

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WALQUIRIA MENNA BRUSAMOLIN

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA DOMÍNIOS DA
PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA pGEX-2T**

CURITIBA
2007

WALQUIRIA MENNA BRUSAMOLIN

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA DOMÍNIOS DA
PROTEÍNA ADAM23 HUMANA EM SISTEMA pGEX-2T**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Patologia como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Co-orientadora: Michele Dietrich Moura Costa

CURITIBA
2007

*Aos meus pais, Maria do Carmo e José
Antônio, e à minha querida avó, Maria Rosa
Menna por todo o apoio, carinho e amor
dedicado a mim.*

*Aos meus queridos orientadores, Silvio
Zanata e Michele, por terem sido
fundamentais na construção do meu saber.*

"...pois Deus disse: 'Eu nunca os deixarei e jamais os abandonarei'. Portanto, sejamos corajosos e afirmemos: 'O Senhor é quem me ajuda, e eu não tenho medo...'"
(Hebreus 13:6)

"Por isso tenhamos confiança e cheguemos perto do trono divino, onde está a graça de Deus. Ali receberemos misericórdia e encontraremos graça sempre que precisarmos de ajuda". (Hebreus: 4:16)

"...que a glória seja dada a Deus, o qual, por meio do seu poder que age em nós, pode fazer muito mais do que nós pedimos ou até pensamos!..."(Efésios 3:21)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, a quem tanto orei, e que sempre esteve ao meu lado, estendendo sua mão amiga quando eu estava sem forças para lutar sozinha...

A meus pais, por estarem sempre preocupados com meu bem estar, alimentação e sempre me dando muito amor.

A minha avó, que me proporcionou tudo que precisei, que cuidou de mim, me fez companhia, sem ela eu com certeza não seria o que sou hoje.

As minhas irmãs, Anatolli e Anelise, que eu quase não via, mas que estavam sempre preocupadas, sempre me ajudando de longe. A minha outra irmã, Vanessa, que, apesar de eu sempre dizer que estava atarefada, sempre procurou me ajudar e aliviar os meus afazeres.

Ao meu namorado, João Paulo, que fez todo o seu possível para me ver bem e feliz e suportou firme minhas crises de choro e irritação.

Ao meu orientador, professor Sílvio, por ter aberto as portas do mundo da ciência a mim, pela confiança e, acima de tudo, pela amizade.

A minha co-orientadora, Michele, que sempre esteve me ensinando tudo “direitinho”, me ajudando, corrigindo meus relatórios, “puxando minha orelha”, e principalmente, sendo minha amiga querida em todos os momentos.

As minhas amigas Vivi e Mari, que me ajudaram nos experimentos, estavam sempre dispostas a colaborar, e aos meus amigos do laboratório Luiz, Sofia, Katya, Beth, Aline, Max, Ju, Mônica, Bia, Helô e Dani com quem compartilhei muitas histórias e risadas.

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular, em especial, a Luiza, a Olga, a Kátia, a Dylza, pela ajuda e a uma antiga aluna e amiga, Luciellen, que foi quem me apresentou ao professor Sílvio.

RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células precursoras nervosas migram para seus destinos finais e os axônios são direcionados ao longo de um trajeto até que encontrem seus alvos, com os quais estabelecem contatos especializados. Durante sua navegação em direção ao alvo, axônios interagem com moléculas da matriz extracelular e de superfície celular, as quais sinalizam o direcionamento axonal. Nesse contexto, eventos de adesão célula-célula e célula-matriz, bem como a proteólise da matriz extracelular são fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso. ADAMs são proteínas transmembranas tipo I envolvidas tanto em eventos de adesão quanto na proteólise. ADAM23 é um membro dessa família expressa principalmente no SNC, tanto de embriões quanto de adultos, com função potencial de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, podendo estar envolvida no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Animais nocaute para o gene que codifica essa proteína apresentam fortes tremores e ataxia e, sobrevivem no máximo duas semanas após o nascimento. Tal fato sugere que ADAM23 possa realmente ter uma importante função biológica no desenvolvimento do sistema nervoso. Com base nessas informações, o presente trabalho teve como objetivo expressar e purificar essa proteína e utilizá-la como antígeno na produção de anticorpos policlonais. Espera-se que essas ferramentas possam ser empregadas em ensaios bioquímicos e funcionais com o intuito de elucidar alguns dos papéis desempenhados pela ADAM23 no desenvolvimento e manutenção do SNC. Diferentes domínios da proteína ADAM23 humana foram expressos em sistema heterólogo de *Escherichia coli* fusionados à proteína Glutathione S-Transferase de *Schistosoma japonicum* a partir do vetor de expressão pGEX-2T. Extratos de células bacterianas foram submetidos a purificação por adsorção à matriz cromatográfica Glutathione Sepharose sob condições nativas. Somente a construção correspondente ao domínio desintegrina (construção 2, aa 499-585) pôde ser purificada satisfatoriamente e utilizada na imunização de camundongos. A eficiência do soro imune foi avaliada pelo método de ELISA e Western Blotting, no entanto o soro não se mostrou eficiente no reconhecimento de ADAM23 endógena nem de ϵ His-ADAM23. Já as construções correspondentes ao domínio metaloprotease (construção 1, aa 293-496) e a ambos os domínios (construção 3, aa 293-585) não puderam ser purificadas, pois permaneceram em corpos de inclusão. Modificações no protocolo original foram realizadas para o domínio metaloprotease na tentativa de solubilizar a proteína, entre essas modificações empregou-se diminuição na concentração do agente indutor, mudança no detergente usado no tampão de lise, adição de agente desnaturante. No entanto não foi possível obter quantidades significativas da proteína na forma solúvel. Uma outra tentativa com a proteína recombinante do domínio metaloprotease, foi a solubilização da fração insolúvel com a utilização de sarcosil. Foi possível solubilizar grande parte das proteínas, no entanto não houve ligação à matriz cromatográfica, provavelmente por influência do sarcosil, que é um detergente iônico. Portanto, somente a construção referente ao domínio desintegrina pôde ser purificada e utilizada para a produção de anticorpos, que, no entanto, se mostraram ineficientes, devido à resposta ter sido gerada contra a proteína GST, que possui mais aminoácidos. Com isso, as perspectivas do projeto são melhorar as condições de purificação das proteínas correspondentes ao domínio metaloprotease e a ambos os domínios, para que se possam obter anticorpos mais eficientes, visto possuírem maior massa molecular. E com essas ferramentas poder se estudar algumas funções da ADAM23.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 <u>A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE DOMAIN</u>	10
2.1.1 Sequência sinal e pró-domínio	11
2.1.2 Domínio metaloprotease	12
2.1.3 Domínio desintegrina	12
2.1.4 Domínio rico e cisteína	13
2.1.5 Domínio semelhante a EGF, domínio transmembrana e cauda citoplasmática	13
2.2 ADAM23	2.2
2.3 ADAM23 E SUAS VARIANTES	16
2.4 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO DA PROTEÍNA ADAM23	17
3 OBJETIVOS	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T	18
4.2 MINIPREPARAÇÃO E REAÇÃO DE DIGESTÃO PARA ANÁLISE DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS	19
4.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO	20
4.4 EXPRESSÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>E.coli</i> A PARTIR DO VETOR pGEX-2T	20
4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DA MATRIZ CROMATOGRÁFICA GLUTATHIONA SEPHAROSE-4B	21
4.6 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE	22
4.7 WESTERN BLOTTING	22
4.8 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	23
4.9 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	23
4.9.1 Diminuição dos níveis de expressão	24
4.9.2 Diminuição na concentração do agente indutor	24
4.9.3 Utilização de agente caotrópico durante a lise	24
4.9.4 Utilização de Tween 20 durante a lise	25
4.10 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM A SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO	25
4.11 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	26
4.12 WESTERN BLOTTING PARA TESTE DO SORO IMUNE	27
5 RESULTADOS	27
5.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T	27
5.1.1 Digestão dos vetores pGEX-2T para a liberação dos insertos de ADAM23	27
5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>E.coli</i> A PARTIR DO VETOR pGEX-2T	29
5.2.1 Miniexpressão das colônias transformadas com produtos da ligação dos diferentes insertos de ADAM23 ao vetor pGEX-2T	30
5.2.2 Expressão em larga escala e purificação dos diferentes domínios de ADAM23 fusionados à GST	31
5.2.3 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING PARA VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO	32

5.3 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	34
5.3.1 Diminuição dos níveis de expressão	35
5.3.2 Diminuição na concentração do agente indutor	36
5.3.3 Utilização de agente caotrópico durante a lise	36
5.3.4 Utilização de Tween 20 durante a lise	37
5.4 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO	38
5.5 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	40
5.6 WESTERN BLOTTING PARA TESTE DO SORO IMUNE	41
6 DISCUSSÃO	42
6.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T	42
6.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>E.coli</i> A PARTIR DO VETOR pGEX-2T	43
6.3 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	45
6.3.1 Diminuição dos níveis de expressão	45
6.3.2 Diminuição na concentração do agente indutor	46
6.3.3 Utilização de agente caotrópico durante a lise	46
6.3.4 Utilização de Tween 20 durante a lise	47
6.4 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO	47
6.5 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	48
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, múltiplos tipos celulares são gerados de uma população inicial de células equivalentes. Essas células precisam, então, migrar e estabelecer os padrões que ao final levarão a formação de tecidos e órgãos durante a embriogênese. O destino celular depende de interações célula-célula e célula-matriz tanto estimulatórias quanto inibitórias, interações estas que têm sido amplamente estudadas no caso do sistema nervoso (SEALS, 2003).

Para que a complexa rede neuronal possa ser formada durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) existe a necessidade da migração neuronal e do direcionamento axonal. Nesses eventos, interações entre célula-célula e célula-matriz extracelular são imprescindíveis. Essas interações são importantes em processos de morfogênese tecidual e cicatrização e em casos patológicos, tais como invasão de células tumorais e metástase. Uma grande variedade de moléculas de adesão e proteases são importantes nesses eventos. Famílias de moléculas de adesão ancoradas à membrana incluem caderinas, imunoglobulinas, selectinas, integrinas (JULIANO, 2002). Uma nova família de moléculas de adesão tem sido descrita, sendo seus membros conhecidos como ADAM. (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease domain), também conhecidas como MDCs, são as únicas entre as proteínas de superfície celular que possuem domínios estruturais que atuam tanto na adesão celular quanto na proteólise (WOLFSBERG *et al.*, 1995). Já foram descritos 40 genes para ADAMs (http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html) em grande variedade de espécies de mamíferos, em *Caenorhabditis elegans*, em *Drosophila sp* e em *Xenopus sp*. Entretanto, tais genes não estão presentes em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou plantas (SEALS *et al.*, 2003).

Em mamíferos a expressão das ADAMs pode variar consideravelmente, muitas são exclusivas ou predominantes de estruturas reprodutivas, outras possuem expressão ampla e ainda há membros dessa família que possuem expressão tecidual específica. Dezesete (17) ADAMs são expressas no sistema nervoso

central (SNC), sugerindo estarem relacionadas com o desenvolvimento neural (SUN *et al.*, 2004; KÄRKKÄINEN *et al.*, 2000).

ADAM23/ MDC3 é um membro da família das ADAMs expressa principalmente no SNC. Animais deficientes para essa proteína apresentam problemas neurológicos, como tremor e ataxia e, sobrevivem no máximo duas semanas após o nascimento (SAGANE *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2001). ADAM23 possui domínio metaloprotease inativo, entretanto, é um ligante de integrina, podendo assim, estar envolvida com adesão de células de origem neural. A expressão predominante de ADAM23 no encéfalo tanto de embriões como de adultos, sugere sua participação no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2004). Devido à ausência de reagentes comerciais que proporcionem o estudo da proteína ADAM23, faz-se necessária à produção de tais reagentes pelos grupos interessados na elucidação de algumas de suas funções biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE DOMAIN

ADAMs são proteínas transmembranas tipo I, constituídas pelos seguintes domínios: metaloprotease, desintegrina, domínio rico em cisteína, EGF (domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal), transmembrana e citoplasmático. Sua estrutura é conservada e está relacionada com a família das metaloproteases de matriz (MMPs) e com as proteínas solúveis de veneno de cobra (SVMPs), nas quais não existe domínio transmembrânico (Figura 1) (WOLFSBERG *et al.*, 1995). Em vítimas de picada de cobra, essas metaloproteases e desintegrinas promovem hemorragia, sendo que as metaloproteases solúveis degradam membranas basais dos capilares (BJARSON *et al.*, 1995) e as desintegrinas solúveis ligam integrinas das plaquetas, através de uma seqüência tripeptídica RGD, inibindo sua agregação (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994).

