

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INGRID LARISSA MELO DE SOUZA

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COMO BIOFERRAMENTAS NO
ESTUDO DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23

CURITIBA

2015

INGRID LARISSA MELO DE SOUZA

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COMO BIOFERRAMENTAS NO
ESTUDO DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular,
Departamento de Biologia Celular,
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques
Zanata

CURITIBA-PR

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Souza, Ingrid Larissa Melo de

Produção de proteínas quiméricas como bioferramentas no estudo da desintegrina e metaloprotease ADAM23. / Ingrid Larissa Melo de Souza. – Curitiba, 2015.

175f. : il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

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

1. Proteínas. 2. Metaloproteases. 3. Proteínas ADAM. I. Título II. Zanata, Silvio Marques. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

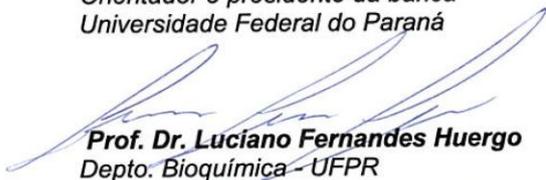
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

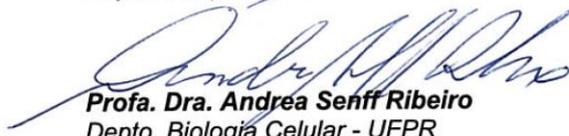
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Depto. Bioquímica - UFPR



Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Depto. Biologia Celular - UFPR

Suplente:

Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Depto. Biologia Celular - UFPR

Após arguir a mestranda **Ingrid Larissa Melo de Souza**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Produção de proteínas quiméricas como bioferramentas no estudo da desintegrina e metaloprotease ADAM23", são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Março de 2015

Ao meu pai Euclides (*in memoriam*) e à minha mãe Marluce por todo amor incondicional, incentivo e exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças para lutar e por tantas oportunidades e alegrias.

Aos meus pais, Euclides (*in memoriam*) e Marluce, por todo apoio, amor e orientação durante toda a minha vida. Muito obrigada não apenas pelo apoio financeiro, mas, principalmente pelo apoio emocional. Não sei como agradecer todo o apoio e a dedicação de vocês para a minha formação. Obrigada por todo incentivo e exemplo de vida.

Ao meu namorado Diego, por todo o amor, compreensão e pela ajuda com configurações de computador. Obrigada por ir comigo ao laboratório aos finais de semana sempre que necessário. Obrigada também por compartilhar comigo momentos de tristeza e alegria.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, pela oportunidade a mim concedida para realizar o mestrado sob sua orientação no Laboratório de Neurobiologia, e, principalmente, pelos ensinamentos científicos que me passou. Obrigada pela orientação, pela ajuda com os experimentos, pela disponibilização de materiais e reagentes, pela boa convivência em laboratório e por me ensinar a sempre ter paciência. Certamente, todo o aprendizado que obtive neste período contribuiu para a minha formação acadêmica e profissional.

Às Professoras Dra. Lia Nakao e Dra. Adriana Frohlich pela ajuda com dúvidas e disponibilização do Laboratório de Neurobiologia, materiais e reagentes.

À Caroline Fidalgo Ribeiro, do Laboratório de Neurobiologia, pelos ensinamentos e ajuda a mim oferecida desde que cheguei ao laboratório. Obrigada pela amizade sincera e ajuda nos ensaios de biologia molecular e clonagem; ensaios bioquímicos e cultivo celular. Obrigada também por compartilhar comigo momentos de tristeza e alegria.

Aos meus colegas e “agregados” do Laboratório de Neurobiologia, Luiz, Zaine, Larissa, Letícia, Maiara, Fernando, Bruno, Sze, Gabriel, Bia, Márcia, Ana Márcia e Gustavo por toda a amizade, ensinamentos e ajuda, em tantos momentos. Obrigada por alegrarem o ambiente de trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia, tanto os integrantes atuais como os que passaram por lá durante o período de realização deste trabalho.

À Mariana e a todo o pessoal do Laboratório de Matriz Extracelular (LME) do Prof. Dr. Silvio Sanchez, por me receberem e me ajudarem em diversas situações. Agradeço pela ajuda, disponibilização e empréstimo de reagentes e equipamentos.

À Flávia e a todo pessoal do Laboratório de Lipídeos do Prof. Edvaldo Silva Trindade, pela ajuda, disponibilização e empréstimo de células CHO-K1, reagentes e equipamentos.

À Graci e a todo pessoal do Laboratório da Prof^a Gisele Klassen, por empréstimos de reagentes e equipamentos.

Ao Fábio e a todos os técnicos por todo suporte e apoio com preparo de materiais.

Ao meu querido irmão Antônio, minha gratidão por todo apoio, carinho e inspiração.

Aos meus outros amigos da pós-graduação em Biologia Celular, Fran, Ueriton, Francisco, José Eduardo, Mariana Feijó e Cléber, pelo incentivo ajuda nas aulas que cursamos juntos.

À minha amiga Nancy Watanabe da UFSC/Unicamp pelo incentivo, inspiração, apoio, carinho e pela amizade sincera ao longo de anos! Obrigada por compartilhar comigo momentos de alegria e tristeza!

A todos os meus outros amigos de graduação em Ciências Biológicas da UFSC, principalmente, Kamille, Thais, Cecília, Stefanny, Bruna e Luan por todo apoio, por me incentivarem a não desistir e por compartilharem comigo momentos de tristeza e alegria. Vou levar vocês comigo sempre aonde quer que eu vá.

A todos os meus outros amigos da UFSC, o químico Leandro e à Lindsey Scarelli por todo apoio, ensinamento, inspiração e por me incentivarem a não desistir. Obrigada também por compartilharem comigo momentos de tristeza e alegria.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e Fundação Araucária pela bolsa e financiamento deste projeto.

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o desenvolvimento da minha formação durante este período.

“O último esforço da razão é reconhecer que existe uma infinidade de coisas que a ultrapassam.”
(Blaise Pascal, 1661)

RESUMO

ADAM23 é uma proteína transmembrana, da família ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*), altamente expressa em células neuronais, cujo papel biológico não está bem elucidado. Sabe-se que a ADAM23 está envolvida no processo de adesão celular em neuroblastomas através da interação com integrinas. Mecanismos de adesão celular envolvendo a ADAM23 humana, informações sobre o seu processamento intracelular e as propriedades do seu ectodomínio podem servir para a compreensão do papel estrutural e biológico dessa proteína. O presente estudo visou o desenvolvimento de vetores de expressão para a produção de quimeras protéicas constituídas pelo ectodomínio de ADAM23 e a região Fc de IgG humana (domínios CH2 e CH3). As quimeras serão utilizadas como bioferramentas no estudo do processamento de ADAM23 e da sua função na adesão e proliferação celular. Os fragmentos de nucleotídeos que codificam os resíduos 60-792 (ADAM23C1) e 287-792 (ADAM23C2) da ADAM23 humana foram clonados no vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 (secreção através do peptídeo sinal da IL-2) enquanto a sequência 1-792 foi clonada no vetor pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 (secreção utilizando o peptídeo sinal da ADAM23). As três construções foram transfectadas nas linhagens N2A (neuroblastoma de camundongo), HEK-293T (rim humano) e CHO-K1 (ovário de hamster) e tanto os extratos celulares como os sobrenadantes de cultura foram analisados para a expressão das quimeras. A linhagem N2A apresentou a mais eficiente secreção das três proteínas quiméricas. As quimeras ADAM23C1 e ADAM23C2, foram adequadamente expressas e recuperadas dos sobrenadantes das culturas de células N2A e HEK-293T. A quimera ADAM23C3 (*full-length* do ectodomínio) foi identificada sempre na forma processada, indicando que seu peptídeo sinal foi reconhecido pelas maquinarias de secreção e processamento das células utilizadas. Diferentes métodos de purificação das quimeras foram comparados, sendo que a precipitação por sulfato de amônio mostrou-se ser o mais adequado, por aliar economicidade de recursos e retenção da estrutura da proteína. Paralelamente foi avaliada a expressão de ADAM23 em diferentes linhagens e tecidos, além do estabelecimento da localização celular das formas imatura e processada da ADAM23. Com a ajuda do anticorpo monoclonal DL11C8 foi possível determinar que a forma processada de ADAM23 (70 kDa) é a mais abundante no encéfalo de camundongos e é expressa na face externa da membrana plasmática da linhagem N2A. Estes dados mostram pela primeira vez que há uma baixa expressão da forma de 100 kDa (não-processada) no sistema nervoso, ao contrário do que foi observado em linhagens tumorais. A relevância da razão de expressão entre as formas imatura e processada para a função da ADAM23 no sistema nervoso, como a sua relevância na progressão do fenótipo tumoral merecem mais investigação.

Palavras-chave: ADAM23. Ectodomínio. Desintegrina. Metaloprotease. Proteínas Fc quiméricas.

ABSTRACT

ADAM23 is a transmembrane protein, member of ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) family, highly expressed in neuronal cells, whose biological role is not yet totally elucidated. It is known that ADAM23 is involved in the cellular adhesion process in neuroblastoma. ADAM23 interacts with integrins promoting cell adhesion. However, ADAM23 full-involvement in cellular adhesion mechanisms remains to be established. The present study aimed for the development of biological tools, particularly the production of expression vectors that code for chimeric proteins containing human ADAM23 ectodomain fused to a human IgG Fc region. Nucleotide fragments coding for the residues 60-792 (ADAM23C1) and 287-792 (ADAM23C2) were cloned in the vector pINFUSE-hlgG1-Fc2 while the sequence 1-792 (ADAM23C3) was inserted onto modified plasmid pcDNA3.1-hlgG1-Fc2. Three different cell lineages (N2A, HEK-293T and CHO-K1) were transfected with the expression plasmids and the chimeric proteins detected in both cell extracts and culture supernatants by monoclonal antibody DL11C8. N2A cell lineage presented the most efficient expression/secretion of the three chimeric proteins. CHO-K1 showed chimeric ADAM23C1 and ADAM23C2 secretion, although ADAM23C3 was not observed in supernatants. The full-length construction (C3) was always detected as a processed protein, indicating that endogenous ADAM23 signal peptide and processing signals were correctly translated by cellular host machinery. Several protocols were compared for purification of chimeric proteins from culture supernatant, being ammonium sulfate salting-out the most practical and convenient. Besides, it was established that mature ADAM23 (70 kDa) is the abundant form in the mouse brain and the processed protein is located at N2A cell surface. In addition it was showed, for the first time, that non-processed ADAM23 (100 kDa) has low expression in the central nervous system when compared with the processed 70 kDa form. Interestingly, tumoral cell lines (MDA-MB-435 and N2A) presented the opposite behavior. If the non-processed/mature ratio profile is specific for each cell line or has a role in the tumoral phenotype will be further investigated in future.

Key words: ADAM23. Ectodomain. Disintegrin. Metalloprotease. Fc chimeric proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA DE UMA ADAM.....	23
FIGURA 2 - DIAGRAMA DAS INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DAS INTEGRINAS COM OS DIFERENTES MOTIVOS (TRIPLEPTÍDEOS COMO O RGD) DAS DESINTEGRINAS DE VENENO DE SERPENTES.....	26
FIGURA 3 - MODELO ESTRUTURAL REPRESENTANDO O SÍTIO CATALÍTICO E A VOLTA DE METIONINA DA PROTEÍNA ADAMALISINA II.....	30
FIGURA 4 - ALINHAMENTO COMPARATIVO DA SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS ADAM15 MURINA E HUMANA.....	37
FIGURA 5 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO INTRACELULAR DA PROTEÍNA ADAM15 MURINA E DO POSICIONAMENTO DOS DOMÍNIOS METALOPROTEASE E DESINTEGRINA, ALÉM DO PRÓ-DOMÍNIO E DO DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO NA PROTEÍNA MADURA.....	39
FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DO DOMÍNIO DA ADAM23 E OUTRAS ADAMS HUMANAS	45
FIGURA 7 - FIGURAS MOSTRANDO ANIMAL NOCAUTE PARA ADAM23, ANIMAL SELVAGEM E CEREBELO DE ANIMAL SELVAGEM	47
FIGURA 8 - ESQUEMA DAS CONSTRUÇÕES DO ECTODOMÍNIO DA ADAM23	58
FIGURA 9 - ESQUEMA DO ECTODOMÍNIO DA ADAM23 FUSIONADO À REGIÃO FC DE UMA IGG1 HUMANA	58
FIGURA 10 - MAPA DO PLASMÍDEO VETOR DE EXPRESSÃO PINFUSE-HIGG1-FC2 E O SEU SÍTIO DE POLICLONAGEM EM VERMELHO	63
FIGURA 11 - MAPA DO PLASMÍDEO VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1(-) E O SEU SÍTIO DE POLICLONAGEM.....	64
FIGURA 12 - SEQUÊNCIA CODIFICANTE (CDS) DO CDNA DA ADAM23 HUMANA	66
FIGURA 13 - PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADAM23 DIS-CYS	96
FIGURA 14 - TESTE DO PADRÃO DE REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DE HIBRIDOMA DL11C8 EM EXTRATOS DE ENCÉFALO POR WESTERN BLOTTING	98
FIGURA 15 - TESTE DE REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DE HIBRIDOMA DL11C8 EM EXTRATOS DE TECIDOS DE CAMUNDONGO ENRIQUECIDOS COM A CONCANAVALINA A-SEPHAROSE POR WESTERN BLOTTING	99
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE ADAM23 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.....	101
FIGURA 17 - A LINHAGEM NEURONAL N2A CO-EXPRESSA AS FORMAS DE 70 KDA E 100 KDA DE ADAM23.....	103

FIGURA 18 - A FORMA PROCESSADA (70 KDA) DE ADAM23 ESTÁ PRESENTE NA FACE EXTERNA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DA LINHAGEM N2A.....	105
FIGURA 19 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAR O INSERTO ADAM23C1, REFERENTE À CONSTRUÇÃO 1.....	107
FIGURA 20 - REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PINFUSE-HIGG1-FC2 E DO INSERTO ADAM23C1.....	108
FIGURA 21 - REAÇÃO DE PCR PARA IDENTIFICAR QUAIS COLÔNIAS CONTINHAM O PLASMÍDEO PINFUSE-ADAM23C1-HIGG1-FC2.....	109
FIGURA 22 - ANÁLISE DA REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PINFUSE-HIGG1-FC2 E DO INSERTO ADAM23C2.....	111
FIGURA 23 - ANÁLISE DA REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PCDNA3.1(-) E DO INSERTO HIGG1-FC2.....	112
FIGURA 24 - ANÁLISE DA REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PCDNA3.1-HIGG1-FC2 E DO INSERTO ADAM23C3.....	113
FIGURA 25 - TESTE DE EXPRESSÃO DE HIGG1-FC2 DO VETOR PINFUSE-HIGG1-FC2 EM CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS.....	114
FIGURA 26 - EXPRESSÃO DOS CONSTRUTOS ECTO-ADAM23-HIGG1-FC2 (C1, C2 E C3) NAS LINHAGENS N2A, HEK-293T E CHO-K1.....	118
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DAS PROTEÍNAS-FC QUIMÉRICAS SECRETADAS POR N2A, HEK-293T E CHO-K1 À PROTEÍNA A-SEPHAROSE.....	121
FIGURA 28 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM AS TRÊS CONSTRUÇÕES DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS.....	122
FIGURA 29 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1.....	123
FIGURA 30 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1.....	125
FIGURA 31 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1 (PINFUSE-ADAM23C1-HIGG1-FC2).....	127
FIGURA 32 - ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA ADAM23 DEVIDO A UMA MUTAÇÃO PRESENTE NO CDNA DESSA PROTEÍNA UTILIZADO COMO MOLDE.....	135

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO APÊNDICE

FIGURA A1 - DADOS DO UNIPROT PARA A ESTRUTURA DA ADAM23 HUMANA	166
FIGURA A2 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 24 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PINFUSE- ADAM23C1-HIGG1-FC2.....	169
FIGURA A3 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 1 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PINFUSE- ADAM23C2-HIGG1-FC2.....	171
FIGURA A4 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 8 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1- HIGG1-FC2.....	172
FIGURA A5 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 15 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1- ADAM23C3-HIGG1-FC2.....	177

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DE INFORMAÇÕES DAS CLONAGENS	68
TABELA 2 - INFORMAÇÕES DE CICLOS DE TEMPERATURA POR TEMPO DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAR CADA INSERTO.....	71
TABELA 3 - RESUMO DAS INFORMAÇÕES DAS REAÇÕES DE PRÉ-SEQUENCIAMENTO DE CADA CLONAGEM E DOS SEUS RESPECTIVOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE EXTREMIDADE E/OU INTERNOS	80
TABELA 4 - TABELA DE SATURAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -ADAM23 – Anticorpo anti-ADAM23

α -IgG – Anticorpo anti-IgG

$\alpha v \beta 3$ – Integrina de subunidade αv e subunidade $\beta 3$

Acc65I – Enzima de restrição

ADAM – Desintegrina e metaloproteinase, do inglês, *A disintegrin and metalloproteinase*

ADAM23C1 – Construção 1 do ectodomínio da ADAM23

ADAM23C2 – Construção 2 do ectodomínio da ADAM23

ADAM23C3 – Construção 3 do ectodomínio da ADAM23

ADAMTS – Desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina, do inglês, *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpo, do inglês, *antibody cellular cytotoxicity*

APMA – Acetato aminofenil mercúrico, do inglês, *aminophenylmercuric acetate*

ATCC – Coleção de microorganismos Norte Americana, do inglês, *American Type Culture Collection*

BglIII – Enzima de restrição

BLAST – Ferramenta básica de busca por alinhamento local, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Proteína albumina do soro bovino

ca. – Cerca de

CA1 – Região do hipocampo

CDC – Citotoxicidade celular dependente do complemento, do inglês, *complement-dependent cytotoxicity*

CHO – Célula de ovário de hamster chinês, do inglês, *chinese hamster ovary cell*

COS-7 – Fibroblastos de rim de macaco verde

CS – Sulfato de condroitina, do inglês, *chondroitin sulfate*

DH5 α – Estirpe de bactéria *E. coli*

Dis-Cys – Proteína ADAM23 recombinante contendo apenas os domínios desintegrina e cisteína

DL11C8 – Sobrenadante de hibridoma DL11C8 contendo anticorpo anti-ADAM23

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

E. coli – Bactéria *Escherichia coli*

EcoRI – Enzima de restrição

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF – Fator de crescimento epidermal, do inglês, *epidermal growth factor*

ELISA – Ensaio imunoenzimático, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EV – Vetor vazio, do inglês, *Empty Vector*

Fc – Região Fc de Imunoglobulina

G418 – Antibiótico geneticina

Hck – Tirosina quinase linfócito-específica

HEK-293T – Célula de rim de embrião humano, do inglês, *Human Embryonic Kidney cells*

HeLa – Linhagem de células de câncer cervical, do nome, *Henrietta Lacks*

HRP – Enzima peroxidase de raiz de rábano silvestre, do inglês, *Horseradish*

Peroxidase

HS – Heparan sulfatado, do inglês, *Heparan Sulfate*

HTLV - Vírus da leucemia humana de células-T, do inglês, *Human T-Cell*

Leukemia Virus

IgG – Imunoglobulina

IL-2ss – Sequência sinal de IL-2 no vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2 necessária para secreção

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

iRNA – RNA de interferência

kB – Kilobases

λ HindIII – Marcador de alto peso molecular

LB – Meio Luria-Broth para cultivo de bactéria *E. coli*

Lck – Tirosina quinase linfócito-específica

LGI1 – Proteína 1 rica em leucina inativada em glioma, do inglês, *Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 1*

LMW – Marcador de baixo peso molecular, do inglês, *Low Molecular Weight*

mA – Miliampere

MadCAM-1 – Molécula adressina de adesão celular de mucosas- 1, do inglês, *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*

MEC – Matriz extracelular

MCF-7 – Linhagem de fibroblastos de câncer de glândula mamária, do inglês, *Michigan Cancer Foundation-7*

mCs – Sítio de multiclonagem do vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2

MDA-MB 435 – Linhagem de fibroblasto de câncer de glândula mamária

MDA-MB 435-1C – Linhagem de fibroblasto de câncer de glândula mamária silenciada com iRNA para expressão de ADAM23.

MDC – Quimiocinas derivadas de macrófagos, do inglês, *Macrophage-derived Chemokine*

MDC15 – ADAM15

MEM – Meio mínimo essencial, do inglês, *Minimum Essential Medium*

µg – Micrograma

µg/µl – Micrograma por microlitro

min – Minuto

mMDC15 – ADAM15 murina

MMP – Metaloproteinase da matriz extracelular, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*

mRNA – RNA mensageiro

MW – Peso Molecular, do inglês, *Molecular Weight*

NB100 – Linhagem celular de neuroblastoma

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

N2A – Linhagem de neuroblastoma murino, também chamada Neuro-2a

NEM – Inibidor de protease N-etil-maleimida

NheI – Enzima de restrição

Ni – Níquel

PAGE – Gel de poliacrilamida, do inglês, *Polyacrylamide gel*

pb – Pares de bases

PBS – Solução salina tamponada por fosfato, do inglês, *phosphate buffered saline*

PC – Enzima pró-proteína convertase

PCR – Reação em cadeia polimerase, do inglês, *polymerase chain reaction*

P19 – Linhagem celular de carcinoma embrionário pluripotente

PI – Fosfatidilinositol

PMSF – Inibidor de protease Fluoreto de fenilmetilsulfonil, do inglês, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

PVDF – Membrana de Transferência de fluoreto de polivinilidene, do inglês, *Polyvinylidene fluoride*

RE – Retículo endoplasmático

RGD – Motivo tripeptídeo RGD conservado em desintegrinas que se liga às integrinas na adesão celular

RPMI – Meio de cultura, do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDS – Dodecil sulfato de sódio, do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*

SFB – Soro fetal bovino

SH – Domínio homólogo à Src tirosina quinase, do inglês, *SRC Homology Domain*

SH3PX – Proteína nexina adaptadora que contém os domínios SH3 e PX

SHSY-5Y – Linhagem celular de neuroblastoma humano

SNC – Sistema nervoso central

Src – Família de tirosina quinases

SVMP – Metaloprotease de veneno de serpente, do inglês, *Snake Venom Metalloproteases*

TACE – Enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também conhecida como ADAM-17, do inglês, *TNF- α Converting Enzyme*

TBST – Tampão Tris salino com Tween-20 0,05%, do inglês, *Tris Buffered Saline with Tween-20*

TCA – Ácido tricloroacético, do inglês, *Trichloroacetic acid*

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteases, do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*

U373 – Linhagem celular de glioblastoma/astrocitoma humano

U87 MG – Linhagem epitelial de glioblastoma/astrocitoma primário maligno humano

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular 1, do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule type 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Características e funções das proteínas metaloproteases desintegrinas	23
2.2 Domínios das desintegrinas metaloproteases (ADAMs)	27
2.2.1 Pró-domínio	27
2.2.2 O domínio metaloprotease	29
2.2.3 O domínio desintegrina das ADAMs	32
2.2.4 Os domínios ricos em cisteína e domínios do tipo EGF	34
2.2.5 A cauda citoplasmática	35
2.3 Processamento e trânsito intracelular da ADAM15	38
2.4 Características e funções da proteína MDC3 ou ADAM23	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Cultivo Celular	49
3.2 Purificação da ADAM23 recombinante	51
3.3 Purificação IgG Anti-ADAM23 por Sepharose A/G	54
3.4 Ensaio imunoenzimático de ELISA das IgGs purificadas	55
3.5 Estratégias de clonagem	57
3.6 Reações de PCR	65
3.6.1 Desenho dos iniciadores para clonagem das regiões do ectodomínio da ADAM23 em pINFUSE-hIgG1-Fc2	65
3.6.2 Obtenção dos insertos para clonagem das porções do ectodomínio da ADAM23 e a da porção Fc2 da imunoglobulina IgG1 humana	68
3.7 Purificação de DNA plasmidial a partir de gel de agarose	71
3.8 Reações de digestão dos insertos obtidos e dos seus respectivos plasmídeos	72
3.9 Reações de ligação dos insertos aos seus respectivos plasmídeos digeridos	74
3.10 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH5 α	76
3.11 PCR de colônia	77
3.12 Purificação de DNA plasmidial por Miniprep	78
3.13 Reações de PCR pré-sequenciamento	79
3.14 Reações de precipitação pré-sequenciamento	81
3.15 Máxima preparação de plasmídeos por Maxiprep	81
3.16 Transfecção de células HEK-293T e CHO-K1 por precipitação por cálcio	83
3.17 Transfecção de células N2A por lipofectamina	84
3.18 Biotinilação de células N2A	85
3.19 Obtenção de extrato celular total (<i>whole cell lysate</i>)	86
3.20 Obtenção de extrato total e parcial de encéfalo de camundongo adulto	88
3.21 Quantificação da concentração protéica por ensaio de Bradford	89
3.22 Enriquecimento de extratos celulares por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose	89
3.23 Precipitação de proteínas presentes em sobrenadante de cultura celular pelo método do metanol-clorofórmio	90
3.24 Precipitação por sal de proteínas presentes em sobrenadante de cultura celular com sulfato de amônio	91
3.25 Cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose	92

3.26	Ensaio de Western Blotting	93
4	RESULTADOS	95
4.1	Purificação da ADAM23 recombinante (ADAM23-Dis-Cys) em sistema bacteriano	95
4.2	Avaliação do padrão de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 (DL11C8) sobre diferentes amostras.....	97
4.3	Avaliação das formas de ADAM23 em diferentes linhagens celulares	100
4.4	Clonagem dos três construtos do ectodomínio da ADAM23.....	106
4.4.1	Construção do vetor pINFUSE-ADAM23C1-hlgG1-Fc2 (ADAM23C1)	106
4.4.2	Construção do vetor pINFUSE-ADAM23C2-hlgG1-Fc2 (ADAM23C2)	110
4.4.3	Construção do vetor pcDNA3.1-hlgG1-Fc2	111
4.4.4	Construção do vetor pcDNA3.1-ADAM23C3-hlgG1-Fc2 (ADAM23C3)	112
4.5	Avaliação da expressão da proteína Fc de IgG humana do vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2.....	113
4.6	Expressão das quimeras ADAM23C1, C2 e C3 nas linhagens HEK-293T, N2A e CHO-K1	114
4.7	Avaliação da afinidade das proteínas quimeras ADAM23C1, C2 e C3 à proteína A-Sepharose.....	118
4.8	Avaliação dos métodos de concentração dos sobrenadantes de cultura contendo as proteínas quimeras secretadas	121
5	DISCUSSÃO	128
5.1	Avaliação do padrão de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 (DL11C8) sobre diferentes amostras.....	128
5.2	Avaliação das formas de ADAM23 em diferentes linhagens celulares	130
5.3	Clonagem dos três construtos do ectodomínio da ADAM23.....	134
5.4	Expressão das quimeras ADAM23C1, C2 e C3 nas linhagens HEK-293T, N2A e CHO-K1	135
5.5	Avaliação da afinidade das proteínas quimeras ADAM23C1, C2 e C3 à proteína A-Sepharose.....	146
5.6	Avaliação dos métodos de concentração dos sobrenadantes de cultura contendo as proteínas quimeras secretadas	149
6	CONCLUSÕES	152
7	PERSPECTIVAS	154
	REFERÊNCIAS	155
	APÊNDICE	166

1 INTRODUÇÃO

ADAM23 é uma proteína desintegrina-metaloprotease membro da família das ADAMs cujo papel biológico ainda não está totalmente elucidado. Sabe-se que várias desintegrinas celulares funcionam como proteinases. As ADAMs em geral atuam como enzimas proteolíticas e moléculas de adesão celular. Sabe-se que a ADAM23 está envolvida no processo de adesão celular em neuroblastomas e que ela está mais envolvida neste processo do que em atuar como protease. Além disso, a ADAM23 interage com integrinas promovendo a adesão celular. Entretanto, os mecanismos de adesão celular envolvendo a ADAM23 humana ainda não estão totalmente destrinchados e elucidados.

A ADAM23 parece estar envolvida nos processos de câncer, apresentando altos níveis de expressão em linhagens tumorais, como por exemplo, em tumores primários de mama, em neuroblastomas e em tumores gástricos. Além disso, sabe-se que animais deficientes para ADAM23 desenvolvem problemas neurológicos tais como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas, o que sugere que esta proteína tem papel fundamental no desenvolvimento do SNC.

A acentuada expressão de ADAM23 em neurônios piramidais na fase adulta sugere sua participação na manutenção do SNC adulto. No entanto, os mecanismos pelos quais esta molécula atua ainda permanecem obscuros. Informações sobre o trajeto e o processamento intracelular da ADAM23, além das propriedades do seu ectodomínio, podem ser importantes para a compreensão do papel estrutural e biológico dessa proteína.

Para que estas questões sejam esclarecidas, é necessária a construção de ferramentas moleculares que possam ser empregadas nos diferentes modelos biológicos utilizados pelo grupo. Essas ferramentas foram aqui produzidas e utilizadas na caracterização do perfil de expressão e do processamento intracelular das proteínas ADAM23-Fc quiméricas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Construção de vetores de expressão quimérica de ADAM23 com imunoglobulina humana e análise do perfil de expressão das construções em diferentes linhagens celulares.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Clonar o ectodomínio de ADAM23, com e sem o pró-domínio em dois diferentes vetores de expressão (pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 e pINFUSE-hlgG1-Fc2) para gerar proteínas quiméricas do ectodomínio da ADAM23 humana fusionado a uma região Fc de uma IgG humana (ectoADAM23-IgG1-Fc2).
- II. Obter o ectodomínio quimérico secretado solúvel da ADAM23 (ectoADAM23-IgG1-Fc2) através do uso de linhagens celulares eucarióticas (HEK-293T, N2A e CHO-K1) transfectadas com o vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 e com o vetor pcDNA3.1-hlgG1-Fc2.
- III. Analisar o perfil de expressão das diferentes quimeras protéicas em linhagens celulares de diferentes origens.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características e funções das proteínas metaloproteases desintegrinas

As ADAMs pertencem a uma família de proteínas transmembranas do tipo I que possuem uma estrutura comum que inclui pró-domínio, domínios metaloprotease, desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), transmembrana e citoplasmático (Figura 1) (WHITE, 2003). As metaloproteases desintegrinas (também conhecidas como proteínas MDC, do inglês, *metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich*, ou como ADAMs, do inglês, *a disintegrin and metalloprotease*) são glicoproteínas ancoradas à membrana as quais atuam tanto na adesão celular, interagindo com integrinas, quanto na proteólise, clivando outras proteínas (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

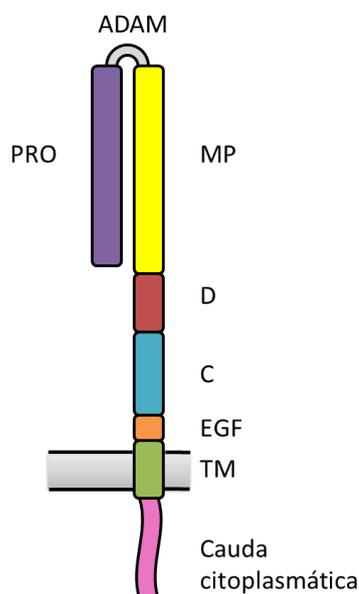


FIGURA 1 - ESTRUTURA DE UMA ADAM

NOTA: PRO: pró-domínio; MP: domínio metaloprotease; D: domínio desintegrina; C: domínio rico em cisteína; EGF: domínio semelhante ao EGF, fator de crescimento epidermal; TM: domínio transmembrana; e cauda citoplasmática. O sítio de clivagem da ADAM23 está situado entre o pró-domínio e o domínio metaloprotease. FONTE: Adaptado de WHITE, 2003.

As ADAMs fazem parte da superfamília Metzincina, que está dentro do grupo das metaloproteases dependentes de zinco. Esse grupo contém três grandes superfamílias: Gluzincina, Metzincina e Aspizincina. A superfamília Metzincina é

composta pela família das metaloproteases de matriz (MMP); pela família das Adamalinas (metaloproteases solúveis de veneno de serpente)/ ADAMs/ ADAMTS (ADAMs com motivo trombospondina)/ Reprolisinas; pela família das Astacinas (proteases encontradas desde bactérias até mamíferos) e, pela família das Serralinas (fatores de virulência secretados por bactérias Gram-negativas) (GOMIS-RUTH, 2003). As ADAMs, as MMPs, ADAMTSs e as metaloproteases e desintegrinas de veneno de serpente possuem uma sequência sinal na região N-terminal que as direciona para a via de secreção. Estas proteínas são então sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

As ADAMs apresentam uma variedade de funções biológicas tais como: liberação de fatores de crescimento e citocinas, desenvolvimento da musculatura (YAGAMI-HIROMASA *et al.*, 1995; SEALS & COURTNEIDGE, 2003), papéis importantes no desenvolvimento, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de vários tipos celulares, na regulação do crescimento axonal e mielinização, no processamento do ectodomínio de outras proteínas (BLOBEL *et al.*, 1992; SCHLONDORFF & BLOBEL, 1999; PRIMAKOFF & MYLES, 2000; YANG *et al.*, 2006), na fertilização (PRIMAKOFF *et al.*, 1987; BLOBEL *et al.*, 1992; MYLES *et al.*, 1994; EVANS, 2002), liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) a partir da membrana plasmática (BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997; ROSENDAHL *et al.*, 1997; WESKAMP *et al.*, 2004), e na modulação da função de Notch, onde a ADAM10 parece ser responsável pela ativação proteolítica da proteína transmembrana Notch, que é necessária para a inibição da sinalização durante a diferenciação neurogênica (WOLFSBERG & WHITE, 1996; BLAUMUELLER *et al.*, 1997; BLOBEL, 1997; PAN & RUBIN, 1997; SOTILLOS *et al.*, 1997; KLEIN, 2002).

Membros da família ADAM executam suas funções celulares através da sua topografia única resultado da disposição dos diferentes domínios estruturais acima descritos (WOLFSBERG *et al.*, 1995). O processamento proteolítico na via secretória é um passo importante na maturação e ativação de proteínas secretadas e ancoradas à membrana. Pró-proteínas convertases (PCs) como a furina têm um papel crucial na maturação, clivagem e ativação de diferentes tipos alvos, incluindo as desintegrinas metaloproteases, que contêm sítios de clivagem para as pró-

proteínas convertases nos seus domínios extracelulares. Isso sugere que o processamento proteolítico na via secretória possui um papel na maturação e ativação dessas proteínas (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; WESKAMP *et al.*, 1996; WOLFSBERG & WHITE, 1996; LUM *et al.*, 1998; WESKAMP *et al.*, 2004).

Estudos sobre o processamento da fertilina, de espermatozoide mostraram que a sua subunidade α (ADAM1) contém um sítio de clivagem para a pró-proteína convertase (PC) (RX(K/R)R) entre o seu domínio metaloprotease e desintegrina e é processada na via secretória próxima a esse sítio de clivagem antes de a proteína emergir na superfície celular (LUM & BLOBEL, 1997). A fertilina α , quando não-processada por uma PC de espermátide, leva à infertilidade (MBIKAY *et al.*, 1997) e a fertilina β (ADAM2) precisa ser processada na superfície do espermatozóide em trânsito através do epidídimo para garantir capacidade de fertilização do primeiro (BLOBEL *et al.*, 1990).

Desde a descoberta da fertilina do espermatozóide, um total de 33 proteínas ADAMs foram identificadas numa variedade de organismos, 24 das quais são encontradas em camundongos. Cerca de metade dessas proteínas apresentam uma sequência de sítio catalítico consenso (HEXXH) no seu domínio metaloprotease e parecem ser cataliticamente ativas. As ADAMs remanescentes não possuem um sítio catalítico em seu domínio metaloprotease e parecem não ser cataliticamente ativas, e, portanto, parecem não apresentar uma função de metaloprotease, apesar de que o domínio é altamente conservado (WOLFSBERG & WHITE, 1996). As ADAMs parecem estar envolvidas também no mecanismo de adesão celular, por exemplo, através das interações com integrinas (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; NATH *et al.*, 2000) ou syndecans (IBA *et al.*, 2000), que são uma família de proteínas transmembranas capazes de carregar cadeias de heparan sulfato (HS, do inglês, *heparan sulfato*) e de condroitin sulfato (CS, do inglês, *chondroitin sulfato*) (TKACHENKO *et al.*, 2005).

O processamento proteolítico das metaloproteases desintegrinas poderia servir para ativar a protease mediante a remoção do pró-domínio ou poderia alternativamente regular a função de outros domínios, como o domínio desintegrina que parece ser responsável por mediar as interações célula-célula através da

ligação às integrinas (LUM *et al.*, 1998). O processamento poderia também liberar domínios extracelulares solúveis de proteínas a partir da membrana plasmática.

As desintegrinas podem atuar como agonistas ou antagonistas de integrinas e podem desempenhar papéis importantes em muitos processos biológicos que envolvem integrinas (Figura 2) (SOUZA *et al.*, 2000; MONLEON *et al.*, 2003; COMINETTI *et al.*, 2004; CALVETE, 2005; CIDADE *et al.*, 2006).

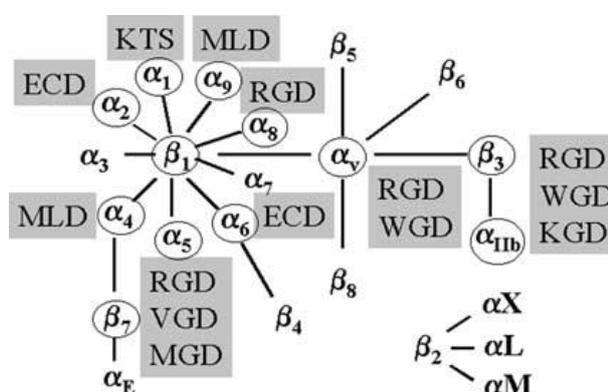


FIGURA 2 - DIAGRAMA DAS INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DAS INTEGRINAS COM OS DIFERENTES MOTIVOS (TRIEPTÍDEOS COMO O RGD) DAS DESINTEGRINAS DE VENENO DE SERPENTES

NOTA: Motivos tripeptídicos como o RGD estão presentes no domínio desintegrina das ADAMS, atuando na interação com integrinas como $\alpha_v\beta_3$.

FONTE: CALVETE *et al.*, 2005.

O processamento proteolítico de outra desintegrina metaloprotease, a α meltrina, também parece ter um papel na regulação da função desta proteína na fusão de mioblastos (YAGAMI-HIROMASA *et al.*, 1995). Em contraste à fertilina, onde o sítio de clivagem da pró-proteína converte-se direcionalmente a remoção do domínio metaloprotease, várias outras proteínas MDC apresentam um sítio de clivagem da pró-proteína converte-se entre o seu pró-domínio e o domínio metaloprotease (YAGAMI-HIROMASA *et al.*, 1995; KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; WESKAMP *et al.*, 1996; BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997; ROSENDAHL *et al.*, 1997; INOUE *et al.*, 1998). Isso sugere que o pró-domínio, mas não o domínio metaloprotease destas proteínas é removido na via secretória.

