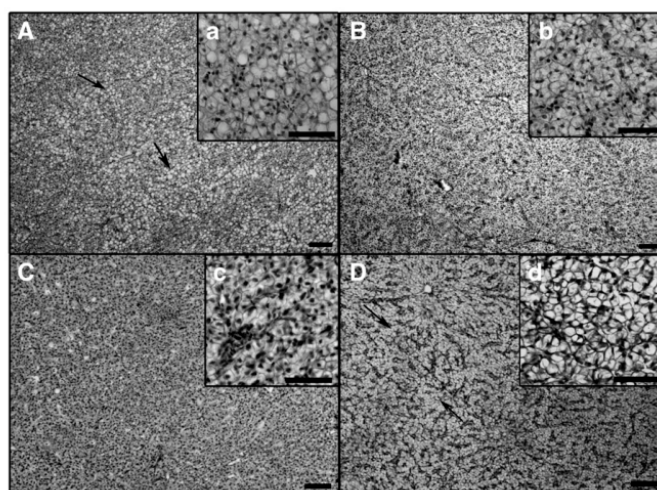


Fig. 2. Liver histology. (A) Female liver structure. Vacuolated cells (arrows). Bar scale = 100 μ m. (a) Details of vacuolated cells. Bar scale = 50 μ m. (B) – Male non-exposed liver structure. Bar scale = 100 μ m. (b) Details of male non exposed liver structure. Bar scale = 50 μ m. (C) Liver structure from male exposed to 1 mg E₂ kg⁻¹. There no differences in liver structure between male exposed to 0.1 and 1.0 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 100 μ m. (c) Details of liver structure from male exposed to 1 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 50 μ m. (D) – Liver structure from male exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹. Vacuolated cells (arrows). Bar scale = 100 μ m. (d) – Details of vacuolated cells. Bar scale = 50 μ m.

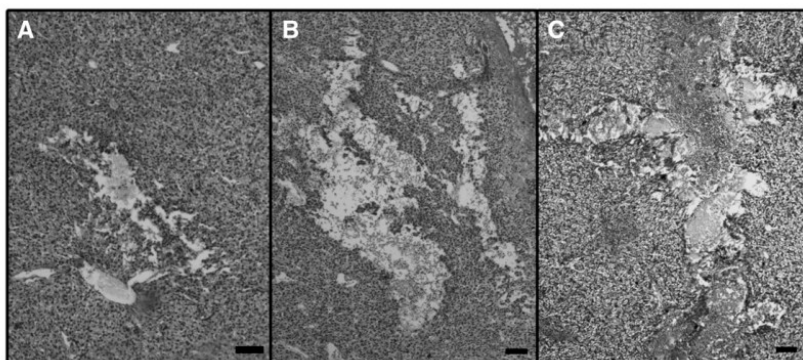


Fig. 3. Necrosis. (A) Necrosis area in males exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 50 µm. (B) Necrosis area in males exposed to 1.0 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 50 µm. (C) Necrosis area in males exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 50 µm.

same alteration was observed in males exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹ (Fig. 2 D), but not in males exposed to 0.1 and 1 mg E₂ kg⁻¹ (Fig. 2 C). The male and female control groups did not have necrotic lesions, which were observed in individuals from all exposed groups (Fig. 3). The presence and intensity of the necrosis areas is similar among the exposed groups. Leukocyte infiltration, that occurs during inflammatory responses, was observed similarly in all groups, except for the 10 mg E₂ kg⁻¹ exposed group (Fig. 4).

3.3. Nuclear morphological abnormalities

Nuclear abnormalities were present in all tested groups, but no significant differences occurred among the groups. Table 1 presents the mean and standard deviation of nuclear abnormalities per group.