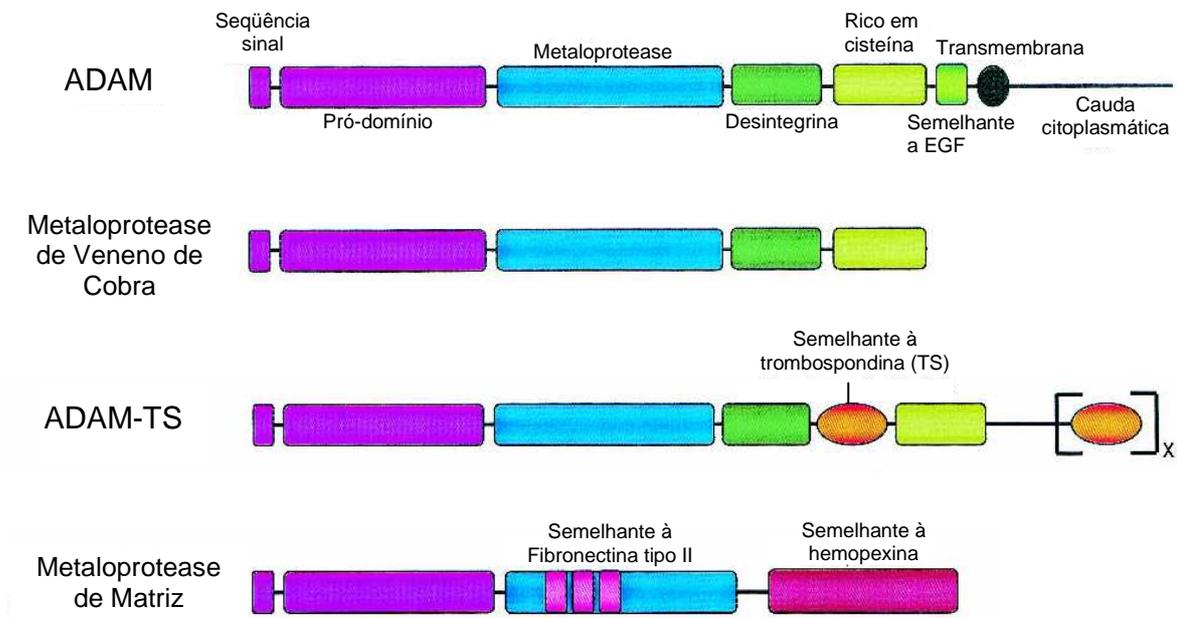


Figura 1. Estrutura típica das proteínas pertencentes à família das ADAMs e metaloproteases relacionadas. Representação da estrutura generalizada dos domínios da família das ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease domain), SVMPs (Metaloproteases de Veneno de Cobra), ADAMs com motivo Trombospondina (ADAM-TS) e MMPs (Metaloproteases de Matriz). Partindo-se da extremidade N terminal ADAM apresenta um peptídeo sinal, um pró-domínio, domínios metaloprotease e desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF), domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Nota-se que os membros da família ADAM-TS possuem número variável de motivos semelhantes à trombospondina (TS). O membro da família das MMPs mostrada é da classe das gelatinases. Outras subclasses de MMPs não apresentam seqüências semelhantes à hemopexina e/ou seqüências semelhantes à fibronectina tipo II. (adaptado COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

2.1.1 SEQUÊNCIA SINAL E PRÓ-DOMÍNIO

A extremidade N terminal das ADAMs contém uma seqüência sinal, que direciona a molécula para uma rota secretória e um pró-domínio, que mantém o sítio metaloprotease inativo. O pró-domínio exerce sua atividade através de um resíduo de cisteína que seqüestra esse domínio em uma conformação inativa. Sua remoção da proteína precursora está envolvida com a maturação desta e com ativação do sítio metaloprotease. Sua função secundária é auxiliar no dobramento correto da proteína, particularmente do domínio metaloprotease (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990; BECKER *et al.* 1995; SEALS, 2003).

As ADAMs são provavelmente sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e sofrem maturação no último compartimento do complexo de Golgi, maturação esta que envolve a remoção do pró-domínio da proteína precursora (LUM *et al.*, 1998)

2.1.2 DOMÍNIO METALOPROTEASE

O domínio metaloprotease de muitas ADAMs possui o sítio ativo consenso HExxHxxGxxH, no qual os resíduos de histidina ligam átomos de zinco, sendo essa ligação necessária para a atividade proteolítica da molécula, enquanto a glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. (LUM *et al.*, 1998; SEALS *et al.*, 2003; WOLFSBERG, *et al.*, 1995). Há uma notável conservação nesse sítio catalítico dentre as várias “metzincins”, que além das ADAMs, inclui as metaloproteases de matriz (MMP) e as ADAMs com motivo Trombospondina (ADAM-TS), no entanto cada proteína dentro de sua família tem características individuais distintas que conferem especificidade para substratos e inibidores de protease (Figura 1) (STOCKER *et al.*, 1995).

O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8 – 10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33-40 contém os resíduos do sítio ativo, e assim, são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 14, 22, 23, 29 e 32 codificam seqüências diferentes neste domínio e apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não está ativo (WOLFSBERG *et al.*, 1995; SAGANE *et al.*, 1998; BRACHVOGEL *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006). Numerosas ADAMs têm sido descritas como atuantes na clivagem de proteínas envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso e em casos patológicos, como por exemplo, a molécula de adesão L1, proteína príon e proteína precursora amilóide (KOIKE *et al.*, 1999; LAMMICH *et al.*, 1999; GUTWEIN *et al.*, 2000)

2.1.3 DOMÍNIO DESINTEGRINA

O domínio desintegrina mimetiza um local de ligação das proteínas de matriz, como a fibronectina, aos receptores de integrinas. Assim como a fibronectina, muitas ADAMs possuem uma seqüência consenso RGD ou ECD (equivalente ao RGD)

dentro de um trecho de 13 aminoácidos, chamado alça desintegrina, que confere ligação a integrinas (BLOBEL *et al.*, 1992). ADAM11, ADAM22 e ADAM23 têm uma seqüência conservada, AVN (E/D) CD, e podem ligar a mesma integrina. Esses exemplos demonstram que a seqüência presente na alça desintegrina tem papel crítico na especificidade da adesão às diferentes integrinas (SAGANE *et al.*, 1998).

Muitos estudos têm dado enfoque à função das ADAMs inativas proteoliticamente no desenvolvimento neural: várias mutações tanto no domínio desintegrina quanto no domínio rico em cisteína da proteína UNC71 de *C. elegans* (homóloga à ADAM14 já descrita como enzimaticamente inativa) resultaram em defeitos na trajetória de axônios de neurônios motores (HUANG *et al.*, 2003).

2.1.4 DOMÍNIO RICO EM CISTEÍNA

ADAMs 1, 3, 12 e 14 têm um motivo na sua região rica em cisteína que é muito similar a seqüências encontradas em peptídeos de fusão virais (BLOBEL *et al.*, 1992). Esse fato, juntamente com observações que mostraram que as ADAMs 1, 3 e 12 participam de reações de fusão celular, levaram à hipótese de que essa região está envolvida em fusão de membranas. Ela também pode complementar a capacidade de ligação do domínio desintegrina e, talvez, proporcione especificidade às interações mediadas por esse domínio. Além disso, já se sabe que essa região regula a atividade metaloprotease em ADAM13 de *Xenopus* (SEALS, 2003).

2.1.5 DOMÍNIO SEMELHANTE A EGF, DOMÍNIO TRANSMEMBRANA E CAUDA CITOPLASMÁTICA

O domínio semelhante à EGF, o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática nas ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutores de sinal entre o meio extracelular e intracelular. As caudas citoplasmáticas das ADAMs são muito variáveis tanto em tamanho quanto na sua seqüência e possuem motivos especializados que têm sido postulados como estando envolvidos na regulação da atividade metaloprotease a partir do meio intra para o meio extracelular, na regulação da sinalização celular a partir do meio extra

para o intracelular, e/ou no controle da maturação e da localização subcelular (SEALS, 2003). Essa região pode ainda conter sítios de ligação para proteínas possuidoras de domínio SH3 e sítios de fosforilação para serina/treonina e/ou tirosina quinases, podendo, assim, não somente regular a função da ADAM diretamente, mas também, prover interação com ligantes intracelulares possuidores de domínio SH2 nos resíduos resultantes de fosfotirosina (HOWARD, 1999; HOUGAARD, 2000; POGHOSYAN, 2001; SUN *et al.*, 2004).

2.2 ADAM23

ADAM23 pertence ao grupo das ADAMs predominantemente expressas no SNC, grupo este que inclui a ADAM11, ADAM22 e ADAM23. As seqüências protéicas dessas três ADAMs são particularmente similares e, devido a ausência do sítio metaloprotease catalítico, elas possivelmente atuam no cérebro através de seu domínio desintegrina (SAGANE *et al.*, 1998). Essa similaridade é corroborada pelo fato de que animais nocaute para ADAM23 apresentam fenótipo similar aos animais nocaute para ADAM22 (SAGANE *et al.*, 1999). Esses fatos sugerem que ADAM22 e ADAM23 possuem funções especiais, que não são redundantes e que não podem ser compensadas pelo aumento de expressão de outras ADAMs (YANG *et al.*, 2006). Em adição, estudos já demonstraram que ADAM22 é requerida em mamíferos para a correta mielinização de axônios do sistema nervoso periférico (SAGANE *et al.*, 2005).

ADAM23 é uma metaloprotease inativa, pois apresenta ausência do sítio de ligação ao zinco (SAGANE *et al.*, 1999), e é expressa predominantemente no SNC, principalmente nas células de Purkinje no cerebelo, no córtex cerebelar, no hipocampo e no gânglio basal, áreas importantes no controle das respostas ao movimento (MITCHEL *et al.*, 2001; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Camundongos mutantes para o gene da ADAM23 foram descritos como sendo menores que o normal, atáxicos, apresentando fortes tremores e morrendo depois de duas semanas após o nascimento (MITCHEL *et al.*, 2001). Embora os mecanismos subjacentes a esses sintomas ainda não estejam claros, eles podem estar relacionados à ausência de maturação neuronal e/ou degeneração neuronal. O envolvimento do gânglio basal e os claros sintomas dos animais nocaute para ADAM23 sugerem que essa

proteína pode exercer um papel biológico em desordens neurológicas que envolvem o gânglio basal, incluindo doenças como Parkinson e Huntington (YANG *et.al.*, 2006).

Cal e cols. (2000) mostraram que a ADAM23 interage *in vitro* com a integrina $\alpha\beta3$ e promove adesão celular por um motivo AVNECDIT do domínio desintegrina. Sabe-se que essa integrina é abundantemente expressa nas células da glia radial durante o desenvolvimento de camundongos e pode estar facilitando a migração neuronal dentro do SNC (HIRSCH *et al.*, 1994; CAL *et.al.*, 2000).

Já foi demonstrado que o domínio desintegrina da ADAM23 promove adesão em células de neuroblastoma de forma dose-dependente. Máxima adesão foi detectada na presença de cátions divalentes, o que converge com a informação de que a atividade de muitas integrinas é regulada por íons divalentes. Logo, os efeitos de adesão celular promovidos pela ADAM23 são mediados por sua interação com integrina, especificamente com $\alpha\beta3$. Essa interação foi demonstrada quando células que expressavam integrina $\alpha\beta3$ funcional ($\beta3$ -CHO -chinese hamster ovary) foram semeadas sobre poços recobertos pelo domínio desintegrina de ADAM23 e aderiram mais em comparação com células CHO que expressavam a integrina $\alpha5\beta1$. Esta interação entre ADAM23 e $\alpha\beta3$ foi evidenciada ao se bloquear a função desta integrina usando um anticorpo monoclonal anti- $\alpha\beta3$. Foi verificado que, mesmo em presença de ADAM23, a adesão da linhagem $\beta3$ -CHO diminuiu substancialmente na presença do anticorpo anti- $\alpha\beta3$ (CAL *et al.*, 2000).

Interessantemente, $\alpha\beta3$ atua na proliferação de precursores de oligodendrócitos em cérebros perinatais (BARON *et al.*, 2001) e parece ser necessária para maturação de sinapses hipocâmpais excitatórias (CHAVIS & WESTBROOK, 2002), além disso, $\alpha\beta3$ é abundantemente expressa nas células gliais radiais durante o desenvolvimento de camundongos (CAL *et al.*, 2000; HIRSH, 1994). Assim, pode estar ocorrendo uma interação entre ADAM23 e $\alpha\beta3$, no sentido de facilitar a migração dos neurônios no SNC (CAL *et al.*, 2000), uma vez que as células da glia radial dão suporte à migração dos neurônios (ZIGMOND *et al.*, 1999).

Sabendo-se que eventos de adesão célula-célula e célula matriz extracelular são de grande importância para a formação da rede neural, pode ser que alguns destes eventos estejam sendo modulados pela ADAM23 que interage especificamente com $\alpha\beta3$ (CAL *et al.*, 2000). Em adição à função potencial de

ADAM23 em processos normais, esta pode ainda favorecer a progressão tumoral através da facilitação das interações célula-célula mediadas por integrina. Consistente com esse fato, já foi demonstrado que $\alpha\beta3$ está envolvida na progressão de melanoma e na indução de neovascularização por células tumorais (BROOKS *et al.*, 1994; RUOSLAHTI, 1997; CAL *et al.*, 2000).

Em células P19 pluripotentes, ADAM23 está distribuída uniformemente na superfície celular, consistente com o fato de que ela é transmembrana. Já nas células em diferenciação, sua distribuição se torna assimétrica antes da formação do neurito e, ao final, existe mais ADAM23 na parte proximal do neurito do que em outras partes do neurônio. Já se demonstrou que moléculas de adesão e proteínas extracelulares podem afetar a diferenciação do axônio e dos dendritos em cultura de neurônios hipocâmpais. Logo, é possível que ADAM23, através de sua interação com integrinas ou outras proteínas, esteja envolvida na formação de neuritos pela modulação das condições de adesão do neurito à matriz extracelular (SUN *et al.*, 2007).