2.2 Domínios das desintegrinas metaloproteinases (ADAMs)

2.2.1 Pró-domínio

A sequência N-terminal das ADAMs contém uma sequência sinal que as direciona para a via secretória e um pró-domínio que está envolvido na maturação das ADAMs (Figuras 1 e 4). A latência de algumas proteínas como a colagenase de fibroblastos humanos é resultado da formação de um complexo intramolecular entre um único resíduo de cisteína em seu domínio propeptídeo (pró-domínio) e o átomo de Zinco essencial no domínio catalítico, um complexo que bloqueia o sítio ativo (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990; BECKER *et al.*, 1995). Dessa forma, o pró-domínio mantém o sítio metaloprotease das ADAMs inativo, onde um resíduo conservado no pró-domínio coordena o sítio ativo do átomo de Zinco, e assim sequestra o domínio metaloprotease numa conformação inativa. Enzimas como a colagenase podem ser ativadas por múltiplos meios, os quais envolvem a dissociação do resíduo de cisteína do complexo. Isso é um mecanismo de ativação chamado de troca de cisteína (*cysteine-switch*). O pró-domínio que contém o resíduo crítico de cisteína e o domínio catalítico que contém o sítio de ligação ao Zinco são os dois únicos domínios comuns a todas as MMPs. A sequência aminoacídica envolvendo ambos o resíduo crítico de cisteína e uma região das cadeias da proteínas contendo duas das histidinas putativas ligantes de Zinco são altamente conservados (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Inibidores farmacológicos da via secretória como brefeldina A ou monesina bloqueiam o processamento da ADAM9 e ADAM15, posicionando o local do processamento das ADAMs e da ativação das mesmas na rede trans-Golgi (LUM *et al.*, 1998; ROGHANI *et al.*, 1999; HOWARD *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2002). Este local é consistente com a localização das furinas e outras pró-proteína convertases (PCs) (NAKAYAMA, 1997).

PCs clivam o pró-domínio do resto da proteína em um motivo conservado Rx(R/K)R, liberando efetivamente o pró-domínio e trocando o direcionamento do Zinco para o domínio metaloprotease, tornando-o capacitado para a atividade catalítica. Suporte para tal mecanismo vem de uma série de estudos experimentais.

Primeiramente, a furina cliva a ADAM15 *in vitro* (LUM *et al.*, 1998). Em segundo lugar, a superexpressão de PCs como PC7 e furina induz o aumento dos níveis de ADAM10 processada *in vivo*, e o processamento é bloqueado pela adição de um peptídeo análogo do sítio de clivagem das PCs (ANDERS *et al.*, 2001). Em terceiro lugar, uma mutação nos sítios de clivagem das PCs bloqueia o processamento de ADAM10, ADAM12 e ADAM19 em suas formas maduras ativas (LOECHEL *et al.*, 1998; ANDERS *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2002). Juntos, esses dados indicam que, *in vivo*, a clivagem do pró-domínio é um pré-requisito para a geração de uma protease ativa. Outros dados consistentes com o modelo vêm da observação de que, *in vitro*, o efeito inibitório de uma mutação no sítio de clivagem PC é superado mediante tratamento com NEM (N-etil-maleimida), um inibidor de protease, um composto sulfidril reativo que alquila o resíduo de cisteína, alterando o direcionamento do Zinco para o sítio ativo da metaloprotease, não necessitando da clivagem dependente da ativação de proteases (LOECHEL *et al.*, 1999). A mutação do resíduo de cisteína no pró-domínio da ADAM12 para uma alanina ou histidina também leva à ativação de proteases independentemente da clivagem do pró-domínio (ANDERS *et al.*, 2001). Finalmente, a aplicação dos peptídeos de troca de cisteína nas células inibe ADAM9 e ADAM17, devido à competição do peptídeo pelo direcionamento do Zinco em *trans* (ROGHANI *et al.*, 1999).

Esse mecanismo de maturação e ativação se aplica à maioria das metaloproteases ADAMs. Entretanto, existem casos em que as ADAMs podem passar por ativação autocatalítica. Isso ocorre com as ADAM8 e ADAM28, nas quais mutações de bloqueio de atividade nos domínios metaloproteases produzem apenas a forma precursora da proteína em células transfectadas (HOWARD *et al.*, 2000; SCHLOMANN *et al.*, 2002). Outra função secundária do pró-domínio é funcionar como chaperona realizando o dobramento apropriado das ADAMs, principalmente do domínio metaloprotease. Alguns estudos demonstraram que a remoção do pró-domínio da ADAM17 gera uma protease inativa (MILLA *et al.*, 1999).

Os construtos de ADAM10 sem o seu pró-domínio são cataliticamente inativos *in vivo*. Entretanto, a cotransfecção dessa forma junto com outro construto que expressa o pró-domínio da ADAM10 gera atividade de protease (ANDERS *et al.*, 2001). Além disso, uma forma de ADAM12-S sem o pró-domínio, diferentemente da

proteína selvagem, não é secretada da célula, ao invés disso, permanece no sistema de endomembranas precoce (LOECHEL *et al.*, 1999). A deleção de ambos os domínios pró-domínio e metaloprotease favorece a secreção da proteína. Dessa forma, parece que os construtos com deleção do pró-domínio são sintetizados numa forma inativa porque eles são inapropriadamente dobrados durante a síntese. Portanto, o pró-domínio parece ser necessário para a manutenção da latência dessas enzimas, e ajuda no dobramento correto das ADAMs, na estruturação do sítio ativo catalítico, e no trânsito adequado das ADAMs através da via secretória (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

2.2.2 O domínio metaloprotease

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*) constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco, chamadas metzincinas. A posição do domínio metaloprotease pode ser vista nas Figuras 1 e 4. A cristalização do domínio metaloprotease de vários membros da família metzincina, incluindo ADAM17 (TACE), permitiu uma definição mais aprofundada do mecanismo de atividade proteolítica (MASKOS *et al.*, 1998). O sítio ativo contém átomos de Zinco e moléculas de água necessários para o processamento proteolítico dos substratos protéicos, que são coordenados por 3 resíduos de histidina conservados e por uma metionina. Esses três resíduos de histidina estão envolvidos na ligação do íon de Zinco cataliticamente essencial. O resíduo de metionina é altamente conservado e está situado abaixo do sítio ativo do metal como parte da sobreponível volta de Metionina (*Met-turn*). As metzincinas apresentam a seguinte estrutura tridimensional: um motivo consenso de ligação ao Zinco (HEXXHXXGXXH), uma metionina conservada contendo uma 1,4-folha β (volta de metionina) formando a base de seus sítios ativos. Além dessa região conservada, as cadeias polipeptídicas das quatro estruturas divergem e, tendo passado por múltiplas estruturas de volta de comprimentos diferentes, a aproximação do sítio ativo de Zinco em uma 1,4-folha β de conformação virtualmente idêntica e posição relativa ao metal. Esta folha β contém um resíduo de

metionina que é altamente conservado e chamado de volta de Metionina (*Met-turn*) (Figura 3). Em proteinases alcalinas, o resíduo de metionina conservado abriga o único átomo de enxofre presente na proteína. A metionina conservada parece ser essencial para a integridade da estrutura do sítio ativo de ligação ao Zinco dessa classe de enzimas (STOCKER *et al.*, 1995). Existe uma grande conservação desse sítio catalítico entre as outras metzincinas, entretanto, as proteínas individuais nessa família se distinguiram em algumas estruturas que podem levar à especificidade por substratos e inibidores de protease (STOCKER *et al.*, 1995). Com base nessa definição estrutural, 12 das ADAMs humanas parecem ser proteoliticamente ativas, embora apenas metade delas apresente atividade de protease.

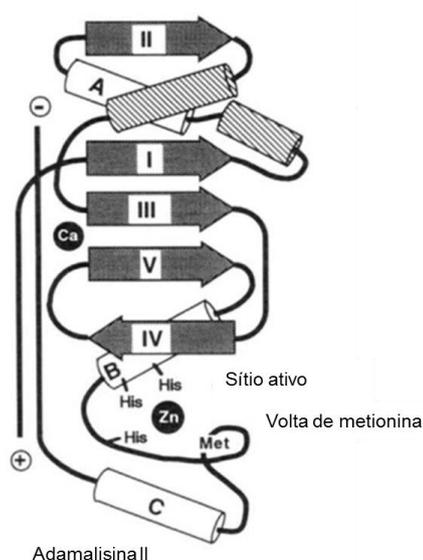


FIGURA 3 - MODELO ESTRUTURAL REPRESENTANDO O SÍTIO CATALÍTICO E A VOLTA DE METIONINA DA PROTEÍNA ADAMALISINA II.

NOTA: Representação dos elementos estruturais secundários de um membro da superfamília das metzincinas. As α -hélices estão em branco e etiquetadas com letras romanas maiúsculas. As folhas β estão sombreadas e indicadas por números romanos. Os resíduos comuns do sítio ativo e íons de metal estão indicados. Também está enfatizada a volta de metionina conservada (*Met-turn*) abaixo do sítio ativo.

FONTE: Adaptado de STOCKER *et al.*, 1995.

Alguns estudos examinaram através de bibliotecas de peptídeos os sítios de clivagem de seis membros da família MMP (TURK *et al.*, 2001). Os dados obtidos sugerem que as MMPs apresentam especificidade inata por sítios de clivagem particulares, entretanto, é esperado que outros fatores como a colocação das MMPs em membranas celulares com proteínas de superfície como integrinas e com

furinas nos contatos com substratos (PUYRAIMOND *et al.*, 2001; MU *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 2003), apresentem um papel importante na seleção de substratos.

Inibidores da atividade de metaloprotease das ADAMs são divididos em quatro grupos: aqueles que inibem por desnaturação; aqueles que inibem pela quelação com Zinco; inibidores de catálise e inibidores protéicos TIMPs. As duas primeiras categorias representam inibidores não seletivos como agentes redutores ou agentes quelantes de Zinco. A terceira classe surgiu a partir de esforços para desenvolver inibidores de MMPs e ADAMs, e compreendem os inibidores hidroxamatos que se ligam competitivamente ao sítio ativo. Esses provaram ser ferramentas adequadas para o estudo das ADAMs e MMPs (MOSS *et al.*, 2001).

A estrutura cristalina da ADAM17 ligada a um composto chamado IC-3, inibidor feito à base de hidroxamato, sugere que inibidores hidroxamato substituem as moléculas de água que coordenam o Zn no sítio ativo (LEE *et al.*, 2003). Outras propriedades químicas, como cadeia peptídica que se alinha junto ao sítio ativo, e uma metade hidrofóbica com um sítio ativo escondido, definem a sua forma e potência como inibidores de metaloprotease. Vários inibidores hidroxamatos foram testados em ensaios clínicos (HIDALGO & ECKHARDT, 2001). Dentre esses inibidores estão o Batimastat e o Marimastat, que foram desenhados para imitar o sítio de clivagem do colágeno, um substrato MMP. Outros inibidores hidroxamatos incluem cadeias laterais sintéticas que maximizam a forma do sítio catalítico (*e.g.*, CGS-27023). Entretanto, apesar da potência, esses inibidores não são sempre seletivos para MMPs. Uma comparação direta da seletividade dos inibidores de metaloprotease mais comumente utilizados indica que eles são igualmente inibidores das ADAMs (ROGHANI *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 2001). Batimastat e Ro-31-9790 inibem ADAM17 melhor do que muitas MMPs (BARLAAM *et al.*, 1999; AMOUR *et al.*, 2000).

Testes clínicos com Marimastat revelaram efeitos colaterais que podem ser devido à inibição de outras adamalinas (ou ADAMs) (HIDALGO & ECKHARDT, 2001). Esforços em gerar inibidores de metaloprotease específicos e seletivos continuam, e muitos desses novos compostos exibem melhor seletividade tanto para MMPs quanto para ADAMs (KOTTIRSCH *et al.*, 2002; SAWA *et al.*, 2002), e se diferenciam pelas atividades de secreção de fator de crescimento dependentes de

ADAMs (PARKIN *et al.*, 2002). Inibidores teciduais de metaloproteases, ou TIMPs, são reguladores endógenos de MMPs (BREW *et al.*, 2000). Existem quatro TIMPs conhecidas em vertebrados, que exibem forte potência de inibição de MMP. O domínio N-terminal das TIMPs se encaixa como uma cunha no sítio catalítico das MMPs, enquanto que o domínio C-terminal provavelmente bloqueia a especificidade de ligação. Entretanto, as TIMPs, não são totalmente seletivas para MMPs. TIMP-3 também inibe ADAM17 (AMOUR *et al.*, 2000) e ADAM12 (LOECHEL *et al.*, 2000), assim como a ADAM-TS4 e ADAM-TS5 (KASHIWAGI *et al.*, 2001). A ADAM10 é inibida pelas TIMPs 1 e 3 (AMOUR *et al.*, 2000). Entretanto, nem todas as ADAMs são sensíveis à TIMP-3, o processamento da mielina pela ADAM8 e ADAM9 não é inibido por TIMP (AMOUR *et al.*, 2002). Quanto à ativação de metaloproteases, por APMA (do inglês, *acetato p-aminofenil mercúrico*), acreditava-se que a ativação dava-se por deslocamento do pró-domínio do domínio metaloprotease por associação preferencial com o resíduo-chave de troca de cisteína. Porém, estudos em mutações de protodomínios MMP sugerem que o mecanismo de ativação seja mais complexo e relacionado com mudanças conformacionais no pró-domínio (GALAZKA *et al.*, 1999). APMA também ativa secreção de fator de crescimento dependente de ADAMs, possivelmente através de um mecanismo similar ao de ativação de MMP (MILLA *et al.*, 1999; MERLOS-SUAREZ *et al.*, 2001).

2.2.3 O domínio desintegrina das ADAMs

O domínio desintegrina recebeu este nome por estar presente nas metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs), onde se encontra envolvido em ligações de receptores de integrina em plaqueta. Isso evita a associação de plaquetas com seus ligantes naturais, tais como o fibrinogênio, resultando num bloqueio da agregação de plaquetas no local do ferimento. Esta interação de SVMPs mediada por desintegrina, juntamente com o colapso dos componentes da membrana basal ocasionado pela atividade de metaloprotease, leva à hemorragia

severa causada por picadas de serpentes portadoras destas toxinas (TAKEDA *et al.*, 2012).

O domínio das desintegrinas de proteínas ADAMs tem aproximadamente 90 aminoácidos (Figuras 1 e 4). Estruturalmente, pouco se sabe sobre este domínio das ADAMs, embora possa-se utilizar informações dos estudos estruturais de cristais SVMP e outros ligantes de receptores de integrina (GOMIS-RUTH *et al.*, 1994). Os domínios desintegrinas de SVMPs mimetizam o sítio de ligação de proteínas de matriz como a fibronectina para receptores de integrina. Assim como a fibronectina, muitas proteínas têm uma sequência consenso RGD em um trecho de 13 aminoácidos chamado de alça de desintegrina, que se projeta a partir da superfície da proteína e proporciona ligação a receptores de integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (BLOBEL *et al.*, 1992). Por outro lado a maioria das ADAMs (inclusive ADAM15 murina) não possui sequência RGD na alça de desintegrina. No entanto, os domínios desintegrina destas ADAMs associam-se a receptores de integrina de forma independente da sequência RGD.

A subfamília de receptores de integrina $\alpha\text{4}/\alpha\text{9}$ não reconhece RGD, mas se liga a sequências que contêm ácido aspártico em proteínas como a fibronectina, VCAM-1, MadCAM-1, e tenascina-C (ZHU & EVANS, 2002). As alças de desintegrina de cada ADAM, exceto da ADAM10 e ADAM17, também possuem sequências semelhantes que contêm ácido aspártico. Muitas ADAMs compartilham uma sequência (Rx6DEVF) no domínio de desintegrina que, em caso de mutação, inibe a associação com integrinas $\alpha\text{9}\beta\text{1}$. Além disso, todas ADAMs testadas exceto ADAM10 e ADAM16, podem associar-se a $\alpha\text{9}\beta\text{1}$ (ETO *et al.*, 2002). No entanto, ADAMs podem, ainda, associar-se a outros receptores de integrina. Por exemplo, ADAM28 liga-se a $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (BRIDGES *et al.*, 2002), ADAM15 liga-se a $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, e muitas ADAMs podem associar-se a receptores de integrina $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ (CHEN *et al.*, 1999; NATH *et al.*, 2000).

2.2.4 Os domínios ricos em cisteína e domínios do tipo EGF

Os domínios rico em cisteína e do tipo EGF (Figuras 1 e 4) parecem não fornecer temas funcionais como observado nos domínios desintegrina e metaloprotease. Foi originalmente observado que as ADAMs 1, 3, 12 e 14 possuem um motivo em seus domínios ricos em cisteína que é muito semelhante às sequências encontradas nos peptídeos de fusão viral (BLOBEL & WHITE, 1992). Isso, somado às observações de que as ADAMs 1, 3 e 12 participam das reações de fusão celular, pode indicar que o domínio rico em cisteína está envolvido na fusão de membranas. O domínio rico em cisteína parece complementar a capacidade de ligação do domínio desintegrina, e talvez bloquear a especificidade de interações mediadas pelo domínio de desintegrina (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). O domínio rico em cisteína (e talvez o domínio desintegrina) da ADAM12 promove a adesão de fibroblastos e mioblastos (ZOLKIEWSKA, 1999). Além disso, o domínio rico em cisteína e o domínio desintegrina da ADAM13 se ligam ambos à fibronectina e aos receptores de integrina que contêm a subunidade $\beta 1$, e a ligação pode ser inibida com anticorpos contra o domínio rico em cisteína (GAULTIER *et al.*, 2002).

A função específica do domínio rico em cisteína é que ele age como um ligante para a molécula de adesão celular syndecan, que são uma família de proteínas transmembranas capazes de carregar cadeias de heparan sulfato (HS, do inglês, *heparan sulfate*). Esse conhecimento foi relatado em um estudo mostrando que o domínio rico em cisteína da ADAM12 promove a ligação *in vitro* de diferentes linhagens de células tumorais, assim como uma variedade de células não tumorais de origem óssea e muscular, através da interação com proteoglicanos de heparan sulfato de superfície celular (IBA *et al.*, 2000). A transfecção de syndecans torna as células competentes para a adesão do domínio rico em cisteína da ADAM12. Experimentos de cromatografia de afinidade sugerem uma interação entre syndecan-4 e ADAM12 (IBA *et al.*, 2000). Outras pesquisas sugerem uma coordenação entre syndecans e integrinas na mediação da adesão e dispersão celular de maneira dependente de ADAMs (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

2.2.5 A cauda citoplasmática

As caudas citoplasmáticas das proteínas da família ADAM são muito variáveis tanto em comprimento quanto na sequência (Figura 4). Esse domínio contém motivos especializados que parecem estar envolvidos na regulação da atividade de metaloprotease, da sinalização celular e/ou do controle da maturação e localização subcelular. Os motivos mais comuns são os sítios de ligação PxxP para proteínas que apresentam o domínio SH3. Esses sítios de ligação SH3 estão presentes nas ADAMs humanas 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 e 30. Várias ADAMs também possuem sítios de fosforilação potenciais para serina-treonina e/ou tirosina quinases. Isso poderia não apenas regular a função da ADAM diretamente, mas os resíduos de fosfotirosina resultantes também poderiam prover ligantes para as proteínas que apresentam o domínio SH2. Portanto, as ADAMs poderiam servir como adaptadores funcionais para a montagem de complexos protéicos em sítios cruciais para a atividade funcional.

ADAM15 apresenta um extensivo arranjo de sítios de interação proteína-proteína, incluindo oito domínios de ligação à SH3 e quatro sítios potenciais para a fosforilação de tirosina que se associam ao domínio SH2. A ADAM15 se associa com um número de proteínas diferentes incluindo adaptadores (endofilina I, SH3PX1 e Grb1), e três tirosina quinases da família Src (Src, Lck, e Hck) (HOWARD *et al.*, 1999; POGHOSYAN *et al.*, 2002). A maioria dessas associações tem sido observada *in vitro*, embora uma associação *in vivo* entre ADAM15 e Lck foi observada em células Jurkat. A ADAM15 também é um substrato para Lck e Hck e a sua fosforilação de tirosina causa impacto na especificidade de suas associações. A associação da ADAM15 com Hck é estimulada por uma fosforilação de ADAM15 dependente de Hck. O domínio SH2 da Hck pode se associar com a ADAM15, através de uma das quatro tirosinas na cauda da ADAM15. A fosforilação de tirosina também interfere na associação da ADAM15 com Lck e Grb2, ainda que, essa associação pode estar mais relacionada às mudanças conformacionais na apresentação dos domínios de ligação SH3, e não com a formação de um sítio de ligação SH2. A ADAM12 possui 10 possíveis domínios de ligação SH3 e 2 potenciais

sítios para a fosforilação de tirosina. Assim como a ADAM15, a ADAM12 pode se associar com Src, a quinase relacionada Yes e Grb2 (KANG *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 2000). Em mioblastos C2C12, isso é mediado pelo domínio SH3 da Src e pelos motivos de prolina na ADAM12 que são proximais da membrana. ADAM12 é também um substrato para a quinase Src em seu resíduo de tirosina C-terminal. Uma associação da ADAM12 com a subunidade p85 α da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3) ativa a própria quinase (KANG *et al.*, 2001).

A ADAM12 associa-se também com α -actinina-1 e 2, por meio de interação tanto de repetições do tipo espectrina ou da região C-terminal da molécula onde estão presentes dois domínios ligantes de cálcio, que se encontram na cauda citoplasmática da ADAM12. O cálcio se liga no centro de uma estrutura com duas α -hélices em forma de mão (*EF hand*) na região da cauda citoplasmática da ADAM12 próxima à membrana celular (GALLIANO *et al.*, 2000). A ADAM9, assim, como a ADAM15, liga-se à endofilina I e SH3PX1 (HOWARD *et al.*, 1999). Neste caso, as interações parecem favorecer as formas intracelulares não processadas destas ADAMs. Como a endofilina I e SH3PX2 têm função potencial para separar vesículas, especula-se que estas interações possam desempenhar um papel na regulação da maturação da ADAM e/ou na localização subcelular.

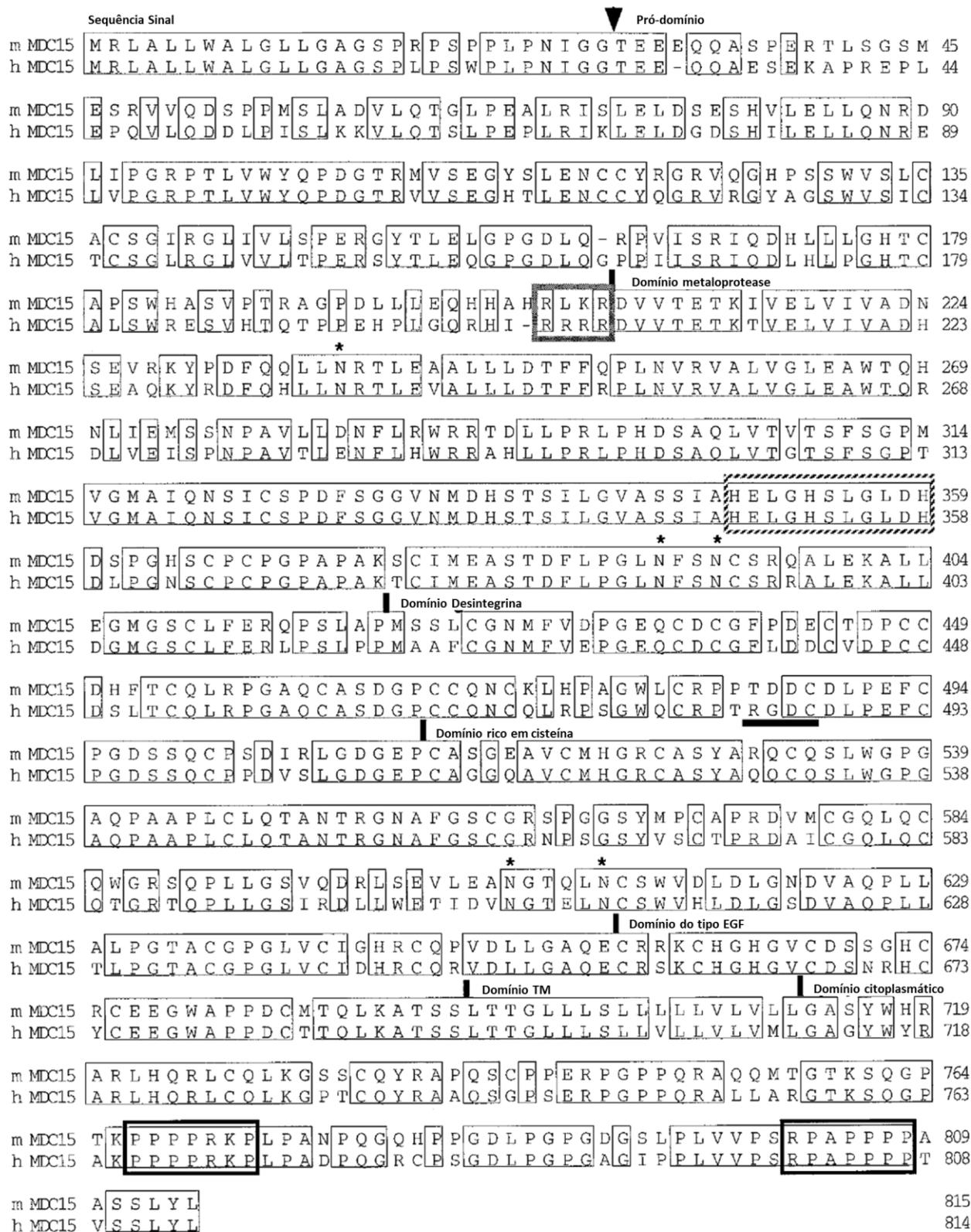


FIGURA 4 - ALINHAMENTO COMPARATIVO DA SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS ADAM15 MURINA E HUMANA

NOTA: Em destaque a sequência sinal, o pró-domínio, os domínios metaloprotease, desintegrina, o domínio de cisteína, além do domínio citoplasmático.

FONTE: Adaptado de LUM *et al.*, 1998.

2.3 Processamento e trânsito intracelular da ADAM15

A ADAM15 murina por ser homóloga à ADAM15 humana, apresenta estrutura e processamento por PCs do tipo furina, semelhante à ADAM23 humana. Como não existem muitos estudos sobre o processamento intracelular do ectodomínio da ADAM23, a ADAM15 serve como um modelo de estudo do processamento e trânsito intracelular daquela. Lum e colaboradores (1998), analisaram o processamento intracelular e a remoção do pró-domínio da proteína MDC15 ou ADAM15 murina (mMDC15), um homólogo humano, a metargidina hMDC15 (ADAM15 humana) (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996), ambos os quais apresentam um sítio de clivagem para a pró-proteína convertase entre os domínios pró e metaloprotease (Figura 5). Análises da mMDC15 por *Western blotting* com anticorpos contra o pró-domínio e o domínio citoplasmático demonstraram que a maioria das proteínas detectáveis, de fato, não apresentaram o pró-domínio em todos os tecidos murinos examinados. Em células COS-7 que expressam mMDC15, a remoção do pró-domínio dessa proteína pode ser inibida pelos inibidores da via secretória como a brefeldina A e a monesina, e a mMDC15 processada é resistente à enzima endoglicosidase endo H. Portanto, o pró-domínio é removido após o trânsito através da região medial do complexo de Golgi (LUM *et al.*, 1998).

In vitro, o pró-domínio da mMDC15 pode ser removido pela furina, sugerindo que uma pró-proteína convertase do tipo furina é importante para a maturação de mMDC15 *in vivo*. Sabe-se que a mMDC15 tem uma localização predominantemente perinuclear em células COS-7, que poderiam corresponder à rede trans-Golgi e/ou aos compartimentos endossomais (LUM *et al.*, 1998). A localização predominantemente intracelular aumenta a possibilidade de que a mMDC15 possa ter funções intracelulares, como uma função na maturação intracelular de proteínas, além das funções de metaloprotease de superfície celular ou proteína de adesão. Esses estudos apresentaram a primeira análise da maturação intracelular de uma

proteína metaloprotease desintegrina em células somáticas e indicam que as metaloproteases desintegrinas podem representar substratos fisiologicamente importantes para as pró-proteínas convertases como a furina (LUM *et al.*, 1998).

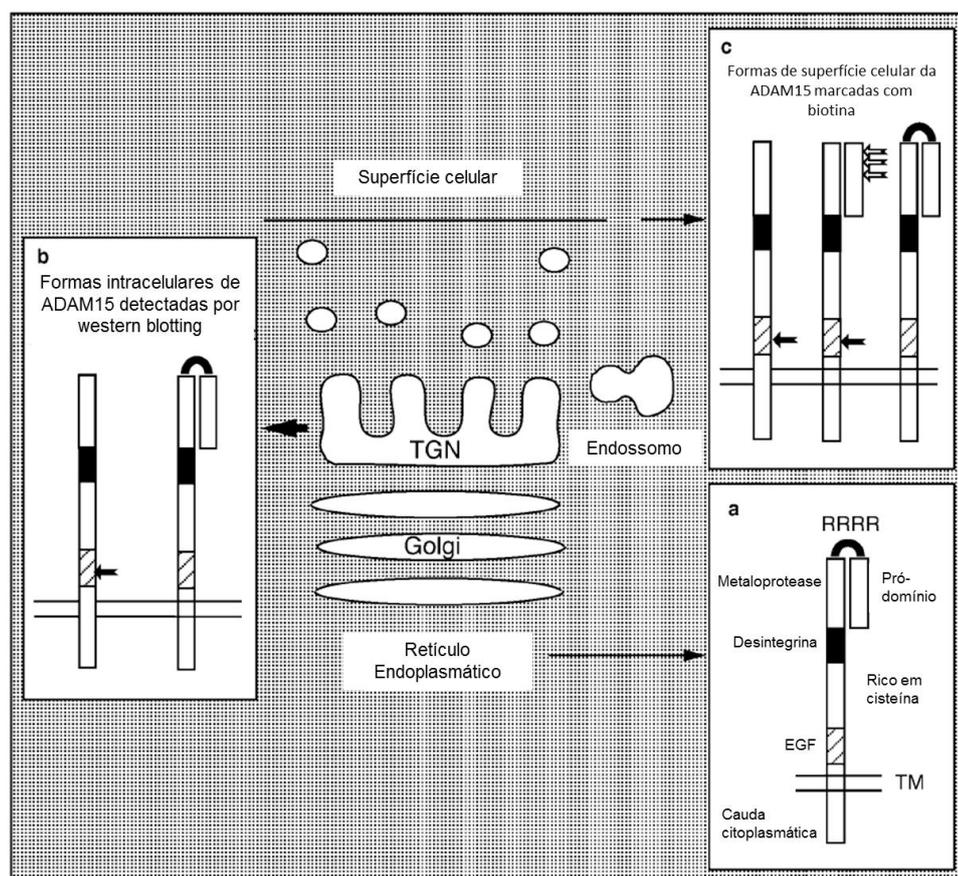


FIGURA 5 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO INTRACELULAR DA PROTEÍNA ADAM15 MURINA E DO POSICIONAMENTO DOS DOMÍNIOS METALOPROTEASE E DESINTEGRINA, ALÉM DO PRÓ-DOMÍNIO E DO DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO NA PROTEÍNA MADURA

NOTA: Em A, ADAM15 não processada contendo pró-domínio, forma encontrada no retículo endoplasmático. Em B, formas intracelulares, encontradas na via trans-Golgi, da ADAM15 detectadas por *wester blotting*. Em C, formas de superfície celular da ADAM15 marcadas com biotina.

FONTE: Adaptado de LUM *et al.*, 1998.

2.4 Características e funções da proteína MDC3 ou ADAM23

ADAM23 é um membro da família ADAM, o qual é predominantemente expresso no sistema nervoso central durante o desenvolvimento e sua expressão permanece na fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Camundongos deficientes para a proteína ADAM23 desenvolvem tremores e ataxia

e não sobrevivem mais do que duas semanas após o nascimento, sugerindo que esta proteína possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central (MITCHELL *et al.*, 2001). Embora o papel biológico de ADAM23 ainda não seja conhecido, é possível que esta molécula atue como molécula de adesão, através do seu domínio desintegrina, tendo em vista que o seu domínio metaloprotease é cataliticamente inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

O gene que expressa ADAM23 humana se encontra no cromossomo 2q33 e o gene da ADAM23 de camundongo na região central do cromossomo 1, sendo que este gene ocupa um único *locus* (SAGANE *et al.*, 1999). A ADAM23 apresenta três isoformas expressas principalmente no encéfalo e coração, ADAM23 ou ADAM23 α (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM23 β e ADAM23 γ (SUN *et al.*, 2004). Essas isoformas são transcritos diferentes derivados do mesmo gene. ADAM23 β e ADAM23 γ são transcritos finais decorrentes da combinação de diferentes éxons, mas originados a partir do mesmo *locus* de ADAM23 α . ADAM23 β difere-se de ADAM23 na sequência aminoacídica que forma o domínio transmembrana, compartilhando 54% (13 de 24 resíduos) de similaridade entre suas sequências. ADAM23 γ não apresenta um domínio transmembrana e nem uma cauda citoplasmática, o que sugere que esta isoforma é secretada, enquanto que a ADAM23 α apresenta essas partes e parece não ser secretada. ADAM23 γ apresenta diferentes níveis de expressão ao longo do tempo, sendo altamente expressa em encéfalos de embriões e de indivíduos neonatos, com níveis de expressão maiores do que ADAM23 α e ADAM23 β , reduzindo-se os níveis de expressão da ADAM23 γ após o nascimento. O período em que ocorrem altos níveis de expressão de ADAM23 γ está relacionado com a formação da rede neural, indicando um importante papel dessa isoforma nesta etapa do desenvolvimento (SUN *et al.*, 2004).

Foi demonstrado que ADAM23 interage *in vitro* com a integrina $\alpha\beta 3$ e promove a adesão de neuroblastomas através de seu domínio desintegrina (CAL *et al.*, 2000). Ao longo das últimas décadas, a família ADAM de desintegrinas celulares aumentou com a descoberta de uma série de novos membros identificados através de métodos de clonagem de partes homólogas dessas proteínas. Essas clonagens

têm sido estimuladas pelas funções putativas e ambíguas das ADAMs como enzimas proteolíticas e moléculas de adesão celular. Estudos recentes possibilitaram a caracterização das propriedades enzimáticas e especificidade de substrato de várias desintegrinas celulares que agem como proteinases, como por exemplo, TACE, MDC9, kuz/ ADAM 10, ADAMTS-1, e ADAMTS-4 (BLACK *et al.*, 1997; KUNO *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997; PAN & RUBIN, 1997; IZUMI *et al.*, 1998; QI *et al.*, 1999; ROGHANI *et al.*, 1999; TORTORELLA *et al.*, 1999). Entretanto, a sua função como molécula de adesão celular não está bem elucidada na maioria dos casos. Este é o caso da ADAM23, cuja expressão em tecidos humanos parece estar restrita ao encéfalo (SAGANE *et al.*, 1998).

Análises estruturais da sequência aminoacídica da ADAM23 demonstraram a presença de todos os domínios protéicos característicos das ADAMs, incluindo as regiões do tipo metaloprotease e desintegrina. Entretanto, o domínio do tipo metaloprotease da ADAM23 não apresenta 3 resíduos de histidina nem o resíduo do ácido glutâmico que faz parte do sítio de ligação ao zinco, que é característico das metaloproteinases (HEXXHXXGXXH) (RAWLINGS & BARRETT, 1995). Esse domínio metaloprotease de sequência consenso conservada entre as ADAMs pode ser visto comparativamente entre várias ADAMs na Figura 6. Entretanto, foi especulado que a ADAM23 poderia estar mais exclusivamente envolvida no processo de adesão celular do que nos eventos mediados por protease (WOLFSBERG & WHITE, 1996; BLOBEL, 1997). Consistente com essa proposta, Cal e colaboradores (2000), observaram que o domínio desintegrina da ADAM23 fortemente promove a adesão celular de neuroblastomas. O domínio desintegrina de ADAM23 originado a partir da expressão heteróloga em *E. coli* promove a adesão celular de neuroblastomas (linhagens NB100 e SHSY-5Y) e de astrocitomas (U373 e U87 MG) de modo semelhante à fibronectina, que também promove adesão. Através do uso de um painel de células CHO (CHO, do inglês, *chinese hamster ovary*) que expressam integrinas recombinantes diferentes, foi observado que a ADAM23 interage especificamente com a integrina $\alpha v \beta 3$, presente em células CHO, promovendo adesão celular. Além disso, a adesão mediada pela interação ADAM23-integrina $\alpha v \beta 3$ foi inibida por um anticorpo monoclonal anti- $\alpha v \beta 3$, mas não por anticorpos específicos contra outras integrinas (CAL *et al.*, 2000).

A especificidade de interação entre a ADAM23 e $\alpha\beta 3$ foi também verificada pelo grupo através de ensaios de ligação utilizando proteínas purificadas e células HeLa transfectadas com um vetor de expressão contendo a sequência inteira da ADAM23 (CAL *et al.*, 2000). Os achados de que a ADAM23 é um ligante de $\alpha\beta 3$ e promove a adesão celular indicam que essas propriedades não são exclusivas de proteínas adesivas típicas de matriz extracelular, sendo também compartilhadas por uma variedade de moléculas com diversas funções biológicas, incluindo trombina (BARSHAVIT *et al.*, 1991), proteoglicana heparan sulfato (ou perlecan) (HAYASHI *et al.*, 1992), metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) (BROOKS *et al.*, 1996), e fator de crescimento de fibroblasto básico (RUSNATI *et al.*, 1997). Células aderentes à ADAM23 exibem diferenças na morfologia quando comparadas com aquelas ligadas às proteínas características de matriz extracelular como a fibronectina. Essas diferenças incluem a presença de numerosas protusões curtas que se assemelham a pequenas pontas em células cultivadas em ADAM23, assim como uma distinta organização de filamentos de actina.

O processo de interação específica entre a integrina $\alpha\beta 3$ e o domínio desintegrina da ADAM23 é mediado por um domínio de sequência de aminoácidos AVNECDIT, localizado na alça da desintegrina ADAM23. Os domínios de desintegrina mais conhecidos são aqueles derivados das proteínas presentes no veneno de serpente, que contêm uma sequência RGD na ponta de uma alça flexível que junta duas fitas de folha- β salientes a partir do núcleo da proteína (ADLER *et al.*, 1993). Esse tripeptídeo interage com integrinas das plaquetas inibindo o estancamento do sangue e favorecendo a ocorrência de hemorragias (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994). Entretanto, com exceção da metargidina (ADAM15) (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996), em todas as outras ADAMs humanas, incluindo a ADAM23, a falta deste motivo tripeptídico em seus domínios do tipo desintegrina, parece indicar que eles podem promover as interações célula-célula ao invés de romper essas interações (WOLFSBERG & WHITE, 1996; BLOBEL, 1997). De fato, o domínio desintegrina de diferentes ADAMs provou ser essencial nos processos envolvendo interações célula-célula como a adesão do espermatozóide ao óvulo e fusão muscular (BLOBEL *et al.*, 1992; ALMEIDA *et al.*, 1995; YUAN *et al.*, 1997; INOUE *et al.*, 1998). Neste aspecto, a interação $\alpha\beta 3$ /ADAM23 mostrou-se

independente da presença do motivo RGD (CAL *et al.*, 2000). O motivo RGD tem sido descrito como o principal domínio de reconhecimento pelas integrinas $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ e $\alpha v\beta 8$ e está presente nas moléculas de matriz extracelular tais como vitronectina e fibronectina (RUOSLAHTI, 2003). No entanto, na família ADAM, apenas a ADAM15 humana apresenta o motivo RGD e interage com as integrina $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ de forma dependente deste motivo (NATH *et al.*, 1999).

A partir desse conhecimento, foi observado que a ADAM23 está envolvida na adesão das células de neuroblastoma. Além disso, um análogo peptídico da alça de desintegrina da ADAM23 inibe especificamente a adesão celular, enquanto que um peptídeo embaralhado análogo da alça de desintegrina da ADAM23 não inibe (CAL *et al.*, 2000). Uma proteína mutante com uma única alteração em um resíduo conservado presente na alça de ligação da ADAM23 apresentou uma reduzida habilidade de facilitar a adesão celular de neuroblastoma. Esses resultados indicam que o reconhecimento do receptor e a subsequente ligação da ADAM23 são mediados, de certo modo, pela alça de desintegrina presente nesta proteína. O fato de que o domínio desintegrina da ADAM23 produzido em bactéria é suficiente para exercer a função de adesão celular indica que essa proteína não precisa dos domínios restantes ou da eficiente glicosilação do domínio de desintegrina para a realização dessa função. Além disso, o fato de que a interação da ADAM23 com $\alpha v\beta 3$ é independente de uma sequência RGD, distingue essa desintegrina celular da metargidina humana (ou ADAM15), que também interage com $\alpha v\beta 3$, de maneira dependente da sequência RGD (ZHANG *et al.*, 1998; NATH *et al.*, 1999).