3.4. Biochemical assays

SOD and CAT activities increased in the 10 mg E₂ kg⁻¹ male exposed group in comparison with male and female controls, but were similar among the male exposed groups. Also, these enzymatic activities were similar in the female control, male control and the males injected with the two lowest doses (Fig. 5 A and B). GST activity decreased at similar magnitude in all male exposed groups comparatively to the male and female controls, which presented similar activities (Fig. 5 C). GSH concentration (Fig. 5 D), GPx activity (Fig. 5 E) and LPO (Fig. 5 F) had similar values among all the experimental groups. The metallothionein (Mt) concentration decreased in the female and 10 mg E₂ kg⁻¹ male exposed groups in comparison with the others experimental groups. No differences among the male

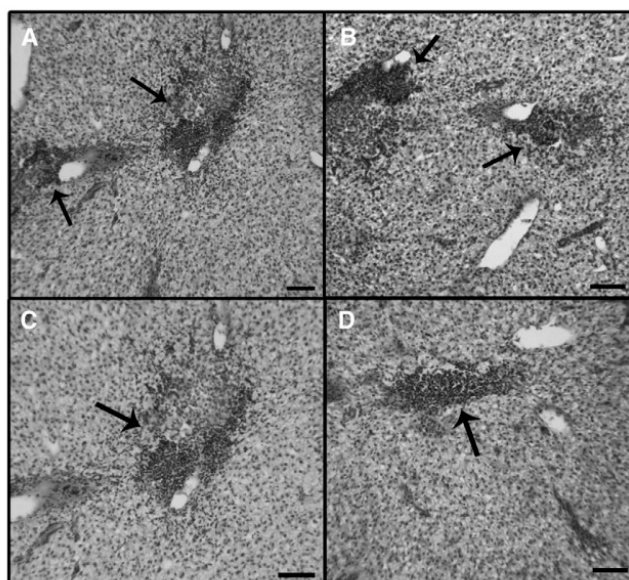


Fig. 4. Inflammatory response. (A) Leukocyte infiltration (arrows) in female control group. (B) Leukocyte infiltration (arrows) in males non exposed. (C) Leukocyte infiltration (arrows) in males exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹. (D) Leukocyte infiltration (arrows) in males exposed to 1.0 mg E₂ kg⁻¹. Bar scale = 50 µm.

Table 1
Mean of nuclear abnormalities per group (NMA).

Group	FC	MC	0.1 mg E ₂	1.0 mg E ₂	10 mg E ₂
NMA	3.12 ± 2.66	2.15 ± 1.45	3.55 ± 2.55	3.07 ± 2.77	6.12 ± 3.27

FC: female non-exposed; MC: male non-exposed; 0.1 mg E₂ kg⁻¹: male exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹; 1.0 mg E₂: male exposed to 1 mg E₂ kg⁻¹; 10 mg E₂: male exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹.

Mean ± Standard deviation. No significant differences among all groups.

control and males exposed to 0.1 or 1 mg E₂ kg⁻¹ were observed (Fig. 5 G).

3.5. Plasma estradiol

Plasma 17-β-estradiol concentration was similar between females and males exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹ and both had higher E₂ concentrations than all other male groups. Males at the control group and males exposed to 0.1 or 1 mg E₂ kg⁻¹ had similar concentrations of plasma estradiol (Fig. 5 H).

3.6. Vitellogenin expression

Vitellogenin (Vg) expression was observed in females and in both 1 and 10 mg E₂ kg⁻¹ male exposed groups. Males injected with highest dose of E₂ over-expressed Vg, while males injected with 1 mg E₂ kg⁻¹ slightly-expressed the protein and so, Vg expression can be considered dose-dependent in *R. quelen*. Vitellogenin was not detected in the male control group and in the 0.1 mg E₂ kg⁻¹ male exposed group (Fig. 6 A and B).