2.3 ADAM23 E SUAS VARIANTES

Sun e colaboradores (2004) identificaram uma isoforma da ADAM23 (ADAM23 α) humana, chamada ADAM23 γ , que não possui o domínio transmembrana e que é principalmente expressa em cérebros de embriões e neonatos, e uma isoforma, chamada ADAM23 β , cujo domínio transmembrana é codificado por um éxon ainda não descrito, ambas provenientes de processamento alternativo do RNA. Interessantemente, o padrão de expressão temporal da subunidade $\alpha\gamma$ durante o desenvolvimento de camundongos é de certo modo coincidente temporalmente com o da ADAM23 γ , a qual é principalmente expressa em encéfalos de embriões e neonatos. O nível de mRNA de ambas diminui drasticamente após o nascimento, desaparecendo no SNC de camundongos adultos. Logo, a interação entre ADAM23 γ e $\alpha\gamma$ pode ser importante em algum estágio durante o desenvolvimento cerebral. Em alguma extensão, ADAM23 γ pode estar competindo com ADAM23 α e β por $\alpha\gamma$, prevenindo a ligação de $\alpha\beta3$ a outras moléculas, e assim modulando as interações célula-célula e célula-matriz. Todos esses fatos corroboram ainda mais para o fato de que ADAM23 tem importante

papel no SNC (SUN *et.al.*, 2004).

Goldsmith e colaboradores (2004) demonstraram que células granulares cerebelares (CGCs) sintetizam duas formas glicosiladas de ADAM23 com massas moleculares aproximadas de 70 kDa (ADAM23^{70kDa}) e de 100 kDa (ADAM23^{100kDa}), e ambas estão presentes na célula. ADAM23^{100kDa} representa a forma imatura da proteína (cuja massa predita é de 92 kDa), enquanto ADAM23^{70kDa} corresponde a forma madura, na qual há ausência do pró-domínio e cuja massa teórica é de 61 kDa. Essa hipótese foi levantada, visto a ADAM23 possuir um motivo de reconhecimento para uma pró-proteína convertase entre seu pró-domínio e seu domínio metaloprotease, e esse fato sugere que não só as ADAMS cataliticamente ativas são processadas por pró-proteínas convertase (GOLDSMITH *et.al.*, 2004).

2.4 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO DA PROTEÍNA ADAM23

Um dos grandes desafios da neurociência é explicar como os axônios e dendritos crescem, encontram seus alvos e estabelecem seletivamente sinapses com estes alvos, formando uma complexa rede funcional. Levando-se em consideração alguns aspectos: que a ADAM23 é predominantemente expressa no SNC; e também o dramático fenótipo de camundongos nocaute, é possível que ela possua papel-chave na biologia do sistema nervoso. Essas várias considerações nos levam a investigar o papel biológico da ADAM23, mas para isso são necessários reagentes específicos que possam reconhecê-la em diversos ensaios bioquímicos e funcionais. Neste contexto, anticorpos policlonais que reconheçam o antígeno de interesse mostram-se adequados como ferramenta no estudo da função biológica da proteína ADAM23.

3 OBJETIVOS

Expressar domínios da proteína ADAM23 humana em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* a partir do vetor de expressão pGEX-2T.

Purificar as proteínas obtidas com o uso da matriz cromatográfica Glutathione Sepharose.

Obter anticorpos policlonais contra os diferentes domínios da proteína ADAM23.

Utilizar os reagentes obtidos em ensaios bioquímicos, tais como Western Blotting e ELISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T

Um fragmento gênico contendo 549 pares de bases correspondente ao domínio metaloprotease (construção 1, aa 293-496), um fragmento gênico contendo 225 pares de bases correspondente ao domínio desintegrina (construção 2, aa 499-585) e um fragmento contendo 813 pares de bases correspondentes aos domínios supracitados juntos (construção 3, aa 293-585), todos provenientes da proteína ADAM23 humana, foram obtidos por meio de PCR (polimerase chain reaction), a partir de cDNA da molécula inteira, proveniente da construção pcDNA- *Adam 23*-HA (CAL *et al.*, 2000) cedida gentilmente por Santiago Cal (Figura 2). Os oligonucleotídeos iniciadores que serão usados são: foward 5'-CGGGATCCATGAAATATTTGGAAGCTTATGATTG-3' e reverse 5'-CGGAATTCTCATGGCCTGTTGAAAAGGC-3' para a construção 1; foward 5'-CGGGATCCGAAGCTGGGGAGGAGTGTG-3' e reverse 5'-CGGAATTCTCAATGAAGATTTGGTGGGCAC-3' para a construção 2 e, para a construção 3 a combinação do foward da construção 1 com o reverse da construção 2. Os fragmentos amplificados foram clivados com as endonucleases de restrição *Bam HI* e *EcoRI* e clonados no vetor pGEX 2T (Pharmacia Biotech) digerido com as mesmas endonucleases. Essas construções permitiriam a expressão dos diferentes domínios da proteína ADAM23 fusionados à proteína Glutathiona S-Transferase (GST) de *Schistosoma mansoni*.

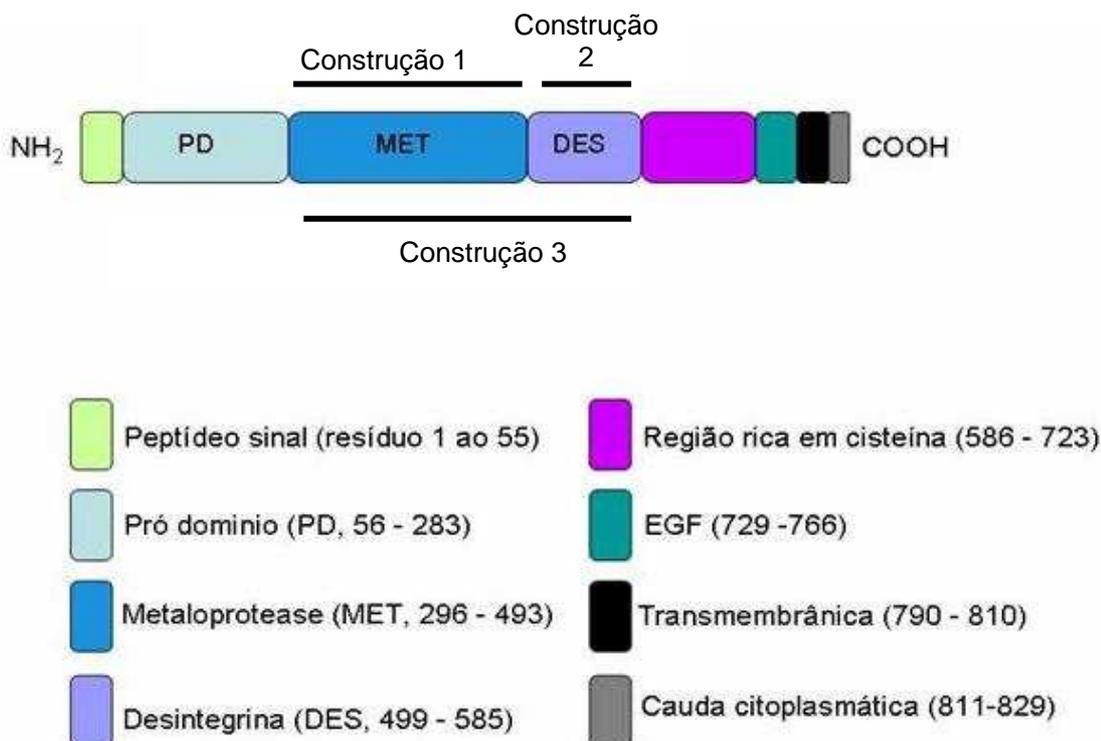


Figura 2. Estrutura primária e domínios presentes na proteína ADAM23. A figura também mostra as três diferentes construções da proteína feitas para serem expressas em sistema pGEX-2T.

4.2 MINIPREPARAÇÃO E REAÇÃO DE DIGESTÃO PARA ANÁLISE DOS PLAMÍDEOS PURIFICADOS

Bactérias eletrocompetentes da cepa DH5 α foram transformadas com as construções da proteína ADAM23. Foi usado um pulso de 1,4 kV em eletroporador (BioRad). As bactérias DH5 α , após transformação, foram recuperadas em 1ml de meio LB (10g/l peptona de soja, 5g/l de extrato de levedura e 10g/l de NaCl) sem antibiótico por 1 hora a 37°C em estufa. Após 1 hora alíquotas de 10, 20, 50 e 100 μ l da suspensão de bactérias foram plaqueadas em meio sólido (10g/l de peptona de soja; 5g/l de extrato de levedura e 10g/l de NaCl e 15g/l de ágar) mais antibiótico (100 μ g/ml de ampicilina) e crescidas por 16 horas a 37°C em estufa. Foram feitos pré-inóculos com cada uma das construções em 5ml de meio LB líquido mais antibiótico, cultivados por 16 horas a 37°C sob agitação constante (agitador Certomat-BS1). Centrifugou-se 3 ml da cultura saturada a 13,4 rpm (minicentrífuga Eppendorf) por 1 minuto para obtenção de um sedimento de células. Procedeu-se,

então, a produção de minipreparações fazendo-se uso do Kit Eppendorff (FastPlasmid™ Mini, Hamburg-Alemanha) para Minipreparações.

4.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO

Para a confirmação da presença do inserto nas preparações dos vetores foi realizada a digestão de 5 µl das minipreparações (tipicamente 200 µg de plasmídeo) com as enzimas de restrição BamHI (20U/µl) e EcoRI (20U/µl), que cortam o vetor nas extremidades mais distais do sítio de policlonagem liberando assim os insertos. Depois de estabelecidas as condições da reação para 15 µl de volume final, os tubos contendo as amostras foram centrifugados rapidamente e após digestão (16 horas a 37°C) foi aplicado tampão de amostra Loading Dye (Fermentas) 1X aos produtos das digestões e então aplicadas em gel de agarose 0,8% para separação eletroforética. O gel foi incubado com solução de brometo de etídeo e visualizado em U.V.

4.4 EXPRESSÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE *E. coli* A PARTIR DO VETOR pGEX-2T

Bactérias de cepa de *E. coli* BL 21 (Novagen Co.) quimiocompetentes (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) foram transformadas com diferentes construções de ADAM23.

Com as colônias recombinantes, foi feito um pré-inóculo de 2 ml de meio 2XYT (16g/l de peptona de caseína; 10g/l de extrato de levedura; 5g/l de NaCl) contendo 100 µg/ml de ampicilina. O pré-inóculo permaneceu por 16 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm. Após o tempo de crescimento, obedecendo a uma diluição de 1:50, 150 µl de pré- inóculo foram adicionados a 8 ml de meio 2XYT com antibiótico. Esses inóculos permaneceram sob agitação a 37°C até atingirem Abs₆₀₀ entre 0,6 – 0,8. Alíquotas de 1 ml foram coletadas para posterior caracterização das culturas não induzidas. A partir desse momento iniciou-se a indução da expressão protéica com a adição de um análogo da lactose, o isopropyl β D-thiogalactoside (IPTG) na concentração de 0,1 mM e após 2 horas de indução, alíquotas de 1 ml

foram coletadas para caracterização das culturas induzidas. Para a verificação do padrão de expressão protéica entre as diferentes colônias, foi feita uma separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS–PAGE) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) com amostras das colônias não induzidas e induzidas. Os clones de cada construção com melhor padrão de expressão foram escolhidos para serem expandidos.

Foi feito um pré-inóculo em 50 ml de meio 2XYT com ampicilina para cada construção, e estes ficaram crescendo por 16 horas a 37°C sob agitação. Após o tempo de crescimento, obedecendo a uma diluição de 1:50, 8 ml de pré- inóculo foram adicionados a 400 ml de meio 2XYT com antibiótico. Esses inóculos permaneceram sob agitação a 37°C até atingirem Abs₆₀₀ entre 0,6 – 0,8. Alíquotas de 1 ml foram coletadas para posterior análise. A partir desse momento iniciou-se a indução da expressão protéica com a adição de IPTG na concentração de 0,1 mM. Após 3 horas de indução, alíquotas de 1 ml foram coletadas e as culturas bacterianas foram centrifugadas por 15 minutos a 5 000 x g. Os sobrenadantes foram então descartados completamente, e as culturas sedimentadas colocadas em gelo, sendo então ressuspensas em 20 ml de tampão de lise (PBS 1X pH 7,4; 1mg/ml de lisozima; 2 mM PMSF) e permanecendo sob incubação em banho de gelo por 15 minutos (para melhor atividade da lisozima) e, posteriormente, submetidos a lise mecânica em prensa de French (1000psi). Logo após, foi adicionado aos lisados Triton-X100 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 9 000 x g. Os sobrenadantes deste clareamento foram filtrados em membrana de 0,45 µm e as frações insolúveis foram analisadas.

4.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DA MATRIZ CROMATOGRÁFICA GLUTATHIONA SEPHAROSE-4B

Um volume de 270 µl da matriz cromatográfica Glutathiona-Sepharose 4B (Amersham Biosciences), 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 16 horas sob agitação. Posteriormente as suspensões foram

centrifugadas (5000 rpm) para a recuperação da matriz e esta passou por uma série de três lavagens com PBS. As proteínas ligadas na resina foram eluídas com tampão de glutathiona reduzida (10mM de glutathiona reduzida em 50mM de Tris-HCl pH 8,0) em cinco frações de 200 µl. As frações que continham proteínas eluídas (somente a proteína correspondente ao domínio desintegrina fusionado à GST) foram combinadas e dialisadas contra 6 litros de PBS, 1mM PMSF a 4°C para a retirada da glutathiona livre.

4.6 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE

As proteínas correspondentes aos diferentes domínios de GST-ADAM23 provenientes da eluição (EI), juntamente com alíquotas da resina após eluição (Res), da fração do lisado que não se ligou à resina (Void), da lavagem da resina (Lav), da fração insolúvel (pellet - Pel) e das colônias bacterianas não induzidas (NI) e induzidas (3h) foram resolvidas por SDS-PAGE 12%.