A especificidade de ligação de outras desintegrinas que não possuem o motivo de sequência RGD é diferente daquelas determinadas para a ADAM23. Dessa forma, a proteína de superfície do espermatozóide, a fertilina β (ou ADAM2), interage com a integrina $\alpha 6\beta 1$ em óvulos murinos e em células somáticas transfectadas (ALMEIDA *et al.*, 1995; YUAN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1999). Outras proteínas, como a metaloproteinase de matriz 2 e o fator de crescimento de fibroblasto básico, além de integrinas $\alpha v\beta 3$, também se ligam às sequências não-RGDs (BROOKS *et al.*, 1996; RUSNATI *et al.*, 1997). A interação da ADAM23 com

$\alpha v\beta 3$ pode estar relacionada à funções biológicas e/ou patológicas dessa desintegrina.

O fato de que a ADAM23 pode promover a adesão de células de origem neural, junto com a predominante expressão de ADAM23 no encéfalo humano em ambas as fases fetal e adulta, pode indicar que essa proteína tem um papel especializado no desenvolvimento e/ou manutenção de funções neurais (CAL *et al.*, 2000). A ADAM23 poderia modular algumas dessas interações com a superfície de células gliais e com a matriz extracelular através da sua habilidade de interagir com $\alpha v\beta 3$ de modo semelhante àquelas encontradas em estudos com células de neuroblastoma *in vitro* (CAL *et al.*, 2000). Além dos papéis potenciais da ADAM23 em processos normais, esta integrina celular pode favorecer a progressão do tumor, através do favorecimento das interações célula-célula mediadas por integrina (VARNER & CHERESH, 1996; RUOSLAHTI, 1997).

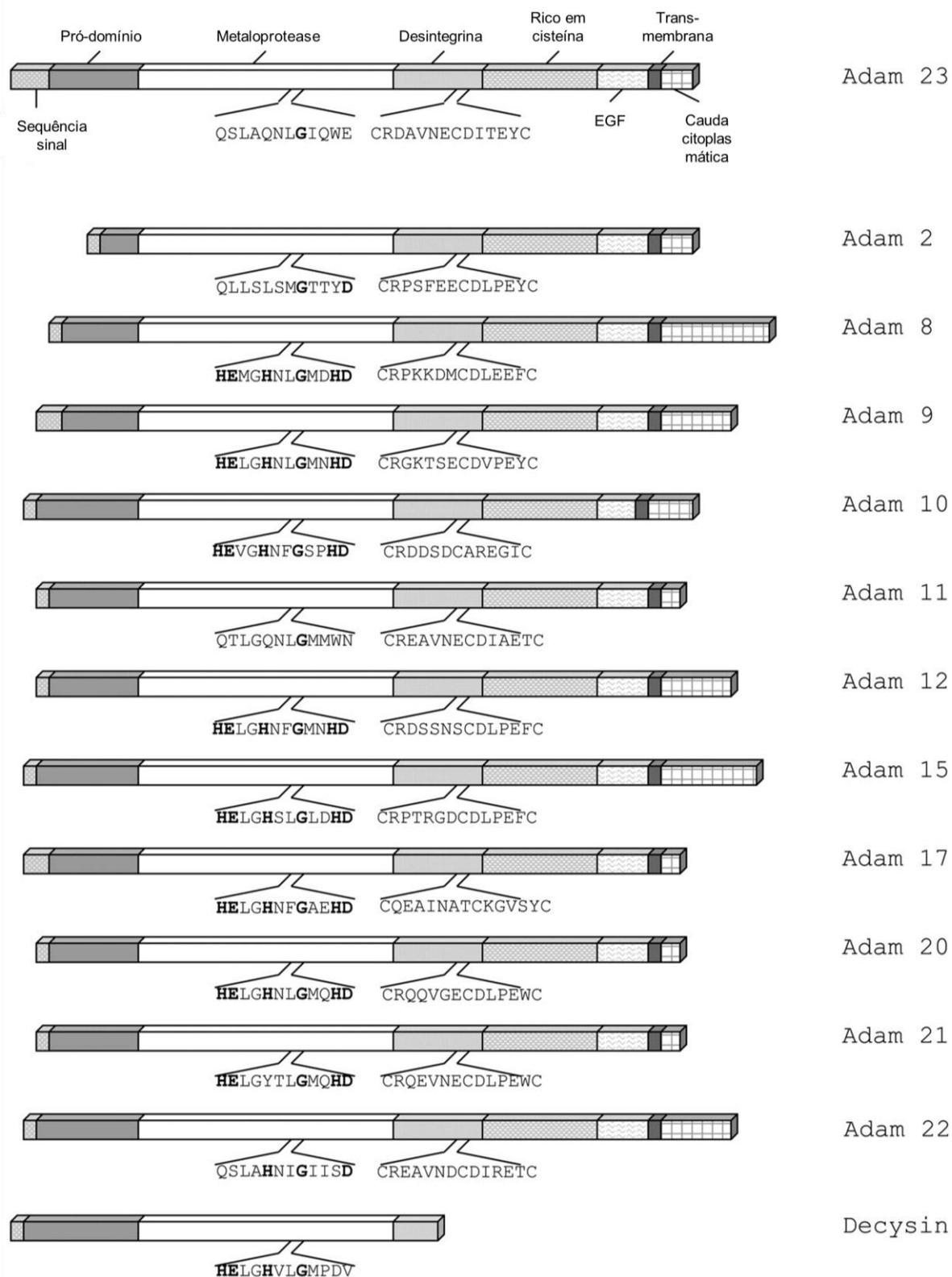


FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DO DOMÍNIO DA ADAM23 E OUTRAS ADAMS HUMANAS

NOTA: A sequência aminoacídica das regiões em torno da sequência consenso das metaloproteinases (HEXXHXXGXXH) e os sítios putativos de ligação à integrinas das proteínas ADAMs estão mostrados.

FONTE: CAL *et al.*, 2000.

Alguns estudos mostram que a ADAM23 é predominantemente expressa no coração e no sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2004; GHILARDI *et al.*, 2008). Outros estudos demonstram que ocorrem altos níveis de expressão de ADAM23 nas células piramidais nas regiões CA1/CA3 do hipocampo e nas células piramidais do córtex cerebral e baixos níveis de expressão dessa proteína nos giros denteados do hipocampo. Owuor e colaboradores (2009) observaram a presença de grande quantidade de ADAM23 nas camadas moleculares do hipocampo e cerebelo, onde se concentram muitos axônios. No cerebelo, ocorre uma maior expressão de ADAM23 nas células de Purkinje e nas células granulares cerebelares (GOLDSMITH *et al.*, 2004; OWUOR *et al.*, 2009).

O tamanho da ADAM23 varia conforme o local onde a mesma é expressa. Ensaios de *Western blotting* demonstraram que nas diferentes regiões do encéfalo (tronco cerebral, cerebelo e córtex) era expressa uma ADAM23 de 70 kDa, uma vez que, células granulares cerebelares expressam outra forma de ADAM23 com massa de aproximadamente 100 kDa, que corresponde à forma imatura. Essas duas formas da proteína ADAM23 apresentam diferenças no processamento do seu pró-domínio por endopeptidases. A forma imatura não-processada tem 100 kDa e, a forma madura processada que não apresenta o pró-domínio tem 70 kDa (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Este processo de clivagem do pró-domínio do resto da proteína ocorre normalmente nas ADAMs sendo crucial para a função de metaloprotease (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Verificou-se que ADAM23 possui papel importante tanto nos eventos de diferenciação neuronal iniciais, quanto nos tardios, uma vez que, atua na indução da diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrional) em neurônios e na formação de neuritos (SUN *et al.*, 2007). Além da integrina $\alpha v \beta 3$, a ADAM23 possui outros dois parceiros moleculares, as proteínas LGI1 (do inglês, *Leucine Rich Glioma Inactivated 1*) e LGI4. Essas proteínas, além de interagirem

com o receptor ADAM23, elas também interagem e se ligam aos receptores ADAM11 e ADAM22 (SAGANE *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009).

Owuor e colaboradores (2009) demonstraram que ADAM23 é o principal receptor para LGI1, uma vez que, na ausência de ADAM23, o crescimento de neuritos *in vitro* mediado por LGI1 é muito reduzido assim como, a arborização dendrítica. Outros autores observaram que a proteína ADAM23 atua de maneira importante no desenvolvimento do sistema nervoso, pois animais nocautes para o gene da ADAM23 apresentaram tremores e ataxia e sobreviveram no máximo 15 dias após o nascimento (Figura 7) (MITCHELL *et al.*, 2001).

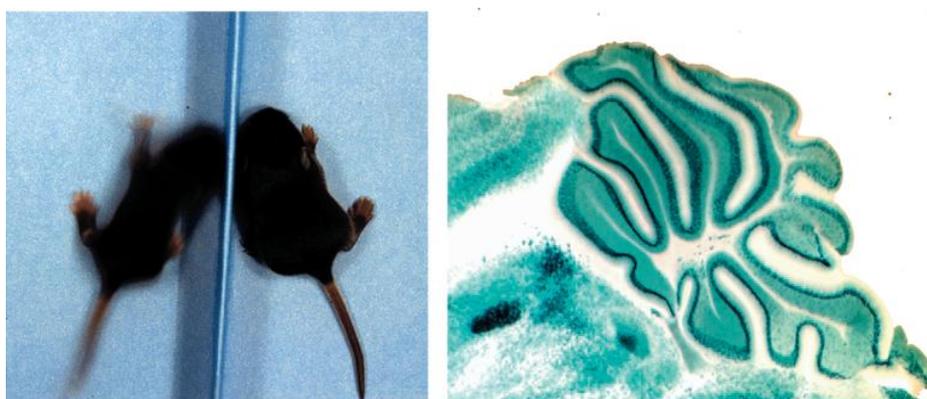


FIGURA 7 - FIGURAS MOSTRANDO ANIMAL NOCAUTE PARA ADAM23, ANIMAL SELVAGEM E CEREBELO DE ANIMAL SELVAGEM

NOTA: À esquerda, a imagem de filhote do tipo selvagem (direita) e mutante nocaute para ADAM23 (esquerda) em animais com idade P12. O animal mutante é notavelmente menor do que o não-mutante, é atáxico e apresenta forte tremor (resultando na imagem borrada em 1 s de exposição). À direita, o cerebello de um animal selvagem, onde a ADAM23 é fortemente expressa em células de Purkinje (secção 200 μ m marcada para atividade de β gal).

FONTE: Adaptado de MITCHELL *et al.*, 2001.

O fato de que esses animais ADAM23^{-/-} não apresentavam nenhuma mudança na posição das células que expressam ADAM23 e nem nas camadas corticais não permitiu a relação da epilepsia observada com malformação cortical desses animais. Esses dados sugerem que uma mutação no gene de LGI1 leva a uma regulação anormal de LGI1 pela proteína ADAM23, levando a um quadro de epilepsia parcial autossomal dominante com características auditivas (OWUOR *et al.*, 2009). Além disso, a ADAM23 parece estar envolvida nos processos de câncer, apresentando baixos níveis de expressão em linhagens tumorais, em tumores primários de mama e tumores gástricos quando realizado o silenciamento do gene da ADAM23 através de metilação do promotor (COSTA *et al.*, 2003).

Linhagens celulares de carcinoma apresentam ausência de expressão do gene da ADAM23, com exceção de células endoteliais derivadas de tumores, nas quais a expressão de ADAM23 é mais significativa do que nas derivadas de tecido normal. Alta expressão ocorre ainda em vasos sanguíneos em meduloblastoma e em tumor de encéfalo maligno. Estes casos de alta expressão dessa proteína em células endoteliais inspiram a hipótese de que esta proteína desempenha um papel significativo na formação de novos vasos sanguíneos no tumor, ou seja, na angiogênese (GHILARDI *et al.*, 2008). ADAM23 também interfere negativamente na modulação da integrina $\alpha\beta3$. Ativação mais elevada de $\alpha\beta3$ pode ser observada em células de linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 sem expressão de ADAM23. Conseqüentemente, estas células desenvolvem maior potencial adesivo e migratório quando na presença dos substratos vitronectina e fibronectina. A aderência e a migração podem ser bloqueadas por anticorpos monoclonais para $\alpha\beta3$, o que corrobora a idéia de que essa integrina é o principal receptor envolvido nesses processos. Outro fenômeno decorrente da perda de expressão de ADAM23 pode ser observado em camundongos imunodeprimidos: a retenção de células tumorais no pulmão. O gene ADAM23 está silenciado por hipermetilação do promotor em tumores primários de mama, relacionada com a alta incidência de metástase e o aumento da mortalidade dos pacientes (VERBISCK *et al.*, 2009).

Informações sobre o trajeto e o processamento intracelular da ADAM23, além das propriedades do seu ectodomínio, podem ser importantes para a compreensão do papel estrutural, biológico e patológico dessa proteína. Portanto, este estudo visa desenvolver bioferramentas (quimeras protéicas) para melhor caracterizar o processamento intracelular da ADAM23 e as propriedades biológicas e estruturais do seu ectodomínio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

A linhagem de câncer de mama MCF-7 (linhagem ATCC MTB-22) foi cultivada com meio MEM (do inglês, *Minimum Essential Medium*) (Cultilab) completo contendo 2 mM glutamina, 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), pH 7,2, antibiótico gamicina (40 µg/ml) (Schering Plough) e insulina recombinante humana (0,01 mg/ml) (NPH Humulin N, Lilly). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa *Thermo Scientific Forma® Water Jacketed CO₂ Incubator* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, quando as células atingiam 80% de confluência, foi feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA e 0,25% (v/v) de tripsina.

A linhagem de câncer de mama MDA-MB-435-1C (linhagem ATCC HTB-129) de um clone que contém RNAi para ADAM23, ou seja, que não expressa ADAM23 e que contém o gene de resistência para o antibiótico geneticina G418, foi cultivada com meio RPMI-1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Cultilab) completo contendo 2 mM glutamina, 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), 25 mM HEPES (2,5 g/l) pH 7,2, antibiótico gamicina (40 µg/ml) (Schering Plough), antibiótico geneticina G418 (500 µg/ml) (Sigma) e insulina recombinante humana (0,01 mg/ml) (NPH Humulin N, Lilly). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, quando as células atingiam 80% de confluência, foi feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA e 0,25% (v/v) de tripsina. O antibiótico G418 bloqueia a síntese de polipeptídeo, inibindo a síntese de proteína no nível dos ribossomos 70S e 80S, interferindo na função ribossomal e na elongação da proteína. É utilizado na manutenção e seleção de células eucarióticas transfectadas com genes de resistência para a neomicina.

A linhagem de câncer de mama MDA-MB-435 (linhagem ATCC HTB-129) foi cultivada do mesmo modo que a linhagem MDA-MB-435-1C, porém, sem o

antibiótico geneticina G418, uma vez que não contém o gene de resistência para este antibiótico.

A linhagem HEK-293T de rim de embrião humano (do inglês, *Human Embryonic Kidney cells*) (293tsA1609neo - ICLC HTL04001) foi cultivada com meio MEM (do inglês, *Minimum Essential Medium*) (Cultilab) completo contendo 2 mM glutamina, 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), pH 7,2, antibiótico garamicina (40 µg/ml) (Scheringh Plough). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, sempre que as células atingiam 80% de confluência, foi feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA e 0,25% (v/v) de tripsina.

A linhagem de neuroblastoma murino, Neuro-2a (N2A) foi cultivada segundo as normas da ATCC, (do inglês, *American Type Culture Collection*) com meio DMEM alta glicose (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Cultilab) completo contendo aminoácidos não-essenciais *MEM NEAA Non-Essential Amino Acids Solution* 1X (Life Technologies); 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab); 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l); pH 7,2; antibiótico garamicina (40 µg/ml) (Scheringh Plough). As células N2A foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, sempre que as células atingiam 80% de confluência, era feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA 2 mM e 0,25% (v/v) de tripsina. Em seguida, essas células em suspensão no meio de cultura eram centrifugadas a 670 x g por 2 minutos para a remoção do sobrenadante contendo tripsina. Esse procedimento é necessário, uma vez que, qualquer resíduo de tripsina é muito tóxico para essa linhagem celular. Dessa forma, o meio de cultura contendo a tripsina era descartado e novo meio adicionado para a ressuspensão do sedimento celular.

A linhagem CHO-K1 de ovário de hamster chinês (do inglês, *chinese hamster ovary cells*) foi cultivada com meio nutriente HAM F-12 (Cultilab) completo contendo 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab); 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l); pH 7,2; antibiótico garamicina (40 µg/ml) (Scheringh Plough). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, sempre que as células atingiam 80% de confluência, era feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA 2 mM e 0,25% (v/v) de tripsina. A linhagem CHO-K1 também se

apresentou sensível à ação da tripsina e por isso, a mesma também foi removida por centrifugação como descrito acima para a linhagem N2A.

3.2 Purificação da ADAM23 recombinante

Foi feita uma eletroporação com 2 μ l do plasmídeo pET28-ADAM23 (que contém a proteína ADAM23 fusionada a uma cauda com 6 resíduos de histidina), 40 μ l de bactérias *E. coli* BL21STAR (DE) (previamente armazenadas em freezer - 80°C). A eletroporação foi realizada em eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Biorad). Após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio LB sem antibiótico para a recuperação e crescimento das bactérias. As bactérias foram incubadas sob agitação a 37°C durante 1 hora para crescer. Em seguida, o meio com bactérias foi submetido à centrifugação em microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf) por 2 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante e o sedimento (*pellet*) foram plaqueados separadamente, cada um em uma placa de Petri de 100 cm² contendo meio LB-ágar (Luria-broth-ágar) (triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l); ágar (15 g/l)) com canamicina (30 μ g/ml), e incubados de um dia para o outro em estufa a 37°C, para garantir o crescimento das colônias, pois as bactérias transformadas com o plasmídeo possuem o gene de resistência para a canamicina. Dessa forma, o meio nas placas é seletivo, e só cresceram as colônias com resistência ao antibiótico.

O pré-inóculo foi feito com uma colônia inoculada em 100 ml de meio LB contendo antibiótico canamicina (30 μ g/ml) e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 15 horas de um dia para o outro. Em seguida, retirou-se 10 ml do pré-inóculo crescido e adicionou-se ao inóculo, contendo 1 litro de meio LB ((triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l)) com canamicina (30 μ g/ml), numa proporção de 1:100. O inóculo foi então incubado por 2 horas a 37°C sob agitação, e em seguida, foi dosada a densidade óptica (D.O.₆₀₀) em 1 ml de meio de cultura crescido do inóculo, para garantir que a mesma estaria entre 0,5 e 0,6. Em seguida, foi adicionado 1 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) para induzir a expressão e as bactérias foram incubadas por mais 3 horas a 37°C sob agitação.

Em seguida, o meio de cultura crescido foi centrifugado a 5.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (*pellet*) foi ressuscitado em 20 ml de tampão de lise nativo (50 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; pH 8,0), com 1 mM do inibidor de protease PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) em banho de gelo. O sedimento (*pellet*) foi então lisado em prensa de French (*French Press*) a 1.000 psig. Em seguida, o lisado foi submetido à centrifugação a 9.000 x g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante guardado em outro tubo e o sedimento (*pellet*) do lisado, ressuscitado em 30 ml de tampão de lise desnaturante com guanidina (6 M de hidrocloreto de guanidina; 20 mM de NaH₂PO₄; 500 mM de NaCl; pH 7,8), um forte desnaturante que favorece a solubilização das proteínas.

Em seguida, essa amostra foi submetida à lise mecânica através de seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40 minutos em banho de gelo. Em seguida, foi incubada por 10 minutos em gangorra para homogeneização a temperatura ambiente. A amostra foi então submetida à centrifugação a 3.500 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi filtrado com um filtro de seringa estéril descartável de 0,45 µM para outro tubo do tipo Falcon estéril. A coluna de purificação (GE Healthcare) foi previamente lavada 3 vezes com água e pré-equilibrada com tampão de lise nativo e depois com tampão de lise desnaturante com guanidina. Em seguida, o sobrenadante filtrado foi ressuscitado em resina de níquel-agarose Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) (QIAGEN), a ele foram adicionados 10 mM de imidazol e essa mistura foi então incubada em um orbital de homogeneização por 1 hora em temperatura ambiente.

O imidazol é adicionado antes da incubação para evitar ligações inespecíficas com a resina. O imidazol compete com a proteína do sobrenadante para se ligar à resina de Ni-NTA agarose. Ni-NTA é uma matriz de cromatografia por afinidade para purificação de proteínas recombinantes, purificadas a partir de *E.coli*, que possuem uma cauda de histidina com 6 ou mais resíduos de histidina (His-tag), a qual se liga à resina na coluna. Os resíduos de histidina na cauda ou “*tag*” de histidina se ligam às posições vazias na esfera dos íons de níquel imobilizados com alta especificidade e afinidade. Os lisados celulares clareados são colocados na matriz da coluna, as proteínas com cauda de histidina se ligam ao níquel da resina e ficam retidas na coluna, sendo que as demais proteínas saem da coluna durante as lavagens. Após

as lavagens, as proteínas com cauda de histidina são eluídas em tampões com condições nativas ou desnaturantes.

Após a montagem da coluna da resina e a adição da mistura do sobrenadante, com resina e imidazol à coluna, todo o sobrenadante que passou pela coluna, caracterizando o *void*, foi coletado. Em seguida, a resina retida na coluna foi lavada 2 vezes, cada uma com 20 ml de tampão desnaturante de ligação à coluna (0,58 ml da solução A (200 mM de NaH_2PO_4 monobásico; 5 M de NaCl); 9,42 ml da solução B (200 mM de Na_2HPO_4 dibásico; 5 M de NaCl); 48,1 g de uréia e q.s.p. 100 ml de H_2O destilada). A próxima lavagem foi com 20 ml do tampão 1 (1:2 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem). Em seguida, a resina foi lavada com 20 ml do tampão 2 (1:4 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem) e com 20 ml do tampão 3 (1:8 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem), nessa ordem. O tampão desnaturante de lavagem contém (7,38 ml da solução A (200 mM de NaH_2PO_4 monobásico; 5 M de NaCl); 2,52 ml da solução B (200 mM de Na_2HPO_4 dibásico; 5 M de NaCl); 48,1 g de uréia e q.s.p. 100 ml de H_2O destilada). Em seguida, a resina foi lavada 2 vezes, cada uma com 20 ml do tampão nativo de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl; 40 mM Imidazol). Cada uma dessas lavagens com cada um desses tampões foi coletada. Em seguida, foi realizada a eluição da proteína com 20 ml do tampão nativo de eluição (10 ml do tampão de lise nativo com 250 mM Imidazol). A partir dessa eluição foram coletadas 10 frações na ordem em que foram eluídas.

O *void* foi submetido a uma precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v), pois continha tampão com guanidina que tem carga positiva e por isso, ao ser submetido à eletroforese, cuja corrente vai do pólo negativo para o positivo, essa amostra poderia sofrer repulsão e não conseguir entrar na malha do gel de poliacrilamida, mesmo quando tratada com tampão SDS (dodecil sulfato de sódio), que tem carga negativa e serve para ajudar as amostras de proteínas a migrarem para o pólo positivo da cuba de eletroforese. O tratamento com TCA consistiu em diluir a amostra 1:2 com H_2O destilada e adicionar igual volume de TCA 10% (v/v). Em seguida a amostra foi incubada em banho de gelo por 20 minutos e submetida à centrifugação em microcentrífuga *Sorvall* a $4.723 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Em seguida, o sedimento (*pellet*) foi submetido a 3 lavagens, cada uma com 100 μl de

etanol 100% gelado. Nessas lavagens o sobrenadante sempre era descartado e o sedimento ressuspendido em 100 µl de etanol 100% gelado e novamente centrifugado a 4.723 x g por 15 minutos a 4 °C.

As lavagens e os eluatos foram misturados com tampão de amostra 5x redutor, desnaturados a 95°C por 7 minutos e submetidos a uma eletroforese em SDS-PAGE, em gel de acrilamida 15%. Em seguida os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie. Em seguida, os eluatos foram combinados e submetidos à diálise contra PBS 1X, com três trocas de PBS 1X, para remover a uréia das amostras que haviam sido purificadas com tampão que continha uréia. Após a diálise, os eluatos unificados foram analisados por eletroforese por SDS-PAGE em gel de acrilamida 10%. Em seguida, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie.

3.3 Purificação IgG Anti-ADAM23 por Sepharose A/G

Foi utilizada a resina A/G sepharose (0,5 g do pó rende 2 ml de pack) (Sigma). Meio grama da resina foi reidratado com 7 ml de H₂O destilada. Em seguida, a resina foi montada na coluna, lavada com cerca de 30 ml de água e pré-equilibrada com 50 ml de Tris 50 mM pH 7,8. O grupo do Laboratório de Neurobiologia produziu um hibridoma, o DL11C8, que secreta anticorpos IgG monoclonais anti-ADAM23. O sobrenadante de cultura de hibridoma contendo 20% (v/v) de SFB (Gibco) tem sido purificado e os anticorpos obtidos têm sido utilizados em ensaios de *Western Blotting*, sendo que ainda estão sendo padronizados. O sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8, foi obtido a partir de um cultivo de 7 dias em meio *animal free* (BD, Biosciences), sendo que o pH do sobrenadante foi previamente ajustado para 7,4. Em seguida, 100 ml do sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 foram incubados com a resina de um dia para o outro a 4°C numa gangorra. Em seguida, a coluna foi montada e a mistura do sobrenadante com a resina foi colocada na coluna, de modo que a resina contendo os anticorpos ficou retida na coluna e o sobrenadante passou para baixo. Em seguida, a resina foi novamente lavada com 50 ml de Tris 50 mM pH 7,8, e, então, a IgG purificada foi

eluída com 25 ml de uma solução de glicina 0,1 M pH 2,5 (preparada antes do uso) que apresenta um pH mais reduzido necessário para desfazer a ligação dos anticorpos IgG à resina. Em cada tubo de 1,5 ml onde foram coletadas as frações da eluição (1 ml por tubo), foram previamente adicionados 100 µl de uma solução de Tris 1 M pH 9,0, necessária para neutralizar o pH e evitar a degradação das IgGs.

Após a eluição, as frações que continham IgG foram unificadas e dialisadas contra PBS 1X. Foram realizadas 3 trocas de PBS 1X, uma após 2 horas, outra após 16 horas e outra após 2 horas. Em seguida, a concentração de IgG foi estimada por leitura da absorbância em 280 nm em um espectrofotômetro *Hitachi U-2900 spectrophotometer* (HITACHI) com cubetas de quartzo. Com os valores de absorbância obtidos, pôde-se calcular a concentração dos anticorpos em µg/µl dividindo-se o valor da absorbância por 1,4. Além disso, esses anticorpos foram testados por ensaio de ELISA.

3.4 Ensaio imunoenzimático de ELISA das IgGs purificadas

A análise das IgGs anti-ADAM23 purificadas foi feita através do ensaio imunoenzimático ELISA. Para este ensaio, foi feita a imobilização de 0,2 µg de ADAM23 recombinante (Dis-Cys), que contém uma cauda de histidina, expressa em bactéria e misturada com 45 µl de tampão carbonato (100 mM, pH 9,6) por poço de 0,3 cm² em placa modulável do tipo *Maxisorp*. Como os anticorpos podem se ligar ao plástico dos poços e não necessariamente apenas ao antígeno, foi feito então o bloqueio dos sítios não ocupados pelo antígeno, com 300 µl/poço de solução de bloqueio PBS-BSA 1% (p/v) (PBS com 1% de albumina bovina (BSA)) por duas horas a 37°C. Os anticorpos primários consistiram no anticorpo anti-ADAM23 de camundongo produzido no laboratório, purificado e concentrado; no soro pré-imune contendo IgG; no sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8, que produz anticorpos anti-ADAM23 de camundongo e no controle positivo, o anticorpo anti-pentahistidina (QIAGEN). O anticorpo anti-ADAM23 foi concentrado através de ultrafiltração em uma coluna Amicon (Millipore) com membrana de corte de 100 kDa, ou seja, retendo na coluna apenas proteínas de até 100 kDa no máximo, deixando

passar proteínas maiores em um tubo do tipo Falcon de 15 ml. Foi utilizado por vez, um volume de 4 ml desse anticorpo, o qual foi submetido a 6 ciclos de centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 25°C em centrífuga *Eppendorf centrifuge 5810R* (Eppendorf), até que todo o volume total de 24 ml desse anticorpo fosse concentrado nessa coluna, o que resultou num volume de 500 µl e numa concentração aproximada de 15,64 µg/µl.

Do anticorpo anti-ADAM23 foram utilizados 62,5 µg diluídos 1:50 em PBS-BSA 0,1% (p/v) (PBS com 0,1% de BSA, albumina bovina), a partir dessa diluição, foram feitas diluições seriadas de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200 e 1:6.400, sendo que foram sempre utilizados 100 µl/poço. Do soro pré-imune foram feitas diluições seriadas de 1:50, 1:100 e 1:200 também em PBS-BSA 0,1% e também foram utilizados 100 µl/poço. Do sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 foram utilizados 100 µl/poço, sem diluição. Do anticorpo anti-pentahistidina foi feita uma diluição de 1:1.000 também em PBS-BSA 0,1%, sendo que foram utilizados 100 µl/poço. Após a adição desses anticorpos primários, foi feita uma incubação de duas horas em estufa a 37 °C. Os poços foram então lavados em três ciclos com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST 0,05%), e foram então adicionados 100 µl por poço de anticorpo secundário contra imunoglobulina de camundongo conjugado com HRP (BD Biosciences) diluído 1:8000 em solução de PBS-BSA 0,1%. Após incubação de uma hora a 37 °C, outros três ciclos de lavagens foram feitos. Em seguida, a reação foi revelada adicionando-se 100 µl/ poço de solução de revelação (0,2 mg/ml de OPD; 100 mM citrato de sódio; 100 mM fosfato de sódio monobásico; 0,0006% (m/v) peróxido de hidrogênio; pH 5,2), sendo incubada em câmara escura por 15 minutos. Após a revelação, a reação foi bloqueada através da adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1 M (1 M H₂SO₄). A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas com filtro para comprimento de onda a 490 nm (BioRad).

3.5 Estratégias de clonagem

Um fragmento gênico correspondente à sequência codificadora para o ectodomínio (sem a sequência do peptídeo sinal e com o pró-domínio), equivalente à construção 1, da proteína ADAM23 humana (Figura 8, construção 1) foi obtido através de PCR a partir do DNA da molécula inteira utilizado como molde, proveniente da construção pcDNA3.1- ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000). Outro fragmento gênico correspondente à sequência codificadora para o ectodomínio (sem a sequência sinal e sem o pró-domínio), equivalente à construção 2, da proteína ADAM23 humana (Figura 8, construção 2) foi obtido a partir do mesmo cDNA também por meio de PCR. As construções C1 e C2, embora tenham perdido o peptídeo sinal endógeno na região N-terminal da ADAM23, foram clonadas e amplificadas com a sequência de secreção da IL-2ss, presente no *backbone* do vetor pINFUSE antes do sítio de policlonagem. Dessa forma, o peptídeo sinal de secreção da IL-2 ficou presente na região amino-terminal das construções.

Um terceiro fragmento gênico correspondente à sequência inteira do ectodomínio da ADAM23 (contendo o pró-domínio e o peptídeo sinal, além de todos os outros domínios) (Figura 8, construção 3), também foi obtido por PCR. Nessa construção 3 foi mantido o peptídeo sinal endógeno da ADAM23 com o objetivo de avaliar o efeito do mesmo sobre o direcionamento para a membrana e secreção dessa proteína. Os fragmentos das construções 1 e 2 foram fusionados à região Fc (domínios CH2 e CH3) da imunoglobulina IgG1 humana que já estava presente no *backbone* do vetor comercial pINFUSE-hlgG1-Fc2 (InvivoGen). O fragmento gênico da construção 3 foi fusionado à sequência da região Fc2 (domínios CH2 e CH3) da imunoglobulina IgG1 humana que já estava presente no vetor previamente engenheirado pcDNA3.1-hlgG1-Fc2. A fusão dessas sequências com a sequência da região Fc da IgG1 humana na região C-terminal das moléculas está representada na Figura 9, em cada uma das três construções.

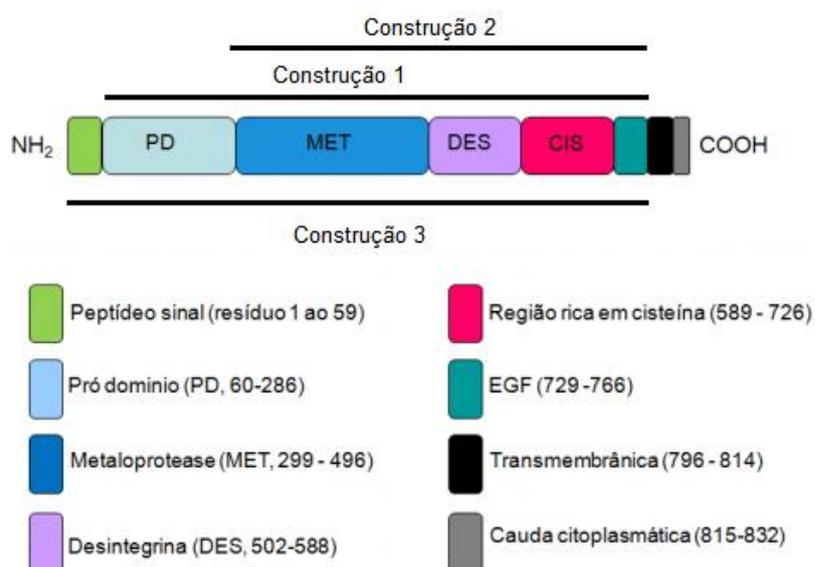


FIGURA 8 - ESQUEMA DAS CONSTRUÇÕES DO ECTODOMÍNIO DA ADAM23

NOTA: O esquema mostra as sequências clonadas no vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 (construções 1 e 2) e no pcDNA3.1 (construção 3). A construção 1 mostra o ectodomínio com o pró-domínio e sem a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal. A construção 2 mostra o ectodomínio sem o pró-domínio e sem a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal. A construção 3 mostra o ectodomínio com o pró-domínio e com a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal, contendo todos os domínios extracelulares da ADAM23. A sequência Fc da IgG1 humana está localizada sempre na região C-terminal dos construtos.

FONTE: Adaptado de Costa (2011).

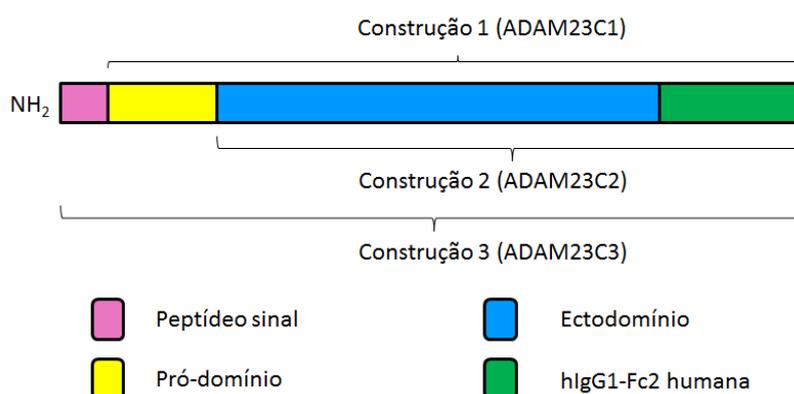


FIGURA 9 - ESQUEMA DO ECTODOMÍNIO DA ADAM23 FUSIONADO À REGIÃO FC DE UMA IGG1 HUMANA

NOTA: O esquema mostra as sequências clonadas no vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 (construções 1 e 2) e no pcDNA3.1 (construção 3). A construção 1 mostra o ectodomínio fusionado à sequência Fc da IgG1 humana com o pró-domínio e sem a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal. A construção 2 mostra o ectodomínio fusionado à sequência Fc da IgG1 humana sem o pró-domínio e sem a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal. A construção 3 mostra o ectodomínio fusionado à sequência Fc da IgG1 humana com o pró-domínio e

com a sequência do peptídeo sinal na região N-terminal. A sequência Fc da IgG1 humana está situada sempre na região C-terminal dos construtos.

FONTE: A Autora (2015).

O objetivo de clonar o ectodomínio da ADAM23 com e sem o pró-domínio foi avaliar o processamento deste ectodomínio e a sua localização após o processamento. Por exemplo, sem o pró-domínio pode ser que a proteína fique acumulada no interior da célula e com o pró-domínio pode ser que ela seja secretada. A sequência Fc de uma imunoglobulina IgG1 humana funcionará como uma etiqueta (ou *tag*) fusionada à região C-terminal da sequência do ectodomínio da ADAM23, nas três diferentes construções, permitindo a purificação dessas proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base nas sequências dos construtos e no plasmídeo escolhido para a clonagem. Foram desenhados iniciadores com sequência de nucleotídeos que amplificassem a sequência que codifica para o ectodomínio da ADAM23 humana, referente a cada uma das três construções, de modo a inserir cada inserto na região entre os sítios das mesmas enzimas, fechando o vetor com uma nova sequência em seu interior, além de um códon terminador (*stop codon*) logo após o sítio de policlonagem. Esses iniciadores também foram testados quanto aos ciclos de temperatura de forma a padronizar a combinação mais eficiente.

A sequência do ectodomínio da ADAM23 humana referente a cada uma das três construções foi então amplificada através de reação de PCR. Em seguida, cada plasmídeo foi digerido com enzimas endonucleases de restrição específicas e a eles foram ligados seus respectivos insertos.

O plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 (Figura 10) (InvivoGen) foi escolhido por ser adequado para a construção de proteínas fusionadas pelas suas regiões efetoras a uma região Fc de imunoglobulina G humana (IgG). O plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 proporciona uma grande expressão de proteínas Fc-fusionadas, geralmente numa quantidade de µg/ml. Estes vetores são facilmente transfectados em uma série de linhagens celulares como células CHO (células de ovário de hamster chinês, do inglês, *chinese hamster ovary cells*), COS-7 (fibroblastos de rim

de macaco verde) e HEK-293T, as quais são comumente usadas em sistemas de purificação de proteínas. Esses plasmídeos pINFUSE-Fc favorecem a secreção de proteínas fusionadas à região Fc de IgG. Como essas proteínas fusionadas são secretadas, elas podem ser facilmente detectadas no sobrenadante de células transfectadas com pINFUSE-hIgG1-Fc2 por SDS-PAGE e *western blotting* através de reação com anticorpo anti-IgG humana.

Além disso, domínios funcionais podem ser facilmente identificados por *immunoblotting* e *blotting* de ligantes. Proteínas fusionadas a uma porção Fc de IgG podem ser facilmente purificadas por cromatografia de afinidade por proteína A/G Sepharose. O vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2 contém a região Fc contendo íntrons do isotipo IgG1. A região Fc medeia funções efetoras, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *antibody cellular cytotoxicity*) e a citotoxicidade celular dependente do complemento (CDC, do inglês *complement-dependent cytotoxicity*). As isoformas de IgG exercem diferentes níveis de funções efetoras de acordo com a ordem: $IgG4 < IgG2 < IgG1 \leq IgG3$. A isoforma IgG1 foi escolhida para ser fusionada à ADAM23 neste presente trabalho, por estar em um nível intermediário de função efetora para que não causasse um alto nível de citotoxicidade celular, caso a função efetora fosse a mais alta e para que sua capacidade de ligação com outras proteínas não ficasse prejudicada, caso a sua função efetora fosse muito reduzida. A IgG1 foi escolhida também por já ter sido fusionada a outras ADAMs em outros trabalhos (AMOUR *et al.*, 2000; NATH *et al.*, 2000; BAX *et al.*, 2004; OZKAYNAK *et al.*, 2010). Essa capacidade de interação com outras proteínas é necessária para a purificação das proteínas Fc-fusionadas por cromatografia de afinidade à proteína A/G Sepharose e para o reconhecimento pelo anti-IgG.