4. Discussion

Occurrence of steroid hormones in natural aquatic environments strongly increased in the last decades due to medicine application and livestock farming release, becoming a matter of concern for ecotoxicologists. Although intraperitoneal injections are not the most environmentally relevant mode of exposure, they do provide a means to determining whether a species responds to compounds of interest and the kinds of responses that are relevant for that species. Different intraperitoneal doses of E₂, with significant physiological effects have been reported by others authors (Flynn and Benfey, 2007; Maria et al., 2007; Zarogian et al., 2000). Some of the doses tested in this study were different from those used by Flynn and Benfey (2007) and Maria et al. (2007), but were similar to those tested by Zarogian et al. (2001). We chose the doses based on the literature and on a previous study in which lethality was observed in *R. quelen* for 20 mg E₂ kg⁻¹ and 50 mg E₂ kg⁻¹ (unpublished data), even though the value of 20 mg E₂ kg⁻¹ was reported as not lethal to *Paralichthys dentatus* (Mills et al., 2001). Then, different species of fish have different sensibility to estrogens.

Estrogenic compounds accumulate in the aquatic environment at concentrations of few micrograms per liter, whereas sewage sludge effluents contain up to some hundreds of micrograms per liter (Ahel et al., 1994; Naylor et al., 1992).

The estradiol concentration on plasma of females of *R. quelen* was similar to the concentration found elsewhere (Barcellos et al., 2001; Soso et al., 2007), and greater than the concentration observed for mammals possibly due to the differences in reproductive strategies of fishes and mammals. Females in the reproductive period and males exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹ present similar concentrations of E₂, demonstrating that the tested dose have physiological significance. However, not exposed males and males exposed to 0.1 and 1.0 mg of E₂ had similar concentrations of the hormone, indicating that this hormone was possibly metabolized and excreted by the organism during the seventeen days that followed the intraperitoneal injection.

Literature reports that 17-β-estradiol is converted in the liver to estrone and subsequently metabolized into 2-, 4- or 16-α-hydroxyestrone. The 2-Hydroxyestrone (2-OHE) is rapidly excreted by the organism, whereas the 16-α-hydroxyestrone (16α-OHE1) is not, being a potent estrogen that exhibits toxic characteristics (Greenspan and Gordon, 1997). Due to this biotransformation and subsequent excretion of estrogens some of their effects can be reversible after discontinuing the exposure.

The increased HSI in individuals exposed to the highest dose can be interpreted as a metabolic disturb related to the increase on Vg production and the vacuolization of hepatocytes. These results were also reported for *Paralichthys dentatus* after 2 and 20 mg E₂ kg⁻¹ exposure (Mills et al., 2001).