4.7 WESTERN BLOTTING

As amostras separadas através de SDS – PAGE foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm – Amersham Biosciences, USA) durante 16 horas sob voltagem de 25 V em tampão gelado (190 mM glicina, 25 mM Tris, 20% MeOH). As membranas foram bloqueadas durante duas horas com TBST (129mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé). Foi utilizado o anticorpo primário anti-GST na concentração de 1:2000 diluído em tampão de bloqueio, com o qual a membrana foi incubada por 16h 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 peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:4000. A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagem se repetiu, sendo a membrana então incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Um auto-

radiograma (Kodak) foi exposto à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

4.8 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

A produção de anticorpos policlonais contra o domínio desintegrina fusionado à GST foi realizada como descrito por Harlow e Lane (1998). Primeiramente, foram coletados 500 µl de sangue através do plexo orbital de quatro camundongos da linhagem Balb/C, devidamente identificados (como MØ84 a MØ87) para obtenção de soro pré-imune antes do início das imunizações. Após coleta do sangue, o mesmo foi mantido em estufa a 37°C por 1 hora para retração do coágulo. O soro foi então separado do coágulo por centrifugação a 4 rpm (centrífuga Eppendorff 5810R rotor A-4-62) por 10 minutos a 4°C, aliquotado e estocado a -20°C.

A primeira imunização dos camundongos (intraperitonealmente) foi feita com 50 µg da proteína recombinante purificada por animal e emulsificada com 50 µl de adjuvante completo de Freund, o qual possui bactérias *Mycobacterium tuberculosis* mortas e funciona como um estimulador não específico da resposta imune (HARLOW & LANE, 1998). Além da proteína, foram adicionados 16 µl de Al(OH)₃ (hidróxido de alumínio a 62 mg/ml) e 14 µl de PBS 1X. As demais imunizações foram realizadas a cada 15 dias sob as mesmas condições, apenas modificando o adjuvante para adjuvante incompleto de Freund.

Após a quarta imunização, foi feita a primeira coleta de soro imune do animal, o qual foi, posteriormente testado por ELISA e Western Blotting.

4.9 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

Visto as proteínas GST-metaloprotease e GST-metaloprotease + desintegrina terem permanecido na fração insolúvel do lisado bacteriano, modificações no protocolo baseadas nas literaturas abaixo foram realizadas na tentativa de solubilizar estas proteínas. Os testes foram feitos somente com uma das construções, a que

corresponde à GST-metaloprotease, pois, como apresentou melhor padrão de expressão, poderia facilitar a padronização das novas modificações (RUDOLPH & LILIE, 1996; CLARK, 1998; SAMBROOK & RUSSEL, 2001; TSUMOTO *et.al.*, 2002; WHITE, 2003).

4.9.1 Diminuição nos níveis de expressão

O protocolo para a expressão em larga escala é o mesmo já explicitado anteriormente. As modificações sofridas foram estas: diminuição na temperatura de crescimento das bactérias de 37°C para 20°C; diminuição no tempo de indução de 3 para 2 horas e aumento na aeração durante o crescimento bacteriano. Tudo isso foi feito na tentativa de melhorar a expressão protéica, possibilitar um tempo maior de dobramento e melhorar a solubilização das proteínas.

4.9.2 Diminuição na concentração do agente indutor

A modificação feita no protocolo foi a diminuição do agente indutor IPTG, cuja concentração inicial era de 0,1 mM e foi modificada para 0,05 mM, também com o intuito de diminuir os níveis de expressão.

4.9.3 Utilização de agente caotrópico durante a lise

A última condição imposta à purificação foi a adição de um agente caotrópico ao tampão de lise, a uréia na concentração de 3 M, concentração esta que permitiria a desnaturação parcial da proteína ao mesmo tempo em que não interferiria na ligação da proteína à matriz cromatográfica

4.9.4 Utilização de Tween 20

A condição imposta para essa nova tentativa foi a modificação do detergente usado durante a lise. Após ser passado na Prensa de French o lisado passou por uma incubação com detergente durante 30 minutos sob agitação constante. O detergente anteriormente utilizado foi o Triton X-100, que nesse experimento foi substituído por Tween 20 na concentração final de 2%.

4.10 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO

Visto os resultados das metodologias anteriores terem demonstrado que a proteína continuou na fração insolúvel do lisado bacteriano, partiu-se para uma nova tentativa. Foi feita uma nova transformação química das bactérias BL21 (DE3) com o produto da minipreparação do plasmídeo correspondentes ao domínio metaloprotease.

Dentre as colônias transformadas, 4 foram escolhidas para se fazer uma expressão em pequena escala, e a colônia com melhor padrão de expressão foi selecionada para ser feita uma expressão em larga escala, que segue o mesmo protocolo das outras expressões (abaixamento de temperatura, diminuição de tempo de indução, aumento de aeração, utilização de Tween 20), a única modificação foi a submissão do lisado bacteriano à sonicação (3 ciclos de 1 minuto cada).

A novidade desse protocolo foi solubilizar a fração insolúvel do lisado bacteriano uma com a utilização de um tampão contendo um detergente diferente, o sarcosil (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1,5% sarcosil) (PHARMACIA; RUDOLPH & LILIE, 1996; SAMBROOK & RUSSEL, 2001; TSUMOTO *et.al.*, 2002; WHITE, 2003). Após a solubilização, a suspensão passou por 3 ciclos de sonicação de 1 minuto, logo após, foi passada 4 vezes na prensa de French e centrifugada a 9 000 X g por 15 minutos a 4°C. A fração solúvel resultante foi filtrada em membrana de 0,45 µm e incubada por 3 horas com a matriz cromatográfica previamente equilibrada. Foram feitas 2 eluições com 400µl cada conforme o protocolo de eluição já descrito anteriormente. As amostras da primeira e

da segunda purificação foram submetidas à SDS-PAGE 12% para análise dos resultados.

4.11 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Ensaio de ELISA de captura de anticorpo foram empregados para se analisar a eficiência dos anticorpos. O método consistiu em sensibilizar doze poços da placa de ELISA com 0,1 µg das seguintes proteínas (antígenos): GST purificada (quatro poços), domínio desintegrina fusionado à GST (quatro poços) e ⁶His-ADAM23 (quatro poços) todas em 50 µl de tampão carbonato 50mM pH 9,7. A placa com a solução de antígeno foi deixada a 4°C por aproximadamente 16 horas, para que a proteína fosse devidamente adsorvida na placa. No dia seguinte, a placa foi lavada com solução de PBST 0,05% e então bloqueada por 1h a 37°C com 100 µl da solução de bloqueio PBS-BSA 1%. A solução de bloqueio foi descartada e cada um dos soros imunes dos camundongos MØ84, MØ85, MØ86 e MØ87 foram adicionados na diluição de 1:100 à solução de PBS-BSA 0,1% e colocados em um poço contendo GST, outro contendo desintegrina fusionada à GST e outro contendo ⁶His-ADAM23. Para que os anticorpos presentes no meio se ligassem devidamente ao antígeno, deixou-se a placa incubando por 2 a 3 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBST 0,05%, e cada poço incubado por 45 minutos a 37°C com 100 µl de solução de anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à enzima peroxidase (1:5000), em solução de PBS-BSA 0,1%. Novamente a placa foi lavada e então foram adicionados a cada poço 100 µl da solução de revelação: tampão citrato (50mM fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (o-fenildiamina) (0,2mg/ml) e peróxido de hidrogênio 30% (2 µl/ml). Após 15 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a revelação foi interrompida com 100 µl por poço de solução de ácido sulfúrico 2M, possibilitando a leitura em leitor de microplacas com filtro de 490nm.

4.12 WESTERN BLOTTING PARA TESTE DO SORO IMUNE

Extrações de proteínas totais de encéfalo de camundongos adultos, bem como frações enriquecidas de proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio preparadas como previamente descrito (MARTINS *et al.*, 1997) foram submetidas à SDS-PAGE 10% (100 µg de proteína por poço) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi utilizada para ensaio de Western Blotting. Os soros imunes dos camundongos MØ84, MØ85, MØ86 e MØ87 foram testados na diluição de 1:500; como controle negativo utilizou-se o soro não imune dos animais e como controle positivo utilizou-se um anticorpo anti- ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005). O anticorpo comercial anti-imunoglobulina de camundongo acoplado à peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário na diluição de 1:4000. Para a verificação da reação antígeno-anticorpo seguiu-se o protocolo de revelação já supracitado.

5 RESULTADOS

5.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T

5.1.1 Digestão dos vetores pGEX-2T para liberação dos insertos de ADAM23

Os fragmentos de cDNA clonados no vetor pGEX-4T-2 foram liberados por dupla digestão como descrito no item 4.3. A figura 3 representa os resultados das digestões. A figura revela a presença de fragmentos de DNA com massas aproximadas de: 549 pb, 225 pb e 813 pb, que correspondem, respectivamente, aos tamanhos dos insertos dos domínios metaloprotease, desintegrina e de ambos os domínios, embora a banda de desintegrina não esteja evidente.

Em função de desvantagens e dificuldades anteriormente encontradas na obtenção da proteína ADAM23 com etiqueta de seis histidinas, resolveu-se mudar para o sistema pGEX que, como se verá adiante, se mostrou mais eficaz na

produção da proteína ADAM23 recombinante. Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que a digestão dos vetores foi eficiente (figura 3), pois os fragmentos de DNA corresponderam às massas moleculares esperadas para os insertos dos domínios de ADAM23 (700pb). A partir desta confirmação, foi possível iniciarem-se os ajustes dos protocolos para a expressão e purificação das três construções da proteína ADAM23.

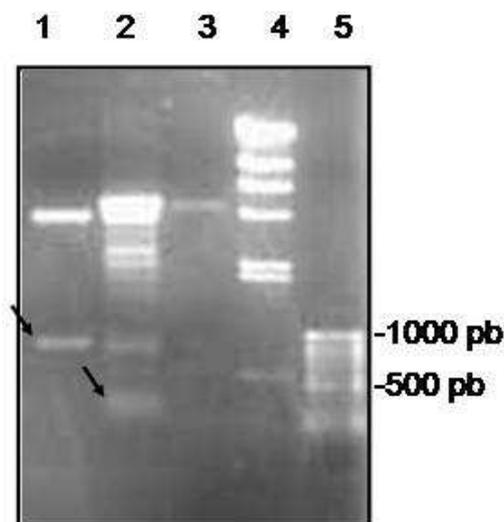


Figura 3. Digestão dos vetores pGEX- 2T contendo os insertos para os diferentes domínios de ADAM23. As enzimas de restrição utilizadas foram BamHI (20U/ μ l) e EcoRI (20U/ μ l), que cortam o vetor nas extremidades mais distais do sítio de policlonagem liberando assim os insertos, na presença de tampão ótimo Buffer Red 1X (Fermentas). Foram utilizados 5 μ l das minipreparações, estimadamente 200 μ g de DNA. Após digestão (16h a 37°C) foi aplicado tampão de amostra 1X aos produtos das digestões e então aplicadas em gel de agarose 0,8% para separação eletroforética. Foram utilizados os marcadores de massa molecular λ Hind (canaleta 4) e Gene Ruller (canaleta 5). Os produtos da digestão dos vetores pGEX-2T-metaloprotease (canaleta 2) e pGEX-2T-metaloprotease+desintegrina (canaleta 1) deixam claro que houve a liberação dos insertos (549 e 813 pb, respectivamente) e que o vetor contém o gene de interesse. Com relação a pGEX-2T-desintegrina (canaleta 3), não foi possível visualizar a banda de interesse, pois o inserto desse domínio possui poucos pares de bases (225 pb), dificultando a visualização.

5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE *E. coli* A PARTIR DO VETOR pGEX-2T

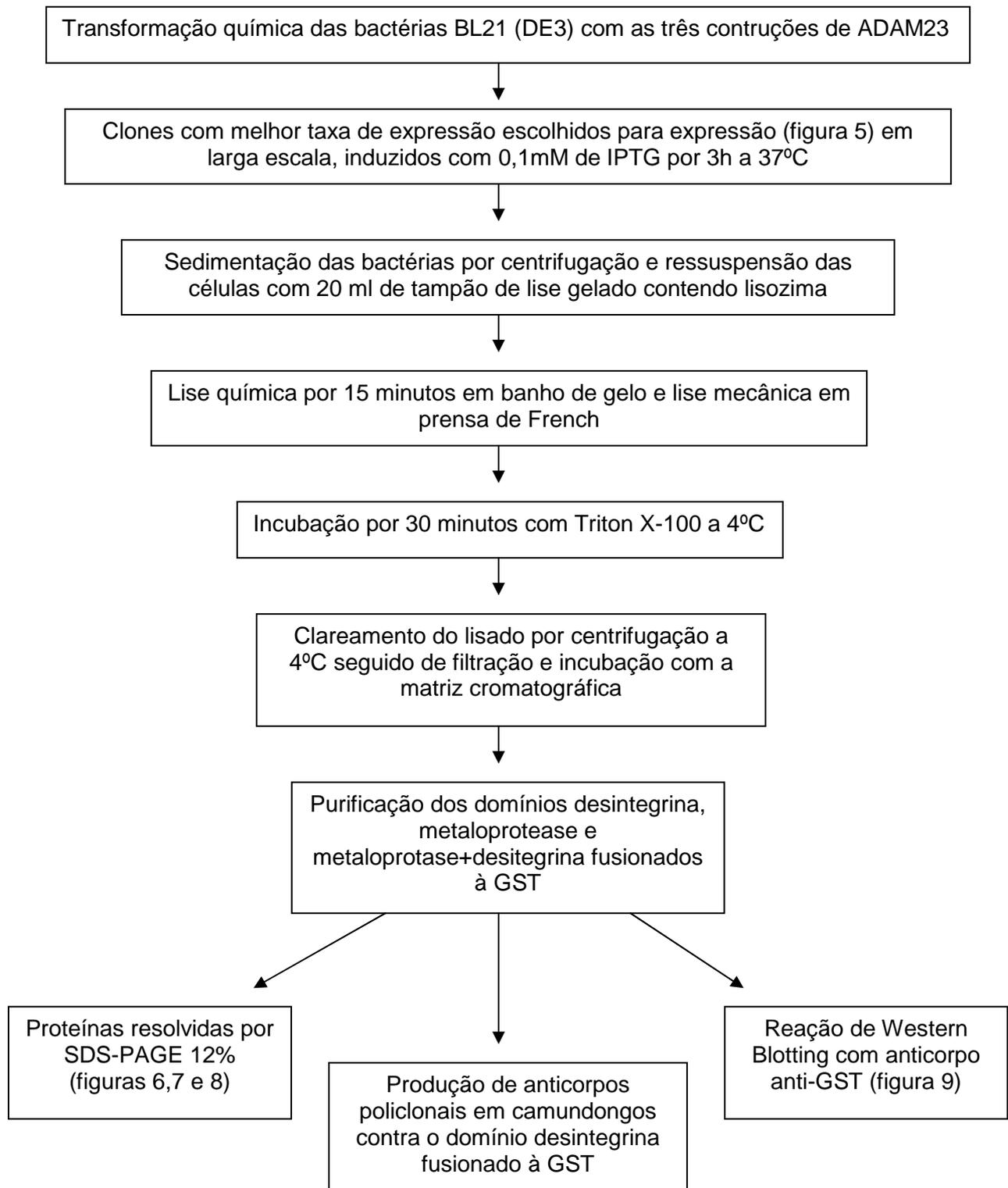


Figura 4. Fluxograma das etapas da expressão e purificação da proteína recombinante 6His-Rnd1. Detalhes em materiais e métodos.