Quanto às características estruturais do vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2, o mesmo apresenta íntrons na região IgG1-Fc2. A região Fc compreende os domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada da IgG e da região de dobradiça (*hinge*). A dobradiça serve como um espaçador flexível entre as duas partes da proteína fusionada à região Fc, permitindo a cada parte da molécula funcionar independentemente. Um curto íntron está presente entre cada região (um íntron entre a dobradiça e o domínio CH2 e outro íntron entre os domínios CH2 e CH3). A presença dos íntrons é necessária

para potencializar o nível de expressão gênica assim como o *splicing* é necessário para promover uma rápida e eficiente exportação de mRNA.

O promotor hef1–HtlV compreende o fator de alongação-1 α (EF-1 α), o segmento R e parte da sequência U5 (R-U5') do vírus da leucemia humana de células-T (HTLV, do inglês, *Human T-Cell Leukemia Virus*). O fator EF-1 α do promotor exibe uma forte atividade e permite uma duradoura expressão de um transgene *in vivo*. O segmento R-U5' se liga ao fator de alongação EF-1 α do promotor para potencializar a estabilidade do RNA. A sequência sinal da IL-2ss contém 20 aminoácidos e compartilha características comuns com peptídeos sinais de outras proteínas de secreção. A clivagem intracelular do peptídeo sinal da IL-2 ocorre após a Ser20 e leva à secreção da proteína antigênica ou recombinante. Por isso, esta região é essencial para o propósito de secreção das construções C1 e C2 (que não possuem o peptídeo sinal endógeno da ADAM23) quiméricas neste presente trabalho. O sítio de multiclonagem (mCs) ou policlonagem, contém vários sítios de restrição que são compatíveis com várias outras enzimas, facilitando portanto, a clonagem das construções da ADAM23. O sinal de poliadenilação do vírus símio 40 (SV40 pAn) favorece a clivagem eficiente e reações de poliadenilação resultando em níveis elevados de mRNAs estáveis, favorecendo portanto, uma alta taxa de expressão. O vetor apresenta uma origem de replicação de *E. coli* (Ori).

O vetor apresenta também o promotor CMV enh, que combina o *enhancer* do gene 1 do citomegalovírus humano e o núcleo do promotor do gene da cadeia leve da ferritina humana. Esse promotor dirige a expressão do gene de resistência à zeocina em células de mamíferos. O promotor bacteriano EM2KC promove a expressão constitutiva do gene de resistência ao antibiótico em *E. coli*. EM2KC está localizado em um íntron e é removido por *splicing* em células de mamíferos. A resistência ao antibiótico zeocina é conferida pelo gene Sh ble de *Streptoalloteichus hindustanus*. Esse mesmo gene de resistência confere seleção em ambas as células de mamíferos e as bactérias *E. coli*. A sequência da beta-globina humana 3'UTR e a sequência de poliadenilação (β Glo pAn) permitem uma eficiente detenção da transcrição do transgene.

As construções C1 e C2 foram clonadas cada uma em um vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen, San Diego, CA, US), conforme foi feito para a ADAM15 (MDC15) segundo Lum e colaboradores (1998).

O plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 foi digerido uma vez nos sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*, no qual foi amplificada e clonada a sequência da ADAM23C1, referente à construção 1, formando o pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2. A ADAM23C1 compreende a ADAM23 do resíduo 60 a 792 aminoácidos, ou seja, é o ectodomínio apenas sem o peptídeo sinal. O plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 foi digerido outra vez nos sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII*, no qual foi amplificada e clonada a sequência da ADAM23C2, referente à construção 2, formando o pINFUSE-ADAM23C2-hIgG1-Fc2. A ADAM23C2 compreende a ADAM23 do resíduo 287 a 792 aminoácidos, ou seja, é o ectodomínio sem o peptídeo sinal e sem o pró-domínio. Em ambos os casos, a ADAM23 foi fusionada pela extremidade C-terminal à região Fc da imunoglobulina IgG1 humana.

a 792 aminoácidos, contendo todos os domínios extracelulares. Dessa forma foi obtido o vetor pcDNA3.1-ADAM23C3-hlgG1-Fc2. Esse vetor foi escolhido por ser bem expresso em células de mamíferos como a HEK-293T, por apresentar um gene de resistência a outro tipo de antibiótico diferente da zeocina, a ampicilina, e por sua maior disponibilidade no laboratório.

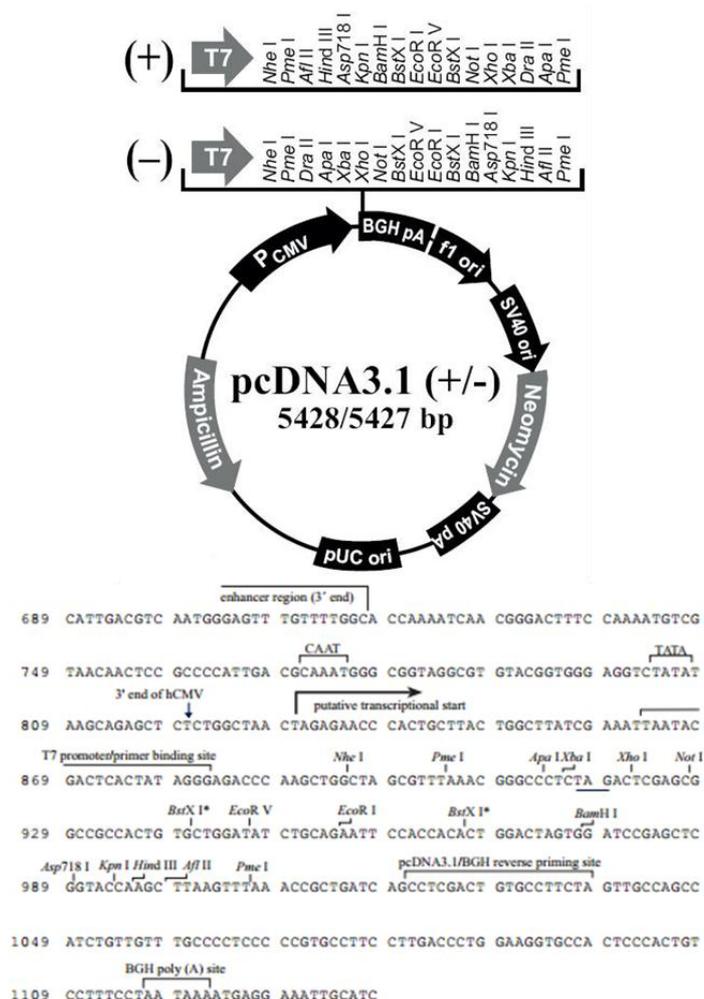


FIGURA 11 - MAPA DO PLASMÍDEO VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1(-) E O SEU SÍTIO DE POLICLONAGEM

FONTE: Manual da Invitrogen.

Todos esses plasmídeos com seus respectivos insertos, após as reações de ligação dos insertos aos vetores, quando confirmados por sequenciamento, foram utilizados na transfecção de células HEK-293T e CHO-K1 pelo método da precipitação por cálcio. Foram também utilizados na transfecção de células N2A pelo método da Lipofectamina (Invitrogen), segundo manual do fabricante.

3.6 Reações de PCR

3.6.1 Desenho dos iniciadores para clonagem das regiões do ectodomínio da ADAM23 em pINFUSE-hIgG1-Fc2

A sequência de cDNA usada para o desenho dos iniciadores foi a região do gene equivalente ao ectodomínio da região codificante da proteína ADAM23 humana (NM_003812.3 do banco de dados do NCBI) indicada na FIGURA 12, considerando-se o uso do vetor para expressão pINFUSE-hIgG1-Fc2 (InvivoGen).

```

1 TCCTCTGCGT CCGGCCCGG GAGTGGCTGC GAGGCTAGGC GAGCCGGGAA AGGGGGCGCC
61 GCCCAGCCCC GAGCCCCGCG CCCCCTGCCC CGAGCCCGGA GCCCCCTGCC CGCCCGGGCA
121 CCATGCGCGC CGAGCCGGCG TGACCGGCTC CGCCCGCGGC CGCCCGCAG CTAGCCCGGC
181 GCTCTCGCCG GCCACACGGA GCGGGCCCG GGAGCTATGA GCCATGAAGC CGCCCGGCAG
241 CAGCTCGCGG CAGCCGCCCG TGGCGGGCTG CAGCCTTGCC GCGGCTTCTT CGGGCCCCCA
301 ACGCGGCCCG GCGGGCTCGG TGCTTGCCAG CGCCCGGCC CGCACGCCGC CCTGCCCGCT
361 GCTTCTCGTC CTFCTCCTGC TGCTTCCGCT CGCCGCTCG TCCCGGCCCG GCGCCTGGGG
421 GGCTGCTGCG CCCAGCGCTC CGCATTGGAA TGAAACTGCA GAAAAAATT TGGGAGTCCCT
481 GGCAGATGAA GACAATACAT TGCAACAGAA TAGCAGCAGT AATATCAGTT ACAGCAATGC
541 AATGCAGAAA GAAATCACAC TGCCCTCAAG ACTCATATAT TACATCAACC AAGACTCGGA
601 AAGCCCTTAT CACGTTCTTG ACACAAGGC AAGACCCAG CAAAAACATA ATAAGCTGTG
661 CCATCTGGCC CAGGCAAGCT TCCAGATTGA AGCCTTCGGC TCCAAATTCA TTCTTGACCT
721 CATACTGAAC AATGGTTTGT TGTCTTCTGA TTATGTGGAG ATTCACTACG AAAATGGGAA
781 ACCACAGTAC TCTAAGGGTG GAGAGCACTG TTACTACCAT GGAAGCATCA GAGGCGTCAA
841 AGACTCCAAG GTGGCTCTGT CAACCTGCAA TGGACTTCAT GGCATGTTG AAGATGATAC
901 CTTCTGTGAT ATGATAGAGC CACTAGAGCT GGTTCATGAT GAGAAAAAGCA CAGTTCGACC
961 ACATATAATC CAGAAAACCT TGGCAGGACA GTATTCTAAG CAAATGAAGA ATCTCATTAT
1021 GGAAGAGAGT GACCAGTGGC CCTTCTCTC TGAATTACAG TGTTGAAAA GAAGGAAGAG
1081 AGCAGTGAAT CCATCACGTG GTATATTTGA AGAAATGAAA TATTTGGAAC TTATGATTTG
1141 TAATGATCAC AAAACGTATA AGAAGCATCG CTCTTCTCAT GCACATACCA ACAACTTTGC
1201 AAAGTCCGTG GTCAACCTTG TGGATTCTAT TTACAAGGAG CAGCTCAACA CCAGGGTTGT
1261 CCTGGTGGCT GTAGAGACCT GGACTGAGAA GGATCAGATT GACATACCA CCAACCTGT
1321 SCAGATGCTC CATGAGTTCT CAAAATACCG GCAGCGCATT AAGCAGCATG CTGATGCTGT
1381 SCACCTCATC TCGCGGGTGA CATTTCATA TAAGAGAAGC AGTCTGAGTT ACTTTGGAGG
1441 TGTCTGTTCT GGCACAAGAG GAGTTGGTGT GAATGAGTAT GGTCTTCCAA TGGCAGTGGC
1501 ACAAGTATTA TCGCAGAGCC TGGCTCAAAA CCTTGGAAATC CAATGGGAAC CTTCTAGCAC
1561 AAAGCCAAAA TGTGACTGCA CAGAATCCTG GGGTGGCTGC ATCATGGAGG AAACAGGGGT
1621 GTCCCATTTCT CGAAAAATTT CAAAGTGCAG CATTTTGGAG TATAGAGACT TTTTACAGAG
1681 AGGAGGTGGA GCCTGCCTTT TCAACAGGCC AACAAAGCTA TTTGAGCCCA CGGAATGTGG
1741 AAATGGATAC GTGGAAGCTG GGGAGGAGTG TGATTGTGGT TTTTATGTGG AATGCTATGG
1801 ATTATGCTGT AAGAAATGTT CCTTCTCCAA CGGGGCTCAC TGCACGGACG GGCCCTGTG
1861 TAACAATACC TCAATGCTTT TTCAGCCACG AGGGATGAA TGCCGGGATG CTGTGAACGA
1921 GTGTGATATT ACTGAATATT GTACTGGAGA CTCTGGTCAG TGCCACCAA ATCTTCATAA
1981 GCAAGACGGA TATGCATGCA ATCAAAATCA GGGCCGCTGC TACAATGGCG AGTGCAGAC
2041 CAGAGACAAC CAGTGTCACT ACATCTGGGG AACAAAGGCT GCAGGGTCTG ACAAGTCTG
2101 CTATGAAAAG CTGAATACAG AAGGCACTGA GAAGGGAAAC TGCGGGAAGG ATGGAGACCG
2161 GTGGATTTCAG TGCAGCAAAC ATGATGTGTT CTGTGGATTC TTAATCTGTA CCAATCTTAC
2221 TCGAGCTCCA CGTATTGGTC AACTTCAGGG TGAGATCATT CCAACTTCCT TCTACCATCA
2281 AGGCGGGTG ATTGACTGCA TGGTGCCCA TGTAGTTTTA GATGATGATA CGGATGTGGG
2341 CTATGTAGAA GATGGAACGC CATGTGCCCC GTCTATGATG TGTTTAGATC GGAAGTGCCT
2401 ACAAAATCAA GCCCTAAATA TGAGCAGCTG TCCACTCGAT TCCAAGGTA AAGTCTGTTC
2461 GGGCCATGGG GTGTGTAGTA ATGAAGCCAC CTGCATTTGT GATTTACACT GGGCAGGGAC
2521 AGATTGCAGT ATCCGGGATC CAGTTAGGAA CCTTCACCCC CCAAGGATG AAGGACCCAA
2581 GGGTCCTAGT GCCACCAATC TCATAATAGG CTCCATCGCT GGTGCCATCC TGGTAGCAGC
2641 TATTGTCTTT GGGGGCACAG GCTGGGGATT TAAAAATGTC AAGAAGAGAA GGTTCGATCC
2701 TACTCAGCAA GGGCCCATCT GATCAGCTG CGCTGGATGG ACACCGCCTT GCACTGTTGG
2761 ATTTCTGGTA TGACATACTC GCAGCAGTGT TACTGGAATC ATTAAGTTTG TAAACAAAAC
2821 CTTTGGGTGG TAATGACTAC GGAGCTAAAG TTGGGGTGAC AAGGATGGGG TAAAAGAAAA
2881 CTGTCTCTTT TGGAAATAAT GTCAAAGAAC ACCTTTCACC ACCTGTCAGT AAACGGGGGA
2941 GGGGGCAAAA GACCATGCTA TAAAAAGAAC TGTTCCAGAA TCTTTTTTTT CCCTAATGGA

```

FIGURA 12 - SEQUÊNCIA CODIFICANTE (CDS) DO CDNA DA ADAM23 HUMANA

NOTA: Do verde ao marrom. Em verde, está representada a sequência do peptídeo sinal da ADAM23; em azul claro, está representada a sequência do pró-domínio; em azul escuro, está representada a sequência do domínio metaloprotease; em rosa, está representada a sequência do domínio desintegrina; em vermelho, está representada a sequência do domínio rico em cisteína; em verde-escuro, está representada a sequência do domínio EGF; em preto, está representada a sequência do domínio transmembrânico e em cinza, está representada a sequência da cauda citoplasmática da ADAM23.

FONTE: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Com auxílio de programas de bioinformática como o *NEBcutter V2.0*, foram determinadas as enzimas de restrição usadas, com base no fato de possuírem sítios

na região de policlonagem do vetor, mas que não digerissem a sequência alvo. Para verificar se os iniciadores estavam adequados, eles foram testados quanto a diversas características da sequência. Uma delas é a temperatura de *melting*, temperatura na qual metade das bases em determinada sequência encontra-se desnaturada, devendo essa temperatura ser muito próxima tanto para o iniciador *forward* quanto o reverso, uma vez que são usados juntos em reações baseadas em gradientes de temperatura. Além disso, analisou-se a formação de estrutura de grampo na sequência, que pode ser formada por interações entre as bases de sua própria fita, atrapalhando a obtenção de insertos quando formadas. Homodímeros, dímeros formados entre duas moléculas do mesmo iniciador, e heterodímeros, dímeros formados entre os iniciadores *forward* e reverso, também foram analisados, pois a intenção não era a de que os iniciadores se anelassem, e sim que flanqueassem a região da sequência de nucleotídeos de interesse para reações de PCR. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados encontra-se na Tabela 1.

Após o desenho desses iniciadores, foi usado o BLAST para confirmar a especificidade do alinhamento dos iniciadores com a sequência e posição desejadas, verificando que de fato os iniciadores se alinhavam apenas na posição prevista, para que não houvesse risco de amplificação de outras sequências do DNA que não as das porções do ectodomínio da ADAM23 e a da porção Fc2 da imunoglobulina IgG1 humana.

TABELA 1 - RESUMO DE INFORMAÇÕES DAS CLONAGENS

Clonagem	Enzimas de restrição	Oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do inserto (pb)
hIlgG1-Fc2 no pcDNA3.1(-)	EcoRI	Forward (Nº 177)	60 °C	5'-AGC TTT TGG AAT TCG GCC ATG GTT AGA TCT-3'	937
	Acc65I	Reverso (Nº 178)		5'-AGC GGT ACC TCA TTT ACC CGG AGA CAG-3'	
ADAM23C1 (ADAM23 de 60 a 792 aa no pINFUSE)	EcoRI	Forward (Nº 181)	60 °C	5'-CGC TTG TGA ATT CGT CCC GGC C-3'	2.227
	BglII	Reverse (Nº 182)		5'-CGC TAT TAT AGA TCT GGT GGC ACT AGG ACC-3'	
ADAM23C2 (ADAM23 de 287 a 792 aa no pINFUSE)	EcoRI	Forward (Nº 183)	60 °C	5'-AGT GGG AAT TCA GCA GTC AAT CCA TCA CG-3'	1.547
	BglII	Reverse (Nº182)		5'-CGC TAT TAT AGA TCT GGT GGC ACT AGG ACC-3'	
ADAM23C3 (ADAM23 de 1 a 792 aa no pcDNA3.1-hIlgG1-Fc2)	NheI	Forward (Nº 179)	62 °C	5'-ATT GGA GCT AGC GCC ATG AAG CCG-3'	2.404
	EcoRI	Reverse (Nº 180)		5'-CCT ATT ATG AAT TCG GTG GCA CTA GGA CCC-3'	

NOTA: Enzimas de restrição, oligonucleotídeos iniciadores, temperaturas de anelamento, sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos insertos em pares de bases utilizados nas clonagens.

FONTE: A Autora (2015).

3.6.2 Obtenção dos insertos para clonagem das porções do ectodomínio da ADAM23 e a da porção Fc2 da imunoglobulina IgG1 humana

Em um primeiro momento, o inserto a ser obtido foi a região Fc (domínios CH2 e CH3) da imunoglobulina humana IgG1 através de PCR a partir do cDNA da molécula inteira, proveniente do vetor comercial pINFUSE-hIlgG1-Fc2 (InvivoGen).

Em um segundo momento, os insertos a serem obtidos foram: ADAM23C1, correspondente ao ectodomínio (sem a sequência do peptídeo sinal e com o pró-domínio), equivalente à construção 1; ADAM23C2, correspondente ao ectodomínio (sem a sequência sinal e sem o pró-domínio), equivalente à construção 2; ADAM23C3, correspondente ao ectodomínio inteiro da ADAM23 (contendo o pró-domínio e o peptídeo sinal, além de todos os outros domínios), equivalente à

construção 3. Esses insertos da ADAM23 foram obtidos através de PCR a partir do cDNA da molécula inteira, proveniente da construção pcDNA3.1- ADAM23-HA (CAL et al., 2000).

Todos os insertos foram obtidos por reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir dos oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos e do DNA obtido. Inicialmente realizaram-se reações testes de PCR utilizando *Taq* DNA Polimerase para padronizar as condições de reação e verificar a especificidade dos iniciadores. Após os testes, foram realizadas reações utilizando a enzima *Pfu* DNA Polimerase para a amplificação de produtos, visando à clonagem com uma taxa de erros mais baixa. Essa menor taxa de erros está relacionada com a atividade exonucleásica 3' → 5' dessa enzima.

Em cada reação, foram usados 2,5 µl de tampão para *Pfu* DNA polimerase 10 vezes concentrado, MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, *Pfu* DNA polimerase 2 U/µl, 0,5 µM de cada iniciador (*forward* e reverso), com todos os reagentes citados da marca Promega, 300 ng de DNA plasmidial e água ultrapura completando 25 µl de volume reacional. No caso das reações para a obtenção do inserto ADAM23C3, referente à construção 3, foi necessário utilizar 3,3 mM de MgSO₄ e 5 % (v/v) de dimetilsufóxido (DMSO) (Amresco).

A reação de amplificação do inserto hlgG1-Fc2 do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 foi realizada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto e, após o término dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos (Tabela 2), sendo todas as etapas realizadas em termociclador *Eppendorf Mastercycler*[®] (Eppendorf).

A reação de amplificação do inserto ADAM23C1 do plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foi realizada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 2,5 minutos e, após o término dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, sendo todas as etapas realizadas no mesmo termociclador.

A reação de amplificação do inserto ADAM23C2 do plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foi realizada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 45 segundos, 60 °C por

45 segundos, 72 °C por 1 minuto e 40 segundos e, após o término dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, no mesmo aparelho termociclador.

A reação de amplificação do inserto ADAM23C3 do plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foi realizada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95 °C por 45 segundos, 62 °C por 45 segundos, 72 °C por 3 minutos e, após o término dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, sendo todas as etapas realizadas no mesmo termociclador.

Cada reação foi então analisada em gel de agarose 1% (p/v) em TAE (Tris-Acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) juntamente com 0,5 µg do marcador de pares de base de acordo com cada caso. Foram utilizados o *Gene Ruler* 100 bp, o *Gene Ruler* 1 kb e *Lambda HindIII ladder* (Fermentas), com o resultado visualizado sob luz Ultravioleta. Essa mesma análise em gel de agarose foi feita nas etapas a seguir.

TABELA 2 - INFORMAÇÕES DE CICLOS DE TEMPERATURA POR TEMPO DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAR CADA INSERTO.

Clonagem	Repetições do ciclo	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
hIgG1-Fc2 no pcDNA3.1(-)	1 x	95	2:30
	40 x	95	0:45
		60	0:45
		72	1:00
		72	10:00
ADAM23C1 (ADAM23 de 60 a 792 aa no pINFUSE)	1 x	95	2:30
	40 x	95	0:45
		60	0:45
		72	2:30
		72	10:00
ADAM23C2 (ADAM23 de 287 a 792 aa no pINFUSE)	1 x	95	2:30
	40 x	95	0:45
		60	0:45
		72	1:40
		72	10:00
ADAM23C3 (ADAM23 de 1 a 792 aa no pcDNA3.1-hIgG1-Fc2)	1 x	95	2:30
	40 x	95	0:45
		62	0:45
		72	3:00
		72	10:00

FONTE: A Autora (2015).

3.7 Purificação de DNA plasmidial a partir de gel de agarose

A purificação dos DNAs plasmidiais a partir de gel de agarose foi realizada com o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit*, conforme manual do fabricante. Cada banda contendo fragmento do DNA de interesse foi excisada do gel de agarose com um bisturi. Cada pedaço de gel foi pesado, e para cada peso de gel, foi adicionado um volume 3 vezes maior de tampão QG, Buffer QG. Cada amostra foi então incubada a 50 °C por 10 minutos, e durante esse tempo, homogeneizada em vortex a cada 3

minutos, até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Após a completa dissolução da agarose, foi adicionado um volume de isopropanol equivalente ao peso do gel de cada amostra. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada, adicionada a uma microcoluna *QIAquick* acoplada a um tubo coletor e, em seguida, submetida à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor embaixo da coluna foi descartado. Em seguida, foram adicionados a cada coluna 500 µl de tampão QG, Buffer QG, as quais foram então submetidas à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. Na lavagem foram adicionados 750 µl de tampão de lavagem PE, Buffer PE e as amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e submetidas à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor foi descartado. Cada coluna foi novamente submetida à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto para a remoção de eventuais resíduos do tampão de lavagem. Em seguida, cada coluna foi acoplada a um novo microtubo do tipo *Eppendorf* de 1,5 ml. Para eluir o DNA de cada coluna, foram adicionados a cada uma delas 50 µl do tampão de eluição Buffer EB (10 mM Tris-Cl; pH 8,5), as quais foram incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente e submetidas à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. A concentração de DNA plasmidial purificado foi quantificada por espectrofotometria UV a 260 nm em *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

3.8 Reações de digestão dos insertos obtidos e dos seus respectivos plasmídeos

A inserção de cada inserto obtido em cada plasmídeo foi feita através de reações de digestão com as enzimas de restrição específicas para cada caso. Para isso, os produtos de PCR obtidos com os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram purificados do gel de agarose por gel-extração usando-se o kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), como descrito no item anterior. A eluição do inserto foi feita com 40 µl de água ultra-pura.

A reação de digestão do inserto hlgG1-Fc2 e do plasmídeo pcDNA3.1(-) foi feita em apenas uma etapa, com ambas as enzimas de restrição *Acc65I* e a *EcoRI*.

Primeiramente, 40 µl do inserto foram incubados com 5 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 50 µl. Paralelamente, 1,5 µg do plasmídeo pcDNA3.1(-), foram incubados com 2 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 µl. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então a inativação das enzimas foi feita a 65 °C por 20 minutos. A digestão foi analisada em gel de agarose 1% (p/v).

A reação de digestão do inserto ADAM23C1 e do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 foi feita em uma etapa somente, com ambas as enzimas de restrição *BglII* e a *EcoRI*. Primeiramente, 40 µl do inserto foram incubados com 5 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 50 µl. Paralelamente, 1,5 µg do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 foram incubados com 2 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 µl. A digestão foi realizada a 37 °C por 4 horas, e então a inativação das enzimas foi feita a 65 °C por 20 minutos. A digestão foi então analisada em gel de agarose 1 % (p/v).

A reação de digestão do inserto ADAM23C2 e do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 foi feita também em uma única etapa, com ambas as enzimas de restrição *BglII* e a *EcoRI*. Primeiramente, 40 µl do inserto foram incubados com 5 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 50 µl. Paralelamente, 1,5 µg do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 foram incubados com 2 µl de tampão “Orange” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U de cada enzima de restrição e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 µl. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então a inativação das enzimas foi feita a 65 °C por 20 minutos. A digestão foi então analisada em gel de agarose 1% (p/v).

A reação de digestão do inserto ADAM23C3 e do plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 foi feita em duas etapas, cada uma com cada enzima de restrição por vez. Primeiramente, 40 µl do inseto foram incubados com 5 µl de tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U da enzima de restrição *NheI* e água

ultrapura completando para um volume reacional de 50 µl. Paralelamente, 1,5 µg do plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2, foram incubados com 2 µl de tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas), 2 U da enzima de restrição *NheI* e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 µl. Essa primeira etapa da digestão foi realizada a 37 °C por 2 horas. Em seguida, o inserto foi incubado com mais 6,3 µl de tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas) e 2 U da enzima de restrição *EcoRI*. Paralelamente, o plasmídeo foi incubado com mais 2,6 µl de tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas) e 2 U da enzima de restrição *EcoRI*. A segunda etapa da digestão foi realizada a 37 °C por 2 horas, e então, a inativação das enzimas foi feita a 65 °C por 20 minutos. A digestão final foi analisada em gel de agarose 1% (p/v).

Como todas as digestões foram satisfatórias, o produto digerido foi gel-extraído com kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) em 40 µl de água. Em seguida, após as digestões dos insertos e vetores, os insertos foram ligados cada um a seus respectivos vetores de expressão. Os insertos ADAM23C1 e ADAM23C2 foram fusionados à sequência da região Fc da IgG1 humana que já estava presente no *backbone* do vetor comercial pINFUSE-hlgG1-Fc2 (InvivoGen). O inserto hlgG1-Fc2 foi fusionado ao vetor pcDNA3.1(-), formando o vetor reengenheirado pcDNA3.1-hlgG1-Fc2. O inserto ADAM23C3 foi ligado pela sua extremidade C-terminal à sequência da região Fc de IgG1 presente no *backbone* do vetor pcDNA3.1-hlgG1-Fc2.

3.9 Reações de ligação dos insertos aos seus respectivos plasmídeos digeridos

O ensaio de ligação consiste na junção de plasmídeo e insertos já digeridos com o mesmo par de enzimas de restrição. Para todas as reações, usou-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto digeridos de 1:5.

Na reação de ligação do inserto hlgG1-Fc2 digerido foram usados 50 ng do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 digerido, o que equivale a 0,014 pmol de produto, foi necessário 0,070 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 2 µl

de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 2 U de T4 DNA ligase recombinante (4 U/ μ l) (Fermentas), sendo essa enzima a responsável pela união de plasmídeo e inserto pela ligação fosfodiéster, 50 ng (0,014 pmol) do vetor digerido, 43,4 ng (0,070 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 μ l. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 20 minutos. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Na reação de ligação do inserto ADAM23C1 digerido foram usados 50 ng do plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 digerido, o que equivale a 0,018 pmol de produto, foi necessário 0,090 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 2 μ l de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 2 U de T4 DNA ligase recombinante (4 U/ μ l) (Fermentas), 50 ng (0,018 pmol) do vetor digerido, 130 ng (0,090 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 μ l. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 20 minutos. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Na reação de ligação do inserto ADAM23C2 digerido foram usados 50 ng do plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 digerido, o que equivale a 0,018 pmol de produto, foi necessário 0,090 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 2 μ l de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 2 U de T4 DNA ligase recombinante (4 U/ μ l) (Fermentas), 50 ng (0,018 pmol) do vetor digerido, 91,8 ng (0,090 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 μ l. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 20 minutos. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Na reação de ligação do inserto ADAM23C3 digerido foram usados 50 ng do plasmídeo pcDNA3.1-hIgG1-Fc2 digerido, o que equivale a 0,011 pmol de produto, foi necessário 0,059 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 2 μ l de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 2 U de T4

DNA ligase recombinante (4 U/ μ l) (Fermentas), 50 ng (0,011 pmol) do vetor digerido, 94,8 ng (0,059 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 20 μ l. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 20 minutos. Paralelamente foi repetida a mesma reação, porém sem adição do inserto, para ser usada como controle negativo.

Em seguida, após as reações de ligação, foram obtidos os insertos ligados aos seus respectivos vetores, como os insertos ADAM23C1 e ADAM23C2 no vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2 (InvivoGen), formando, respectivamente, pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2 e pINFUSE-ADAM23C2-hIgG1-Fc2; o inserto hIgG1-Fc2 no vetor pcDNA3.1(-), formando o vetor re-engenheirado pcDNA3.1-hIgG1-Fc2; o inserto ADAM23C3 no vetor pcDNA3.1-hIgG1-Fc2, formando pcDNA3.1-ADAM23C3-hIgG1-Fc2.

Obtidos os vetores de expressão com seus respectivos insertos, foi feita a inserção desses produtos em bactérias.

3.10 Transformação em bactérias *E. coli* DH5 α

Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias *E. coli* da estirpe DH5 α . A transformação foi feita a partir de alíquotas de 40 μ l de bactérias eletrocompetentes, preparadas conforme descrito por Sambrook em 2001. A alíquota foi adicionada do produto de ligação, incubadas no gelo durante 1 minuto e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador Biorad). Os meios LB utilizados foram diferentes para cada caso, o meio LB para bactérias transformadas com pcDNA3.1 continha ampicilina (50 μ g/ml); triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l) e NaCl (10 g/l). O meio LB para as bactérias transformadas com pINFUSE continha zeocina (50 μ g/ml); triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l) e NaCl (5 g/l), sendo este meio chamado de LB *low-salt* devido à baixa concentração do sal. O antibiótico zeocina, em meio a uma concentração mais alta de NaCl no meio LB, pode ser degradado e, conseqüentemente, tornar-se ineficiente para selecionar bactérias. Dessa forma, o

meio LB utilizado com a zeocina apresentava sempre uma concentração de 5 g/l em vez de 10g/l de NaCl do meio LB utilizado com o antibiótico ampicilina. Vale ressaltar que o plasmídeo pcDNA3.1 confere resistência à ampicilina e o plasmídeo pINFUSE confere resistência à zeocina.

Após os pulsos elétricos, foi adicionado às células 1 ml de meio LB (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e NaCl 10 g/l ou 5 g/l) para recuperação celular durante uma hora a 37 °C sob agitação leve (SAMBROOK *et al.*, 2001). Após a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido LB-Ágar 15 g/l contendo 50 µg/ml de ampicilina ou zeocina (SAMBROOK *et al.*, 2001).

3.11 PCR de colônia

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, na qual ao invés de se usar um molde de DNA para amplificar uma região determinada pelos iniciadores, utiliza-se a própria cultura bacteriana.

Cada reação para cada caso foi feita coletando-se colônias de bactérias em palitos que foram então passados no fundo de microtubos próprios para reações de PCR. Cada amostra recebeu 1 µl de tampão para Taq DNA polimerase 10 vezes concentrado, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,5 µM de iniciador *forward*, 0,5 µM de iniciador *reverse*, 2 U Taq DNA polimerase (5U/µl) e água ultrapura autoclavada completando para um volume reacional de 10 µl. No caso das reações com a construção ADAM23C3, foi necessário utilizar 3,3 mM de MgCl₂ e 5 % (v/v) de dimetilsufóxido (DMSO) (Amresco) uma vez que os iniciadores funcionaram melhor na presença de DMSO.

Os iniciadores usados e as condições da reação foram os mesmos usados na produção de cada inserto por PCR, exceto o primeiro aquecimento a 95 °C que durou 5 minutos, com o objetivo de garantir uma lise eficiente das bactérias presentes no tubo para liberação do material genético no meio reacional. A reação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v).

3.12 Purificação de DNA plasmidial por Miniprep

O procedimento de purificação de DNA plasmidial por Miniprep foi feito da mesma forma para os seguintes plasmídeos: pcDNA3.1-ADAM23-HA; pINFUSE-hlgG1-Fc2; pcDNA3.1-hlgG1-Fc2; pINFUSE-ADAM23C1-hlgG1-Fc2; pINFUSE-ADAM23C2-hlgG1-Fc2; pcDNA3.1-ADAM23C3-hlgG1-Fc2.

Esse procedimento foi realizado com um kit e baseado no protocolo do fabricante do kit *QIAGEN® QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Foi feita uma eletroporação de bactérias eletrocompetentes *E. coli* DH5 α com cada plasmídeo e as mesmas foram plaqueadas em meio LB-ágar do mesmo modo conforme descrito no item anterior. Apenas variou-se o antibiótico adicionado ao meio de acordo com o gene de resistência presente em cada plasmídeo. Dentre as colônias que cresceram em meio sólido foram selecionadas sempre 27 colônias para serem submetidas a uma reação de PCR de colônia para verificar se as mesmas continham o inserto clonado em cada vetor com o qual haviam sido transformadas.

Após a confirmação por PCR de colônia, foram sempre escolhidas 5 colônias para serem inoculadas em 5 ml de meio LB (triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l)) (para as bactérias transformadas com pcDNA3.1 selecionadas com ampicilina) ou NaCl (5 g/l)) (para as bactérias transformadas com pINFUSE selecionadas com zeocina), contendo sempre o respectivo antibiótico (ampicilina (50 μ g/ml) ou zeocina (50 μ g/ml)), incubadas de um dia para o outro por 12 a 16 horas em estufa a 37°C.

O pré-inóculo foi feito com uma colônia inoculada em 5 ml de meio LB, contendo antibiótico específico e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 16 horas. Em seguida, todo o volume do meio de cultura crescido foi submetido à centrifugação a 6.000 x g a 4°C por 30 minutos. Em seguida, os sedimentos (*pellets*) de bactérias foram ressuspensos em 250 μ l do tampão de ressuspensão (*resuspension buffer*) Buffer P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; RNase A (100 μ g/ml); pH 8,0) gelado e cada volume de cada amostra, transferido para um microtubo do tipo *Eppendorf* de 2 ml. Em seguida, a cada tubo, adicionou-se 250 μ l do tampão de lise (*lysis buffer*) Buffer P2 (200 mM NaOH; 1% (p/v) SDS). Em

seguida, homogeneizou-se por inversão de 4 a 6 vezes. A essas amostras foram adicionados 350 µl do tampão de neutralização (*neutralization buffer*) Buffer N3 (4,2 M hidrocloreto de guanidina; 0,9 M acetato de potássio; pH 4,8) e novamente a homogeneização foi feita por inversão de 4 a 6 vezes. As amostras foram então submetidas à centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante (que contém o DNA plasmidial) foi coletado e adicionado à minicoluna *QIAprep*, a qual foi então submetida à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor embaixo da coluna foi descartado. A coluna foi lavada com a adição de 500 µl do tampão PB, Buffer PB (5 M Gu-HCl; isopropanol 30% (v/v)) e centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor foi descartado.

Em seguida, cada coluna foi novamente lavada com a adição de 750 µl do tampão PE, Buffer PE (10 mM Tris-HCl; etanol 80% (v/v); pH 7,5) e centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor foi novamente descartado e cada coluna foi novamente submetida à centrifugação por mais 1 minuto a 13.000 rpm para a remoção de eventuais resíduos do tampão de lavagem. Em seguida, cada coluna foi acoplada a um microtubo novo do tipo *Eppendorf* de 1,5 ml. O DNA plasmidial foi então eluído da coluna com a adição de 50 µl do tampão de eluição Buffer EB (10 mM Tris-Cl; pH 8,5) incubação por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. A concentração de DNA plasmidial purificado foi quantificada por espectrofotometria UV a 260 nm em *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

3.13 Reações de PCR pré-sequenciamento

Foram feitas reações de sequenciamento para confirmar a sequência das construções das proteínas quiméricas ADAM23-hIgG1-Fc2 humanas clonadas. As reações de sequenciamento foram feitas em microtubos contendo 1 µl de BigDye v3.1 *Applied Biosystems*[®] (Life Technologies[™], Carlsbad, CA, US), uma solução com *Taq* DNA Polimerase modificada, dNTPs e ddNTPs, 1,5 µl de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciadores para sequenciamento,

300 ng de cada plasmídeo a ser sequenciado, em um volume final de 10 µl de reação. Cada reação foi realizada a 96 °C por 2 minutos (desnaturação) e 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 48 °C (temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores) por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos (extensão). Nas reações de sequenciamento foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para as extremidades das sequências e/ou para regiões internas das sequências conforme cada caso, devido ao grande tamanho de algumas construções (Tabela 3). Após essa reação, os produtos foram submetidos à reação de precipitação.