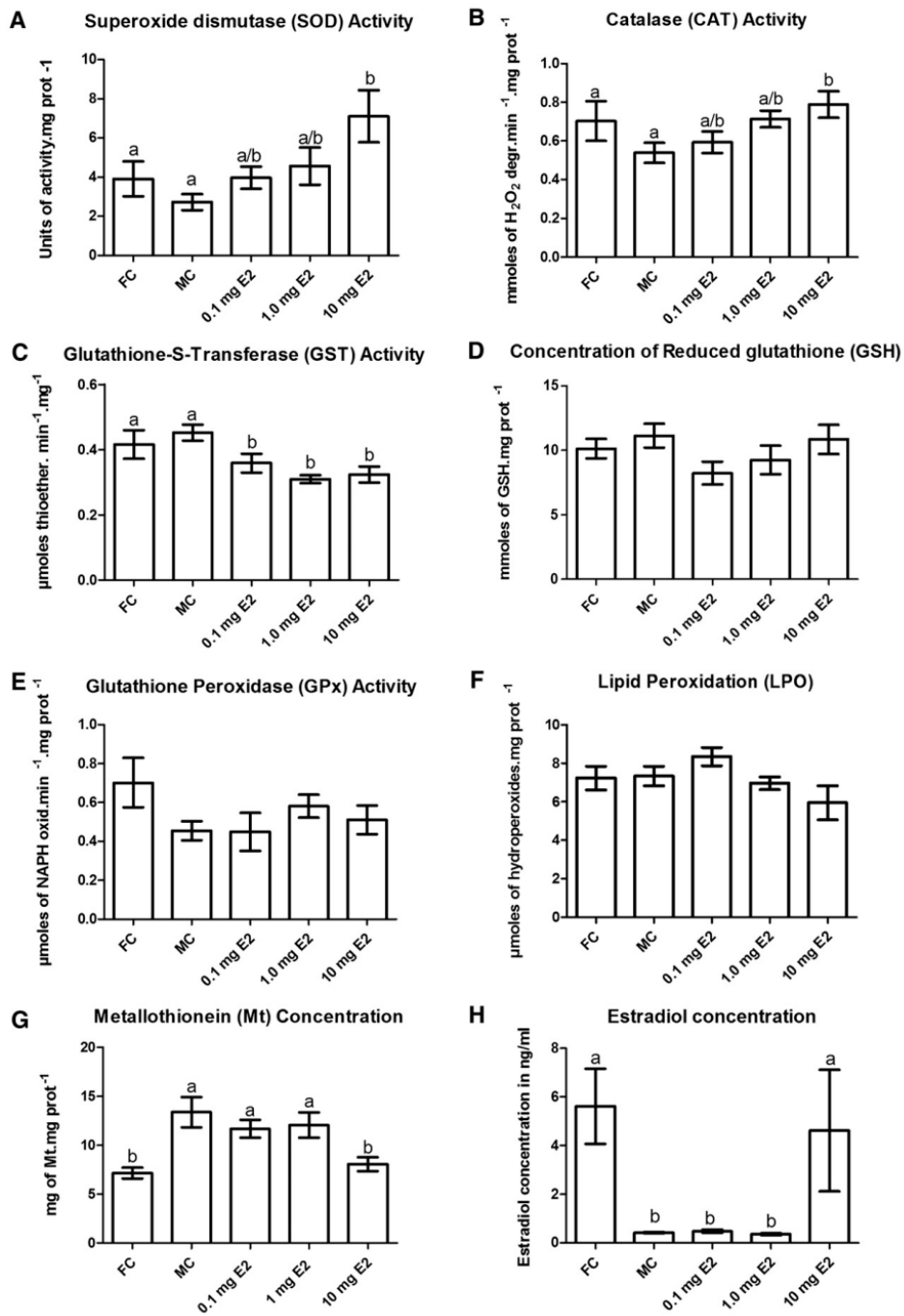
Histological damages have been poorly used as biomarkers to study the toxic effects of E₂ in fishes. The presence of necrosis in all E₂ exposed groups suggests a cause-effect relationship. Excessive cell death through necrosis may lead to immediate or long-term tissue and organ failure. Hepatic disarrays in *Cichlasoma dimerus* (Moncaut et al., 2002) and necrosis in the liver of *P. dentatus* (Zarogian et al., 2001) were also reported after E₂ injection, demonstrating that high doses of E₂ are hepatotoxic and corroborating the findings for *R. quelen*. Necrosis can occur as a consequence of oxidative stress (Lu et al., 2004), however the occurrence of oxidative stress was not confirmed in *R. quelen* after seventeen days after the injection with E₂. One possibility is that the cell damages such as necrosis were a consequence of the acute exposure to E₂ and redox unbalance not evaluated in the beginning of the experiment, meaning that the absence of oxidative stress after seventeen days is due to a modulation after long-term exposure (cell response) as described by Hughes and Gallagher (2004) in *Micropterus salmoides*. According to the same authors the oxidative stress occurred after 48 h of estrogen exposure, but after 7 and 14 days of exposure the normal conditions were reestablished, corroborating our hypothesis for *R. quelen*.

In both groups, female control and males injected with the highest dose of E₂, cytoplasm vacuolization were observed in the hepatocytes. This morphological finding could be a lipid accumulation for egg yolk production, since a high Vg synthesis was observed in females group and males exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹ group; in females it is a normal physiological situation, but in males it can be considered an alteration since they do not produce eggs.