5.2.1 Miniexpressão das colônias transformadas com produtos da ligação dos diferentes insertos de ADAM23 ao vetor pGEX-2T

Produtos da ligação do vetor pGEX-2T com os diferentes insertos de ADAM23, após sua purificação pela técnica de minipreparação, foram utilizados para transformar bactérias quimiocompetentes da cepa de BL21(DE3). Clones contendo o plasmídeo foram selecionados por antibiótico (ampicilina). Para a verificação do padrão de expressão, foi feita uma miniexpressão com 4 colônias de cada construção, escolhidas aleatoriamente. Amostras das colônias antes da indução e após 2h de indução foram submetidas à SDS-PAGE 12% (Figura 5). As colônias que expressaram os domínios da proteína GST-ADAM23 foram selecionadas para a realização da expressão em larga escala (1 colônia de cada construção).

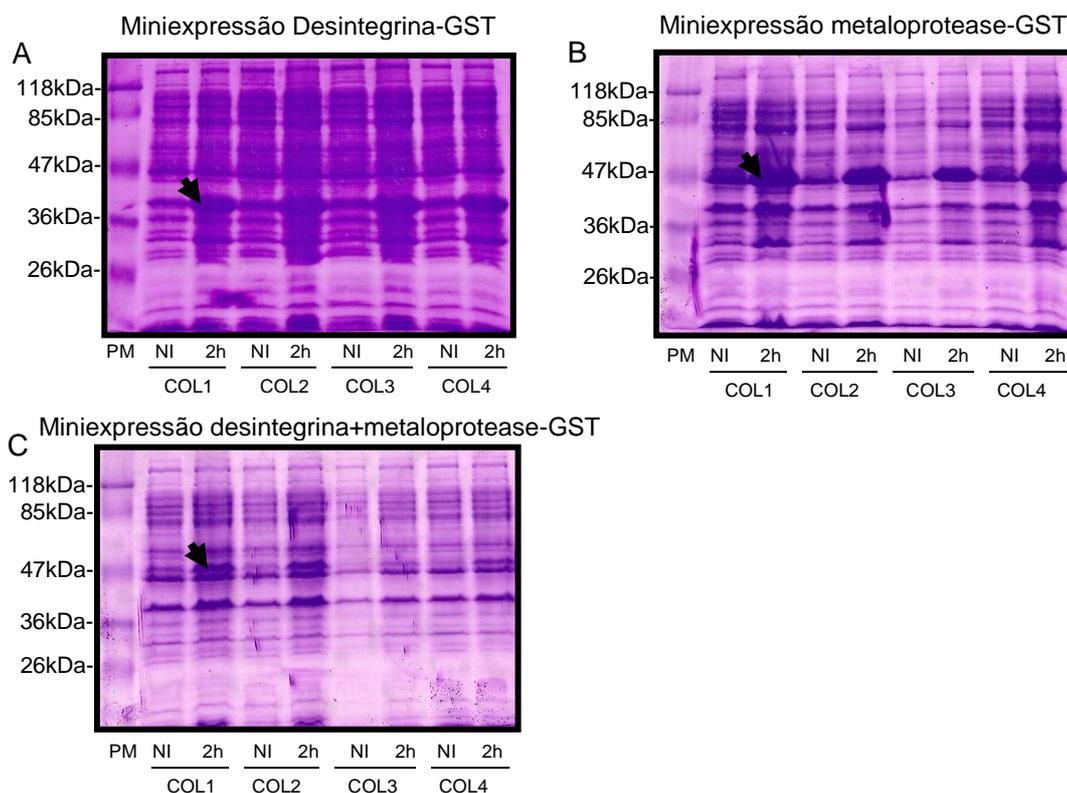


Figura 5: Análise da miniexpressão dos diferentes domínios da proteína GST-ADAM23 a partir do vetor pGEX-2T em gel de poliacrilamida 12%. A figura A mostra a expressão do domínio desintegrina; a B do domínio metaloprotease, e a C de ambos os domínios. Os 3 géis mostram uma ordem de 4 diferentes colônias, cada uma das quais com amostras da colônia não induzida (NI) e após 2h de indução (2h). A primeira canaleta refere-se ao peso molecular (PM). Nas colônias após indução, observa-se na figura A uma banda de aproximadamente 34kDa, referente ao domínio desintegrina fusionado à GST. Na figura B observa-se uma banda de aproximadamente 46 kDa, referente ao domínio metaloprotease fusionado à GST e na figura C observa-se uma banda de aproximadamente 55 referente a ambos os domínios mais GST.

5.2.2 Expressão em larga escala e purificação dos diferentes domínios de ADAM23 fusionados à GST

Após verificar-se que as bactérias transformadas estavam realmente expressando as proteínas recombinantes, foram escolhidas as colônias com melhor padrão de expressão para serem expandidas e induzidas a expressar os diferentes domínios da proteína ADAM23.

As culturas bacterianas após indução foram centrifugadas e as células sedimentadas foram lisadas quimicamente e mecanicamente na prensa de French. Os lisados também passaram por uma incubação com Triton X-100, centrifugação e filtração, incubação com a matriz cromatográfica. Após recuperação da matriz por centrifugação, realizou-se uma seqüência de lavagens, eluição das proteínas e determinação da concentração protéica.

Amostras do lisado bacteriano antes de ser incubado com a resina (Lis), do lisado após incubação com a resina (Void), da lavagem da matriz cromatográfica para desligamento de ligações inespecíficas (Lav), da resina após a eluição (Res), da fração insolúvel do lisado bacteriano (pellet - Pel) e dos eluatos foram analisadas por SDS-PAGE 12% . Também foram analisadas amostras brutas das culturas não induzidas (NI) e induzidas (3h).

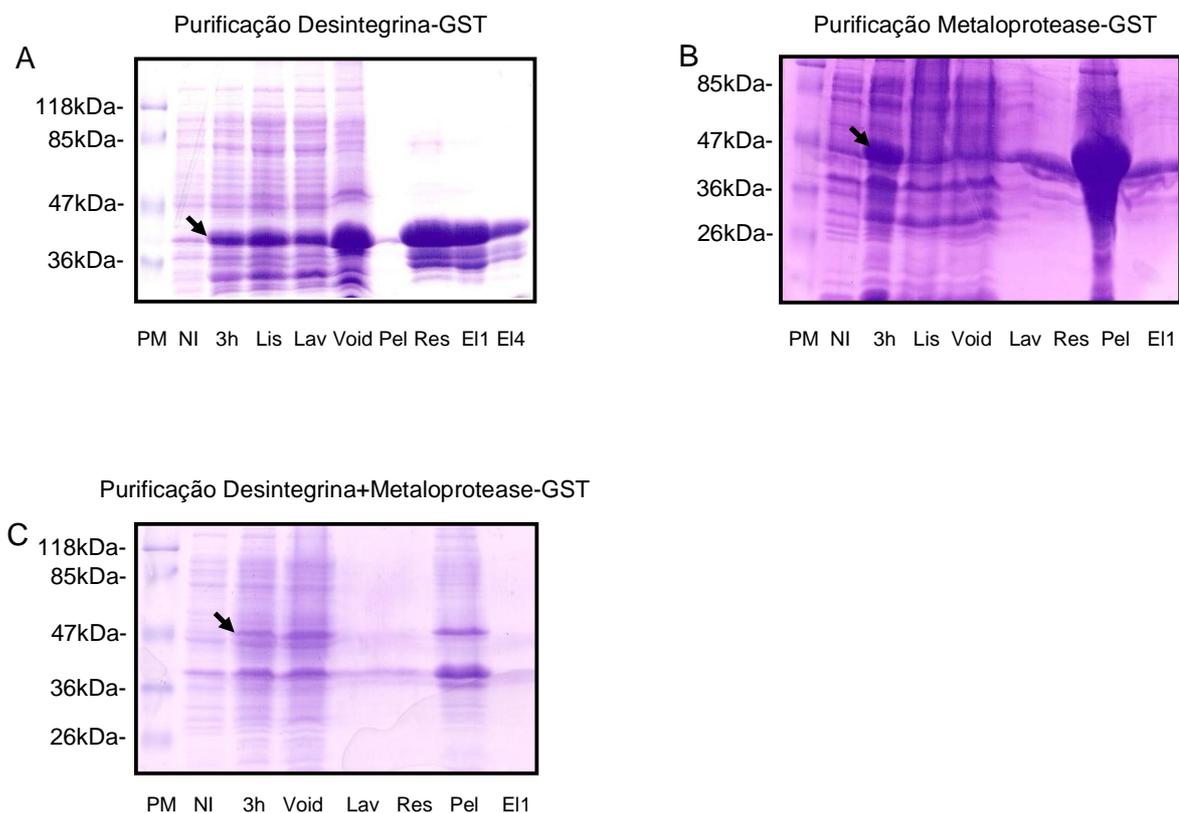


Figura 6: Expressão em larga escala e purificação dos diferentes domínios da proteína GST-ADAM23. A figura representa as expressões e purificações dos domínios desintegrina (figura A), metaloprotease (figura B) e de ambos os domínios (figura C). Nos géis das figuras A e B foram aplicadas as seguintes amostras: marcador de massa molecular (PM), cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (3h), lisado bacteriano antes da incubação com a resina (Lis), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), resina (Res), fração insolúvel (pellet - Pel) e diferentes frações do eluato (EI). Na figura C foram aplicadas as mesmas amostras, com exceção da amostra do lisado antes da incubação com a resina (Lis). Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 34 kDa correspondente ao domínio desintegrina fusionado à GST (figura A). A proteína foi eluída, embora uma parte tenha ficado ligada à resina. Também pode-se verificar nas culturas induzidas bandas na altura de aproximadamente 46 kDa correspondente ao domínio metaloprotease-GST (figura B) e na altura de 55 kDa correspondente a ambos os domínios fusionados à GST (figura C), demonstrando que as proteínas foram expressas, mas formaram corpos de inclusão e permaneceram na fração insolúvel.

5.2.3 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING PARA VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO

Os resultados mostraram que apenas a proteína correspondente ao domínio desintegrina fusionado à GST pôde ser purificada satisfatoriamente, embora grande parte da proteína tenha permanecido na fração do lisado após incubação com a

resina e ligada à resina, devido ao fato de estar altamente concentrada. Com relação ao domínio metaloprotease e a ambos os domínios, verifica-se que estes permaneceram na fração insolúvel do lisado bacteriano, embora haja uma banda aparente na fração do eluato do domínio metaloprotease, que na verdade, corresponde a um vazamento de amostra do poço ao lado.

Com isso decidiu-se fazer um imunoenensaio de Wester Blotting para confirmar a eficiência da purificação do domínio desintegrina, no qual utilizou-se o anticorpo primário anti-GST. Além disso, diferentes frações do eluato e a proteína GST foram submetidos à SDS-PAGE 15%, para se confirmar a presença da proteína no eluato e para se fazer uma comparação entre o perfil eletroforético de migração da proteína GST e de desintegrina fusionada à GST.