TABELA 3 - RESUMO DAS INFORMAÇÕES DAS REAÇÕES DE PRÉ-SEQUENCIAMENTO DE CADA CLONAGEM E DOS SEUS RESPECTIVOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE EXTREMIDADE E/OU INTERNOS

Clonagem	Oligonucleotídeos iniciadores de extremidade e internos	Temperatura de anelamento	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do inserto (pb)
hlgG1-Fc2 no pcDNA3.1(-)	Forward (Nº 204)	60 °C	5'-GCT CTC TGG CTA ACT AG -3'	937
	Reverso (Nº 211)		5'-AGG GGC AAA CAA CAG -3'	
ADAM23C1 (ADAM23 de 60 a 792 aa no pINFUSE)	Forward (Nº 184)	60 °C	5'-CCT ACC TAG ACT CAG C -3'	2.227
	Reverso (Nº 185)		5'-TAC CAG TTG AAC TTG A -3'	
	Interno (Nº 186)		5'-CTG TCA ACC TGC AAT G -3'	
	Interno (Nº 188)		5'- TCT TCC AAT GGC AGT G -3'	
ADAM23C2 (ADAM23 de 287 a 792 aa no pINFUSE)	Forward (Nº 184)	60 °C	5'-CCT ACC TAG ACT CAG C -3'	1.547
	Reverso (Nº 185)		5'-TAC CAG TTG AAC TTG A -3'	
	Interno (Nº 188)		5'- TCT TCC AAT GGC AGT G -3'	
ADAM23C3 (ADAM23 de 1 a 792 aa no pcDNA3.1-hlgG1-Fc2)	Interno (Nº 187)	62 °C	5'-GCA CTG TTA CTA CCA TG -3'	2.404
	Interno (Nº 188)		5'- TCT TCC AAT GGC AGT G -3'	
	Interno (Nº 189)		5'- GGT GGA TTC AGT GCA G -3'	
	Forward (Nº 204)		5'-GCT CTC TGG CTA ACT AG -3'	
	Reverso (Nº 211)		5'-AGG GGC AAA CAA CAG -3'	

FONTE: A Autora (2015).

3.14 Reações de precipitação pré-sequenciamento

Após a reação, todas as amostras foram precipitadas da mesma forma, adicionando-se 1 µl de solução de precipitação (1,5 M acetato de sódio; 0,25 M EDTA) e 30 µl de etanol 100% (Merck), com incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação por 30 minutos a 20.000 x g e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recebeu 15 µl de etanol 70% (Merck) gelado para lavagem e remoção de resíduos de sais. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados e o precipitado foi secado em estufa a 37 °C por uma hora. As reações foram mantidas em -20 °C até serem aplicadas no sequenciador. Antes do sequenciamento foram adicionados a cada amostra, 10 µl de formamida (HI-DI). Em seguida, foram incubadas por 5 minutos a 95 °C e, então, mantidas em gelo logo antes da corrida. Foram utilizados os sequenciadores *Applied Biosystems*[®] *ABI 3500* e *3130* (Life Technologies) e o eletroferograma analisado no programa BioEdit[®] v.7.0.9.0.

3.15 Máxima preparação de plasmídeos por Maxiprep

O procedimento de máxima purificação de DNA plasmidial foi feito da mesma forma para todos os plasmídeos contendo as construções.

O procedimento de máxima preparação de plasmídeos foi realizado com um kit e baseado no protocolo do fabricante do kit *QIAGEN*[®] *Plasmid Purification Handbook* (QIAGEN). Foi feita uma eletroporação com 1 µl do plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA, 40 µl de bactérias eletrocompetentes *E. coli* DH5α (previamente armazenadas em freezer -80°C). A eletroporação foi realizada em eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Biorad). Após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio LB sem antibiótico para a recuperação e crescimento das bactérias. As bactérias foram incubadas sob agitação de 300 rpm a 37°C durante 1 hora para crescer. Em seguida, o meio com bactérias foi submetido à centrifugação em microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf) por 2 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante e o sedimento (*pellet*) foram plaqueados separadamente, cada um em

uma placa de Petri de 100 cm² contendo meio LB-ágar (Luria-broth-ágar) (triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l); ágar (15 g/l)) com ampicilina (50 µg/ml) ou zeocina (50 µg/ml), as quais foram incubadas de um dia para o outro por 12 a 16 horas em estufa a 37°C. Além disso, a concentração de NaCl utilizada para cada situação foi diferente, (10 g/l) (para as bactérias transformadas com pcDNA3.1 selecionadas com ampicilina) ou (5 g/l) (para as bactérias transformadas com pINFUSE selecionadas com zeocina). Dessa forma, o meio nas placas é seletivo, e só cresceram as colônias com resistência ao antibiótico.

O pré-inóculo foi feito com uma colônia inoculada em 5 ml de meio LB contendo o respectivo antibiótico e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 8 horas. Em seguida, a cultura crescida do pré-inóculo foi diluída 1/500 no inóculo (200 ml de meio LB com ampicilina ou zeocina (50 µg/ml)). Essa proporção é adequada para plasmídeos de alta cópia (*high copy*) que é o caso de todos os plasmídeos citados neste item. Em seguida, o inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 12 a 16 horas de um dia para o outro. Todo o volume do meio de cultura crescido foi submetido à centrifugação a 6.000 x g a 4°C por 15 minutos. Em seguida, os sedimentos (*pellets*) de bactérias foram ressuspensos em 10 ml do tampão de ressuspensão (*resuspension buffer*) Buffer P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; RNase A (100 µg/ml); pH 8,0) gelado e adicionou-se 10 ml do tampão de lise (*lysis buffer*) Buffer P2 (200 mM NaOH; 1% (p/v) SDS). Em seguida, homogeneizou-se por inversão de 4 a 6 vezes e as amostras foram incubadas a 25°C por 5 minutos. A essas amostras foram adicionados 10 ml do tampão de neutralização (*neutralization buffer*) Buffer P3 (3 M KAc; pH 5,5) gelado e novamente a homogeneização foi feita por inversão de 4 a 6 vezes. As amostras foram então incubadas em banho de gelo por 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 9.000 x g a 4°C por 48 minutos na centrífuga *Eppendorf centrifuge 5810R/rotor 34-6-3x*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e novamente submetido à centrifugação a 9.000 x g a 4°C por 25 minutos. O sobrenadante (que contém o DNA plasmidial) foi coletado e adicionado à coluna QIAGEN-tip500, a qual havia sido previamente equilibrada com 10 ml de tampão de equilíbrio Buffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) isopropanol; 0,15% (v/v) Triton X-100; pH 7,0) e esvaziada. Após a

passagem do sobrenadante pela coluna, a mesma foi lavada com 30 ml de lavagem Buffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) isopropanol; pH 7,0). Em seguida, o DNA plasmidial foi eluído da coluna com 15 ml do tampão de eluição Buffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl; 15% (v/v) isopropanol; pH 8,5). O DNA plasmidial foi precipitado com 10,5 ml (0,7 volumes) de isopropanol (Merck) a 25°C, passou por homogeneização por inversão e submetido à centrifugação a 9.000 x g por 48 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente descartado sem causar distúrbios ao sedimento (*pellet*) que era onde estava o DNA. O sedimento (*pellet*) foi então lavado com 5 ml de etanol 70% a 25°C e, em seguida, submetido à centrifugação a 9.000 x g por 48 minutos. O sobrenadante foi novamente cuidadosamente descartado sem causar distúrbios ao precipitado (*pellet*). Finalmente, o sedimento foi colocado em um fluxo laminar para permitir a secagem estéril do excesso de etanol por 16 horas de um dia para o outro. O DNA seco foi redissolvido em 500 µl de H₂O Milli-Q (Millipore) estéril. A concentração de DNA plasmidial purificado foi quantificada por espectrofotometria UV a 260 nm em *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

3.16 Transfecção de células HEK-293T e CHO-K1 por precipitação por cálcio

O procedimento de transfecção de células HEK-293T e CHO-K1 foi feito sempre da mesma forma para os seguintes plasmídeos: pcDNA3.1-ADAM23-HA; pINFUSE-hIgG1-Fc2; pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2; pINFUSE-ADAM23C2-hIgG1-Fc2; pcDNA3.1-ADAM23C3-hIgG1-Fc2.

As linhagens HEK-293T e CHO-K1 foram cultivadas conforme descrito no item 3.1 de cultivo celular.

As células foram transfectadas com cada plasmídeo por co-precipitação de fosfato de cálcio como previamente descrito (PUSCHEL *et al.*, 1995). Uma alíquota 12 µg do plasmídeo de interesse foi adicionado na superfície de 750 µl de água ultrapura estéril, seguido de 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 1.000 µl de solução BBS 2X concentrada (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1 mM Na₂HPO₄; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 8 ml de meio

respectivo acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino. O número de placas, e, conseqüentemente, o número de células, variou em cada transfecção realizada. As placas de Petri de 100 cm² contendo as células com confluência de aproximadamente 60-70% tiveram os seus meios de cultura aspirados, e em seguida, adicionou-se a elas a solução descrita acima.

Cada placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi novamente aspirado e a placa foi cuidadosamente lavada com 5 ml de PBS. Em seguida, adicionou-se 6 ml de meio novo respectivo para cada linhagem e cada placa foi mantida intacta na estufa por 72 horas (3 dias). Para os casos nos quais foram coletados os sobrenadantes do meio de cultura, para ensaios com proteínas secretadas no meio de cultura, as células transfectadas receberam meio sem soro fetal bovino, para evitar a grande quantidade de proteínas, como albumina, presentes no soro em relação às proteínas quiméricas secretadas.

3.17 Transfecção de células N2A por lipofectamina

O procedimento de transfecção de células de neuroblastoma murino N2A foi feito sempre da mesma forma para cada vetor/construção. A linhagem N2A foi cultivada conforme descrito no item 3.1 de cultivo celular.

Antes da realização da transfecção, foram sempre plaqueadas 4 x 10⁵ células por placa em placas de Petri de 60 cm². Foram utilizadas sempre 2 placas por condição/construção, ou seja, 2 placas para cada uma das 4 construções dos vetores. Para cada placa foram feitos sempre 2 tubos tipo Eppendorf: o tubo 1 contendo 500 µl de meio DMEM alta glicose com 10% (v/v) de SFB, aminoácidos não-essenciais, sem antibiótico e 3 µg de plasmídeo; o tubo 2 contendo 500 µl do mesmo meio com 6 µl de Lipofectamina *Lipofectamine*[®] 2000 Reagent (Invitrogen). Em seguida, para cada placa o conteúdo dos tubos 1 e 2 foram misturados e incubados em temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, o meio de cultura das placas foi aspirado e as mesmas lavadas com PBS 1X. Adicionou-se então a cada placa 5 ml de meio de transfecção (DMEM alta glicose com 10% (v/v) de SFB,

piruvato 1X, aminoácidos não-essenciais, sem antibiótico). Após os 30 minutos de incubação, adicionou-se a cada placa a mistura 1+2. O meio de transfecção não deve conter antibiótico para não prejudicar a célula, uma vez, que a lipofectamina pode levar o antibiótico direto para dentro da célula. Cada placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi novamente aspirado e a placa foi cuidadosamente lavada com 3 ml de PBS 1X. Em seguida, adicionou-se 3 ml de meio DMEM alta glicose com ou sem 10% (v/v) de SFB, com piruvato, com aminoácidos não-essenciais e antibiótico. Cada placa foi mantida intacta na estufa por 72 horas (3 dias). Para os casos nos quais foram coletados os sobrenadantes do meio de cultura, para ensaios com proteínas secretadas, as células N2A transfectadas também receberam meio sem soro fetal bovino.

3.18 Biotinilação de células N2A

A biotinilação, ou seja, a marcação de proteínas de superfície celular com biotina, neste caso, para tentar marcar a ADAM23 de superfície celular, foi feita com células de neuroblastoma Neuro-2A (N2A). Identificar o tamanho da ADAM23 que se encontra na superfície celular é importante para comparar com o tamanho da ADAM23 presente no interior da célula, e dessa, forma avaliar o seu processamento quando sai do citoplasma e é direcionada para a membrana plasmática.

Três placas de Petri de cultura de N2A, com pelo menos 80% de confluência, tiveram suas células lavadas apenas uma vez com PBS 1X. Em seguida, as células foram soltas com PBS-EDTA e colocadas em tubo tipo Falcon de 15 ml. As células vivas foram então incubadas com 1 mM de biotina *EZ-Link™ Hydrazide-Biotin* (Thermo Scientific) em 1 ml de PBS 1X por 40 minutos a 4°C. As células foram então submetidas à centrifugação a 600 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e adicionou-se PBS 1X, realizando-se assim uma lavagem. As células foram então novamente submetidas à centrifugação a 600 x g por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se PBS 1X com solução de glicina 0,1 M, necessária para o bloqueio de biotinas livres. As células foram então novamente submetidas à centrifugação a 600

x g por 5 minutos. Esse processo de bloqueio com glicina e centrifugação foi repetido 3 vezes. As células foram então lisadas com tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; pH 7,4 contendo 1 comprimido do coquetel de inibidores de protease *Complete Mini* (Roche)) em banho de gelo por 40 minutos a 4°C.

Os lisados foram então submetidos à centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e quantificado por Bradford, o sedimento foi descartado. Os sobrenadantes dos lisados foram então submetidos à cromatografia de afinidade à avidina-agarose. Foram utilizados 20 µl de matriz cromatográfica avidina-agarose *Pierce Avidin Agarose* (Thermo Scientific) para o extrato celular de uma placa de cultura, ou seja, como foram utilizadas 3 placas de cultura celular, foram utilizados 60 µl de resina. A incubação dos extratos celulares com avidina-agarose foi realizada por 2 horas sob agitação em orbital a 4° C. A biotina tem afinidade pela avidina-agarose, dessa forma, apenas as proteínas de células que foram realmente biotiniladas se ligam à resina avidina-agarose pela biotina e, portanto, são purificadas em relação às demais. Após a incubação, são feitas duas lavagens com PBS 1X com centrifugações de 8.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se a cada amostra tampão de amostra 2 X redutor, contendo β-mercaptoetanol, ferveu-se as amostras por 10 minutos a 95° C. Após a fervura, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos, sendo os sobrenadantes onde se encontram as proteínas coletados e os sedimentos descartados.

3.19 Obtenção de extrato celular total (*whole cell lysate*)

Este método foi utilizado para obtenção de extratos celulares e de tecidos de camundongo suíço (Swiss) de diferentes idades como rim, pulmão e testículo. Estes órgãos foram obtidos de animais utilizados em outro projeto sob o certificado n° 615 do CEEA-SCB-UFPR.

Após 72 horas, o meio de cultura das placas contendo células transfectadas com cada plasmídeo foi aspirado, as placas foram lavadas com PBS 1X, e em

seguida, as células foram soltas das placas apenas com PBS-EDTA 2 mM, e não mais com tripsina, para a obtenção do extrato celular das células transfectadas, o qual deve conter a proteína quimérica de interesse. A tripsina cliva proteínas de superfície celular e não foi utilizada para que fosse possível encontrar a ADAM23, que é uma proteína de membrana celular, no extrato celular total. O EDTA, por sua vez, não cliva proteínas de superfície e é quelante de metais divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} , que são necessários para a função de adesão das integrinas, sem eles a adesão não ocorre e a célula se desprende do substrato, ou seja, da placa de cultura.

As células foram coletadas em um tubo tipo Falcon e submetidas à centrifugação a 670 x g por 2 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O sedimento (*pellet*) de células foi mantido em gelo, sendo que cada sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de PBS 1X. Os sedimentos ressuspensionados foram passados para tubos de 1,5 ml do tipo Eppendorf e submetidos à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto e meio, em seguida, o sobrenadante foi descartado. A cada sedimento, em cada tubo, foi adicionada uma mistura de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% (p/v) de deoxicolato de sódio; 1% (v/v) Nonidet-40 (NP-40); 0,5% (v/v) de Triton X-100; pH 7,4) com inibidores de protease (1 mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil); 1 mM Fenantrolina; 1 mM NEM (N-etil-maleimida)) e 5 mM EDTA, contendo um volume 4 vezes maior do que o volume do sedimento (*pellet*). Em seguida, os sedimentos de células foram homogeneizados com a mistura de tampão de lise com inibidores de protease e EDTA e lisados mecanicamente através de passagens em seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40 minutos em banho de gelo.

Em seguida, as amostras lisadas foram submetidas à centrifugação a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C, na microcentrífuga *Sorvall™ Biofuge fresco* (Thermo Scientific). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml novo e o sedimento (*pellet*) foi descartado. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção de extratos celulares de todas as linhagens utilizadas neste trabalho. A concentração desses extratos foi estimada por ensaio de Bradford.

3.20 Obtenção de extrato total e parcial de encéfalo de camundongo adulto

O encéfalo foi obtido de camundongo suíço com idade P3 utilizado em outro projeto sob o certificado n° 615 do CEEA-SCB-UFPR. Após a extração, o encéfalo foi lavado em PBS 1X gelado. O encéfalo foi macerado no homogeneizador de tecidos *Potter Elvehjem*, um homogeneizador de vidro. Para cada encéfalo foram adicionados 2 ml de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho de gelo por 5 minutos e transferidas de volta para o homogeneizador. O procedimento de homogeneização foi feito manualmente com o *Potter*, movimentando-se o tubo de vidro para cima e para baixo por 15 vezes. As amostras foram novamente incubadas no gelo por 5 minutos e novamente lisadas com o *Potter*, sendo esse ciclo repetido por 5 vezes. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 15.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante obtido dessa centrifugação foi coletado (sobrenadante 1). O sedimento (*pellet*) foi ressuscitado em tampão de lise e lisado por mais 20 minutos com sessões de homogeneização novamente no *Potter*. Em seguida, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante dessa segunda centrifugação foi coletado (sobrenadante 2) e o sedimento (*pellet*) foi descartado.

O extrato total é composto pela junção dos sobrenadantes 1 e 2 que foram coletados. Uma parte desse extrato foi utilizada para fazer o extrato parcial. Ao extrato total foi sendo adicionado aos poucos sulfato de amônio (30%) ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$), e essa mistura foi sendo homogeneizada após cada adição do sulfato de amônio. O volume total de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ adicionado foi de 1,5 ml. Em seguida, a amostra foi incubada em um orbital homogeneizador por 15 minutos a 4°C. A amostra foi então submetida à centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado para o caso de precisar ser utilizado para outras precipitações. O sedimento (*pellet*) foi coletado e era nele que supostamente estavam as proteínas precipitadas. O mesmo foi ressuscitado 5 vezes em tampão de lise com inibidores de protease ((1 mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil); 1 mM Fenantrolina; 1 mM

NEM (N-etil-maleimida)). Em seguida, a amostra foi dialisada contra PBS 1X contendo 0,5 mM PMSF. Foram realizadas três trocas de PBS 1X durante a diálise. A concentração desse extrato foi estimada por ensaio de Bradford.

3.21 Quantificação da concentração protéica por ensaio de Bradford

Todas as amostras de extratos celulares foram submetidas à quantificação da concentração protéica por ensaio de Bradford sempre em triplicata, no qual a curva foi feita com 5 pontos de 0 a 4 μl de BSA (0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Pierce), a solução de Bradford (Biorad) foi diluída 1:4 em água destilada e a absorbância medida em 595 nm. Os pontos da reta foram obtidos a partir da média aritmética das triplicatas e a equação da reta foi utilizada para o cálculo das concentrações em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Os extratos obtidos foram utilizados nos ensaios de *Western blotting*.

3.22 Enriquecimento de extratos celulares por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose

Os extratos celulares foram submetidos à centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos a 4°C na microcentrífuga *Sorvall*. Após a centrifugação, apenas o sobrenadante, sem *debris* celulares, foi coletado, transferido para um tubo de 1,5 ml do tipo *Eppendorf* e incubado com concanavalina A-Sepharose (GE Healthcare), para enriquecimento das amostras em glicoproteínas, como a ADAM23. Essa resina foi previamente lavada com PBS 1X por 3 vezes, sendo cada centrifugação feita a 8.000 rpm por 2 minutos em microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf), para a remoção do excesso de álcool no qual a resina estava armazenada em suspensão. Após a última lavagem, a resina foi ressuspensa em PBS 1X numa proporção de 1:1. A cada extrato celular foi adicionado sempre $\frac{1}{4}$ do volume dessa mistura de concanavalina A-Sepharose com PBS 1X. As amostras de extratos com resina foram incubadas em um orbital homogeneizador a 4°C por 1 hora. Em seguida, cada

amostra foi submetida à centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos e o primeiro sobrenadante “*void*” foi coletado. Logo após, a resina de cada amostra foi lavada 3 vezes com igual volume de PBS 1X, com centrifugações a 8.000 rpm por 2 minutos. Após a última centrifugação os sobrenadantes foram descartados. O sedimento (*pellet*) de cada amostra contendo a resina foi equilibrada sendo ressuspensionado em igual volume de tampão de amostra 2,5X redutor (contendo β -mercaptoetanol, que pode separar dímeros de proteínas). As amostras contendo a resina foram denaturadas a 95°C por 10 minutos. Em seguida, as mesmas foram submetidas à centrifugação a 8.000 rpm por “2 minutos. O sobrenadante foi coletado, e o sedimento (*pellet*), descartado. Ao ferver as amostras, as glicoproteínas se desligam da resina e ficam soltas no sobrenadante, por isso, é necessário centrifugar a amostra para separar a resina do sobrenadante e coletar este último. Em seguida, os sobrenadantes dessas amostras (25 μ l) foram analisados por uma eletroforese em SDS-PAGE e *Western blotting*, juntamente com os extratos comuns não-enriquecidos (80 μ g) em glicoproteínas por concanavalina A-Sepharose (GE Healthcare).

3.23 Precipitação de proteínas presentes em sobrenadante de cultura celular pelo método do metanol-clorofórmio

Os sobrenadantes de cultura de células (HEK-293T, CHO-K1 e N2A) transfectadas com os vetores dos construtos contendo proteínas quimeras secretadas foram concentrados a partir de um volume de 6 ml em um concentrador a vácuo *SavantTM SPD1010 SpeedVac* para um volume final de 100 μ l. Em seguida, adicionou-se a esse volume, 400 μ l de metanol 100% (Merck). Cada amostra foi então homogeneizada por vortex e submetida à centrifugação a 11.000 rpm por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 100 μ l de clorofórmio 100% (Merck). As amostras foram novamente submetidas à homogeneização por vortex e, a seguir, à centrifugação a 11.000 rpm por 15 segundos. Após a centrifugação, cada amostra recebeu 300 μ l de H₂O Milli-Q (Millipore) estéril. Em seguida, as amostras foram submetidas à homogeneização por vortex e à centrifugação a 11.000 rpm por 1

minuto. Após esta etapa, pôde-se observar nitidamente 3 fases, uma fase superior, interface e fase inferior.

A fase superior foi removida e descartada. A interface e fase inferior correspondem à fase do clorofórmio, onde estão as proteínas e, por isso, foram mantidas. Em seguida, foram adicionados 300 µl de metanol 100% (Merck). Cada amostra foi então homogeneizada por vortex e submetida à centrifugação a 11.000 rpm por 2 minutos. Após esta etapa, pôde-se observar 2 fases, a fase superior e um precipitado “*pellet*” de proteína. A fase superior foi descartada e o precipitado incubado em fluxo laminar por 15 minutos, para a evaporação de qualquer resíduo de metanol. Em seguida, cada precipitado de proteínas foi ressuscitado em 30 µl de tampão de amostra com SDS 2X redutor ou não-redutor de acordo com cada caso e avaliados por ensaios de SDS-PAGE e *Western blotting*.

3.24 Precipitação por sal de proteínas presentes em sobrenadante de cultura celular com sulfato de amônio

Altas concentrações de sais precipitam proteínas de suas soluções. Esta técnica é denominada “*salting out*” ou precipitação por sais. Os sais desidratam as proteínas, atraindo as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas protéicas. A solubilidade de uma proteína depende da quantidade de água disponível em volta de seus grupos iônicos, ou seja, na ionosfera. Quanto menor for o número de moléculas de água, menor será a solubilidade.

A precipitação das proteínas quimeras secretadas presentes no sobrenadante de cultura das células transfectadas com os vetores dos construtos foi realizada mediante a adição de sulfato de amônio com base na Tabela 4, considerando que a porcentagem inicial de precipitados seria zero e que a porcentagem desejada a se obter seria de 80%. Dessa forma, para cada 1000 ml de sobrenadante de meio de cultura seriam adicionados 561 g de sulfato de amônio (HARLOW & LANE, 1988). Essa proporção foi utilizada na precipitação das proteínas de sobrenadante de cultura de acordo com o volume de cada sobrenadante de cada condição.

TABELA 4 - TABELA DE SATURAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO

Concentração inicial	Concentração final													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	114	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	–	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%		–	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%			–	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%				–	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%					–	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%						–	31	63	97	132	168	205	245	285
45%							–	32	65	99	134	171	210	250
50%								–	33	66	101	137	176	214
55%									–	33	67	103	141	179
60%										–	34	69	105	143

NOTA: Considerando que a porcentagem inicial de proteína precipitada seria 0% e que a porcentagem a ser obtida seria de 80%, seriam adicionados 561 g de sulfato de amônio para cada 1000 ml de sobrenadante de meio de cultura.

FONTE: Adaptado de HARLOW & LANE, 1988

3.25 Cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose

Este ensaio foi realizado com o objetivo de confirmar a presença da região Fc da IgG humana nas proteínas ADAM23 Fc quiméricas e purificá-las a partir do sobrenadante do meio de cultura de células transfectadas com essas quimeras. Um sítio presente na região Fc (domínios CH2 e CH3) de IgG1 humana tem afinidade pela proteína A-Sepharose. A proteína A-Sepharose foi escolhida para este ensaio porque, segundo o manual do fabricante (Sigma), sua afinidade ao isotipo 1 da IgG humana é alta em relação a outros isotipos, como IgG3 (LINDMARK *et al.*, 1983). Este método foi realizado do mesmo modo como feito para a cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose, descrito no item 3.22, com a diferença de que foram incubados com a resina sobrenadantes e não extratos.

3.26 Ensaios de Western Blotting

Nos ensaios de *Western blotting* foram feitos géis SDS-PAGE com acrilamida 10% ou 15%. Em geral, foram sempre utilizados 70, 80 ou 200 µg de extratos de células ou de tecidos enriquecidos ou não por qualquer uma das cromatografias de afinidade, e, 100 ng ou 1 µg da proteína ADAM23 recombinante Desintegrina-Cisteína (Dis-Cys). Às amostras foi adicionado o tampão de amostra com azul de bromofenol 2X redutor (contendo β-mercaptoetanol) ou não. Em seguida, as amostras foram desnaturadas entre 95 e 100°C por 5 a 7 minutos. A eletroforese foi realizada entre 15-25 mA. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada a 10 volts por 1 hora em aparelho Semi-Dry (Biorad). A transferência para alguns casos foi feita do gel para membrana de PVDF (Biorad) em cuba de eletroforese (tanque), contendo gelo e tampão de transferência (48 mM de trisbase; 39 mM de glicina; 0,037% (p/v) de SDS; 20% de metanol (v/v); pH 8,3) gelado em banho de gelo, sob agitação magnética, a 100 volts por 1 hora com miliamperagem máxima de 220 mA. A presença de proteínas na membrana, após a transferência, pôde ser verificada pela coloração vermelha com Ponceau 0,2% (p/v) apenas para os casos em que foi utilizada a membrana de nitrocelulose, pois a membrana de PVDF não pode ser submetida a essa coloração. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com TBST 0,05% (v/v) até a remoção do corante e todos os tipos de membrana foram bloqueados com solução de leite Mólico em pó com TBST 0,05% (v/v) por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi adicionado o anticorpo primário.

Para a identificação da ADAM23 e avaliação do padrão de reatividade do anticorpo monoclonal DL11C8, foram utilizados o sobrenadante não-purificado de hibridoma DL11C8 ou o próprio anticorpo anti-ADAM23 purificado a partir do hibridoma. O sobrenadante de hibridoma DL11C8 foi utilizado sem concentração definida e do anti-ADAM23 purificado foi utilizada a massa de 10 µg. Para identificar as proteínas quiméricas fusionadas à região Fc de IgG1 humana (ADAM23C1, ADAM23C2 e ADAM23C3), foi utilizado o anticorpo conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) anti-IgG humana A6029 (Sigma) numa diluição de 1:4.000.

O anti-IgG, apesar de ser um anticorpo secundário, foi utilizado de forma direta, como se fosse um primário, ligando direto nas regiões Fc, e, ao mesmo tempo, como se fosse um secundário, contendo a peroxidase necessária para a reação com o substrato quimioluminescente. As diluições de todos os anticorpos foram feitas em solução de leite Molico com TBST 0,05% (v/v), exceto do sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 (anti-ADAM23) que não foi diluído. A incubação com o anticorpo primário ocorreu por até 16 horas sob agitação em gangorra a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas sob agitação em gangorra, com TBST 0,05% (v/v), 5 vezes de 3 minutos.

Os anticorpos secundários utilizados foram os conjugados com HRP anti-mouse (1:4.000) contra o primário anti-ADAM23 purificado ou do sobrenadante de hibridoma (DL11C8). A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 1 hora sob agitação em gangorra em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas sob agitação em gangorra, com TBST 0,05% (v/v), 5 vezes de 3 minutos. Após a incubação com o anticorpo secundário, cada membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o *Kit West Pico* (Thermo Scientific) ou o kit mais sensível *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). Filmes de auto-radiograma *Carestream Medical X-ray Green/MXG Film* (Carestream Health) foram expostos a cada membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação da ADAM23 recombinante (ADAM23-Dis-Cys) em sistema bacteriano

Como anteriormente estabelecido pelo grupo (COSTA *et al.*, 2009) a proteína ADAM23 recombinante, domínios Desintegrina-Cisteína (Dis-Cys), pode ser adequadamente empregada como controle positivo de reatividade quando anticorpos anti-ADAM23 são utilizados.

Neste estudo foram obtidos vários lotes de proteína recombinante purificada e um resultado representativo de tais procedimentos de purificação é apresentado na Figura 13. É possível observar uma banda predominante de ca. 30 kDa nas diferentes frações coletadas (Figura 13A-B) demonstrando que o protocolo utilizado para a purificação é eficiente na obtenção de proteína razoavelmente pura. Após combinação das frações e diálise contra PBS para a remoção do agente caotrópico desnaturante a proteína permaneceu em solução e com padrão eletroforético de migração compatível com a massa molecular esperada (Figura 13C). A análise das frações contendo as proteínas não ligadas na coluna Ni-NTA-Agarose (Figura 13C, linha VOID1), as frações contendo diferentes condições de lavagem (Figura 13C, linhas TDLC, T1-3 e TNL) e uma alíquota da matriz cromatográfica (fase estacionária, dado não mostrado) indicam que as proteínas que não possuíam a etiqueta de histidina não interagiram fortemente com a fase estacionária e foram adequadamente removidas pelas lavagens.

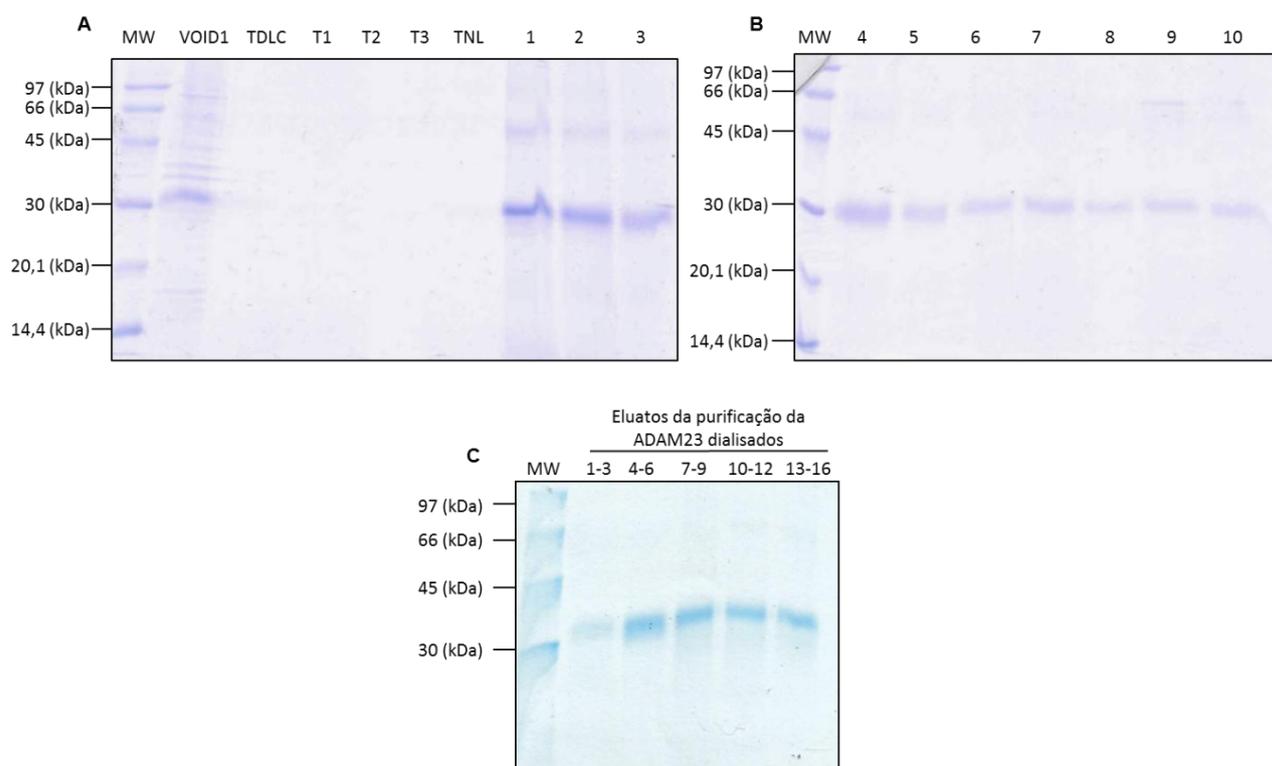


FIGURA 13 - PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADAM23 DIS-CYS

NOTA: (A e B) Géis representativos da separação eletroforética (gel 12,5% de poliacrilamida) das diferentes frações (1 a 10) eluídas da coluna Ni-NTA-Agarose indicam a presença predominante de banda de ca. 30 kDa, a qual é coerente com a massa molecular esperada da proteína recombinante monomérica ADAM23 Dis-Cys. As frações contendo as proteínas que não ligaram na matriz cromatográfica (VOID1) e alíquotas das diferentes condições de lavagem (TDLC, T1-3 e TNL) indicam que houve pouca perda de proteína recombinante. (C) Análise (SDS-PAGE 10%) das frações combinadas após a diálise em PBS para remoção do agente desnaturante. Os intervalos numéricos indicam os números das frações que foram combinadas antes da diálise. A diferença de massa molecular observada nos eluatos de ADAM23 (Dis-Cys) dialisados em C é um artefato do perfil de migração eletroforético. Portanto, deve-se considerar que todas as bandas têm a mesma massa molecular esperada de cerca de 30 kDa.

FONTE: A Autora (2015).

4.2 Avaliação do padrão de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 (DL11C8) sobre diferentes amostras

A ausência de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis para ADAM23 levou o grupo a desenvolvê-los previamente a partir de hibridomas (DL11C8) secretores de anti-ADAM23. Essas ferramentas foram essenciais para as reações com ADAM23 nos ensaios de *Western Blotting*.

Foi realizado o teste de reatividade dos anticorpos monoclonais IgG anti-ADAM23, derivados do sobrenadante de hibridoma DL11C8, que haviam sido purificados por proteína A/G sepharose. Esses anticorpos foram utilizados em ensaio de *Western Blotting* com as seguintes amostras: ADAM23 recombinante (Dis-Cys) (o controle positivo com cerca de 30 kDa), extrato de encéfalo de camundongo e glicoproteínas enriquecidas do extrato de encéfalo com concanavalina A-Sepharose. O enriquecimento de glicoproteínas do extrato de encéfalo com concanavalina A-Sepharose teve por objetivo concentrar a ADAM23 nessa amostra, uma vez que as ADAMs têm alta especificidade de ligação a essa resina (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SCHAFER *et al.*, 2004). As amostras foram reagidas com sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 que secreta anticorpos anti-ADAM23 ou apenas com meio RPMI como controle negativo (Figura 14). Foi possível observar bandas referentes à ADAM23 de extrato de encéfalo (70 kDa), forma processada da ADAM23 sem o pró-domínio, em ambas as amostras de extrato de encéfalo, como observado por Goldsmith e colaboradores (2004). Apenas no extrato de encéfalo enriquecido em glicoproteínas com concanavalina A-Sepharose foi possível observar, além da banda de 70 kDa, outra banda de cerca de 30 kDa, que pode ser de uma forma processada da ADAM23, com tamanho semelhante à ADAM23 recombinante (Figura 14, linha 3). É possível observar que a forma de 70 kDa também está presente no extrato de encéfalo não enriquecido, contudo com intensidade inferior àquela observada na amostra enriquecida por concanavalina A-Sepharose.

Nenhuma banda foi reconhecida quando RPMI foi empregado no lugar do anticorpo primário, sugerindo especificidade para a reação observada com o

anticorpo monoclonal. A ADAM23 recombinante (Dis-Cys) (Figura 14, linha 1), aparece com duas bandas, a banda característica de 28 kDa, e outra de aproximadamente 60 kDa (provavelmente um dímero não dependente de pontes dissulfeto). O intenso arraste observado para ADAM23 (Dys-Cys) deriva de uma reação de forte intensidade devido a alta quantidade de massa de proteína utilizada (1 µg). Por isso, nos demais ensaios, utilizou-se uma massa menor de ADAM23 recombinante. Este ensaio foi realizado para testar a positividade de reação do anticorpo anti-ADAM23 obtido a partir de sobrenadante de hibridoma DL11C8 com a proteína ADAM23 recombinante e com a dos extratos de encéfalo.

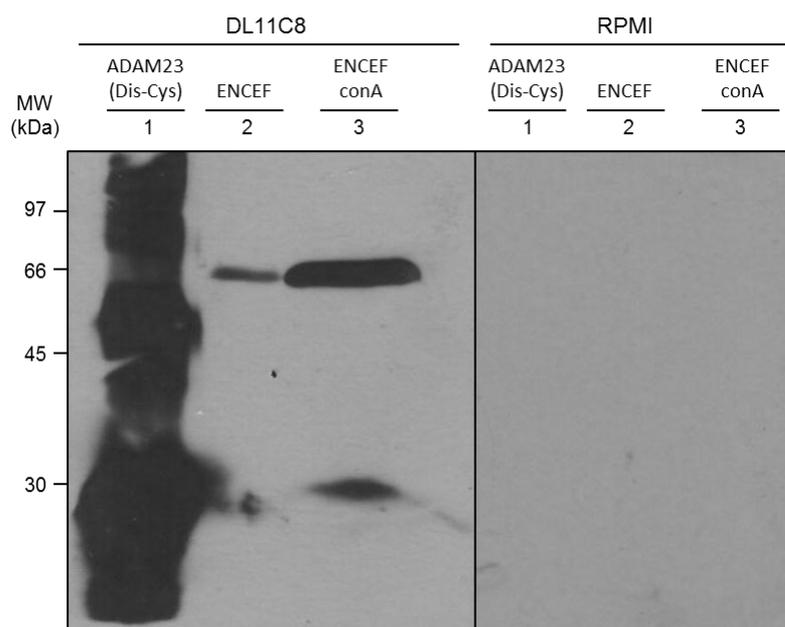


FIGURA 14 - TESTE DO PADRÃO DE REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DE HIBRIDOMA DL11C8 EM EXTRATOS DE ENCÉFALO POR WESTERN BLOTTING

NOTA: DL11C8: Sobrenadante de hibridoma DL11C8, contendo anticorpos anti-ADAM23; RPMI: Meio de cultura (controle negativo); 1: Proteína ADAM23 recombinante (controle positivo) (1 µg); 2: Extrato de encéfalo (80 µg); 3: Extrato de encéfalo enriquecido em glicoproteínas por concanavalina A-Sepharose.

FONTE: A Autora (2015).

Com o objetivo de avaliar a expressão de ADAM23 em outros órgãos, o sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 foi reagido com extratos de vários tecidos (encéfalo, pulmão, testículo e rim) de camundongo enriquecidos em glicoproteínas por concanavalina A-Sepharose, como acima descrito.