The effects of estrogens in immune system of fishes are still unclear, but these effects on mammal immune systems are widely studied (Josefsson et al., 1992). In *Cyprinus carpio* and some mammals, the phagocytic activity of leukocytes was suppressed by estradiol (Magnusson and Fossum, 1992; Yamaguchi et al., 2001), and in mammals estradiol inhibits leukocyte production in bone marrow and affects the distribution of polymorphonuclear cells in peripheral blood (Josefsson, et al., 1992). The action of E₂ on important physiological activities such as leukocyte production and activity may lead to inflammatory suppression in *R. quelen* male fishes exposed to the highest dose of E₂, and thus to impairment of immunity and tissue repair.

According to Liehr (2000) and Joosten et al. (2004) high concentration of estrogens are genotoxic to mammals and E₂ was classified as a class I carcinogen (IARC, 1999). No morphological nuclear alterations indicating genotoxic effects on erythrocytes after short-term exposure were observed in the current and on other works, for *Dicentrarchus labrax* (Teles et al., 2004) and for *Spaurus aurata* (Teles et al., 2005). Despite of that, other authors have observed DNA breakage and DNA adduct formation in cells and tissues after E₂ long-term exposure, meaning that 17 days are probably not enough to cause DNA damages in *R. quelen* observable by microscopic analysis even injecting high doses.

Metallothioneins are highly conserved proteins responsible for metal sequestration and detoxication (Smirnov et al., 2005), having its induction affected by metals and other chemicals stressors (Smirnov



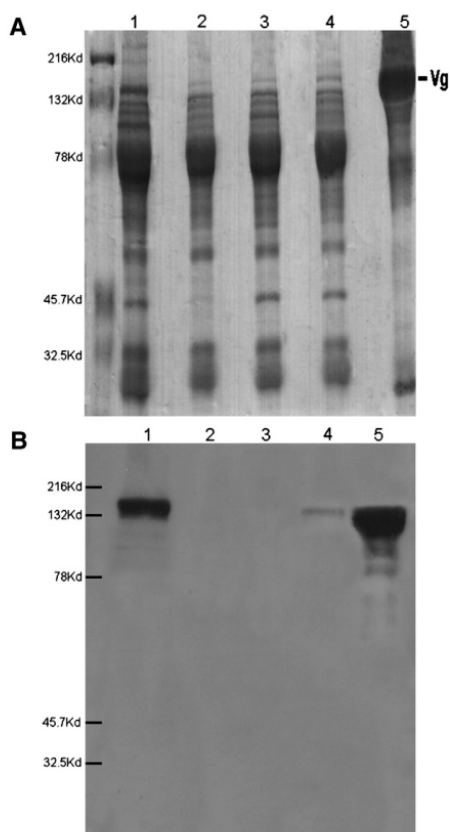


Fig. 6. Differential expression of vitellogenin. (A) Equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, gel was stained with Coomassie brilliant blue. (B) Same samples were analyzed by western blot, using the rabbit anti-sea bream vitellogenin polyclonal antibody MM: molecular mass – Kd = kDa; Lane 1: plasma from female; Lane 2: plasma from male non exposed; Lane 3: plasma from male exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹; Lane 4: plasma from male exposed to 1.0 mg E₂ kg⁻¹; Lane 5: plasma from male exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹.

et al., 2005). Because elevated MT levels have frequently been associated with metal exposure, MT measurement has been used as a biomarker of metal pollution (Amiard et al., 2006; Costa et al., 2007). However, there are several factors that influence MT expression (Smirnov et al., 2005), such as age, sex and tissue type, both in the control and exposed fishes (Rhee et al., 2009). The levels of metallothionein decreased in the liver of *R. quelen* in males exposed to the highest E₂ dose, corroborating the findings described for *Salvelinus alpinus* (Gerpe et al., 2000) and for *Salvelinus namaycush* (Werner et al., 2003). Metallothionein levels in the liver of *R. quelen* were influenced by sex, indicating that the tested E₂ levels can modulate the metallothionein expression in this tissue down to the levels found in females. This study highlights that endocrine disruptors can modulate

MT expression and vitellogenin together with MT are suitable for biomonitoring areas impacted by endocrine disruptor compounds.