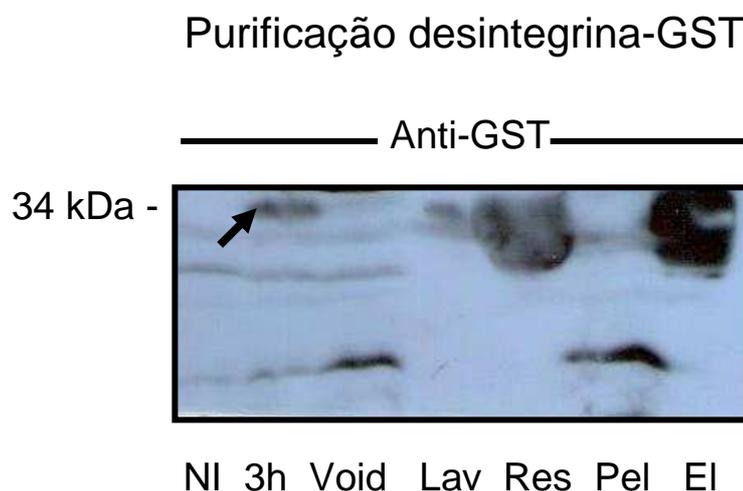


Figura 7: Expressão em larga escala e purificação do domínio desintegrina da proteína GST-ADAM23 a partir do vetor pGEX-2T. A figura mostra um Western Blot cujas amostras foram reagidas com o anticorpo primário anti-GST (diluição 1:2000) e anticorpo secundário anti-rabbit (1:3000). As amostras são as seguintes: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (3h), fração do lisado que não se ligou à resina (VOID), lavagem da resina após incubação com o lisado (LAV), resina (RES), fração insolúvel (pellet - PEL) e eluato (EL). Observa-se que grande parte da proteína de interesse foi eluída e, uma grande quantidade permaneceu ligada à resina.

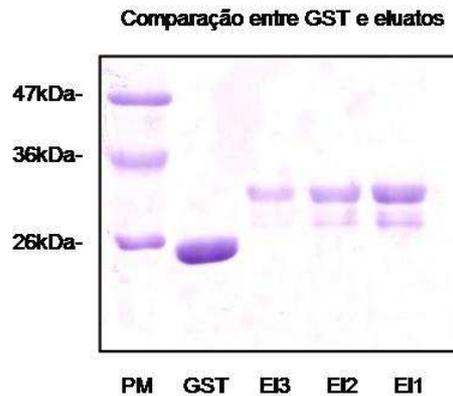


Figura 8. Análise do domínio desintegrina fusionado à GST purificado. A figura apresenta amostras coletadas da eluição da proteína e amostra da proteína GST sozinha resolvidas por SDS-PAGE 15%. A primeira canaleta representa os padrões de massa molecular (PM). A segunda canaleta representa a proteína GST sozinha, com a altura esperada de aproximadamente 26kDa. As amostras E11, E12 e E13 representam frações da 1^a, 2^a e 3^a eluições, respectivamente, também na altura esperada de aproximadamente 34kDa. Isso demonstra que o domínio desintegrina foi purificado com sucesso.

Após verificação do sucesso na obtenção do domínio desintegrina solúvel, este pôde ser utilizado na imunização de camundongos Balb/C, para a obtenção de anticorpos policlonais. No entanto, os problemas com a purificação dos outros dois domínios precisavam ser contornados e novas tentativas, com mudanças no protocolo, foram feitas.

5.3 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE

A partir da hipótese que metaloprotease-GST e metaloprotease+desintegrina-GST estariam formando corpos de inclusão, como mostra a figura 6 (B e C), na tentativa de se solubilizar essas proteínas, foram feitas modificações no protocolo original baseadas em literaturas sobre corpos de inclusão (RUDOLPH & LILIE, 1996; CLARK, 1998; SAMBROOK & RUSSEL, 2001; TSUMOTO *et.al.*, 2002; WHITE, 2003). As novas tentativas foram feitas somente com uma das construções, a que corresponde à GST-metaloprotease, para facilitar o trabalho e também, porque esse

domínio apresentou melhor padrão de expressão, o que poderia facilitar a padronização das novas modificações.

5.3.1 Diminuição dos níveis de expressão

Na tentativa de se obter uma proteína mais solúvel, e prevenir a formação de corpos de inclusão, seguindo dados da literatura, os níveis de expressão foram diminuídos. Isso foi feito pela diminuição na temperatura de crescimento bacteriano, que passou de 37° C para 20° C. Além disso, o tempo de indução foi diminuído de 3h para 2h, e a aeração foi aumentada (RUDOLPH & LILIE, 1996; CLARK, 1998; SAMBROOK & RUSSEL, 2001; TSUMOTO *et.al.*, 2002; WHITE, 2003).

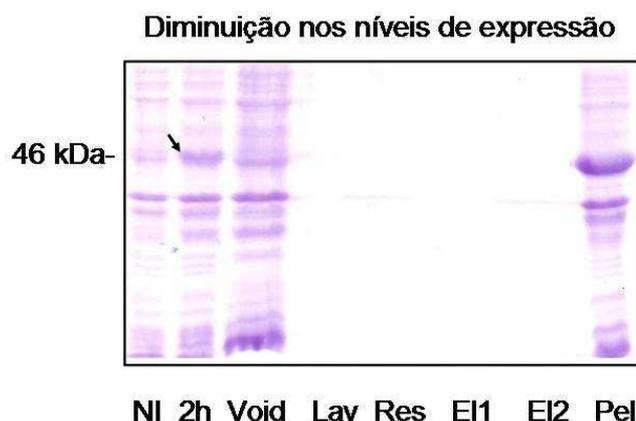


Figura 9. Diminuição dos níveis de expressão de metaloprotease-GST na tentativa de prevenir a formação de corpos de inclusão. A figura mostra uma corrida eletroforética (SDS-PAGE 12%) das seguintes amostras da purificação: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), resina (Res), eluato 1 (E11), eluato 2 (E12) e fração insolúvel (pellet – Pel). Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, porém, que permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano.

Já que diminuindo a temperatura e o tempo de indução não foi possível evitar a formação de corpos de inclusão e assim solubilizar a proteína, como mostra a figura 9, novas modificações foram realizadas. A próxima delas também buscou impedir a formação de corpos de inclusão pela diminuição dos níveis de expressão, através da diminuição na concentração do agente indutor.

5.3.2 Diminuição na concentração do agente indutor

Ainda buscando-se uma diminuição dos níveis de expressão, diminuiu-se a concentração do agente indutor, o IPTG. A concentração original era de 0,1 mM e foi baixada para 0,05 mM.

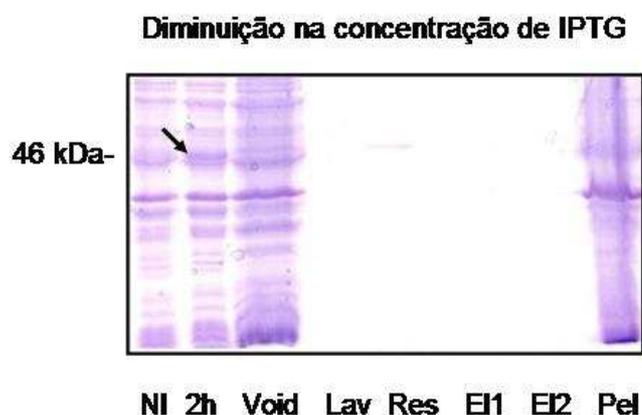


Figura 10. Diminuição na concentração do agente indutor na tentativa de prevenir a formação de corpos de inclusão. A figura mostra uma corrida eletroforética (SDS-PAGE 12%) das seguintes amostras da purificação: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), resina (Res), eluato 1 (E1), eluato 2 (E2) e fração insolúvel (pellet – Pel). Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, porém, que permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano.

Através da diminuição dos níveis de expressão, como mostram as figuras 9 e 10, não foi possível evitar a formação de corpos de inclusão. Então o próximo passo foi tentar solubilizá-los, primeiramente com a adição de um agente caotrópico ao tampão de lise.

5.3.3 Adição de agente caotrópico durante a lise

Nessa etapa, foi adicionado ao tampão de lise um agente caotrópico, uréia na concentração de 3M, na tentativa de se solubilizar os corpos de inclusão. Como a ligação de GST à matriz cromatográfica depende de conformação, essa foi a concentração máxima de uréia permitida, que não interfere na ligação, segundo

orientação do manual do fabricante (Pharmacia).

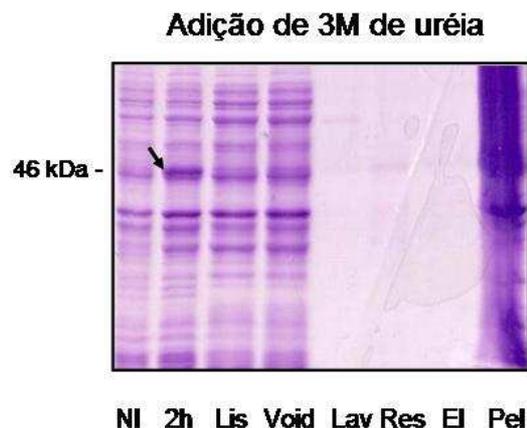


Figura 11. Adição de agente caotrópico na tentativa de solubilizar os corpos de inclusão. SDS-PAGE 12% das seguintes amostras da purificação: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), fração do lisado antes da incubação com a resina (Lis), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), resina (Res), eluato (El) e fração insolúvel (pellet – Pel). Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, porém, que permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano.

Mesmo após adição de 3M de uréia ao tampão de lise, não foi possível solubilizar as proteínas. Logo, tentou-se uma modificação no detergente usado durante a incubação do lisado bacteriano após passagem pela prensa de French.

5.3.4 Utilização de Tween 20 durante a lise

Após ser passado na prensa de French, o lisado bacteriano passa por uma incubação de 30 minutos sob agitação com um detergente, o Triton X-100 na concentração final de 1%. Na tentativa de se solubilizar os corpos de inclusão, modificou-se esse detergente para Tween 20, na concentração final de 2%.

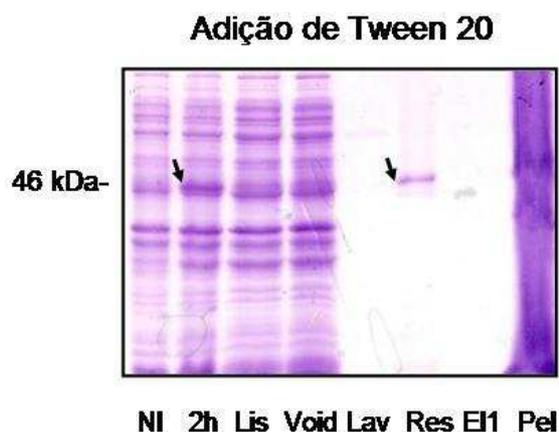


Figura 12. Adição de Tween 20 na tentativa de solubilizar os corpos de inclusão. SDS-PAGE 12% das seguintes amostras da purificação: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), fração do lisado antes da incubação com a resina (Lis), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), resina (Res), eluato 1 (El1) e fração insolúvel (pellet – Pel). Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, e ligada à resina, o que significa que a troca do detergente Triton X-100 pelo Tween 20 possibilitou uma pequena solubilização dos corpos de inclusão.

Essa modificação permitiu que pequena quantidade de proteína fosse solubilizada, permanecendo ligada à matriz cromatográfica. Esse resultado foi mais promissor que os anteriores, e conduziu à uma nova idéia. Visto as proteínas que permaneceram na fração insolúvel do lisado bacteriano terem sido solubilizadas, mesmo que em diminutas quantidades através da mudança no detergente, poderia se tentar solubilizar a fração insolúvel restante com um novo detergente. Foi então, que se decidiu fazer uma segunda solubilização da fração insolúvel com um detergente iônico, o sarcosil.

5.4 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM DUPLA SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO

Para essa purificação, primeiramente foi feita uma nova transformação química das bactérias BL21 (DE3) com o produto de mini preparação dos plasmídeos correspondentes ao domínio metaloprotease e uma nova mini-expressão. A colônia com melhor padrão de expressão foi selecionada para ser feita uma expressão em larga escala, que segue o mesmo protocolo das outras expressões (abaixamento de temperatura, diminuição de tempo de indução,

aumento de aeração e uso de Tween 20 no lugar do Triton X-100). Uma modificação na primeira purificação foi submeter a suspensão à sonicação durante três ciclos de 1 minuto. As amostras da primeira purificação foram submetidas à SDS-PAGE 12%.

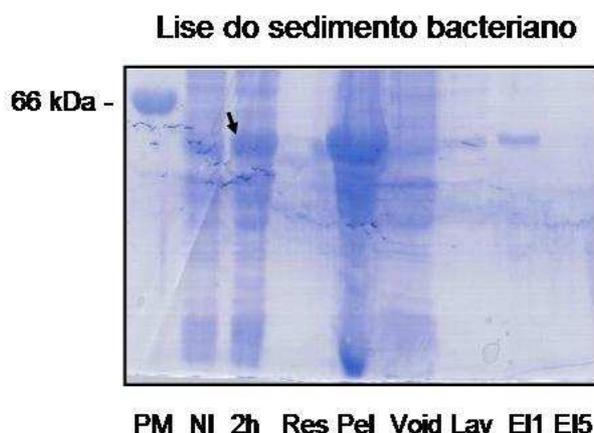


Figura 13. Análise das amostras da primeira purificação de metaloprotease-GST. SDS-PAGE 12% das seguintes amostras da purificação: cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), resina (Res), fração insolúvel (pellet – Pel), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), eluato 1 (EI1) e eluato 5 (EI 5),. Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, na fração insolúvel, na lavagem e no eluato, demonstrando que um pouco da proteína foi solubilizada.

A fração insolúvel do lisado bacteriano restante foi solubilizada uma segunda vez com a utilização de um tampão contendo um detergente diferente, o sarcosil (PHARMACIA; RUDOLPH & LILIE, 1996; SAMBROOK & RUSSEL, 2001; TSUMOTO *et.al.*, 2002; WHITE, 2003). A suspensão foi sonicada, passada na prensa de French, centrifugada, filtrada, incubada com a matriz cromatográfica e as frações eluídas como já descrito anteriormente. Amostras dessa segunda purificação foram submetidas à SDS-PAGE 12%.