Como controle positivo da reação, foi utilizado extrato de células HEK-293T transfectadas com o vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA, que expressam a ADAM23 não processada (100 kDa) contendo uma etiqueta de hemaglutinina (HA) e o pró-domínio (Figura 15, linha 1). Neste resultado obtido, as células HEK-293T transfectadas com ADAM23-HA, apresentaram apenas a forma da ADAM23 não-processada. Já no encéfalo, foi observada uma banda (70 kDa) que corresponde à forma madura e processada (sem o pró-domínio) da molécula. Este resultado sugere que a forma não processada de ADAM23 (100 kDa) no sistema nervoso é muito pequena. Não foi possível detectar nenhuma forma (processada ou não) de ADAM23 nos extratos de testículo, rim e pulmão. Estes resultados vão ao encontro dos dados de Sagane e colaboradores (1998) no que se refere à não observação de mRNAs de ADAM23 em extratos de testículo e pulmão. Esse mesmo grupo observou mRNAs da ADAM23 em coração, cérebro e musculatura esquelética.

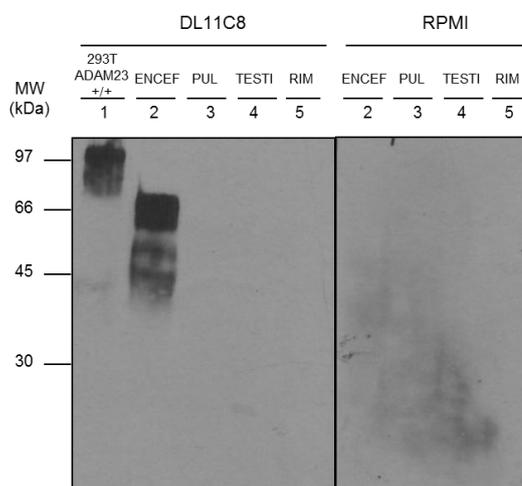


FIGURA 15 - TESTE DE REATIVIDADE DO SOBRENADANTE DE HIBRIDOMA DL11C8 EM EXTRATOS DE TECIDOS DE CAMUNDONGO ENRIQUECIDOS COM A CONCAVALINA A-SEPHAROSE POR WESTERN BLOTTING Extratos de: 1: HEK-293T transfectadas com ADAM23-HA; 2: encéfalo; 3: pulmão; 4: testículo; 5: rim. Foram utilizados 70 µg de cada extrato.
FONTE: A Autora (2015).

4.3 Avaliação das formas de ADAM23 em diferentes linhagens celulares

A presença de mRNAs de ADAM23 foi inicialmente caracterizada pelo nosso grupo nas linhagens de mama MDA-MB-436 (COSTA *et al.*, 2003) e MDA-MB-435 (VERBISCK *et al.*, 2009), além disso, o uso de anticorpos específicos anti-ADAM23 permitiu a avaliação direta da expressão desta proteína através de *western blotting* segundo Costa e colaboradores (2003). Já a linhagem MCF-7 foi sempre utilizada como controle negativo, uma vez que nestas células o promotor do gene da ADAM23 se encontra altamente metilado e por isso a proteína não é expressa (COSTA *et al.*, 2003).

Assim, os extratos de diferentes linhagens celulares foram submetidas à reação com o anticorpo anti-ADAM23 (Figura 16). Antes da imunoreação, as amostras foram enriquecidas em glicoproteínas através de afinidade por concanavalina A-Sepharose, uma vez que este procedimento mostrou-se adequado na identificação de outras ADAMs com baixa abundância relativa (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SCHAFER *et al.*, 2004). Das quatro linhagens, analisadas apenas MDA-MB 435 apresentou positividade para a forma de 100 kDa de ADAM23 (Figura 16, linha 7). As linhagens HEK-293T (linha 4), MCF-7 (linha 8) e MDA-MB 435-1C (linha 9) não apresentaram positividade para ADAM23 nestas condições. A banda de 100 kDa reconhecida pelo anti-ADAM23 na linhagem MDA-MB 435 possui perfil eletroforético semelhante ao da proteína ADAM23*full-length*-HA super expressa na linhagem HEK-293T (linha 5, extrato total e linha 6, amostra enriquecida por con-A) sugerindo que aquela linhagem expressa apenas a forma não processada (imatura) de ADAM23. Extrato total de encéfalo de camundongo foi utilizado como controle positivo da reação (linha 2, extrato total e linha 3, amostra enriquecida por con-A) e apresentou o padrão de expressão predominante da forma processada (70 kDa). Esse dado confirma os resultados obtidos por Goldsmith e colaboradores (2004), que mostra a presença predominante da forma de 70 kDa da ADAM23 em relação à forma de 100 kDa em células granulares cerebelares. A presença de ambas as formas no extrato de encéfalo pode ser explicada pelo processamento por furinas e pela glicosilação das formas da

ADAM23 de 61 e 92 kDa, respectivamente, como foi descrito por Goldsmith e colaboradores (2004). Nossos resultados sugerem que a presença da forma não-processada de ADAM23 (100 kDa) no sistema nervoso é muito pequena, que pode ser devido a um rápido processamento proteolítico da forma não-madura para madura durante a síntese desta molécula.

É importante ressaltar a impossibilidade de análise quantitativa entre as amostras, uma vez que, as massas de partida utilizadas foram diferentes. Interessantemente, a forma de 100 kDa só foi observada quando a amostra foi enriquecida em glicoproteínas por afinidade à concanavalina-A (comparar linha 3 com linha 2).

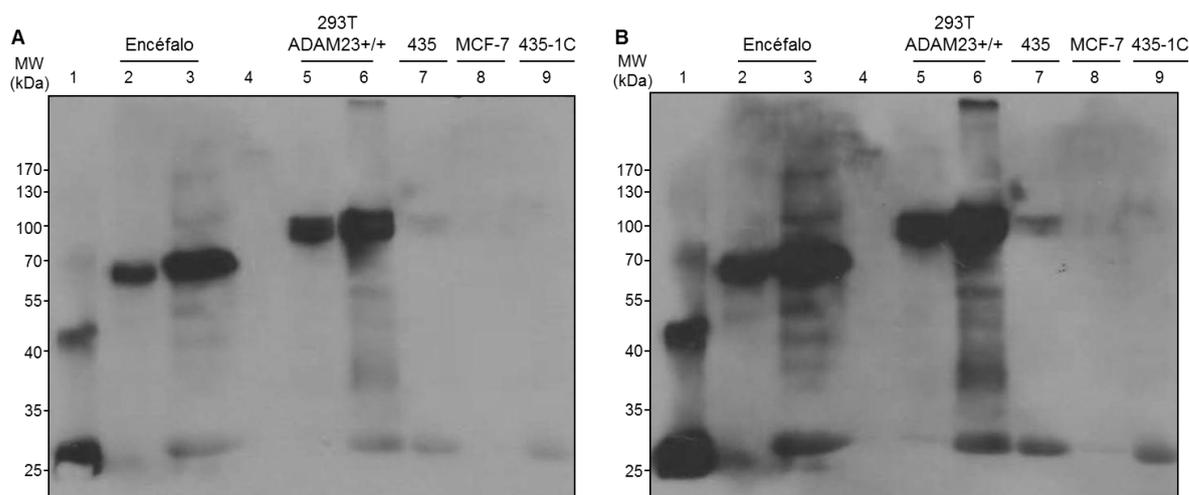


FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE ADAM23 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

NOTA: Amostras de extrato de encéfalo de camundongo (2-3), das linhagens HEK-293T (4), HEK-293T-ADAM23*full-length*-HA (5-6), MDA-MB-435 (7), MCF-7 (8) e MDA-MB 435-1C (9) foram submetidas (3, 6-9) ou não (2, 4-5) ao enriquecimento com concanavalina-A e reagidas com anti-ADAM23. Nas linhas 2, 4 e 5 foram resolvidos 80 µg de proteína, enquanto que nas linhas 3, 6 a 9 foram empregadas as massas 2, 7, 23, 16 e 8 mg de extrato total como material de partida para o enriquecimento com concanavalina-A. Os extratos totais de encéfalo (2 e 3) e da linhagem HEK-293T-ADAM23*full-length*-HA (5 e 6) foram utilizados como controles positivos da reação com anti-ADAM23 e apresentam as formas de 70 e 100 kDa de ADAM23, respectivamente. Pode ser observado que das linhagens de tumor de mama (7-9) apenas a MDA-MB-435 expressa ADAM23 (forma imatura de 100 kDa). As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 10% em condições redutoras, e a proteína ADAM23 (Dis-Cys) recombinante (0,1 µg, linha 1) foi utilizada como controle positivo complementar ao das linhas 2 e 5. Autorradiogramas foram expostos a membrana de nitrocelulose por (A) 30 segundos e (B) 1 minuto.

FONTE: A Autora (2015).

Para avaliar o perfil de expressão da ADAM23 em linhagem de origem neuronal e compará-lo com o perfil expresso no encéfalo murino, extrato da

linhagem N2A (neuroblastoma de camundongo) enriquecido ou não por concanavalina-A foi reagido com anti-ADAM23 (Figura 17).

Como anteriormente observado (Figura 16), a forma de 70 kDa é aquela que predomina no encéfalo de camundongos (Figura 17, linhas 2 e 3). O perfil de expressão de ADAM23 na linhagem N2A é semelhante àquele observado no encéfalo, com a diferença que ambas as formas (70 e 100 kDa) parecem ser co-expressas (Figura 17, linha 4). O enriquecimento por concanavalina-A sugere que a forma de 100 kDa é a mais abundantemente presente nesta linhagem (Figura 17, linha 5), apesar da forma de 70 kDa também ter sido enriquecida por este método. O extrato de células HEK-293T super expressando ADAM23 $full-length$ -HA foi utilizado como controle positivo e predominantemente apresenta a forma de 100 kDa (Figura 17, linhas 7 e 8). Dessa forma, foi observado o perfil de 70 kDa para a ADAM23 expressa no encéfalo e em células de linhagem neuronal e o perfil de 100 kDa para a ADAM23 expressa em tumor.

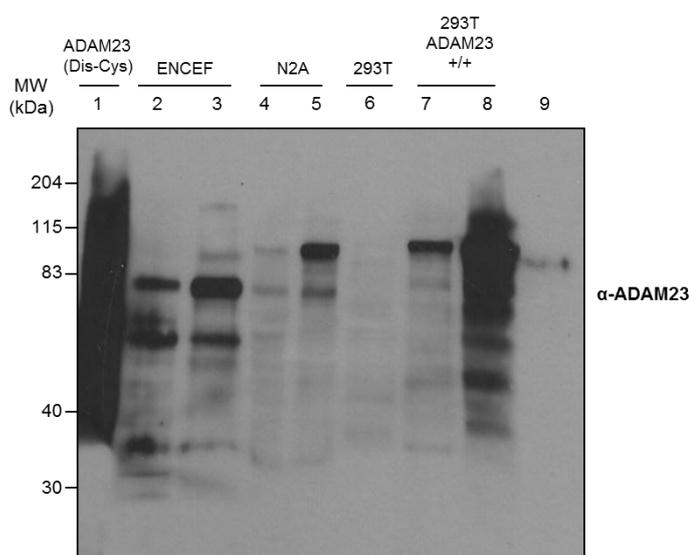


FIGURA 17 - A LINHAGEM NEURONAL N2A CO-EXPRESSA AS FORMAS DE 70 KDA E 100 KDA DE ADAM23.

NOTA: Amostras de extrato de encéfalo de camundongo (2-3), e das linhagens N2A (4-5), HEK-293T (6) e HEK-293T-ADAM23*full-length*-HA (7-8) foram submetidas (3, 5 e 8) ou não (2, 4, 6-7) ao enriquecimento com concanavalina-A e reagidas com anti-ADAM23. Nas linhas 2, 4, 6 e 7 foram resolvidos 80 μ g de proteína, enquanto que nas linhas 3, 6 e 8 foram empregadas 5, 10 e 6 mg de extrato total como material de partida para o enriquecimento com concanavalina-A. Pode ser observado que a linhagem N2A expressa as formas de 70 e 100 kDa de ADAM23 (4) e que ambas foram enriquecidas na amostra após ligação à concanavalina-A (5). As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 10% em condições redutoras e a proteína ADAM23 (Dis-Cys) recombinante (0,1 μ g, linha 1) foi utilizada como controle positivo da reação.

FONTE: A Autora (2015).

A fim de se identificar qual das formas de ADAM23 estava presente na superfície celular, a linhagem N2A teve suas proteínas de superfície marcadas com biotina (biotinilação). Quando o extrato destas células foi enriquecido por matriz cromatográfica avidina-Agarose (*i.e.* enriquecimento das proteínas que estavam do lado externo da membrana plasmática e receberam etiqueta covalente de biotina, Figura 18, linha 4), e na amostra reagida com anti-ADAM23 foi observada apenas a forma processada de 70 kDa, a qual tem o mesmo perfil eletroforético de migração da banda observada no extrato de encéfalo (Figura 18, linha 2, controle positivo). A forma da ADAM23 de 70 kDa, presente na membrana celular, é a forma sem o pró-domínio e com o menor grau de glicosilação, uma vez que essa forma apresenta apenas 4 sítios putativos glicosilados, enquanto que a forma inteira de 100 kDa (com pró-domínio) apresenta 8 sítios de glicosilação (dados do Uniprot para a estrutura da ADAM23 humana, Figura A1 do Apêndice). Dessa forma, com a clivagem do pró-

domínio por furinas ocorre uma perda de 4 sítios putativos glicosilados e com isso, ocorre uma redução da massa molecular da proteína observada no perfil eletroforético.

A liberação de proteínas solúveis para o meio extracelular a partir do processamento proteolítico de seus precursores residentes na membrana plasmática é um fenômeno bioquímico largamente utilizado pelas células nos mais diversos contextos biológicos. Esta possibilidade foi inicialmente investigada no sobrenadante de cultura de células HEK-293T transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA (Figura 18, linha 5). Nestas condições experimentais não foi observada nenhuma das formas da ADAM23, ao contrário do extrato celular (Figura 18, linha 6) que apresenta a forma de 100 kDa, como anteriormente observado (Figuras 16 e 17). Nesta linhagem a ADAM23 não sofre *shedding*, não sendo secretada na forma solúvel, e se encontra na membrana celular na forma não-processada. Além disso, essa proteína não atua como shedase como ocorre com as demais ADAMs, uma vez que o seu domínio metaloprotease é cataliticamente inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

Em extrato de encéfalo enriquecido em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à con-A, foi possível observar apenas a forma de 100 kDa da ADAM23 (Figura 18, linha 3), apesar de que era esperado observar ambas as formas como foi visto no resultado anterior (Figura 17, linha 5). Entretanto, isso não significa que o processamento não tenha ocorrido nem que a forma de 70 kDa não esteja presente. O que aconteceu foi que neste ensaio foi utilizada uma massa de extrato quase duas vezes menor do que a massa de extrato de células de neuroblastoma N2A utilizada no ensaio anterior (Figura 17, linha 5). Naquele ensaio foram observadas ambas as formas da ADAM23 na amostra enriquecida com concanavalina-A, sendo a de 100 kDa em maior intensidade, sugerindo uma maior afinidade dessa resina pelas formas não-processadas e com maior grau de glicosilação da ADAM23 (Figura 17, linha 5 e Figura 18, linha 3). Como explicado anteriormente, a remoção do pró-domínio por furinas leva a uma perda de 4 sítios putativos glicosilados e com isso, ocorre uma redução da massa molecular da proteína.

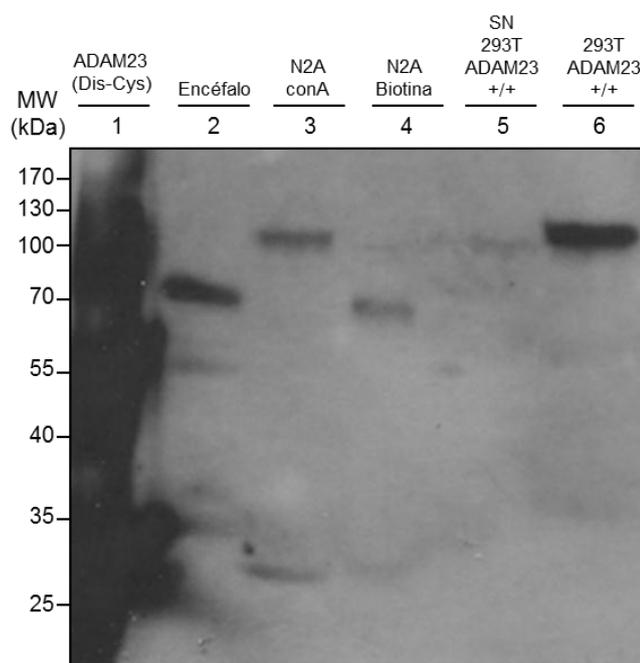


FIGURA 18 - A FORMA PROCESSADA (70 KDA) DE ADAM23 ESTÁ PRESENTE NA FACE EXTERNA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DA LINHAGEM N2A

NOTA: Amostras de extrato de encéfalo de camundongo (2), das linhagens N2A (3-4) e HEK-293T-ADAM23*full-length*-HA (6) e do sobrenadante de cultura desta última linhagem (5) foram submetidas (3) ou não (2, 4-6) ao enriquecimento com concanavalina-A e reagidas com anti-ADAM23. Nas linhas 2 e 6 foram resolvidos 80 µg de proteína, enquanto que na linha 3 foram empregados 6 mg de extrato total de N2A como material de partida para o enriquecimento com concanavalina-A. Após a marcação das proteínas de superfície celular da linhagem N2A com biotina, o extrato total foi enriquecido por afinidade à avidina-Agarose (4) e uma banda correspondente à forma processada de 70 kDa foi evidenciada com anti-ADAM23, sugerindo que esta forma de ADAM23 esteja presente na face externa da membrana plasmática. Já o meio de cultura condicionado e concentrado (28 ml) da linhagem HEK-293T-ADAM23*full-length*-HA (linha 5) não apresentou reatividade para ADAM23 nestas condições experimentais. As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 10% em condições redutoras e a proteína ADAM23 (Dis-Cys) recombinante (0,1 µg, linha 1) foi utilizada como controle positivo adicional da reação.

FONTE: A Autora (2015).

4.4 Clonagem dos três construtos do ectodomínio da ADAM23

Dentre as diferentes abordagens experimentais que podem ser utilizadas para o estudo da funcionalidade de uma proteína, a superexpressão empregando vetores plasmidiais em linhagens de mamíferos tem sido largamente utilizada desde o início do advento da tecnologia do DNA recombinante (JACKSON *et al.*, 1972; MERTZ & DAVIS, 1972; COHEN *et al.*, 1973).

Neste trabalho foi utilizada esta abordagem, porém empregando-se dois tipos de vetores com características e propósitos distintos. A clonagem dos insertos de interesse no vetor pINFUSE (itens 4.4.1 e 4.4.2) e sua introdução em células adequadas produziram proteínas secretadas para o meio de cultura na forma de quimeras com os domínios CH2 e CH3 da IgG humana. Estas proteínas deverão ser utilizadas como ferramenta na forma de moléculas biologicamente ativas.

Por outro lado, o uso do vetor re-engenheirado pcDNA3.1-hIgG1 (item 4.4.3) permitirá o estudo do direcionamento da ADAM23 em diferentes linhagens celulares sob o controle do peptídeo sinal endógeno da ADAM23 quimérica fusionada na região C-terminal a uma imunoglobulina que substitui os domínios transmembrânico e citoplasmático da ADAM23 humana, como utilizado para outras ADAMS em outros estudos do papel dessas proteínas na adesão e migração celular (AMOUR *et al.*, 2000; NATH *et al.*, 2000; BRIDGES *et al.*, 2002; BAX *et al.*, 2004; BRIDGES *et al.*, 2005; OZKAYNAK *et al.*, 2010) (item 4.4.4).

4.4.1 Construção do vetor pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2 (ADAM23C1)

A construção 1, ADAM23C1, é a clonagem da sequência nucleotídica da ADAM23 que codifica os resíduos 60 a 792 no plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2. Essa construção não contém o peptídeo-sinal, a região transmembrânica, nem a cauda citoplasmática. Além disso, será inserida na porção amino-terminal da quimera um peptídeo-sinal da IL-2ss e na porção carboxi-terminal os domínios CH2 e CH3 da IgG1 humana. Com o objetivo de padronizar a reação de amplificação do

inserto ADAM23C1 a partir do vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA (utilizado como molde), foi feita uma PCR com 12 temperaturas diferentes de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (Figura 19, linhas 1 a 12). As temperaturas utilizadas foram: 1: 60 °C; 2: 60,2 °C; 3: 60,7 °C; 4: 61,6 °C; 5: 62,8 °C; 6: 64,1 °C; 7: 65,5 °C; 8: 66,9 °C; 9: 68,1 °C; 10: 68,7 °C; 11: 69,2 °C; 12: 70 °C. Essa reação foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase convencional. Observou-se que a temperatura de anelamento mais eficiente foi a de 60 °C (Figura 19, linha 1). Além disso, observou-se um produto único de amplificação do inserto ADAM23C1 compatível com um fragmento de 2.227 pb.

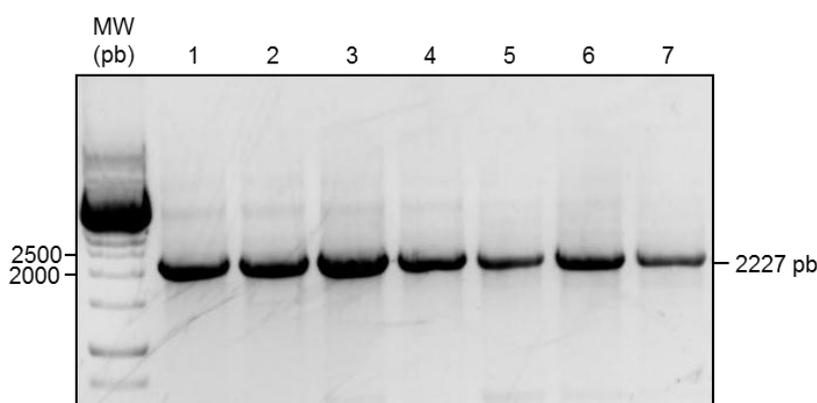


FIGURA 19 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAR O INSERTO ADAM23C1, REFERENTE À CONSTRUÇÃO 1

NOTA: A construção 1 é a clonagem da ADAM23 dos resíduos 60 a 792 aminoácidos no plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2. Essa construção não contém o peptídeo-sinal, a região transmembrânica, nem a cauda citoplasmática. MW: Gene Ruler 1 kb. Temperaturas de anelamento: 1: 60 °C; 2: 60,2 °C; 3: 60,7 °C; 4: 61,6 °C; 5: 62,8 °C; 6: 64,1 °C; 7: 65,5 °C. A temperatura de anelamento escolhida para a reação foi a de 60 °C. O inserto amplificado apresenta mobilidade eletroforética compatível com fragmento de 2.227 pb.

FONTE: A Autora (2015).

A partir da realização de outras reações de amplificação com a temperatura de anelamento dos iniciadores de 60 °C e a enzima Pfu DNA polimerase, a qual possui maior fidelidade e menor processividade do que a Taq DNA polimerase, foi possível obter maior massa do inserto ADAM23C1. O produto destas reações de amplificação foram separados em gel de agarose e extraídos do gel para serem utilizados nas etapas subsequentes de clonagem.

As digestões do inserto ADAM23C1 e do vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII* foram analisadas em gel de agarose. O controle

negativo da digestão foi o vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 não digerido com 4.194 pb (Figura 20, linha 2), que possui um tamanho maior do que o do mesmo vetor digerido com pouco menos do que 4.194 pb (Figura 20, linha 1, banda superior). Foi possível observar o inserto ADAM23C1 digerido com 2.227 pb (Figura 20, linha 1, banda inferior). O vetor digerido e o inserto digerido foram colocados no mesmo poço do gel (linha 1) e depois foram gel-extraídos. Em seguida, foi realizada a ligação do inserto ao vetor de expressão pINFUSE-hlgG1-Fc2, para formar o pINFUSE-ADAM23C1-hlgG1-Fc2.

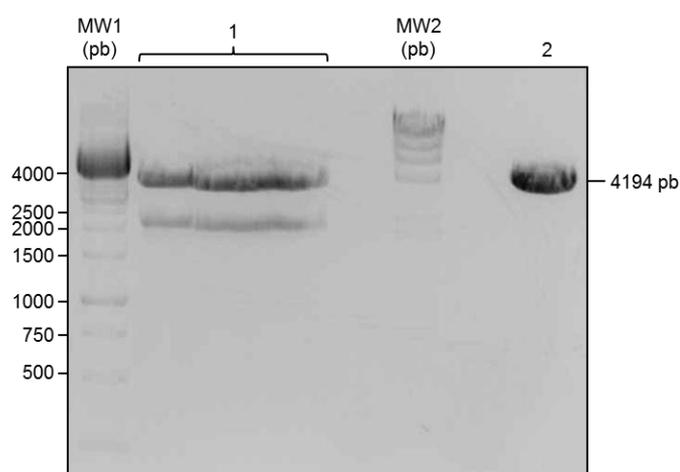


FIGURA 20 - REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PINFUSE-HIGG1-FC2 E DO INSERTO ADAM23C1

NOTA: MW1: Gene Ruler 1 kb. MW2: λ *HindIII*. 1: banda superior referente ao plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 digerido com pouco menos do que 4.194 pb.; banda inferior referente ao inserto ADAM23C1 digerido com 2.227 pb. 2: plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 não-digerido com 4.194 pb. A reação de digestão foi feita com as enzimas *EcoRI* e *BglII* a 37 °C por 4 horas, e, em seguida, as enzimas foram inativadas a 65° por 20 minutos.

FONTE: A Autora (2015).

Após a transformação de bactérias da estirpe DH5 α , foi realizada uma PCR com amostras de diferentes colônias com o objetivo de identificar quais delas haviam sido transformadas com o plasmídeo pINFUSE-ADAM23C1-hlgG1-Fc2. Foi possível observar que todas as 27 colônias analisadas apresentaram o inserto ADAM23C1 com 2.227 pb inserto, e foi escolhida a colônia n° 24 (Figura 21).

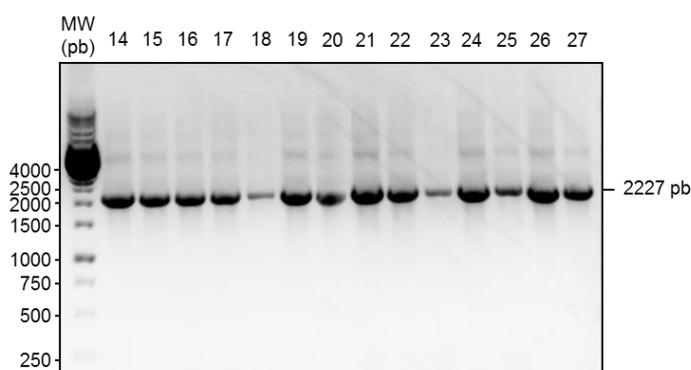


FIGURA 21 - REAÇÃO DE PCR PARA IDENTIFICAR QUAIS COLÔNIAS CONTINHAM O PLASMÍDEO PINFUSE-ADAM23C1-HIGG1-FC2

NOTA: MW: Gene Ruler 1 kb. Reação de PCR feita após a reação de ligação do inserto ADAM23C1 ao plasmídeo pINFUSE–hlgG1-Fc2. Todas as colônias apresentaram a banda referente a este inserto com 2.227 pb. A colônia escolhida foi a de nº 24.

FONTE: A Autora (2015).

Após a análise do teste de digestão e da PCR de colônia, os plasmídeos foram sequenciados a fim de se determinar sua sequência de nucleotídeos e avaliar possíveis mutações. O plasmídeo purificado a partir da colônia 24 foi sequenciado e a sequência confirmada, com o inserto ADAM23C1 devidamente clonado no vetor pINFUSE–hlgG1-Fc2. O resultado do sequenciamento está na Figura A2 (Apêndice), e pode-se verificar que, entre os sítios de restrição das enzimas, a sequência de ADAM23C1 clonada apresentou, apenas uma mutação pontual de T por C na posição 212 da sequência da colônia 24 (mudança do códon CTT para CCT). Tal mutação implicou na mudança do códon de lisina para prolina. Essa mutação já estava presente no cDNA da ADAM23 utilizado como molde para a clonagem dos três construtos do ectodomínio da ADAM23. Esse cDNA foi obtido a partir do vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA, cedido ao nosso grupo de pesquisa por Cal e colaboradores (2000).

O sequenciamento da região clonada que está compreendida entre o sítio das enzimas *EcoRI* e *BglIII* permitiu a adequada verificação do inserto de ADAM23C1, porém cobre apenas um pedaço da região Fc de IgG1 do vetor, não sendo possível a verificação completa da sequência até o códon de terminação (*stop codon*).

No caso dos três construtos, foi sequenciada a região mais importante da região Fc da IgG1 humana, ou seja, a sequência dos domínios CH2 e CH3, na qual é possível observar que não houve inserção de bases entre o final da sequência do

ectodomínio da ADAM23 e o começo da sequência da região Fc de IgG1 que pudessem mudar a sequência aberta de leitura. Além disso, como a região Fc de IgG1 é parte do *backbone* do vetor, é pouco provável que existam mutações nessa região.

4.4.2 Construção do vetor pINFUSE-ADAM23C2-hIgG1-Fc2 (ADAM23C2)

A construção 2, ADAM23C2, é a clonagem da ADAM23 dos resíduos 287 a 792, sem o peptídeo sinal, sem o pró-domínio, sem a região transmembrânica e sem a cauda citoplasmática no plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2. A obtenção deste vetor seguiu etapas experimentais muito semelhantes àquelas levadas à cabo para obtenção da construção ADAM23C1. Desta forma, apenas alguns resultados serão apresentados para este vetor. A amplificação do inserto ADAM23C2 a partir do vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA foi feita como acima descrito, sendo que a temperatura de anelamento mais eficiente foi a de 60 °C e produto obtido era compatível com um fragmento de 1.547 pb.

Reações de amplificação do inserto com a enzima Pfu DNA polimerase foram realizadas para obtenção de massa suficiente de fragmento, o qual foi utilizado em reações de ligação no vetor pINFUSE digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *EcoRI* (Figura 22).

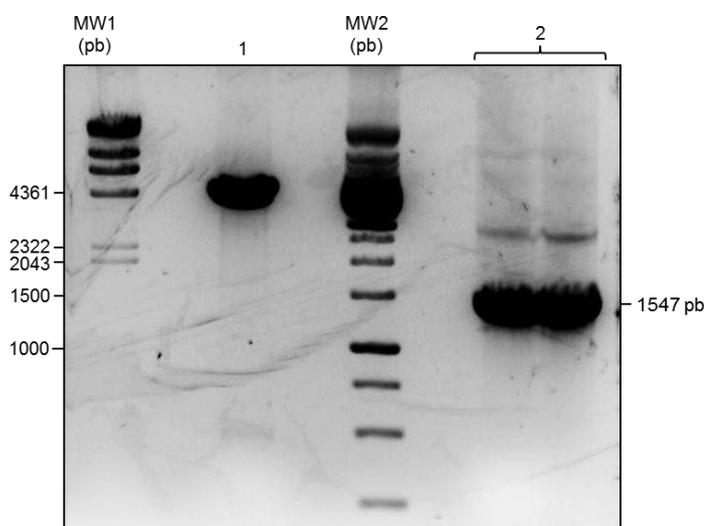


FIGURA 22 - ANÁLISE DA REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PINFUSE–hlgG1-FC2 E DO INSERTO ADAM23C2

NOTA: MW1: λ *HindIII*; MW2: Gene Ruler 1 kb ; 1: plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 não-digerido com 4.194 pb; 2: banda superior: plasmídeo pINFUSE–hlgG1-Fc2 digerido; banda inferior: inserto ADAM23C2 digerido com 1.547 pb.

FONTE: A Autora (2015).

Após a transformação da estirpe bacteriana DH5 α e a escolha de uma colônia positiva para o inserto de 1.547 pb através de PCR de colônia, o plasmídeo purificado a partir da colônia 1 foi sequenciado e confirmou-se que o inserto ADAM23C2 foi clonado no vetor pINFUSE–hlgG1-Fc2 de forma adequada (Figura A3 do Apêndice).

4.4.3 Construção do vetor pcDNA3.1-hlgG1-Fc2

Com o objetivo de construir um vetor que tivesse etiqueta de IgG humana mas sem expressar o peptídeo sinal para secreção da IL-2, optou-se pela geração deste novo vetor no laboratório. Como estratégia, o fragmento Fc da IgG1 humana seria amplificado do vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2 e ligado no vetor pcDNA3.1(-) após o sítio de policlonagem. Das diversas temperaturas de anelamento, aquela que produziu o fragmento desejado (937 pb) de forma mais adequada foi a de 60 °C. Vetor e inserto foram digeridos com as enzimas de restrição *Acc65I* e *EcoRI*. Procedimentos padrão para obtenção de massa de fragmento, reações de ligação

entre vetor e inserto (Figura 23), inserção dos produtos da reação de ligação em bactérias, varredura das colônias transformadas por reação de PCR (colônia nº8 foi a escolhida) e obtenção de massa de plasmidídeo para análise por sequenciamento (Figura A4 do Apêndice) foram feitos de forma semelhante ao descrito acima para as outras construções. A região Fc de IgG1 não apresentou nenhuma mutação, mostrando-se adequada para a obtenção do vetor re-engenheirado.

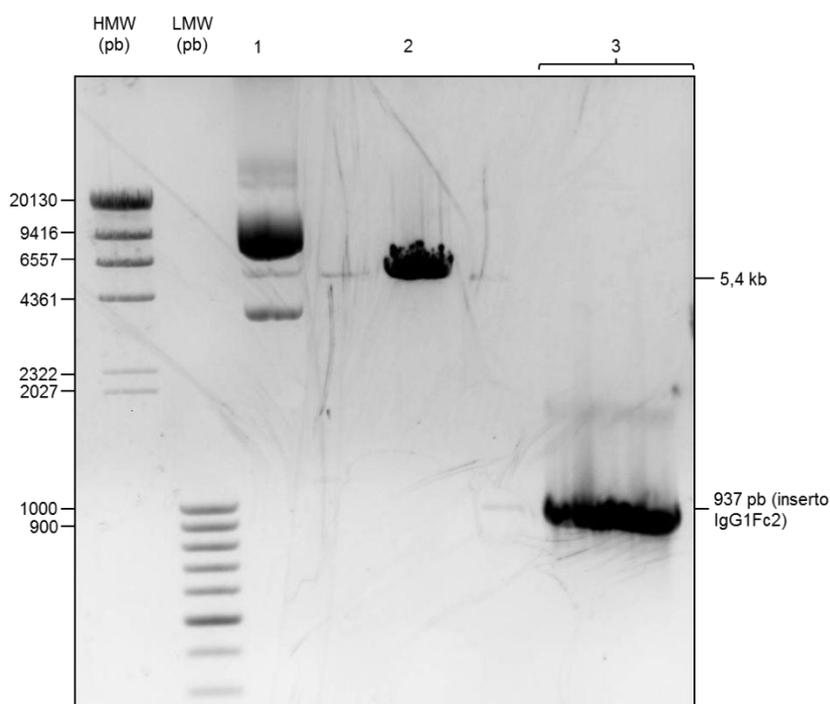


FIGURA 23 - ANÁLISE DA REAÇÃO DE DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PCDNA3.1(-) E DO INSERTO HIGG1-FC2

NOTA: HMW: λ HindIII; LMW: Gene Ruler 100 pb; 1: plasmídeo pcDNA3.1(-) não-digerido; 2: plasmídeo pcDNA3.1(-) digerido com aproximadamente 5,4 kb; 3: inserto hlgG1-Fc2 digerido com 937 pb. A reação de digestão do plasmídeo e do inserto foi feita com as enzimas de restrição *Acc65I* e *EcoRI*.

FONTE: A Autora (2015).

4.4.4 Construção do vetor pcDNA3.1-ADAM23C3-hlgG1-Fc2 (ADAM23C3)

A construção 3, ADAM23C3, é a clonagem do ectodomínio inteiro da ADAM23 dos resíduos 1 a 792 aminoácidos, com o peptídeo sinal, com o pró-domínio, sem a região transmembrânica e sem a cauda citoplasmática no plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2.

Novamente foram utilizados procedimentos padrão acima descritos e resultados muito semelhantes àqueles já descritos para as outras construções foram obtidos. Perfil eletroforético dos fragmentos obtidos é apresentado na Figura 24. Neste caso, a reação de digestão do vetor e do inserto foi feita com as enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*. Após a PCR de colônia foi escolhida a de nº 15, a qual foi submetida à reação de sequenciamento, cujo resultado se encontra na Figura A5 do Apêndice.

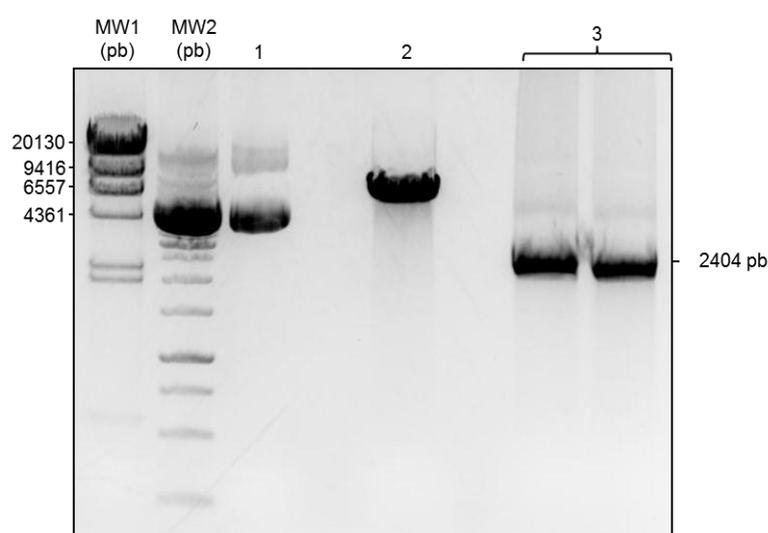


Figura 24 - Análise da reação de digestão do plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 e do inserto ADAM23C3

NOTA: MW1: λ *HindIII*; MW2: Gene Ruler 1 kb; 1: plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 não-digerido com 6.337 pb; 2: plasmídeo pcDNA3.1-hlgG1-Fc2 digerido; 3: inserto ADAM23C3 digerido com 2.404 pb. A temperatura de anelamento escolhida para a obtenção deste fragmento foi de 62 °C. A reação de digestão do vetor e do inserto foi feita com as enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*.

FONTE: A Autora (2015).

4.5 Avaliação da expressão da proteína Fc de IgG humana do vetor pINFUSE-hlgG1-Fc2

Com o objetivo de testar a expressão da proteína hlgG1-Fc2 e a sua possível secreção para o meio de cultura celular, foi realizada a transfecção de células HEK-293T com o vetor comercial de expressão pINFUSE-hlgG1-Fc2. Sabe-se que esse vetor é adequado para a construção de proteínas de fusão que precisam ser secretadas da célula para o meio extracelular, devido à fusão da região Fc2 de IgG1

humana e o peptídeo sinal da IL-2 na porção amino-terminal. Uma vez que a proteína expressa tem domínios da porção Fc de IgG1 humana, é possível detectá-la diretamente com anticorpos anti-IgG humana acoplados à peroxidase, em reações de *western blotting* de uma única etapa (ensaio direto).

Os extratos de células HEK-293T, transfectadas ou não com o plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2, e os seus respectivos sobrenadantes de cultura foram reagidos com anticorpo anti-IgG humana-HRP (Figura 25). Como as amostras foram submetidas a condições não-redutoras, foi observada a banda relativa ao dímero da região Fc da IgG1 com aproximadamente 55 kDa (Figura 25). Dessa forma, observou-se que a transfecção e a secreção desta proteína para o meio de cultura celular foram satisfatórias.