Since E₂ is normally metabolized by hepatic enzymes the decrease in GST activity observed was not expected, and can compromise the metabolism of endobiotic molecules and xenobiotics, sensitizing the organism to the effects of pollutants that require GST conjugating activities for detoxication. In the current study, GST activity was inhibited in all E₂-treated groups and the same results were observed in *D. labrax* (Vaccaro et al., 2005). These findings may have an important impact on hepatic cell survival since GST expression is necessary for normal cell metabolism of many endobiotic molecules and protection against many xenobiotics.

The CAT and SOD increases, but not the GPx activity, represent an efficient modulation of the cellular defense mechanism against oxidative stress and cellular damage in the fishes exposed to the highest dose of E₂, meaning an initial direct or indirect disturbance to redox milieu caused by E₂ that was successfully neutralized by the increased expression of both enzymes, so that GSH, DNA structure and lipid peroxidation levels remained unaltered. The same biochemical responses were also observed in *S. auratus* (Vaccaro et al., 2005; Carrera et al., 2007), but not in *Cyprinus carpio* (Solé et al., 2000), which had a slight decrease of selenium-dependent GPx.

Vg is a large phospholipoglycoprotein precursor of egg yolk found on oviparous vertebrates, including fish (Hiramatsu et al., 2002; Pantino and Sullivan, 2002). It is a female-specific protein (Hara et al., 1980) synthesized in response to endogenous estrogens (Stifani et al., 1990) involved in both, defensive reactions and yolk proteins synthesis (Shi et al., 2006). Here and in other studies (Funkenstein et al., 2000; Moncaut et al., 2002; Pait and Nelson, 2003), there are strong indicatives that Vg production in males are dose and time-dependent. In natural environment fishes are “not pierced by needles” containing estrogens, however their chronic exposure to low levels of such compounds may induce Vg expression as well, as reported by Folmar et al. (2000).

In the present study, we observed that exposure to E₂ caused important damage to liver (necrosis) and can increase the Vg levels, the hepatocyte cytoplasm vacuolization, the HSI and the metallothionein concentration in *R. quelen* males, particularly on those fishes exposed to the highest E₂ dose. Foremost, E₂ injection resulted in levels of these biomarkers that are similar in females and exposed males. Then, E₂ can be considered harmful to *R. quelen* species and could potentially be hazardous for other tropical fishes on natural environment, because of the impairment of the capacity of fishes to maintain male-characteristic levels of those biomarkers, which are normally different from those of females.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology) and by Piscicultura Panama (SC-Brazil). The authors would like to thank the Neurobiology Laboratory for technical support, the Animal Cytogenetic Laboratory and the Environmental Toxicology Laboratory at Federal University of Parana for scientific assistance.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Ahel, M., Gijer, W., Koch, M., 1994. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic treatment. *Water Res.* 28, 1131–1142.

Fig. 5. Biochemical response on liver and estradiol on plasma. (A) Super oxide dismutase (SOD) activity in unities of activity per milligram of protein; (B) Catalase (CAT) activity in millimoles of H₂O₂ degraded per min per mg of protein; (C) Glutathione-S-transferase (GST) activity in micromoles of thioether produced per min per mg of protein; (D) Reduced glutathione (GSH) concentration in micromoles of cellular reduced glutathione per mg of protein; (E) Glutathione peroxidase (GPx) activity in micromoles of NAPH oxidized per min per mg of protein; (F) Lipid peroxidation (LPO) in micromoles of hydroperoxides per mg of protein; (G) Metallothionein concentration in mg of metallothionein per mg of protein. (H) 17-β-estradiol in ng of estradiol per mL of plasma. FC: female non-exposed; MC: male non-exposed; 0.1 mg E₂: male exposed to 0.1 mg E₂ kg⁻¹; 1.0 mg E₂: male exposed to 1.0 mg E₂ kg⁻¹; 10 mg E₂: male exposed to 10 mg E₂ kg⁻¹. Different letters (i.e. a, b) mean statistical differences (P<0.05) among groups.