Solubilização da fração insolúvel

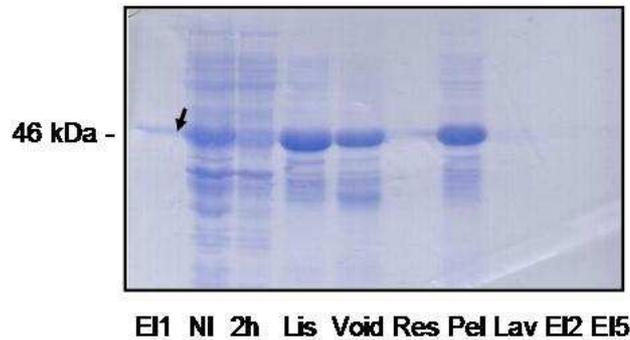


Figura 14. Análise das amostras da segunda purificação de metaloprotease-GST. SDS-PAGE 12% das seguintes amostras da purificação: eluato da primeira purificação (E1), cultura bacteriana não induzida (NI), induzida (2h), lisado antes da incubação com a resina (Lis), fração do lisado que não se ligou à resina (Void), resina (Res), fração insolúvel (pellet – Pel), lavagem da resina após incubação com o lisado (Lav), fração 1 e 5 do eluato da segunda purificação, (E2) (E1 5) respectivamente. Observa-se uma banda na altura de aproximadamente 46kDa correspondente a metaloprotease-GST na cultura induzida, na fração insolúvel, na lavagem e no eluato, demonstrando que um pouco da proteína foi solubilizada.

Essa nova tentativa demonstrou que a proteína metaloprotease-GST foi solubilizada, embora grande quantidade tenha permanecido na fração insolúvel. No entanto, a proteína solúvel não conseguiu se ligar à resina, sugerindo que algo interferiu na adsorção de GST à matriz cromatográfica.

Para que os objetivos iniciais fossem alcançados, prosseguiu-se com as imunizações dos animais apenas com o domínio desintegrina-GST. E após quatro imunizações, foi feita a coleta do sangue para obtenção do soro imune. Então, seguiram-se os testes com o soro imune para a averiguação de sua eficiência.

5.5 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Ensaio de ELISA foram empregados para se analisar a eficiência dos anticorpos, através da sensibilização dos poços da placa de ELISA com GST purificada (quatro poços), domínio desintegrina fusionado à GST (quatro poços) e ϵ His-ADAM23 (também quatro poços) em tampão carbonato. Após incubação a placa foi lavada, bloqueada e foram adicionados cada um dos soros imunes dos camundongos MØ84, MØ85, MØ86 e MØ87 aos poços contendo GST, desintegrina

fusionada à GST e ϵ His-ADAM23. Após incubação a placa foi lavada e os poços incubados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo. Novamente a placa foi lavada e foi feita a revelação, possibilitando a leitura em leitor de microplacas com filtro de 490nm.

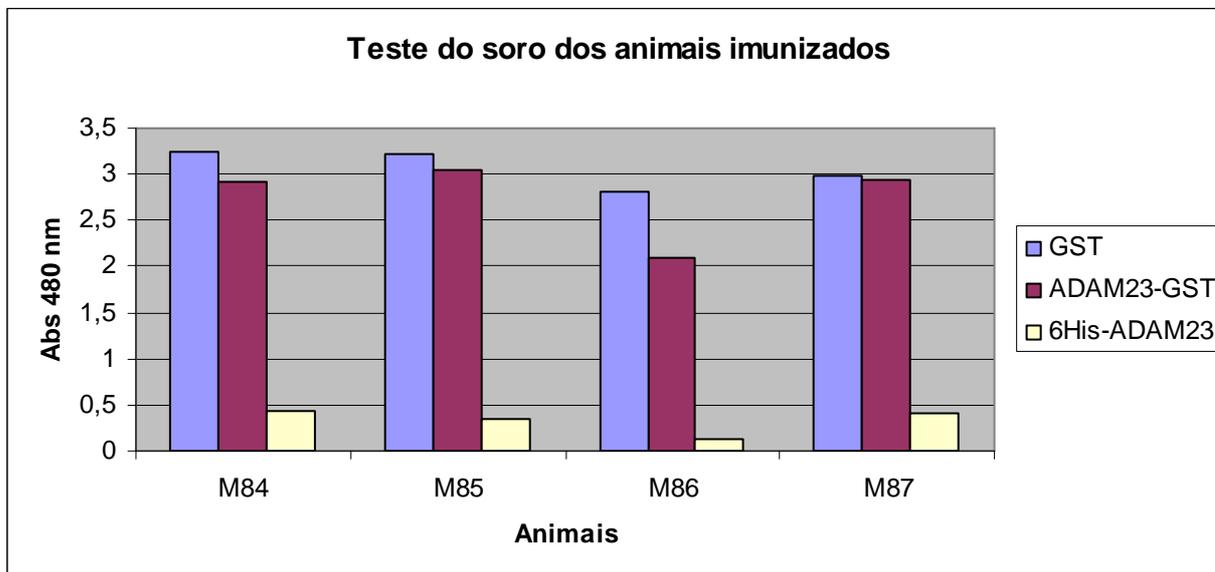


Figura 15. Teste de ELISA de captura dos anticorpos com o soro dos camundongos imunizados. O soro dos camundongos M84, M85, M86 e M87 foi incubado na diluição de 1:100 com três diferentes antígenos adsorvidos à placa de ELISA (GST, ADAM23-GST, 6His-ADAM23). A figura mostra que o soro reage fortemente com GST e ADAM23-GST, no entanto reage fracamente com a proteína recombinante ϵ His-ADAM23.

Mais um teste foi feito para analisar a eficiência do anticorpo, através da reação com extratos totais de encéfalo e frações de proteínas precipitadas. Isso demonstraria se o anticorpo consegue ou não reconhecer proteínas endógenas.

5.6 WESTERN BLOTTING PARA TESTE DO SORO IMUNE

Foi feito um SDS-PAGE 10% com extratos de proteínas totais de encéfalo de camundongos adultos, bem como frações enriquecidas de proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio e transferência para uma membrana de nitrocelulose. Os soros imunes dos camundongos M084, M085, M086 e M087 foram testados; como controle negativo utilizou-se o soro não imune dos animais e como controle positivo utilizou-se um anticorpo anti-ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005).

Seguiu-se a incubação com anti-IgG de camundongo e revelação em câmara escura.

No entanto, os resultados foram negativos (dados não mostrados), não houve nenhum reconhecimento dos antígenos pelo soro imune. Mesmo após exposição da membrana ao filme por 30 minutos, nenhuma banda apareceu, apenas o controle positivo foi revelado.

6 DISCUSSÃO

6.1 CLONAGEM DOS DIFERENTES FRAGMENTOS GÊNICOS DE INTERESSE EM VETOR pGEX-2T

Para que fosse possível investigar algumas funções biológicas da proteína ADAM23, foi preciso produzir ferramentas que possibilitassem este estudo. Para isso, fez-se necessário a produção da proteína recombinante ADAM23, bem como a produção de anticorpos policlonais para ensaios bioquímicos e de reconhecimento da proteína endógena, uma vez que não existem reagentes disponíveis comercialmente.

Anteriormente à utilização do sistema pGEX de purificação, o trabalho com a proteína ADAM23 estava sendo desenvolvido em sistema pET32. A proteína recombinante ADAM23 era expressa com uma cauda de 6 histidinas que permitia purificação por ligação a átomos de níquel imobilizados na matriz cromatográfica. No entanto, a proteína permanecia na fração insolúvel do lisado bacteriano e eram necessárias condições desnaturantes para sua solubilização. E, uma vez solubilizadas, baixíssimas concentrações de proteína eram purificadas. A maior parte da proteína não se ligava à resina, e as que se ligavam ficavam retidas, não sendo possível eluí-las, gerando um rendimento de 100 µg proteína por litro de cultura. Mesmo após diversas modificações no protocolo, como mudanças na temperatura e tempo de indução, volume de resina, mudanças no tampão de eluição (pH, aumento da concentração do imidazol para aumento de competição com as seis histidinas, adição de EDTA para o desligamento do íon Ni^{2+}) não se obtiveram resultados satisfatórios, e algumas das hipóteses levantadas seriam que proteína recombinante provavelmente precipitaria na coluna, ou então ela apresentaria uma

conformação que esconderia sua etiqueta de histidinas, não sendo possível eluí-la.

Como eram baixas as perspectivas de prosseguimento do projeto com esse tipo de sistema, decidiu-se a mudança para um sistema baseado em proteínas de fusão, o sistema pGEX. Esse sistema permitiria a expressão da proteína ADAM23 fusionada à proteína Glutathione S-Transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*. Foi descrito que esse sistema seria uma das soluções para a purificação de proteínas insolúveis, permitindo, inclusive, a obtenção da proteína nativa (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Para a mudança de sistema, foi realizada a clonagem de diferentes domínios da ADAM23 em vetor pGEX-2T. A partir das construções 1, 2 e 3 (referentes aos domínios metaloprotease, desintegrina e a ambos os domínios, respectivamente) (figura 2) e sua inserção nos vetores de expressão pGEX-2T, foi feita uma minipreparação dos plasmídeos e dupla digestão para análise da liberação dos insertos, como mostra a figura 3. Os produtos da digestão dos vetores pGEX-2T-metaloprotease (canaleta 2) e pGEX-2T-metaloprotease+desintegrina (canaleta 1) revelam que houve a liberação dos insertos (549 e 813 pb, respectivamente) e que o vetor contém os genes de interesse. Com relação a pGEX-2T-desintegrina (canaleta 3), não foi possível visualizar a banda de interesse, pois o inserto desse domínio possui apenas 225 pares de bases, além disso, uma baixa concentração de DNA foi utilizada para a digestão. No entanto, nova digestão demonstrou a presença de uma banda sutil na altura esperada (dados não mostrados).

6.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DA PROTEÍNA ADAM23 EM SISTEMA HETERÓLOGO DE *E. coli* A PARTIR DO VETOR pGEX-2T

A partir dos produtos da minipreparação, bactérias quimiocompetentes foram transformadas e iniciou-se a fase de padronização dos protocolos de expressão e purificação dos diferentes domínios da proteína ADAM23 fusionados à GST. Os resultados das miniexpressões (figura 5) mostraram sucesso na expressão dos domínios fusionados à GST (desintegrina-GST com 34kDa, desintegrina-metaloprotease com 46kDa e metaloprotease+desintegrina com 55kDa), embora a expressão de metaloprotease+desintegrina-GST não tenha sido satisfatória.

Prosseguiu-se com a expressão em larga escala e purificação das proteínas

recombinantes (figura 6). No entanto, somente a construção correspondente ao domínio desintegrina pôde ser obtida em altas concentrações e em sua forma nativa, como mostra a figura 6A. Mas grande quantidade da proteína permaneceu na fração do lisado após incubação com a resina e outra grande parte permaneceu ligada a esta. Isso, provavelmente, se deve ao fato da proteína estar altamente concentrada e a quantidade de matriz ter sido insuficiente. Além disso, o fato das proteínas terem permanecido ligadas à resina ocorreu porque o número de eluições não foi suficiente para desligar a grande quantidade de proteínas da matriz cromatográfica.

Como os resultados dessa purificação foram positivos, foi feito um Western Blotting (figura 7) com utilização do anticorpo primário anti-GST, o qual reconheceu a proteína com o tamanho esperado, 34 kDa, na cultura induzida e fortemente nas frações do eluato e da resina. Amostras da eluição e de GST isolada foram submetidas à SDS-PAGE 15% (figura 8) e os resultados confirmaram a presença da proteína nas 3 primeiras frações do eluato e pôde-se compará-la com a proteína GST isolada, que possui massa aproximada de 26kDa. Após esses testes, pôde-se iniciar a imunização dos camundongos para a produção de anticorpos policlonais.

Com relação à metaloprotease-GST e metaloprotease+desintegrina-GST (figuras 6B e 6C), os resultados mostraram que as proteínas foram expressas, através da visualização de bandas na altura de 46 e 55 kDa, respectivamente, na cultura induzida. No entanto, novamente a expressão de metaloprotease+desintegrina-GST se mostrou insatisfatória. Também observa-se que as proteínas permaneceram na fração insolúvel do lisado bacteriano, formando corpos de inclusão. Isso provavelmente deve ocorrer, porque o domínio metaloprotease possui três sítios de formação de pontes dissulfeto. Segundo Rudolph & Lilie (1996) o ambiente redutor do citosol, compromete o dobramento oxidativo de proteínas com pontes dissulfeto, havendo inevitável formação de agregados. Superexpressão, ou seja, aumento na concentração de peptídeos nascentes, é suficiente para induzir a formação de agregados inativos (RUDOLPH & LILIE, 1996). Baseado nisso, foi proposto que o rendimento na obtenção da proteína nativa depende somente da taxa de dobramento, da taxa de agregação e da taxa de síntese protéica, implicando aumento na concentração de proteína solúvel com diminuição dos níveis de expressão (KIEFHABER *et al.*, 1991).

Foi descrito que o espaço periplasmático de *E. coli* provê um ambiente oxidante que permite a formação de pontes dissulfeto. Além disso, tiol-dissulfeto

isomerases, que estão envolvidas na formação de pontes dissulfeto de proteínas periplasmáticas ou ligadas à membrana de *E. coli*, estão presentes no periplasma de *E. coli*. No entanto, essas isomerases não são eficientes na catalização da formação de pontes dissulfeto em proteínas eucarióticas. Como consequência, a formação de corpos de inclusão é também freqüentemente observada na produção proteínas periplasmáticas heterólogas (RUDOLPH & LILIE, 1996). Com isso, buscaram-se modificações no protocolo inicial na tentativa de prevenir a formação dos corpos de inclusão.