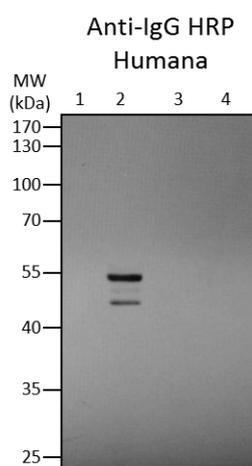


FIGURA 25 - TESTE DE EXPRESSÃO DE HIGG1-FC2 DO VETOR PINFUSE-HIGG1-FC2 EM CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS

NOTA: Amostras do extrato (200 µg/linha) de células HEK-293T (1 e 3) ou respectivos sobrenadantes de cultura (2 e 4), expressando (1 e 2) ou não (3 e 4) o plasmídeo pINFUSE-hIgG1-Fc2 foram resolvidos por SDS-PAGE em condições não-redutoras e reagidos com anti-human IgG-HRP. Pode ser observado que uma banda de ca. 55 kDa, compatível com a massa molecular esperada para o dímero CH2-CH3 da imunoglobulina humana, foi evidenciada com o Anti-hIgG.

FONTE: A Autora (2015).

4.6 Expressão das quimeras ADAM23C1, C2 e C3 nas linhagens HEK-293T, N2A e CHO-K1

O perfil de expressão das proteínas Fc quiméricas nos extratos e sobrenadantes das linhagens de mamífero HEK-293T, N2A e CHO-K1 foi avaliado

por *western blotting* (Figura 26). A linhagem 293T, embora seja transformada e imortalizada, foi escolhida por ser uma linhagem de humano que contém o gene SV40, do vírus símio 40 que permite uma alta taxa de expressão protéica quando do uso dos vetores pcDNA3.1 e pINFUSE. Além disso, a linhagem CHO-K1, embora seja de camundongo, também foi escolhida por ser eficiente, facilmente transfectável e por permitir uma alta taxa de expressão, inclusive de proteínas recombinantes. Já a linhagem de neuroblastoma N2A, embora seja de espécie murina e apresente taxas de transfecção inferiores do que aquelas apresentadas pelas linhagens acima descritas, foi escolhida por ser de origem neuronal, onde a ADAM23 é naturalmente expressa, e por provavelmente possuir a maquinaria necessária para a expressão e processamento dessa proteína. Dessa forma, utilizando-se linhagens de espécies e tecidos diferentes pôde-se comparar o perfil de expressão e processamento das proteínas Fc quiméricas.

Após a transfecção destas linhagens com os vetores de expressão adequados, os extratos celulares e seus sobrenadantes de cultura foram reagidos tanto com anticorpo anti-ADAM23 (painéis inferiores) como com anticorpo anti-IgG humana (painéis superiores).

Tomada cada uma das construções isoladamente, foi possível observar que o padrão de bandas destas se assemelha nas três linhagens para a reação com anti-ADAM23. Além disso, é possível constatar uma relação quase biunívoca entre as bandas detectadas com o anti-IgG e o anti-ADAM23, apesar de um número maior de bandas ter sido evidenciado pelo anti-ADAM23. Por exemplo, na linhagem N2A, a construção ADAM23C2, quando reconhecida pelo anti-IgG, apresenta um perfil de banda única relativa à proteína não-processada e com massa molecular esperada de 89 kDa, tanto no extrato quanto no sobrenadante. Entretanto, a mesma construção, ao ser reconhecida pelo anti-ADAM23 apenas no sobrenadante, apresenta um perfil de duas bandas de tamanhos diferentes, uma de maior massa molecular esperada e outra menor, indicando que houve um processamento dessa quimera. A mesma observação vale para as construções C1 e C2 na linhagem CHO-K1.

Quanto à secreção das quimeras C1 e C2, as linhagens N2A e CHO-K1 apresentaram perfil semelhante e, a princípio foram consideradas mais eficientes do

que a linhagem HEK-293T, se compararmos a detecção relativa das quimeras presentes no extrato e no sobrenadante (Figura 26, painéis A e C). Entretanto, C3 não foi identificada no sobrenadante de CHO-K1. Tendo em vista o objetivo de secretar as três quimeras em grande quantidade para em seguida coletar e purificar, as linhagens N2A e HEK-293T foram mais adequadas por apresentarem secreção das três proteínas Fc-fusionadas com a massa molecular esperada e em maiores quantidades. Apesar de apresentar intensidades semelhantes de quimeras no extrato e no sobrenadante, a linhagem HEK-293T apresentou maior quantidade absoluta das três proteínas quiméricas tanto no extrato quanto no sobrenadante em relação às outras duas linhagens (Figura 26, painel B).

Nas três linhagens, foi possível observar bandas das quimeras com a massa molecular esperada e outras bandas com massas moleculares menores, indicando que houve algum processamento por PCs ou outras enzimas de clivagem. O reconhecimento dessas formas processadas foi diferente em relação aos dois anticorpos, sendo que as formas processadas e não processadas foram reconhecidas pelo anti-ADAM23, enquanto que as formas processadas nem sempre foram reconhecidas pelo anti-IgG humana. Isso pode ser explicado por algum processamento na região Fc da IgG, que, dependendo da linhagem celular, pode estar removendo ou o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG ou o sítio de ligação à proteína A-Sepharose. Por exemplo, nas construções C1 e C2 em CHO-K1, pode ter ocorrido uma remoção do sítio de ligação à proteína-A, uma vez que as mesmas não puderam ser purificadas por cromatografia de afinidade à proteína-A. Além disso, nessas construções e nessa linhagem, o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG foi mantido, pois houve reação dessas proteínas com o anticorpo.

Nas linhagens N2A e HEK-293T houve a expressão e secreção apenas da forma processada da ADAM23C3 (ca. 89 kDa), apesar da ORF (*open reading frame*, do inglês janela aberta de leitura) conter a porção extracelular inteira da ADAM23 (PS+PD+EC) fundida com a região Fc de IgG humana (domínios CH2 e CH3) (ca. 115 kDa). Este resultado indica que o peptídeo sinal endógeno (PS) da ADAM23 foi reconhecido adequadamente pela maquinaria de secreção destas duas linhagens e que a proteína provavelmente foi processada adequadamente. Dessa forma, esse peptídeo sinal endógeno cumpriu a mesma função de secreção do peptídeo sinal da

IL-2 (presente no *backbone* do vetor pINFLUSE antes do sítio de policlonagem), e que não estava presente no *backbone* do vetor pcDNA3.1. Portanto, após o processamento, com a remoção do peptídeo sinal e do pró-domínio, a ADAM23C3 ficou com massa molecular semelhante à da ADAM23C2, observada tanto nas reações com anti-IgG humana quanto nas com anti-ADAM23. Essa explicação é válida para as construções ADAM23C2 e ADAM23C3 das Figuras 26 e 27.

Já na linhagem CHO-K1, a ADAM23C3 foi observada apenas no extrato celular e não no sobrenadante de cultura (Figura 26, painel inferior da CHO-K1). Esta retenção de C3 no citoplasma em CHO-K1 pode ser reflexo da própria maquinaria de secreção não ter reconhecido adequadamente esta quimera, apesar da proteína retida ter padrão equivalente aquele observado para a forma processada de ADAM23C3, i.e. 89 kDa (comparar com sobrenadante de C2 em CHO-K1 ou mesmo sobrenadante de C3 em N2A, na Figura 26). A presença dessa forma de menor massa molecular pode indicar que esta proteína quimérica sofreu processamento/clivagem intracelular por PCs. As possíveis explicações para a não-detecção de C3 no sobrenadante de CHO-K1 (Figuras 26 e 27) são: um processamento errôneo do peptídeo sinal endógeno da ADAM23, prejudicando o direcionamento da proteína para a via de secreção; a remoção do sítio de ligação à proteína-A; a remoção do epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG.

A intensidade de expressão e a quantidade de secreção não podem ser comparadas entre as três linhagens, uma vez que o método de transfecção (por Lipofectamina), a quantidade de células N2A (4×10^5) e de vetores (3 μg por vetor) utilizados nessa linhagem foram diferentes do que nas outras duas linhagens (método de transfecção por precipitação por Cálcio e 12 μg por vetor).

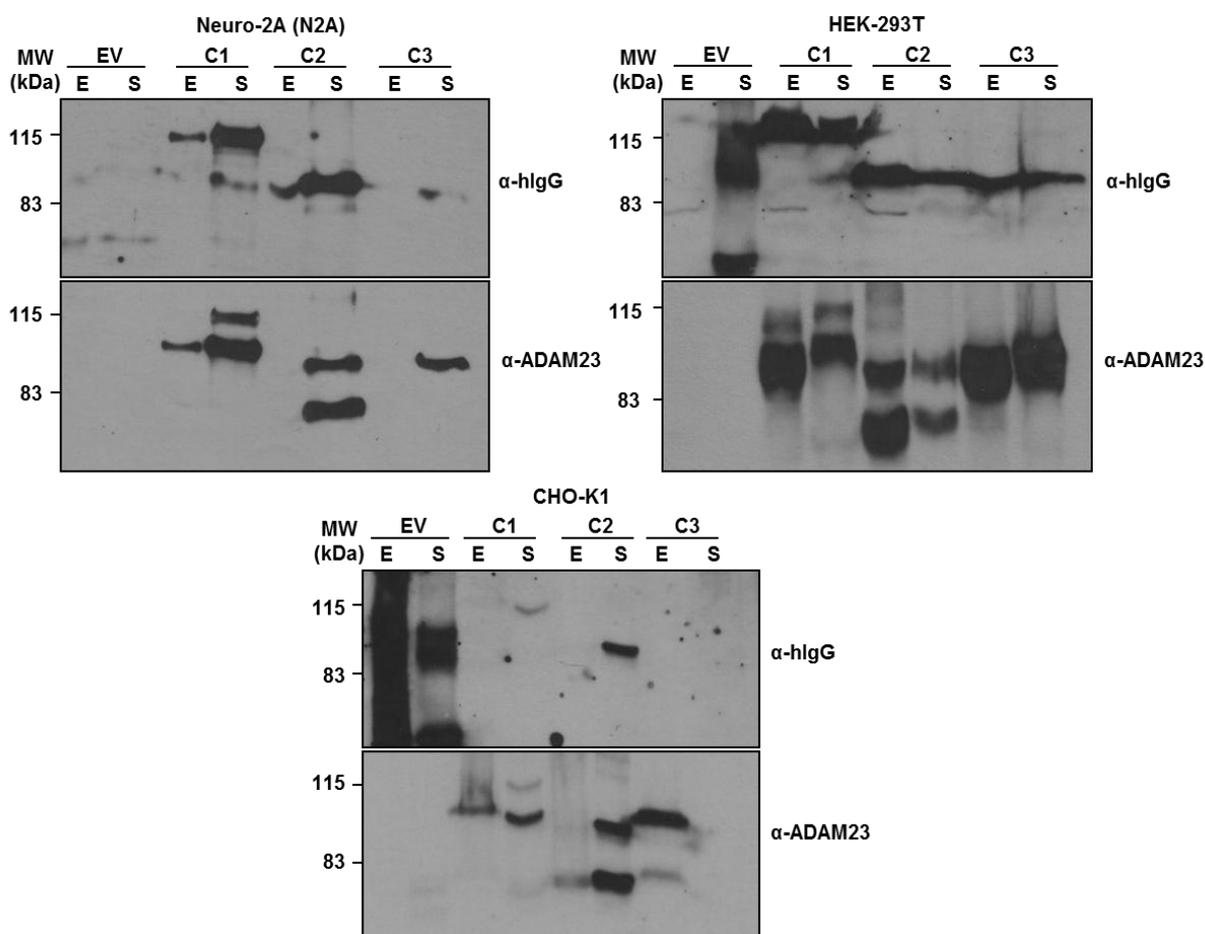


FIGURA 26 - EXPRESSÃO DOS CONSTRUTOS ECTO-ADAM23-HIGG1-FC2 (C1, C2 E C3) NAS LINHAGENS N2A, HEK-293T E CHO-K1

NOTA: As proteínas indicadas foram reagidas contra anticorpos anti-IgG humana (painel superior) e anti-ADAM23 (painel inferior). As massas moleculares esperadas para os três construtos são: ADAM23C1-hlgG-Fc2: 114,9 kDa; ADAM23C2-hlgG-Fc2: 89,01 kDa; ADAM23C3-hlgG-Fc2: 115 kDa. E: extrato celular total; S: sobrenadante de cultura; EV: vetor vazio utilizado como controle positivo para anti-IgG.

FONTE: A Autora (2015).

4.7 Avaliação da afinidade das proteínas quimeras ADAM23C1, C2 e C3 à proteína A-Sepharose

Com o objetivo de enriquecer os sobrenadantes com as proteínas Fc quiméricas e avaliar a presença funcional da região Fc das proteínas quiméricas pela proteína A-Sepharose, foram realizados experimentos de enriquecimento protéico por afinidade à Proteína-A seguida de análise por *western blotting* com anticorpos anti-ADAM23. Em resumo, as amostras de extrato celular (total) e

sobrenadante de cultura (incubado com proteína A-Sepharose) das três linhagens foram reagidas com anticorpo anti-ADAM23. Foi possível observar ligação das proteínas Fc quiméricas com proteína A-Sepharose apenas nos sobrenadantes de N2A e HEK-293T, confirmando a secreção das mesmas.

As proteínas Fc quiméricas ADAM23C1 e ADAM23C2 dos sobrenadantes de N2A reagiram mais eficientemente com a proteína A-Sepharose, confirmando a presença da etiqueta de Fc (Figura 27, painel da N2A). Entretanto, nessa linhagem foi possível observar a presença das formas processadas dessas proteínas tanto nas amostras de extratos celulares como nos sobrenadantes de cultura. Em N2A, C1 e C2 parecem manter tanto o sítio de ligação à proteína-A quanto o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG, sugerindo que o processamento pode ter ocorrido em outra região das moléculas. A ADAM23C3 foi observada apenas em sua forma processada em ambas as amostras. A presença das formas processadas nos sobrenadantes incubados com proteína A-Sepharose, as quais se ligam a esta última pela cauda de Fc da IgG, pode indicar que o processamento esteja ocorrendo em outro sítio da molécula, diferente daquele que interage com a proteína-A.

Na linhagem de HEK-293T, foi possível observar uma abundância maior das formas processadas de todas as três proteínas Fc quiméricas em relação às formas não-processadas tanto nas amostras de extratos celulares como nos sobrenadantes de cultura. Em 293T, a ADAM23C3 foi observada apenas em sua forma processada, embora tenha interagido com A-Sepharose (Figura 27, painel da HEK-293T). Constatou-se também que houve ligação/interação das outras duas proteínas quiméricas dos sobrenadantes com a proteína A-Sepharose, confirmando a presença do sítio de interação da região Fc com proteína-A, sugerindo também que o processamento pode estar ocorrendo em outra região das moléculas que não interfere na secreção das mesmas.

O epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG pode ter sofrido processamento, sendo que o sítio de ligação à proteína A-Sepharose pode estar situado em local diferente desse epítipo. Isso explicaria por que a banda inferior do sobrenadante de ADAM23C1 incubado com A-Sepharose, forte aqui (Figura 27, painel da HEK-293T), não aparece no sobrenadante do painel da 293T sem proteína-A (Figura 26, painel superior da HEK-293T, reação com anti-IgG humana), indicando que houve um

processamento do epítopo do anti-IgG mas não do sítio de ligação à proteína-A. O mesmo vale para C2 nessa linhagem.

Em N2A e HEK-293T, ADAM23C3 foi identificada apenas na forma processada, com massa molecular semelhante à ADAM23C2 (que não possuía o pró-domínio e continha o peptídeo sinal de secreção da IL-2), indicando que ocorreu um processamento adequado de C3 levando à remoção do peptídeo sinal de secreção endógeno da própria ADAM23 e do pró-domínio e ao correto endereçamento para a via de secreção como explicado no item anterior. Nestas linhagens, C3 parece manter tanto o epítopo de reconhecimento pelo anti-IgG como o sítio de afinidade à proteína A-Sepharose.

Ao contrário do que se imaginava antes, a linhagem CHO-K1 apresentou menor eficiência na expressão e secreção das quimeras, uma vez que não ocorreu purificação das quimeras com proteína A-Sepharose a partir dos sobrenadantes de cultura. Na linhagem CHO-K1, não foi possível observar as quimeras nos sobrenadantes de cultura, indicando que não houve ligação das proteínas Fc quiméricas à proteína A-Sepharose e que a secreção pode não ter ocorrido (Figura 27, painel CHO-K1). Comparando com o resultado anterior na Figura 26, parece que esta linhagem é a mais ineficiente em secretar as quimeras (comparar a secreção em CHO-K1 com a das outras linhagens nas Figuras 26 e 27). Assim, a baixa eficiência de secreção nas condições do experimento da Figura 27, pode ser uma explicação para a ausência de detecção destas formas no sobredante das culturas das três construções. Em CHO-K1, C1 e C2 parecem ter sofrido um processamento que removeu o sítio de ligação à proteína-A, mas não o epítopo de reconhecimento pelo anti-IgG. Entretanto, nesta mesma linhagem, C3, parece ter perdido o sítio de interação com a proteína-A e o epítopo de reconhecimento pelo anti-IgG ou, ainda, como explicado anteriormente, pode ter sofrido um processamento aberrante do peptídeo sinal de secreção endógeno prejudicando o direcionamento da quimera para a via de secreção (Figuras 26 e 27).

De um modo geral, as linhagens N2A e HEK-293T foram mais adequadas nos quesitos expressão e purificação das ADAMs Fc quiméricas por proteína-A.

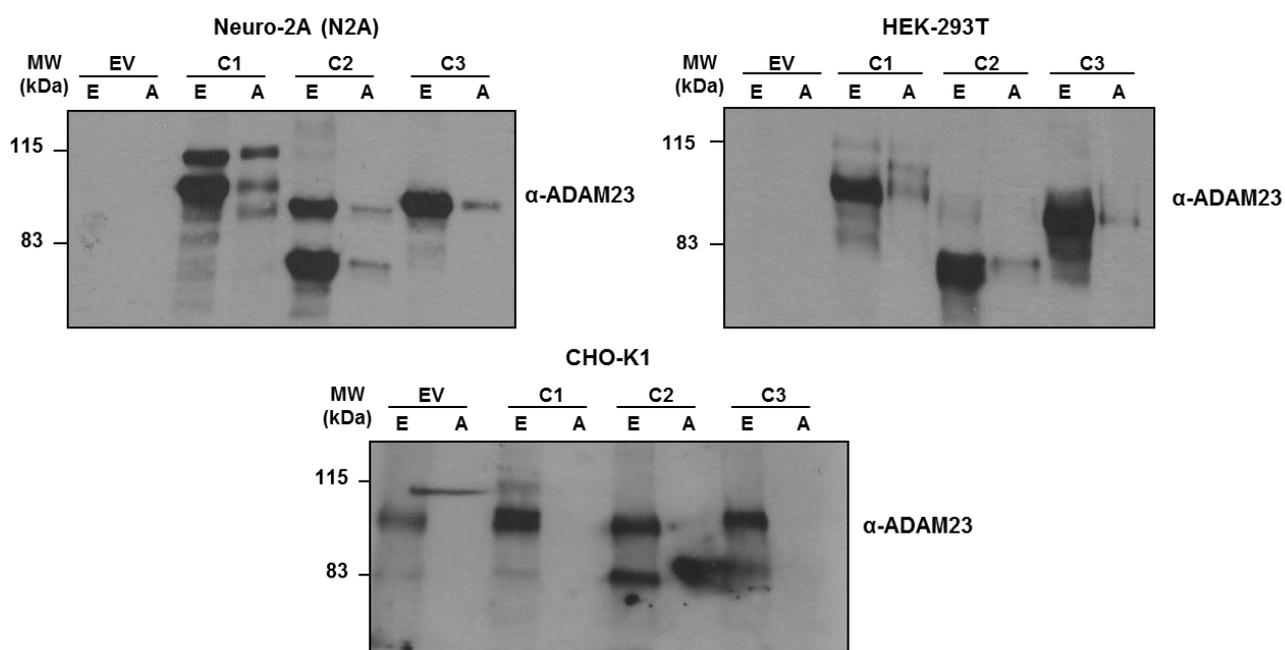


Figura 27 - Avaliação da afinidade das proteínas-Fc quiméricas secretadas por N2A, HEK-293T e CHO-K1 à proteína A-Sepharose

NOTA: Cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose foi realizada, apenas nos sobrenadantes, para confirmar a presença do sítio de afinidade da região Fc das três proteínas quiméricas. As massas moleculares esperadas para os três construtos são: ADAM23C1-hlgG-Fc2: 114,9 kDa; ADAM23C2-hlgG-Fc2: 89,01 kDa; ADAM23C3-hlgG-Fc2: 115 kDa. E: extrato celular total; A: sobrenadante de cultura incubado com proteína A-Sepharose; EV: vetor vazio.

FONTE: A Autora (2015).

4.8 Avaliação dos métodos de concentração dos sobrenadantes de cultura contendo as proteínas quimeras secretadas

Apesar do uso de um vetor de expressão adequado para a obtenção de proteínas diretamente do sobrenadante de cultura, foi constatado que a concentração das mesmas nestes sobrenadantes era sempre muito baixa. Para resolver este problema foram testados diferentes protocolos para o enriquecimento destas quimeras protéicas. Os métodos de concentração de proteínas utilizados envolveram ultrafiltração com membrana de 60 kDa de corte, precipitação com sulfato de amônio (*“salting-out”*) e liofilização a vácuo. Eventualmente foi empregada a combinação de dois métodos (e.g. combinação entre precipitação por sulfato de amônio seguida de precipitação por metanol-clorofórmio). A presença das proteínas

de interesse foi avaliada em diferentes etapas metodológicas através de reação de *western blotting* e coloração direta de géis de poliacrilamida com azul de Coomassie.

A purificação de proteínas por ultrafiltração com membrana de 60 kDa de corte (Amicon) mostrou-se ineficaz na purificação das quimeras, o que pode ser devido a uma baixa expressão e secreção das mesmas. Como controles, foram utilizados os sobrenadantes de cultura contendo as quimeras submetidas à precipitação por metanol-clorofórmio (Figura 28A).

As três quimeras foram identificadas nos controles através de reação com anticorpo anti-ADAM23, tanto nas formas processadas como nas não-processadas, sendo, inclusive, identificada a ADAM23C3 na forma processada. Este perfil de expressão das quimeras no sobrenadante das células HEK293T é semelhante aquele já descrito nas Figuras 26 e 27.

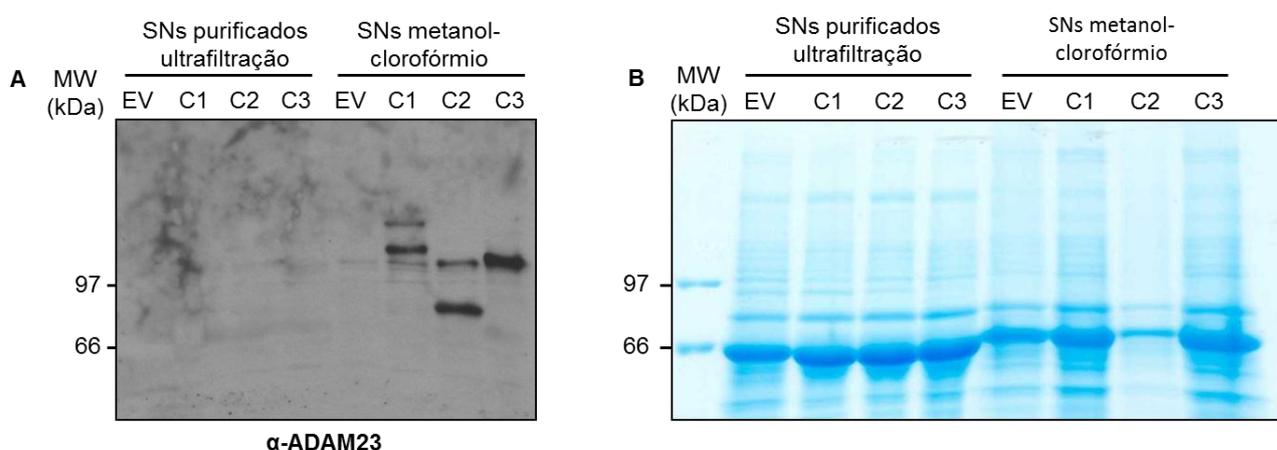


FIGURA 28 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM AS TRÊS CONSTRUÇÕES DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

NOTA: Os métodos de enriquecimento de proteínas comparados foram a concentração direta dos sobrenadantes com uso de ultrafiltração (Amicon, corte de 60 kDa) e a precipitação das proteínas dos sobrenadantes pelo método do metanol-clorofórmio. Em **A**, amostras reagidas contra anti-ADAM23. Em **B**, perfil de expressão protéica das amostras em coloração por azul de Coomassie. A massa molecular esperada para cada construção é: ADAM23C1-hIgG-Fc2: 114,9 kDa; ADAM23C2-hIgG-Fc2: 89,01 kDa; ADAM23C3-hIgG-Fc2: 115 kDa. EV: vetor vazio; C1: sobrenadante de células HEK-293T transfectadas com a construção 1; C2: sobrenadante de células HEK-293T transfectadas com a construção 2; C3: sobrenadante de células HEK-293T transfectadas com a construção 3.

FONTE: A Autora (2015).

Foi realizada em seguida (Figura 29) uma comparação entre o enriquecimento da proteína ADAM23C1 por: (1) liofilização a vácuo (remoção do

solvente) e precipitação por metanol-clorofórmio; (2) precipitação por sulfato de amônio; (3) precipitação por sulfato de amônio seguida de precipitação por metanol-clorofórmio e (4) precipitação por sulfato de amônio e concentração através de ultrafiltração com membrana de corte. Observou-se que esta última combinação de métodos de enriquecimento protéico se apresentou a menos eficiente (Figura 29A, linha 4) apesar de ser uma combinação de métodos menos desnaturantes e portanto, menos agressivos para a estrutura das proteínas. No caso da amostra enriquecida por precipitação com sulfato de amônio (Figura 29A, linha 2), a ADAM23C1 foi reconhecida apenas na forma processada. As outras duas amostras apresentaram a ADAM23C1 tanto na forma processada quanto não-processada, embora a primeira tenha ocorrido em maior intensidade (Figura 29A, linhas 1 e 3).

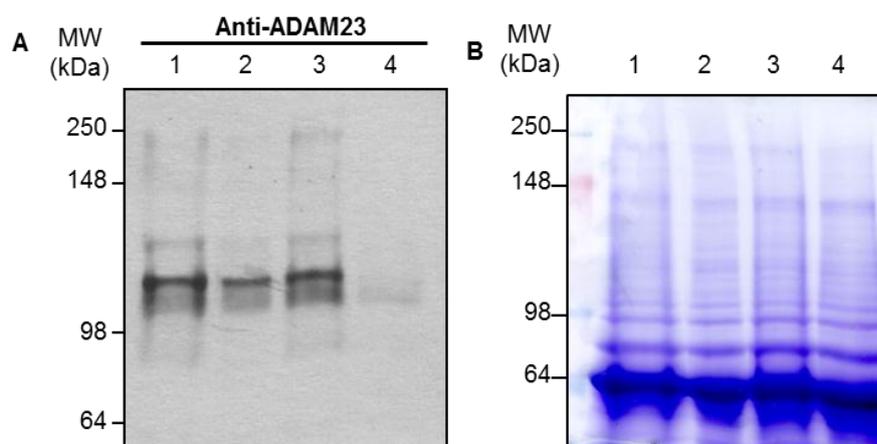


FIGURA 29 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1

NOTA: Em 1: amostra liofilizada a vácuo e precipitada por metanol-clorofórmio. Em 2: amostra precipitada por sulfato de amônio e dialisada contra PBS 1X. Em 3: amostra precipitada por sulfato de amônio, dialisada contra PBS 1X e novamente precipitada por metanol-clorofórmio. Em 4: amostra precipitada por sulfato de amônio e concentrada por ultrafiltração (Amicon). Em A, amostras reagidas contra anti-ADAM23. Em B, perfil de expressão protéica das amostras em coloração por azul de Coomassie. A massa molecular esperada para a construção 1, ADAM23C1-hIgG-Fc2, é 114,9 kDa. FONTE: A Autora (2015).

Na comparação entre os métodos de enriquecimento da proteína ADAM23C1 por liofilização a vácuo seguida de precipitação por metanol-clorofórmio e precipitação por sulfato de amônio, observou-se que este último foi o menos eficiente em termos de recuperação de proteínas (Figura 30 A e B, linhas 2 e 3) apesar deste ser um método pouco desnaturante e favorável para a manutenção da

estrutura das proteínas. Como este método de precipitação por sal foi seguido de uma diálise contra PBS, pode ser que tenha ocorrido uma purificação mais eficiente da ADAM23C1, o que não significa uma obtenção de maior quantidade dessa proteína. Isso explicaria a menor intensidade de reação das proteínas da amostra de sobrenadante de cultura que passou pela precipitação por sulfato de amônio em relação à reação das proteínas enriquecidas pelo outro método. Dessa forma, o método da precipitação com sal seguida de diálise, apesar de ser um método pouco eficiente no quesito rendimento, parece ser o método mais eficiente na obtenção de proteínas mais purificadas (Figura 30A, linha 2). A utilização de métodos de concentração protéica não-desnaturantes é importante para a utilização dessas proteínas quiméricas purificadas como bioferramentas em outros ensaios biológicos funcionais. O método da liofilização a vácuo seguida de precipitação por metanol-clorofórmio foi satisfatório na questão de recuperação das quimeras, apesar de ser um método altamente desnaturante. É importante salientar que o método de precipitação por metanol-clorofórmio visa somente a concentração das proteínas quiméricas para observação por SDS-PAGE, não sendo considerado um método de purificação.

A proteína ADAM23C1 quimérica foi identificada nos sobrenadantes submetidos a ambos os métodos de enriquecimento. Em ambos os casos de enriquecimento, a ADAM23C1 foi reconhecida tanto na forma processada quanto na não-processada (114,9 kDa). Outro gel-espelho foi submetido à coloração de proteínas totais por azul de Coomassie (Figura 30B) para que o padrão total de proteínas pudesse ser comparado com as bandas evidenciadas pelo anti-ADAM23. Dessa forma, constatou-se que a quantidade das proteínas quiméricas obtidas por ambos os métodos de concentração era baixa, provavelmente na ordem de nanogramas em relação à quantidade de outras proteínas presentes nos sobrenadantes e que foram concentradas juntamente com as quimeras. Entretanto, apesar da baixa quantidade quase indetectável na coloração por Coomassie, a reação das proteínas quiméricas com o anticorpo anti-ADAM23 foi satisfatória, permitindo a sua identificação.

Em outro ensaio, foi feito um gel com coloração de proteínas totais por azul de Coomassie com o intuito de comparar a relação de intensidade da banda

correspondente à proteína ADAM23C1 e a de outros constituintes, tanto no sobrenadante em que não houve enriquecimento de proteínas (Figura 30C, linha 3) quanto naquele em que houve (linha 4). Foi possível observar que o sobrenadante submetido à precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise apresentou uma maior intensidade de proteínas totais, por outro lado, não foi possível verificar um enriquecimento de banda que fosse compatível com a massa molecular de ADAM23C1 (comparar banda evidenciada com anti-ADAM23, painel A, linha 3 e bandas da linha 4 no painel C).

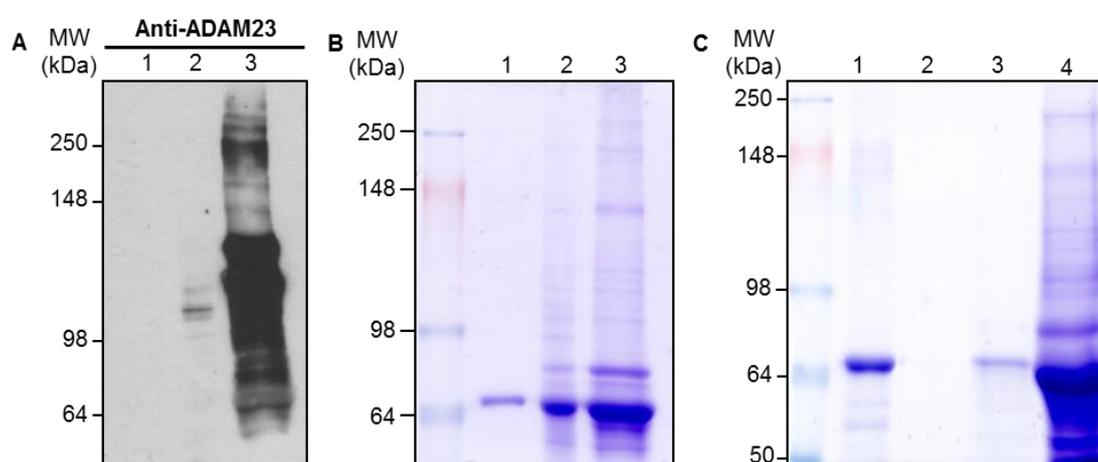


FIGURA 30 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1.

NOTA: (A e B) Amostras foram enriquecidas de sobrenadante de cultura por precipitação por sulfato de amônio e diálise contra PBS (linha 2) ou liofilização seguida de precipitação por metanol-clorofórmio (linha 3). Albumina do soro bovino (0,5 µg, linha 1) foi utilizada como marcador de massa molecular. Após SDS-PAGE as amostras foram reagidas com anti-ADAM23 (painel A) ou coradas com Azul de Coomassie (painel B). No painel C podem ser observados: a coloração por Azul de Coomassie de albumina (0,5 µg, linha 1), meio de cultura sem soro fetal bovino (linha 2), alíquota de sobrenadante de cultura não-precipitado (linha 3) ou precipitado com sulfato de amônio e dialisado contra PBS (linha 4). A massa molecular esperada para a construção ADAM23C1 é 114,9 kDa.
 FONTE: A Autora (2015).

Para testar a reatividade das amostras frente ao anticorpo anti-IgG humana e comparar o seu perfil de marcação com aquele obtido com anti-ADAM23, amostras provenientes dos sobrenadantes de cultura de expressão da proteína quimérica ADAM23C1 em células HEK-293T, contendo ou não soro fetal bovino no meio de cultivo, foram avaliadas. O método de concentração de proteínas realizado nesse ensaio foi a precipitação por liofilização seguida da precipitação por metanol-

clorofórmio. Foi possível observar que na reação com anti-IgG humana nenhuma proteína foi reconhecida nem no sobrenadante sem soro fetal bovino (SFB) nem no que o continha (Figura 31A linhas 3 e 4, respectivamente). Isso pode ser explicado das seguintes formas: ou a quantidade de proteínas obtida era tão baixa que não pôde ser reconhecida pelo anticorpo anti-IgG ou essas proteínas sofreram processamento que resultou na perda do epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG humana situado na região Fc.

Como a reação de IgG humana purificada com anti-IgG foi muito intensa (Figura 31A, linha 2, controle positivo), pode ser que quase todos os anticorpos anti-IgG se ligaram por competição apenas à proteína IgG imobilizada na membrana de nitrocelulose, sendo que não havia mais anti-IgG disponível para se ligar aos poucos epítipos de IgG disponíveis na quimera. Como as condições do gel eram redutoras, apareceram formas reduzidas (e.g. cadeia pesada, com domínios CH2 e CH3, com aproximadamente 55 kDa) e não reduzidas (e.g. molécula inteira com cadeias leve e pesada) da IgG humana purificada.

Por outro lado, a reação com anti-ADAM23 evidenciou a presença da ADAM23C1 apenas no sobrenadante de cultura contendo soro fetal bovino, tanto na forma não-processada, em menor intensidade, como na forma processada, em maior intensidade (Figura 31B, linha 4).

Foi feito um gel-espelho para avaliar o perfil geral de expressão e intensidade de proteínas totais e comparar com a intensidade específica das proteínas quiméricas observada através de *western blotting*. A análise no gel-espelho pôde ser feita através de coloração proteína-inespecífica por azul de Coomassie (Figura 31C). Foi constatado que a intensidade das proteínas quiméricas obtidas com o método da precipitação por metanol-clorofórmio foi muito baixa em relação às outras proteínas presentes no sobrenadante. Entretanto, apesar da baixa quantidade da ADAM23C1 quase indetectável na coloração por coomassie, a reação dessa proteína quimérica com o anticorpo anti-ADAM23 foi satisfatória, permitindo a sua identificação no sobrenadante de cultura contendo SFB.

Ainda na Figura 31, pode-se observar que não houve reação cruzada da albumina presente no soro com nenhum dos anticorpos utilizados, nem a interferência dessa proteína no enriquecimento, purificação e interações das

proteínas quiméricas. O uso de soro fetal no início do procedimento (primeiras 24 horas de cultivo celular, durante o período de transfecção ou sub-cultivo) é tempo suficiente para a permanência de traços de soro fetal, a qual resulta em contaminação dos sobrenadantes com proteínas do soro fetal. Assim, mesmo no cultivo das linhagens com baixa quantidade ou ausência de soro fetal bovino, pode-se observar que a albumina é o principal elemento protéico destas amostras. Como a precipitação por metanol-clorofórmio funcionou de forma quantitativa nos demais ensaios com a mesma proteína e mesma linhagem celular, descartou-se a possibilidade de perda de proteínas nesse processo.

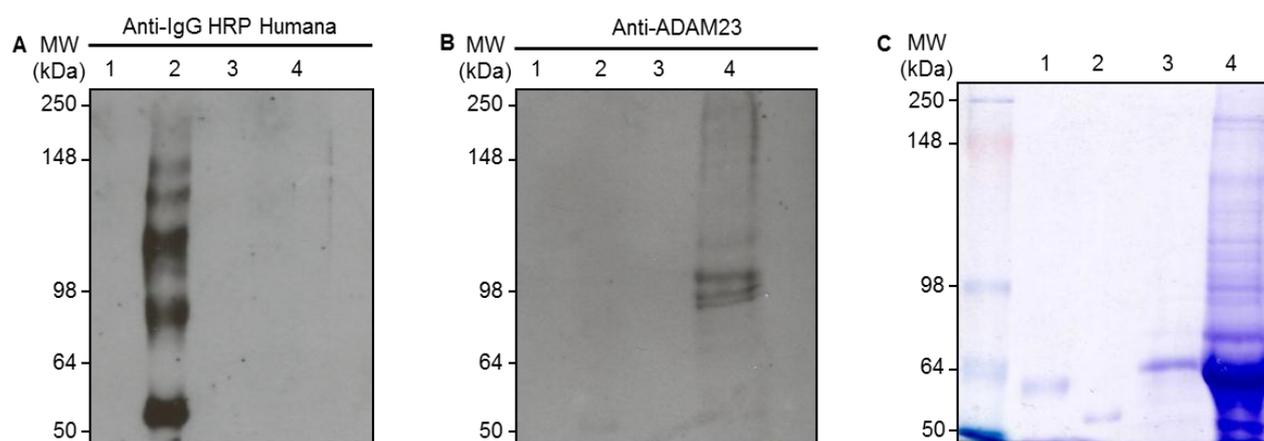


FIGURA 31 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ENRIQUECIMENTO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS HEK-293T TRANSFECTADAS COM A CONSTRUÇÃO C1 (PINFUSE-ADAM23C1-HIGG1-FC2)

NOTA: Em **1**: controle positivo para albumina, 0,5 µg de BSA. Em **2**: 0,4 µg de IgG humana purificada. Em **3**: sobrenadante sem soro fetal bovino precipitado por metanol-clorofórmio. Em **4**: sobrenadante com soro fetal bovino precipitado por metanol-clorofórmio. Em **A**, amostras reagidas contra anti-IgG humana e em **B**, contra anti-ADAM23. Em **C**, perfil de expressão protéica das amostras em coloração por azul de Coomassie. A massa molecular esperada para a construção 1, ADAM23C1-hlgG-Fc2, é 114,9 kDa.

FONTE: A Autora (2015).