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Barcellos, L.J.G., Guillermo, F.W., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittze, I., Krieger, M.H., Lulhier, F., 2001. Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 325–332.
- Berg, C., Halldín, K., Brunström, B., Brandt, I., 1998. Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicol. Lett.* 102–103, 671–676.
- Boelsterli, A.U., 2007. Mechanistic toxicology, The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets, Second Edition. CRC Press.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brouwer, A., Reijnders, P.J.H., Koeman, J.H., 1989. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*). *Aquat. Toxicol.* 15, 99–106.
- Campbell, P.M., Hutchinson, T.H., 1998. Wildlife and endocrine disruptors: requirements for hazard identification. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 127–135.
- Carrera, E.P., García-López, A., Río, M.P.M., Martínez-Rodríguez, G., Solé, M., Mancera, J.M., 2007. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Compar. Biochem. Physiol. Part C* 145, 210–217.
- Carrasco, K.R., Tibbiry, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 697–708.
- Colborn, T., 1998. Building scientific consensus on endocrine disruptors. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1–2.
- Costa, P.M., Repolho, T., Caeiro, S., Diniz, M.E., Moura, I., Costa, M.H., 2007. Modelling metallothionein induction in the liver of *Sparus aurata* exposed to metal-contaminated sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 117–124.
- Crouch, R.K., Gandy, S.C., Kimsey, G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30, 235–241.
- Dorabawila, N., Gupta, G., 2005. Endocrine disrupter-estradiol in Chesapeake Bay tributaries. *J. Hazard. Mater.* 120, 67–71.
- EDSTAC, 2000. Report to Congress. Endocrine Disrupting Screening Program-Environmental Protection Agency.
- EMWAT, 1997. In: Tattersfield, L., Matthiessen, P., Campbell, P., Grandy, N., Länge, R. (Eds.), SETAC-Europe, OECD, EC Expert Workshop on Endocrine Modulators and Wildlife: Assessment and Testing, Veldhoven, The Netherlands, 10–13 April 1997: SETAC-Europe, Brussels, Belgium, p. 126.
- Flynn, S.R., Benfey, T., 2007. Effects of dietary estradiol-17 β in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*. *Lesueur. Aquaculture* 270, 405–412.
- Folmar, L.C., Hemmer, M., Bowman, R.C., Kroll, K.N., Denslow, D., 2000. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat. Toxicol.* 48, 77–88.
- Funkenstein, B., Bowman, C.J., Denslow, N.D., Cardinali, M., Carnevali, O., 2000. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 167, 33–41.
- Gagné, F., André, C., Blaise, C., 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β . *Fresenius Environ. Bull.* 14, 861–866.
- Gerpe, M., Kling, P., Berg, A.H., Olsson, P.E., 2000. Arctic char (*Salvelinus alpinus*) metallothionein: cDNA sequence, expression, and tissue-specific inhibition of cadmium-mediated metallothionein induction by 17 β -estradiol, 4-OH-PCB30, and PCB104. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 638–645.
- Gomes, L.C., Golombieski, J., Chippari-Gomes, A.R., Baldisserotto, B., 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciênc. Rural* 30, 179–185.
- Greenspan, F.S., Gordon, J.S., 1997. Introduction to endocrinology. In: Reinhardt, S., Langan, S. (Eds.), Basic & Clinical Endocrinology. Appleton & Lange, Stamford, pp. 1–38.
- Guillette, L.J., 2000. Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth hormone and IGF Research* 10, 45–50.
- Hara, A., Yamauchi, K., Hirai, H., 1980. Studies on female specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 65, 315–320.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Hara, A., 2002. Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish Sci.* 68 (Suppl. 1), 694–699.
- Hughes, E.M., Gallagher, E.P., 2004. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 137, 237–247.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to Humans: hormonal contraception and postmenopausal hormone therapy. IARC, Lyon, France.
- Imai, S., Koyama, J., Fujii, K., 2005. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*), a new test fish species. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 702–714.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylene orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.
- Joosten, H.F., van Acker, F.A., van den Dobbelsteen, D.J., Horbach, G.J., Krajnc, E.I., 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicol. Lett.* 151, 113–134.