6.3 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE SOB QUATRO DIFERENTES CONDIÇÕES PARA PROMOVER A SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE

As modificações no protocolo foram feitas somente com uma das construções, a que corresponde à GST-metaloprotease, pois, como apresentou melhor padrão de expressão, poderia facilitar a padronização das novas modificações.

6.3.1 Diminuição nos níveis de expressão

Na tentativa de se prevenir a formação de corpos de inclusão, permitindo um melhor dobramento às proteínas, a primeira tentativa foi a diminuição dos níveis de expressão, através da diminuição na temperatura de crescimento das bactérias; diminuição no tempo de indução e aumento na aeração durante o crescimento bacteriano (RUDOLPH & LILIE, 1996). Diminuindo-se a temperatura e o tempo de indução, menos cadeias peptídicas seriam formadas, havendo menos risco de agregação, possibilitando um tempo maior de dobramento para as proteínas. Isso porque o aumento no número de peptídeos nascentes é suficiente para induzir a formação de agregados (RUDOLPH & LILIE, 1996). Em altas concentrações, as proteínas prontamente se agregariam e não teriam tempo de formar suas pontes dissulfeto. Estudos já demonstraram que abaixamento de temperatura e limitação da indução aumentaram a quantidade de proteína solúvel (SHEIN & NOTEBORN,

1988). Com relação ao aumento da aeração, isso impediria a formação de metabólitos que pudessem interferir na maquinaria bacteriana. Por exemplo, em ambiente saturado de CO₂, as bactérias poderiam passar a fazer metabolismo anaeróbico, gerando metabólitos que poderiam influenciar sua expressão protéica.

As mudanças aplicadas, no entanto, como se observa na figura 9, não foram suficientes para impedir a formação dos corpos de inclusão, talvez, porque ainda os níveis de expressão ainda estivessem altos.

6.3.2 Diminuição na concentração do agente indutor

Para tentar diminuir ainda mais os níveis de expressão diminui-se a concentração do agente indutor IPTG. Entretanto, novamente, como se observa na figura 10, a proteína permaneceu na fração insolúvel do lisado bacteriano. Isso demonstra que as proteínas recombinantes têm alta tendência de se agregar, visto possuírem sítios de formação de pontes dissulfeto e não conseguem atingir a conformação correta. É comum que proteínas eucarióticas expressas em bactérias acabem formando corpos de inclusão, pois além da maquinaria molecular ser ineficiente para o correto dobramento das proteínas e o ambiente em que são formadas mostra-se desfavorável (RUDOLPH & LILIE, 1996). Como não foi possível prevenir a formação dos corpos de inclusão, partiu-se para uma nova etapa, tentar solubilizá-lo.

6.3.3 Utilização de agente caotrópico durante a lise

Uma estratégia para a solubilização da fração insolúvel do lisado bacteriano é a utilização de um agente caotrópico ao tampão de lise, como a uréia ou cloreto de guanidina (CLARK, 1998). Seguindo-se o protocolo do fabricante da matriz cromatográfica (Pharmacia), utilizou-se uréia em uma concentração baixa, isso porque durante a purificação, a ligação de GST à matriz cromatográfica depende de conformação, e uma concentração maior de uréia poderia resultar em desnaturação. Mas como se observa na figura 11, não houve solubilização da fração insolúvel. Isso pode ter ocorrido, porque a uréia liga-se às proteínas dependentemente de

concentração. Na maioria dos casos, 6-8 M de uréia são requeridos para se alcançar uma suficiente ligação para desdobrar e solubilizar proteínas, e mesmo em altas concentrações, interações intra e inter-moleculares podem ocorrer (TSUMOTO *et.al.* 2002. Logo, a concentração de 3M usada pode não ter sido suficiente para desdobrar as proteínas, com isso partiu-se para uma nova tentativa.

6.3.4 Utilização de Tween 20 durante a lise

A utilização de detergentes pode vir a solubilizar os corpos de inclusão, mas como já havia sido usado Triton X-100 sem sucesso, modificou-se o detergente para Tween 20 (CLARK, 1998). Ao contrário das tentativas anteriores, essa modificação possibilitou uma pequena solubilização, embora as proteínas tenham ficado retidas na resina. Com isso, buscou-se repetir essa purificação, mas com algumas modificações.

6.4 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DO DOMÍNIO METALOPROTEASE E PURIFICAÇÃO COM DUPLA SOLUBILIZAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO BACTERIANO

Nessa tentativa todas as condições anteriores foram mantidas (abaixamento de temperatura, diminuição de tempo de indução, aumento de aeração, utilização de Tween 20), a única modificação foi a submissão do lisado bacteriano à sonicação. Conforme mostra a figura 13, uma pequena fração das proteínas foi solubilizada e está presente na primeira fração do eluato. Provavelmente, o Tween 20 em conjunto com os ciclos de sonicação possibilitaram essa solubilização. Além disso, as colônias usadas na expressão em larga escala eram provenientes de colônias que tiveram um ótimo padrão de expressão na miniexpressão.

Como grande parte da proteína permaneceu na fração insolúvel, esta foi solubilizada com a utilização de um tampão contendo sarcosil, conforme orientação do fabricante da matriz (Pharmacia) e literatura (CLARK, 1998; SAMBROOK & RUSSEL, 1991). Como mostra a figura 14, embora uma parte das proteínas tenha continuado na fração insolúvel, grande parte delas estava na sua forma solúvel. No

entanto não houve ligação à resina. Isso pode ser explicado pelo fato do sarcosil ser um detergente iônico, que pode estar impedindo a ligação de GST à matriz cromatográfica.

Com isso, futuramente pretende-se fazer uma segunda solubilização ainda com Tween 20, que foi o detergente que melhor solubilizou a proteína sem influenciar na sua ligação à resina. Após ser feita a padronização para metaloprotease-GST, esta será usada na produção de anticorpos e também serão iniciados os testes com metaloprotease+desintegrina-GST.

6.5 TESTE DO SORO IMUNE POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Ensaio de ELISA de captura de anticorpo foram empregados para se analisar a eficiência do anticorpo anti-desintegrina-GST. Como mostra a figura 15, o anticorpo reage fortemente com a proteína recombinante desintegrina-GST e com GST isolada e quase não há reação com a proteína recombinante ϵ His-ADAM23. Isso provavelmente ocorre, porque o organismo dos camundongos gerou resposta imune à GST. GST tem massa aproximada de 26kDa é altamente imunogênica, pois é proveniente de *Schistosoma japonicum*. Já o domínio desintegrina tem massa aproximada de 8 kDa, além de ser um domínio proveniente de ADAM23 que tem um alto índice de conservação entre humanos e camundongos (<http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>), o que diminui sua imunogenicidade (cabe lembrar que a construção desintegrina-GST é proveniente de ADAM23 humana). Isso também corrobora com o fato do anticorpo reconhecer só GST, pois a proteína ϵ His-ADAM23 provém de uma construção murina, e a ADAM23 murina tem alto índice de similaridade com a humana, portanto deveria ter sido reconhecida pelo anticorpo. Outro fato que confirma que o anticorpo produzido é anti-GST e tem pouquíssima função anti-desintegrina-GST foi o Western Blotting feito com extratos de proteínas totais de encéfalo e frações de proteínas precipitadas com 30% de sulfato de amônio. Não houve nenhum reconhecimento das proteínas endógenas, demonstrando que o anticorpo não é eficiente.

7 CONCLUSÕES

- Os produtos da minipreparação dos plasmídeos continham os insertos de ADAM23 humana correspondentes aos domínios desintegrina, metaloprotease e a ambos os domínios;
- A proteína desintegrina-GST pôde ser expressa em sistema heterólogo de *E. coli*, a partir do vetor de expressão pGEX-2T;
- Desintegrina-GST pôde ser purificada e utilizada para produção de anticorpos;
- As proteínas metaloprotease-GST e metaloprotease+desintegrina-GST não puderam ser purificadas, pois permaneceram em corpos de inclusão;
- A mudança para o detergente Tween 20 possibilitou uma pequena solubilização da proteína metaloprotease-GST;
- O uso do detergente sarcosil para a solubilização da fração insolúvel do lisado bacteriano permitiu que uma boa parte da proteína metaloprotease-GST fosse solubilizada;
- No entanto, impediu sua ligação à resina, provavelmente por se tratar de uma detergente iônico;
- Os anticorpos policlonais obtidos não foram eficientes no reconhecimento da proteína ADAM23 endógena e da proteína recombinante ϵ His-ADAM23;
- Mudanças ainda precisam ser feitas, para se obter as proteínas purificadas e os anticorpos, para que se possa iniciar o estudo das funções de ADAM23.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAHR, B. A.; LYNCH, G. Purification of an Arg-Gly-Asp selective matrix receptor from brain synaptic plasma membranes. **Biochem. J.** 281: 137–142, 1992.

BARON, W., SHATTI, SJ, FFRENCH-CONSTANT, C. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of α (v) beta (3) integrins. **Embo J.** 21: 1957-1966, 2002.

BJARSON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods Enzymol.** 248:345-68, 1995.

BLOBEL, C.P.; WHITE, J.M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 4: 760–765, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** V. 72, p. 248-54, 1976.

BROOKS, P.C.; MONTGOMERY, A.M.; ROSENFELD, R.A.; HU, T.; KLIER, G.;CHERESH, D.A. Integrin $\alpha v\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell** 79: 1157–1164, 1994.

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.

CHAVIS, P. & WESTBROOK, G. Integrins mediate functional pre and postsynaptic maturation at hippocampal synapse. **Nature.** 411: 317-321, 2001.

CLARK, E.B. Refolding os recombinant proteins. **Biochemical engineering.** 9:157-163, 1998.

COSTA, F. F; COLIN, C.; SHINJO, S. M. O.; ZANATA, S. M.; MARIE, S. K. N.; SOGAYAR, M. C.; CAMARGO, A. A. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters.** v 380, p. 260-264, 2005.

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, n. 7, p. 1481-1488, 2004.

GALILEO, D.S.; MAJORS, J.; HORWITZ, A.F.; SANES, J.R. Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo. **Neuron** 9:1117–1131, 1992.

GÖDDE, N. J.; D'ABACO, G.M.; PARADISO, L.; NOVAK, U. Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. **Journal of Cell Science** 119, 3296-3305, 2006

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

GROTEWIEL, M. S.; BECK, C. D.; WU, K. H.; ZHU, X. R.; DAVIS, R. L. Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. **Nature** 391: 455–460, 1998.

GUTWEIN P.; OLESZEWSKI, M.; MECHTERSHEIMER, S.; AGMON-LEVIN, N.; KRAUSS, K.; ALTEVOGT, P. Role of the Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cell. **J. Biol. Chem.** 275: 15490-15497, 2000.

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

HIRSCH, E.; GULLBERG, D.; BALZAC, F.; ALTRUDA, F.; SILENGO, L.; TARONE, G. α v integrin subunit is predominantly located in nervous tissue and skeletal muscle during mouse development. **Dev. Dyn.** 201, 108–120. 1994.

HOUGAARD, S.; LOECHEL, F.; XU, X.; TAJIMA, R.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Trafficking of human ADAM 12-L: Retention in the trans-Golgi network. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 275: 261–267, 2000.

HOWARD, L.; NELSON, K.K.; MACIEWCZ, R.A.; BLOBEL, C.P. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. **J. Biol. Chem.** 274: 31693–31699, 1999.

HYNES, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell** 69: 11–25. 1992.

JULIANO, R.L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 42: 283-323, 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.

KIEFHABER, T.; RUDOLPH, R.; KOHLER, H.H.; BUCHNER, J. Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Bio/Technology**. 9: 825-829.

KOIKE, H.; TOMIOKA, S.; SORIMACHI, H.; SAIDO, T.C.; MARUYAMA, K.; OKUYAMA, A.; FUJISAWA-SEHARA, A.; OHNO, S.; SUZUKI, K.; ISHIURA, S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. **Biochem. J.** 343:371-375, 1999.

LAMMICH, S.; KOJRO, E.; POSTINA, R.; GILBERT, S.; PFEIFFER, R.; JASIONOWSKI, M.; HAASS, C.; FAHRENHOLZ, F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by disintegrin metalloprotease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 3922-3927, 1999.

LUM, L.; REID, M.S.; BLOBEL, C.P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J. Biol. Chem.** 273: 26236–26247. 1998.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; ABREU, J.G.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M. & BRENTANI, R.R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Med.** 3: 1376-1382, 1997.

MITCHELL, K. J. et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**. 28: 241-249, 2001.

NIEMIAROWSKI, S.; MACLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol** 31:289-300. 1994.

POGHOSYAN, Z.; ROBBINS, S.M.; HOUSLAY, M.D.; WEBSTER, A.; MURPHY, G.; EDWARDS, D.R. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.** **277**: 4999–5007, 2000.

RUOSLAHTI, E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. **Kidney Int.** **51**, 1413–1417. 1997.

SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene.** **236**: 79-86, 1999.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, desintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem. J.** **334**: 93-98, 1998.

SAGANE, K.; HAYAKAWA, K.; KAI, J.; HIROHASHI, T.; TAKAHASHI, E.; MIYAMOTO, N.; INO, M.; OKI, T.; YAMAKAKI, K.; NAGASU, T. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. **BMC Neuroscience.** **6**:33. 2005

RUDOLPH, R.; LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal** **10**: 49-55, 1996.

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

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev** **17**:7–30. 2003.

SHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *E. coli* is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology.** **6**:291-294.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. 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.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification.** **28**: 1-8, 2003.

VAN WART, H.E.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; The cysteine switch: A principle of regulation of metalloprotease activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 5578-5582, 1990.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**. Academic Press, San Diego, California, 1999.

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, n. 2, p. 275-278, 1995.