- Josefsson, E., Tarkowski, A., Carlsten, H., 1992. Anti-inflammatory properties of estrogen: in vitro suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell. Immunol.* 142, 67–78.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47, 71–80.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715–740.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Liehr, J.G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr. Soc.* 21, 40–54.
- Lu, G., Shimizu, I., Cui, X., Itonaga, M., Tamaki, K., Fukuno, H., Inoue, H., Honda, H., Ito, S., 2004. Antioxidant and antiapoptotic activities of idoxifene and estradiol in hepatic fibrosis in rats. *Life Sci.* 74, 97–107.
- Lyle, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., McCormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 34–41.
- Magnusson, U., Fossum, C., 1992. Effect of estradiol-17 β treatment of gilts on the blood mononuclear cell functions in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1427–1430.
- Maria, V.L., Ahamad, I., Santos, M.A., 2007. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) DNA strand breaks and lipid peroxidation response following 17 β -estradiol two mode of exposures. *Environ. Int.* 34, 23–29.
- Mills, L.J., Gutjahr-Gobell, R., Haebler, R., Horowitz, D., Jayaraman, S., Pruell, R., 2001. Effects of estrogenic (o, p'-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (p, p'-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* 52, 157–176.
- Moncaut, N., Lo Nostro, F., Maggese, M.C., 2002. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquat. Toxicol.* 60, 1–11.
- Naylor, G.C., Miereur, J.P., Adams, W.J., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R., 1992. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 695–703. Neumann, G., Grunert, G., Tchemitchin, A.N., 1987. Effects of various estrogens on spleen eosinophilia. *Med. Sci. Res.* 15, 97–98.
- Pait, A.S., Nelson, J.O., 2003. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquat. Toxicol.* 64, 331–342.
- Pantino, R., Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 57–70.
- Rhee, J.S., Raissudin, S., Hwang, D.S., Lee, K.W., Kim, I.C., Lee, J.S., 2009. Differential expression of metallothionein(MT) gene by trace metals and endocrine-disrupting chemicals in the hermaphroditic mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 206–209.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein bound and non protein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Shi, X.D., Zhang, S.C., Pang, Q.X., 2006. Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 769–772.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–290.
- Silversand, C., Hyllner, S.J., Haux, C., 1993. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.* 267, 587–597.
- Smirnov, L.P., Sukhovskaya, I.V., Nemova, N.N., 2005. Effects of environmental actors on low-molecular-weight peptides of fishes: a review. *Russ. J. Ecol.* 36, 41–47.
- Solé, M., Porte, C., Barceló, D., 2000. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp *Cyprinus carpio* after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 494–500.
- Soso, A.B., Barcello, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silca, L.B., Riter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sublethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308–313.
- Stifani, S., Le Menn, F., Rodriguez, J.N., Schneider, W.J., 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta* 3, 271–279.
- Teles, M., Gravato, C., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere* 57, 147–158.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2005. *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Sci. Total Environ.* 336, 357–369.
- Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., Gervasi, P.G., Pretti, C., 2005. Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 75, 293–305.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Yamaguchi, T., Watanuki, H., Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C* 129, 49–55.
- Ying, G., Kookana, R.S., Ru, Y., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551.
- Warner, R.H., 1994. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 249–258.

- Werner, J., Wautier, K., Evans, R.E., Baron, C.L., Kidd, K., Palace, V., 2003. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquat. Toxicol.* 62, 321–328.
- Witorsch, R.J., 2002. Endocrine Disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 118–130.
- Zarogian, G., Gardner, G., Borsay Horowitz, D., Gutjahr-Gobell, R., Haebler, R., Mills, L., 2001. Effect of 17betaestradiol, o, p,-DDT, octylphenol and p, p,-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* 54, 101–112.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)