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do padrão de reatividade dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 (DL11C8) sobre diferentes amostras

O enriquecimento de glicoproteínas do extrato de encéfalo com concanavalina A-Sepharose teve por objetivo concentrar a ADAM23 nessa amostra, uma vez que, ADAMs são glicoproteínas e estas possuem afinidade por esta lectina. Tal método de enriquecimento já foi utilizado por Lum e colaboradores (1998) para a detecção da ADAM15 em vários tecidos. Foi possível observar a banda referente à forma processada de ADAM23, a qual não possui o pró-domínio, no extrato de encéfalo (70 kDa). Na amostra enriquecida por conA-Sepharose, foi possível observar, além da banda de 70 kDa, outra banda de cerca de 30 kDa, que pode ser de uma forma processada da ADAM23 ou o produto da clivagem, com tamanho semelhante à ADAM23 recombinante (Dis-Cys) (Figura 14, linha 3). Este resultado sugere que o procedimento de enriquecimento utilizado para ADAM15 (LUM *et al.* 1998) também é adequado para ADAM23. É interessante observar que a forma de baixa massa molecular ainda retém tanto a antigenicidade ao anticorpo DL11C8 como a afinidade pela concanavalina A. Já a presença da forma de 70 kDa também na amostra não-enriquecida, mas com intensidade inferior àquela observada na amostra enriquecida por concanavalina A, sugere que o enriquecimento cromatográfico da ADAM23 é uma boa estratégia na identificação deste antígeno quando em baixa abundância relativa. Quando RPMI foi empregado no lugar do anticorpo primário, não foi possível identificar nenhuma das formas de ADAM23, sugerindo especificidade para a reação observada com o anticorpo monoclonal obtido a partir do sobrenadante de hibridoma DL11C8.

No caso da ADAM23 não-processada (100 kDa) contendo uma etiqueta de hemaglutinina (HA) e o pró-domínio expressa em células HEK-293T transfectadas com o vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA (Figura 15, linha 1), pode ser que a imunoreatividade de HA esteja localizada na superfície celular, uma vez que, em

células HeLa transfectadas com um construto codificando a hemaglutinina (HA) fusionada à ADAM23, a imunoreatividade de HA está prioritariamente localizada na superfície (CAL *et al.*, 2000). Além disso, já foi observado que ambas as formas da ADAM10 imatura e processada por pró-proteína convertases (PCs) estão presentes na superfície de células HEK-293T transfectadas (LAMMICH *et al.*, 1999). Apesar de o mesmo resultado ter sido observado para as ADAMs 15, 28 e 33, a abundância relativa da proteína processada ou não-processada na superfície celular é diferente em cada caso (LUM *et al.*, 1998; HOWARD *et al.*, 2000; GARLISI *et al.*, 2003). Dessa forma, as células HEK-293T transfectadas com ADAM23-HA, apresentaram apenas a forma da ADAM23 de 100 kDa, não-processada por PCs, que poderia estar presente na membrana dessas células.

No extrato de encéfalo foi observada a ADAM23 de 70 kDa confirmando os dados de que a ADAM23 é predominantemente expressa no tecido nervoso (SAGANE *et al.*, 1998). Goldsmith e colaboradores (2004) trataram células granulares cerebelares (CGC, do inglês, *Cerebellar Granule Cells*) com um inibidor de furina (uma pró-proteína-convertase) e observaram que a ADAM23 de 100 kDa pode ser clivada por uma furina ou uma enzima relacionada e que a geração da ADAM23 de 70 kDa contendo o domínio citoplasmático, mas sem o pró-domínio, é uma consequência desse evento de processamento. A ADAM23 contém um motivo que é reconhecido pelas pró-proteínas convertases (PC) entre o pró-domínio e o domínio metaloprotease. A ADAM23 de 100 kDa representa a forma imatura, cuja massa teórica é de 92 kDa, ao passo que, a ADAM23 de 70 kDa corresponde à forma madura da ADAM23 que não possui o pró-domínio e tem uma massa teórica de 61 kDa. Essas massas de 92 e 61 kDa indicam respectivamente a forma não-glicosilada da ADAM23 e a forma clivada por pró-proteína convertases. Por causa da remoção do pró-domínio, ocorre uma redução da massa da ADAM23 de 92 para 61 kDa. Portanto, a ADAM23 de 100 kDa e a de 70 kDa representam respectivamente as formas glicosiladas da proteína imatura e da proteína processada por pró-proteínas convertases. Com relação à abundância de ambas as formas, 75% da ADAM23 (70 kDa) está presente na membrana celular em algum momento do processamento celular, e é muito mais abundante na superfície celular do que a forma de 100 kDa (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

Não foi possível detectar nenhuma das formas de ADAM23 nos extratos dos diferentes tecidos murinos analisados: pulmão, testículo e rim. Um estudo não detectou mRNAs da ADAM23 em extratos de pulmão e testículo humanos (SAGANE *et al.*, 1998). Entretanto, não é possível afirmar a inexistência de mRNA da ADAM23 nestes extratos, e, se existir, a sua estabilidade ou a regulação da tradução não permitiram uma síntese protéica robusta. Por outro lado, em estudos correlatos, foi detectada a presença do mRNA da ADAM23 em extratos de linhagens celulares (COSTA *et al.*, 2003; VERBISCK *et al.*, 2009), e em extratos de coração, cérebro e musculatura esquelética (SAGANE *et al.*, 1998).

5.2 Avaliação das formas de ADAM23 em diferentes linhagens celulares

As formas de ADAM23 de 70 kDa e de 100 kDa estão presentes em células cerebelares (GOLDSMITH *et al.*, 2004) do sistema nervoso central. A presença da forma não processada de ADAM23 (100 kDa) no sistema nervoso é muito reduzida, sugerindo um rápido processamento proteolítico da forma não-madura para madura durante a síntese desta molécula.

Não foi possível observar expressão de nenhuma das diferentes formas da ADAM23 nos extratos de células das linhagens de tumor de mama, MDA-MB-435-1C e MCF-7 enriquecidos em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose. A linhagem MCF-7 segundo Costa e colaboradores (2003), não expressa ADAM23. O clone 1C da linhagem 435 (MDA-MB-435-1C) apresenta RNAi para ADAM23, bloqueando a sua expressão.

A linhagem MDA-MB-435 apresentou expressão de ADAM23, assim como a expressão de ADAM23 em células MDA-MB-436, linhagem correlacionada, já havia sido descrita por Costa e colaboradores (2003). Já foi descrito pelo grupo que a linhagem MDA-MB-435 possui mRNAs específicos para a síntese de ADAM23 (VERBISCK *et al.*, 2009). O extrato de células MDA-MB-435 enriquecido por conA (Figura 16, linha 7) apresentou a forma da ADAM23 de 100 kDa, podendo indicar que nessa linhagem celular, a ADAM23 não sofre processamento por pró-proteínas convertases (PCs) ou que a conA utilizada nesse enriquecimento tem maior

afinidade pelas formas não-processadas e pelas formas que apresentam maior grau de glicosilação como a de 100 kDa. A forma de 100 kDa da ADAM23 observada neste resultado é equivalente àquela descrita por Goldsmith e colaboradores (2004) como sendo de 92 kDa. Esse resultado confirma os de outros do grupo que correlacionam a expressão do mRNA de *adam23* com a expressão da proteína (COSTA *et al.*, 2003; VERBISCK *et al.*, 2009). Da mesma forma que observado para células HEK-293T superexpressando ADAM23, aparentemente na linhagem MDA-MB-435 a ADAM23 não sofreu o processamento por enzimas celulares (PCs). Ainda não está claro qual a relevância da expressão apenas da forma de 100 kDa para o fenótipo tumoral ou o papel que esta exerce neste tipo celular (tecido mamário tumoral). Em extrato de encéfalo de camundongo enriquecido ou não em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à conA foi identificada a forma processada de 70 kDa da ADAM23 (Figura 16, linhas 3 e 2, respectivamente). Por outro lado, a forma de 100 kDa não-processada foi identificada apenas nas amostras de encéfalo enriquecidas por conA (Figura 16, linha 3), sugerindo que a maior parte da ADAM23 no encéfalo encontra-se na forma processada. As formas da ADAM23 não-processadas e com maior grau de glicosilação, como a de 100 kDa, parecem apresentar maior afinidade à conA, uma vez que, essa forma de 100 kDa (com pró-domínio) apresenta 8 sítios de glicosilação (dados do Unipot para a estrutura da ADAM23 humana), enquanto que a forma de 70 kDa é a forma sem o pró-domínio e com o menor grau de glicosilação. A forma de 70 kDa apresenta apenas 4 sítios putativos glicosilados. Portanto, com a clivagem do pró-domínio por furinas ocorreria uma perda de 4 sítios putativos glicosilados e com isso, ocorre uma redução da massa molecular da proteína observada no perfil eletroforético. Dessa forma, mesmo estando presente nas células neuronais em menor quantidade do que a forma de 70 kDa, a forma de 100 kDa pode se tornar detectável em ensaios de *western blotting* quando capturada por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose.

No extrato de células HEK-293T transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA (Figura 16, linha 5) foi observada apenas a forma de 100 kDa não-processada e glicosilada (GOLDSMITH *et al.*, 2004), sugerindo que neste tipo celular não ocorreu o processamento desta ADAM específica, ou que o ensaio utilizado não permitiu a detecção das outras formas da ADAM23. Portanto, seria necessário realizar outros

ensaios para detectar a forma processada da ADAM23 nesta linhagem, como ensaios de biotinylation, ou seja, a marcação das proteínas de superfície celular. Isso porque já foi observado o processamento de outras ADAMs, como a ADAM10 neste mesmo tipo celular por PCs, sendo que ambas as formas processada e não processada da ADAM10 foram encontradas na superfície celular através de ensaios de biotinylation (LAMMICH *et al.*, 1999). Além disso, as formas processada e não processada da ADAM33 foram detectadas na membrana de células HEK-293T através de biotinylation (GARLISI *et al.*, 2003); ambas as formas da ADAM28 (HOWARD *et al.*, 2000) e da ADAM15 (LUM *et al.*, 1998) foram detectadas na superfície de outras células também através de biotinylation. O processamento das ADAMs 15, 28 e 33 e a abundância relativa das proteínas processadas ou não na superfície celular são diferentes em cada caso (LUM *et al.*, 1998; HOWARD *et al.*, 2000; GARLISI *et al.*, 2003), sugerindo mecanismos regulatórios específicos para cada membro da família. O resultado obtido com o extrato enriquecido por conA (Figura 16, linha 6) foi o mesmo, observando-se majoritariamente a forma da ADAM23 de 100 kDa.

Os extratos de diferentes linhagens celulares foram eficientemente enriquecidos em glicoproteínas através de afinidade por conA, confirmando ser um procedimento adequado na identificação da ADAM23 assim como já havia sido descrito na identificação de outras ADAMs com baixa abundância relativa (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SCHAFER *et al.*, 2004).

Em seguida, foi realizada uma comparação das formas de ADAM23 expressas em células de linhagem de neuroblastoma de camundongo, N2A, e em células HEK-293T. No extrato de encéfalo murino enriquecido ou não por conA (Figura 17, linhas 3 e 2, respectivamente) foi identificada apenas a forma processada de 70 kDa da ADAM23. No extrato de células de linhagem neuronal N2A (Neuro-2A) (Figura 17, linha 4), foi possível observar as duas formas de ADAM23, sendo a forma de 70 kDa semelhante àquela observada no extrato de encéfalo (Figura 17, linhas 2 e 3). Interessantemente, após enriquecimento por conA (Figura 17, linha 5), foi possível observar uma maior abundância relativa da forma não-processada de 100 kDa em relação à forma processada de 70 kDa. Ainda não está elucidado se a estabilização da forma não-processada de ADAM23 é um evento que ocorre apenas

nesta linhagem tumoral e espécie ou se outras linhagens neuronais de outras espécies, como SH-SY5Y (humano), CF-10 (camundongo) e NB100 (humano), também apresentam co-expressão das formas de 70 e 100 kDa. Em geral, foi observado o perfil de 70 kDa para a ADAM23 expressa no encéfalo e em células de linhagem neuronal e o perfil de 100 kDa para a ADAM23 expressa em tumor. A relevância da razão de expressão das duas formas de ADAM23 para a função desta proteína no sistema nervoso central bem como no desenvolvimento do fenótipo tumoral merece ser melhor investigada.

Quando as proteínas da superfície de células N2A vivas foram derivatizadas por biotina e, em seguida, enriquecidas por afinidade à avidina-Agarose (Figura 18, linha 4), foi observada apenas a forma processada de 70 kDa. Estes resultados sugerem que a forma processada de 70 kDa está do lado externo da membrana plasmática e que a forma de 100 kDa está dentro da célula ou não acessível à biotilação. Não está bem elucidado se a forma de 70 kDa pode ser encontrada dentro da célula como forma pré-endereçada à superfície ou pós-internalizada da superfície celular. Tendo em vista o conhecimento de que algumas ADAMs estão envolvidas no processamento proteolítico de proteínas na face extracelular da membrana plasmática e o seu ectodomínio pode ser liberado na forma solúvel para o meio (*shedding*), foi investigado se a ADAM23 poderia também ser processada desta forma.

No sobrenadante de cultura de células HEK-293T transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA (Figura 18, linha 5) não foi identificada nenhuma das formas da ADAM23, sugerindo que nestas condições experimentais não há secreção da ADAM23 na forma solúvel para o meio extracelular, sendo que a mesma não sofre *shedding* e se encontra na membrana celular na forma não-processada. Além disso, essa proteína não atua como shedase, como ocorre com as demais ADAMs, uma vez que o seu domínio metaloprotease é cataliticamente inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

Em extrato de células N2A enriquecido por conA foi possível observar apenas a forma de 100 kDa da ADAM23 (Figura 18, linha 3), o que não significa que o processamento não tenha ocorrido e nem que a forma de 70 kDa não esteja presente. Isso pode ser explicado por uma diferença na quantidade de massa de

extrato utilizada, quase duas vezes menor do que a massa de extrato de células de neuroblastoma N2A utilizada no ensaio anterior (Figura 17, linha 5). Neste ensaio anterior, foram observadas ambas as formas da ADAM23 na amostra enriquecida por conA, sendo a de 100 kDa em maior intensidade, novamente sugerindo uma maior afinidade dessa resina pelas formas não-processadas e com maior grau de glicosilação da ADAM23 (Figura 17, linha 5 e Figura 18, linha 3). Como explicado anteriormente, a remoção do pró-domínio por furinas leva a uma perda de 4 sítios putativos glicosilados e, com isso, ocorre uma redução da massa molecular da proteína.

5.3 Clonagem dos três construtos do ectodomínio da ADAM23

O ectodomínio da ADAM23 foi clonado com e sem o pró-domínio fusionado a uma região Fc de uma imunoglobulina IgG1 humana na região C-terminal, a fim de se avaliar o processamento do ectodomínio em diferentes linhagens celulares de mamífero, bem como as suas formas secretadas e de se obter as proteínas Fc quiméricas solúveis nos sobrenadantes de cultura dessas linhagens.

As construções dos vetores pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2, pINFUSE-ADAM23C2-hIgG1-Fc2, pcDNA3.1-hIgG1-Fc2 e pcDNA3.1-ADAM23C3-hIgG1-Fc2 em geral foram bem-sucedidas. Entretanto, foi identificada uma mutação na sequência molde da ADAM23 obtida a partir do vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA, cedido pelo grupo de Cal e colaboradores (2000). A alteração na estrutura secundária do ectodomínio da ADAM23, que ocorreu nos três construtos, devido à mutação com alteração de lisina para prolina, apresentou uma mudança de uma folha β entre duas α -hélices para uma α -hélice e está representada na Figura 32. É importante lembrar que essa alteração já estava presente no cDNA molde da ADAM23 proveniente do vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA cedido por Cal e colaboradores (2000). Esta mutação se encontra na região do domínio metaloprotease, e, apesar de ter ocasionado uma alteração na estrutura secundária, não se sabe se a mesma afeta a função deste domínio e da ADAM23 humana como um todo.

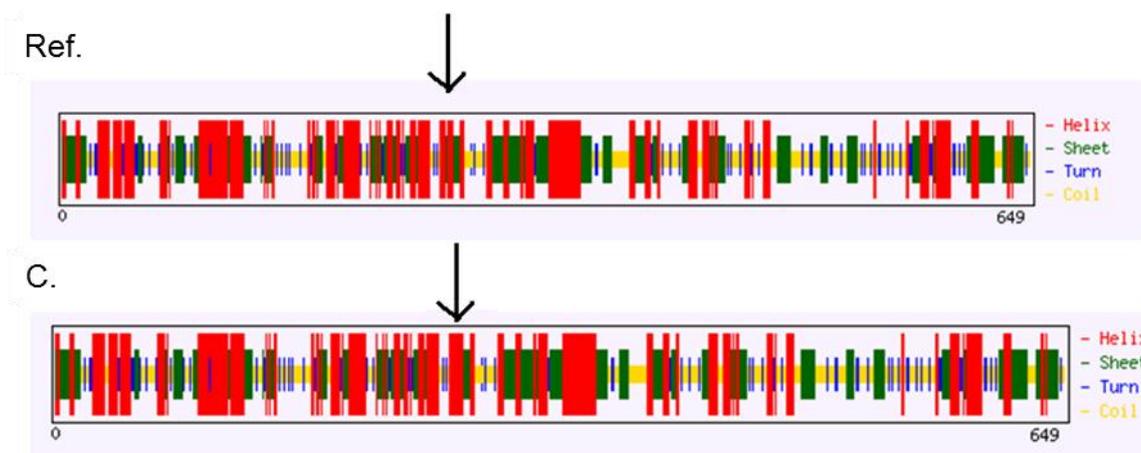


FIGURA 32 - ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA ADAM23 DEVIDO A UMA MUTAÇÃO PRESENTE NO CDNA DESSA PROTEÍNA UTILIZADO COMO MOLDE

NOTA: Essa alteração vale para os três construtos. **Ref.**, estrutura secundária da proteína com base na sequência-referência (sequência da ADAM23 humana, NM_003812.3 do banco de dados do NCBI) e **C.**, estrutura secundária da proteína com base na sequência obtida por sequenciamento da ADAM23. Uma mutação pontual presente no cDNA da ADAM23, levou a uma troca de uma T por C (códon CTT para CCT), alterando a sequência de aminoácidos de lisina para prolina. A seta mostra o ponto exato onde ocorreu a alteração de uma folha β entre duas α -hélices para uma α -hélice.

FONTE: A Autora (2015).

5.4 Expressão das quimeras ADAM23C1, C2 e C3 nas linhagens HEK-293T, N2A e CHO-K1

O padrão de bandas das três quimeras se assemelha nas três linhagens para a reação com anti-ADAM23. Além disso, foi possível constatar uma relação quase biunívoca entre as bandas detectadas com o anti-IgG e o anti-ADAM23, apesar de um número maior de bandas ser evidenciado pelo anti-ADAM23, tanto no extrato quanto no sobrenadante. Esse maior número de bandas identificadas deve-se à presença de formas processadas e/ou não-processadas das três proteínas quimeras, indicando que pode ter ocorrido algum processamento em alguma região dessas construções, variando conforme a linhagem celular, afetando ou não o reconhecimento pelo anti-IgG humana ou a afinidade à proteína A-Sepharose.

Quanto à secreção das quimeras C1 e C2, as linhagens N2A e CHO-K1 pareciam mais eficientes do que a linhagem HEK-293T, com relação à secreção das quimeras e à detecção relativa das mesmas presentes no extrato e no sobrenadante

(Figura 26, painéis A e C). Por outro lado, as células 293T (Figura 26, painel B) foram as que produziram maior quantidade absoluta das três construções protéicas, tanto no extrato quanto no sobrenadante em relação às outras duas linhagens (Figura 26, painel B).

A diferença em relação à reação com o anticorpo anti-IgG pode estar relacionada com o processamento dessas proteínas por PCs ou outras enzimas de clivagem, que eventualmente podem estar removendo um fragmento da região Fc dessas quimeras. Dependendo da linhagem celular, o fragmento da Fc que estaria sendo removido poderia ser ou o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG humana ou o sítio de ligação à proteína A-Sepharose. Por sua vez, o epítipo de reconhecimento das quimeras pelo anti-ADAM23 estaria sendo mantido. De fato, quando IgG humana foi utilizada como controle positivo em uma das reações de *western blotting*, foi possível observar que a reação do anti-hIgG promove reação robusta frente ao antígeno (Figura 31A, linha 2), sugerindo múltiplos epítopos de reconhecimento da IgG pelo anti-IgG. Como as quimeras possuem apenas os dois domínios da região Fc de IgG humana (CH2 e CH3), é de se esperar que o reconhecimento destas pelo anti-IgG seja menos robusto.

No caso da reação com anti-ADAM23, a linhagem de neuroblastoma N2A apresentou a mais eficiente secreção das três proteínas quiméricas, uma vez que a maior abundância das quimeras foi observada nas amostras de sobrenadantes de meio de cultura, enquanto que nos extratos celulares, exceto pelo extrato da transfecção com a ADAM23C1 (Figura 26, painel inferior da N2A), quase não foi possível observar a presença dessas proteínas quiméricas, o que não significa que elas não estejam presentes em menor quantidade do que nos sobrenadantes de cultura. A linhagem de rim de embrião humano, HEK-293T, foi a única que apresentou uma quantidade de proteínas quiméricas secretadas semelhante à sua quantidade intracelular (Figura 26, painel inferior da HEK-293T). Em relação às outras linhagens, a HEK-293T apresentou alta secreção das proteínas quiméricas. A linhagem de ovário de hamster, CHO-K1, apresentou boa secreção das quimeras ADAM23C1 e ADAM23C2, entretanto, não foi observada a secreção da ADAM23C3 (Figura 26, painel inferior da CHO-K1).

No caso do reconhecimento das proteínas quiméricas por anti-IgG humana, foi possível observar nas linhagens N2A e HEK-293T uma expressão e secreção satisfatórias da ADAM23C1 e ADAM23C2, cujas respectivas bandas foram observadas com a massa molecular esperada. Além disso, fragmentos de menor massa molecular também foram detectados para ambas as construções, indicando que ocorreu processamento.

Outros estudos detectaram formas processadas e não processadas do ectodomínio de outras ADAMs humanas, inclusive sem a sequência do peptídeo sinal endógeno e fusionadas a uma região Fc (domínios CH2 e CH3) de uma IgG humana em sobrenadantes de cultura de células de mamífero transfectadas com esses construtos. Lum e colaboradores (1998) avaliaram o processamento da ADAM15 humana (hADAM15-Fc) e murina (mADAM15-Fc) em células COS-7. Esse grupo utilizou o ectodomínio de cada ADAM15 sem a sequência sinal endógena da ADAM15 fusionado a uma região Fc de uma IgG humana, que estava presente no vetor pcDNA3-IgG-Fc, formando hADAM15-Fc e mADAM15-Fc. Esses construtos são semelhantes aos construtos da ADAM23, principalmente da ADAM23C1 e ADAM23C2, que não contêm o peptídeo sinal endógeno. Os construtos da ADAM15 foram utilizados na transfecção também transiente, porém, de células COS-7. Os sobrenadantes de cultura de células transfectadas com os construtos da ADAM15 foram enriquecidos em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose. Essas amostras foram avaliadas em condições redutoras através de SDS-PAGE, assim como no presente projeto. Em sobrenadante de células COS-7, foram detectadas as formas não-processada (140 kDa) e processada (125 kDa) de hADAM15-Fc (LUM *et al.*, 1998), indicando que, no presente trabalho, pode ter ocorrido o processamento do ectodomínio da ADAM23 humana em células HEK293T, N2A e CHO-K1, devido à detecção das formas de menor massa molecular. Por exemplo, para a construção ADAM23C1, em N2A, foram identificadas formas com massa molecular menor do que a esperada (114,9 kDa).

Outro grupo utilizou a ADAM10 fusionada a região Fc de IgG1 humana, contendo a região de dobradiça e os domínios CH2 e CH3, para avaliar a inibição da atividade da ADAM10 por TIMP-1 e TIMP-3 (AMOUR *et al.*, 2000). Este grupo

também purificou com sucesso a proteína Fc quimérica ADAM10-Fc por cromatografia de afinidade à proteína A-sepharose e detectou a presença da região Fc por *western blotting* com anticorpo anti-Fc humana, como foi feito no presente trabalho. Amour e colaboradores (2000) observaram nos ensaios de *western blotting* diferentes massas moleculares da ADAM10-Fc e sugeriram que a massa maior, de 65 kDa, apresentava o domínio catalítico e a menor, de 31 kDa, representava a ADAM10-Fc sem o domínio catalítico. Portanto, a ADAM10-Fc sofreu degradação proteolítica do domínio catalítico, provavelmente por metaloproteinase, da região de dobradiça (*hinge*) da porção Fc, que é proteoliticamente sensível (AMOUR *et al.*, 2000). Esse processamento proteolítico também pode ter ocorrido na mesma região Fc dos construtos da ADAM23-Fc no presente trabalho, o que pode ser responsável pelo surgimento das formas processadas.

Uma maneira de evitar a degradação proteolítica de proteínas Fc quiméricas é condicionar o meio de cultura celular com inibidores de enzimas proteolíticas que previnem esta degradação. Amour e colaboradores (2000) utilizaram meio condicionado com MMPI BB94, um inibidor de metaloprotease, em linhagem de mieloma murino NS0 transfectado com ADAM10-Fc para evitar a degradação proteolítica de Fc. Ao utilizar meio não condicionado, não foi mais possível observar a forma maior, com 65 kDa. Este método poderia ser utilizado para confirmar o processamento de um fragmento da região Fc de IgG dos construtos da ADAM23 humana, que pode ser o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG no presente trabalho. Amour e colaboradores (2000) purificaram a ADAM10-Fc do sobrenadante de cultura por cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose, como foi feito para os construtos da ADAM23 no presente trabalho.

Outro grupo utilizou a proteína Fc quimérica contendo o domínio extracelular (ectodomínio) da ADAM17 (ADAM17-Fc), uma enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), também conhecida por TACE (do inglês, *TNF- α Converting Enzyme*), como substrato em ensaios de espalhamento e adesão celular de fibroblastos (BAX *et al.*, 2004). O construto ADAM17-Fc foi expresso também em células de mamífero COS-1, que, ao serem transfectadas foram cultivadas em meio livre de imunoglobulinas, removidas por cromatografia de afinidade à proteína G-Sepharose, para evitar interferência de outras Igs nos ensaios. A ADAM17-Fc foi

purificada dos sobrenadantes de cultura também por cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose, como foi feito para os construtos Fc quiméricos da ADAM23 humana no presente trabalho. Através de SDS-PAGE, diferenças de massa molecular entre as formas de ADAM17-Fc foram observadas. Em condições redutoras, foram observadas formas de 120 e 140 kDa, indicando as formas processada e precursora da ADAM17. A forma de 120 kDa sofreu uma remoção do pró-domínio no sítio intra-molecular de clivagem por furina situado entre o pró-domínio e o domínio metaloprotease. Esse tipo de processamento pode ter ocorrido no presente trabalho com a ADAM23C3, na qual se supõe que houve perda do peptídeo sinal e do pró-domínio, uma vez que esta construção apresentou massa molecular semelhante à C2, que não continha o pró-domínio.

Em condições não-redutoras, uma forma de 250 kDa foi observada, indicando a presença de dímeros de ADAM17-Fc de 120 e 140 kDa ligados por pontes dissulfeto (BAX *et al.*, 2004). Todas essas formas da ADAM17-Fc reagiram satisfatoriamente com anticorpos anti-Fc e anti-ADAM17. No presente trabalho, as formas da ADAM23-Fc foram satisfatoriamente reconhecidas pelos anticorpos anti-IgG e anti-ADAM23 nos sobrenadantes de cultura de células HEK-293T e N2A.

Com a utilização de proteínas Fc quiméricas, foi possível observar que a ADAM17 promove a adesão, espraiamento e migração de dermofibroblastos humanos e de outros tipos celulares. A adesão celular dependente de ADAM17 é mediada pela integrina $\alpha 5\beta 1$ (BAX *et al.*, 2004). A atividade de ligação às integrinas está presente no domínio desintegrina/região rica em cisteína da ADAM17. ADAM17 está co-localizada com $\alpha 5\beta 1$ em junções celulares e em protrusões de membrana em células HeLa que estão migrando. A ADAM17 age como um ligante específico da integrina $\alpha 5\beta 1$. A interação é mediada tanto pelo domínio desintegrina como pela região rica em cisteína da ADAM17 (BAX *et al.*, 2004). Assim como a ADAM17, as ADAM23-Fc quiméricas desenvolvidas no presente trabalho são ferramentas relevantes para investigar o papel do ectodomínio da ADAM23 nos eventos de adesão, migração, proliferação e interação com integrinas de superfície celular e com outros possíveis ligantes.

Na linhagem CHO-K1 houve secreção e reconhecimento de C1 e C2 nos sobrenadantes de cultura. Essas duas proteínas quiméricas estiveram presentes

apenas na forma não-processada (Figura 26, painel superior da CHO-K1). Isso pode indicar que, nesta linhagem celular, o processamento intracelular das quimeras C1 e C2 pode não ter ocorrido levando à secreção das mesmas inteiras.

Apesar de uma parte de algumas das quimeras ter sofrido clivagem e ter sido detectada com massa molecular menor, todas as linhagens apresentaram as formas Fc quiméricas ADAM23C1 e ADAM23C2 com massas moleculares esperadas. A proteína quimérica ADAM23C3 foi identificada sempre na forma menor do que a esperada, ou seja, na forma processada, cuja massa molecular seria de 115 kDa, nas três linhagens celulares. Nas linhagens N2A e HEK-293T a ADAM23C3 foi observada sempre numa forma de menor massa molecular do que a esperada para essa construção no sobrenadante, indicando que houve secreção da mesma. A presença da forma de menor massa molecular sugere que o peptídeo sinal endógeno da ADAM23 foi adequadamente processado e funcionou como peptídeo de secreção nestas linhagens celulares, cumprindo a mesma função do peptídeo sinal da IL-2 (presente no *backbone* do vetor pINFUSE antes do sítio de policlonagem), e que não estava presente no *backbone* do vetor pcDNA3.1, ficando com massa molecular semelhante à construção ADAM23C2. Na linhagem CHO-K1, a ADAM23C3 não foi observada no sobrenadante de cultura submetido à purificação por proteína-A (Figura 26, painel inferior da CHO-K1). Diferenças nas enzimas, mecanismo de processamento e na secreção de proteínas poderiam explicar a diferença de processamento da ADAM23C3 quimérica entre a CHO-K1 e as demais linhagens.

A diferença no processo de secreção de cada quimera está diretamente relacionada com a diferença de processamento em cada linhagem. Isso pode explicar por que elas são ou não secretadas em maior ou menor intensidade. Além disso, o processamento pode ter ocorrido em locais específicos da região Fc ou em outros locais. Isso se deve ao fato de algumas proteínas terem sido identificadas numa forma processada apenas no extrato celular, mas não no sobrenadante de cultura da mesma amostra. Por exemplo, na linhagem CHO-K1, um processamento aberrante da ADAM23C3 pode ter ocorrido, clivando erroneamente o fragmento correspondente ao peptídeo sinal endógeno, responsável por endereçar a ADAM23 para a superfície celular, ou removendo o sítio de ligação à proteína A-sepharose,

mas não o sítio de reconhecimento pelo anti-IgG humana, presentes na região Fc da IgG, ocorrendo, portanto, o contrário das outras duas linhagens (a ser abordado no item 5.5).

Por outro lado, nas linhagens HEK-293T e N2A, a ADAM23C3 foi observada na forma processada, no sobrenadante, indicando que pode ter ocorrido um processamento adequado que levou à remoção do peptídeo sinal endógeno e do pró-domínio da ADAM23, ficando com massa molecular semelhante à construção ADAM23C2, que não tinha pró-domínio e que perdeu o peptídeo sinal da IL-2 (presente no *backbone* do vetor pINFUSE antes do sítio de policlonagem como explicado anteriormente) durante o processamento. A ADAM23C1 e a ADAM23C2, apesar de não possuírem o peptídeo sinal endógeno, foram satisfatoriamente secretadas no sobrenadante de cultura das três linhagens, indicando que essa secreção foi garantida pela presença da sequência sinal de secreção IL-2ss dessas quimeras. Em N2A e HEK-293T, as proteínas ADAM23C1 e ADAM23C2 foram identificadas por ambos os anticorpos em suas formas processadas e não-processadas, confirmando a presença da “tag” de Fc em todas as formas matura e imatura, e, que, portanto, o processamento pode ter ocorrido ou em outra região das moléculas ou em um fragmento curto e específico da região Fc, como o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG. Ainda não está claro em qual fragmento dessas duas proteínas pode ter ocorrido o processamento por PCs. Entretanto, isso poderia ser esclarecido incubando-se as mesmas membranas dos resultados da Figura 26 diretamente com proteína A-Sepharose HRP, principalmente para detectar em HEK-293T as formas processadas de ADAM23C1 de menor massa molecular do que a esperada, que foram detectadas nesta mesma linhagem no outro ensaio de afinidade dos sobrenadantes à proteína-A (Figura 27), mas que não foram detectadas pelo anti-IgG (Figura 26, painel superior de HEK293T, reação com anti-IgG). Outra explicação para a não-deteccção das quimeras em alguns casos, tanto nos extratos quanto nos sobrenadantes, é que a quantidade de proteína traduzida pode ter sido tão baixa, a ponto de estar fora do limite de deteção do método empregado (*western blotting*).

Outro estudo utilizando uma proteína quimérica recombinante consistindo no domínio extracelular inteiro (ectodomínio) da meltrina y (ADAM9) fusionada à porção

Fc de uma IgG1 humana (Melg-Fc) foi realizado para identificar ligantes da ADAM9 (NATH *et al.*, 2000). Neste estudo, a proteína quimérica foi purificada dos sobrenadantes de células transfectadas das linhagens COS e NS0 (mieloma murino), através de cromatografia de afinidade à proteína A-sepharose, assim como foi feito no presente trabalho para as quimeras de ADAM23-Fc. A proteína quimérica Melg-Fc (ADAM9-Fc) purificada de 90 kDa foi resolvida por SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras e observou-se uma diferença de massa molecular sob estas diferentes condições. Em condições não-redutoras, a proteína migra a cerca de 180 kDa, como esperado para uma forma dimérica da proteína de fusão cujas ligações são por pontes dissulfeto na região de dobradiça (*hinge*) da porção Fc (NATH *et al.*, 2000). Dessa forma, em condições redutoras, as proteínas Fc quiméricas podem apresentar uma massa molecular menor correspondente ao monômero, quando observadas por SDS-PAGE e *western blotting*. Apesar de no presente trabalho não terem sido utilizadas condições não redutoras, mas apenas redutoras, pode-se sugerir que ocorreu um processamento das quimeras de ADAM23, levando à presença de formas de menor e maior massa molecular, ambas monoméricas. Isso se deve ao fato de que as formas maiores identificadas apresentaram exatamente a massa molecular esperada para os monômeros dessas construções. Além disso, a ADAM23C3, ao sofrer processamento e perder o pró-domínio e o peptídeo sinal endógeno, apresentou massa molecular semelhante à da ADAM23C2, que foi construída sem este domínio.

A forma observada por Nath e colaboradores (2000) corresponde ao domínio metaloprotease, seguido do domínio desintegrina, da região rica em cisteína, do domínio EGF da meltrina γ (ADAM9) e da região de dobradiça e a cadeia constante (CH2 e CH3) da região Fc de IgG1 humana. Essa ferramenta construída por este grupo foi importante para a identificação de possíveis ligantes da ADAM9 e para os ensaios de adesão celular envolvendo ADAM9-Fc. Com isso, observou-se que Melg-Fc se liga a fibroblastos de maneira dependente de cátion divalente e medeia a adesão celular através de seu domínio desintegrina. As células tratadas com essa proteína Fc quimérica (Mely-Fc), mas não com laminina, apresentaram migração. A meltrina γ é uma ADAM expressa na superfície celular de uma variedade de células. Dessa forma, a ADAM9 funciona como uma molécula de adesão celular se ligando à

integrina $\alpha 6\beta 1$, sendo que fibrosarcomas podem migrar mais sobre a ADAM9 imobilizada de uma maneira dependente de $\alpha 6\beta 1$ do que sobre a laminina (NATH *et al.*, 2000). Do mesmo modo que para o construto da ADAM9-Fc, os construtos contendo o domínio extracelular da ADAM23-Fc desenvolvidos no presente trabalho também são importantes para a identificação de ligantes da ADAM23 e para o estudo do seu papel na adesão celular e interação com integrinas.

Outro grupo utilizou sequências da ADAM22 e ADAM23 para construir proteínas Fc quiméricas contendo o ectodomínio da ADAM (ADAM22-ED-Fc) com o objetivo de avaliar a ligação da ADAM22 com LGI4, proteína 4 rica em leucina inativada em glioma (do inglês, *Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 4*), uma proteína ligante de ADAMs (OZKAYNAK *et al.*, 2010). Células HeLa e HEK-293T foram transfectadas com ADAM22-ED-Fc através de lipofectamina ou fosfato de cálcio. No presente trabalho, células HEK-293T foram transfectadas transientemente com os construtos da ADAM23-Fc através de fosfato de cálcio e células N2A com lipofectamina. No caso da ADAM22-ED-Fc, a mesma também foi purificada dos sobrenadantes de cultura por cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose, assim como os construtos da ADAM23-Fc. As proteínas Fc quiméricas da ADAM22 purificadas foram incubadas com sobrenadante de células CHO que expressam e secretam LGI4 e novamente precipitadas por proteína A-Sepharose. A ADAM22-Fc precipitou eficientemente LGI4 do sobrenadante de cultura. Dessa forma, Ozkaynak e colaboradores (2010) demonstraram que a ligação de LGI4 à ADAM22 não requer outros receptores de membrana e que a ligação depende do domínio de ligação à integrina na ADAM22. Além da ADAM22, LGI4 se liga também à ADAM11 e à ADAM23, as quais também são expressas em células de Schwann e neurônios sensoriais (OZKAYNAK *et al.*, 2010). LGI2 e LGI3, proteínas 2 e 3 ricas em leucina inativadas em glioma, também são expressas nos nervos periféricos e se ligam respectivamente à ADAM11 e a ambas ADAM22/ADAM23. Dessa forma, os construtos desenvolvidos no presente trabalho contendo o ectodomínio da ADAM23 são importantes na validação da ligação de proteínas à ADAM23, como as proteínas ligantes ricas em leucina inativadas em glioma (LGIs).

ADAM22 pertence a uma pequena subfamília das ADAMs, que inclui ADAM23 e ADAM11, que são predominantemente expressas no sistema nervoso

(YANG *et al.*, 2006). A ADAM22 assim como ADAM23 e ADAM11, não apresenta atividade de metaloprotease e, portanto, essas ADAMs parecem funcionar como receptores de integrinas através do domínio desintegrina (YANG *et al.*, 2006). As formas solúveis do ectodomínio da ADAM22 inibem a proliferação celular de uma maneira dependente de integrina (D'ABACO *et al.*, 2006). As ferramentas quiméricas da ADAM23, que são formas solúveis do seu ectodomínio, desenvolvidas neste projeto podem ser úteis no estudo de uma inibição da proliferação celular através de interação com integrinas.

Outra proteína Fc quimérica (disADAM28-Fc ou rDis-Fc) foi utilizada em um estudo sobre o papel da ADAM28 (MDC-L) na adesão celular de linfócitos T (BRIDGES *et al.*, 2002). A construção da proteína quimérica foi feita com a região Fc de uma IgG3 humana, diferentemente dos casos anteriores que utilizaram a IgG1. As proteínas Fc quiméricas foram concentradas do sobrenadante de cultura por polietilenoglicol (PEG) e purificadas por cromatografia de afinidade à proteína G-Sepharose, diferentemente dos outros estudos que utilizaram A-Sepharose. Entretanto, ambas as proteínas A e G-Sepharose têm afinidade por IgGs.

O domínio desintegrina da ADAM28 (rDis-Fc) promove a adesão de linhagem de linfoma (linfócitos T Jurkat), à qual se liga de maneira dependente de cátions divalentes. O domínio desintegrina da ADAM28, que é expressa na superfície de linfócitos, é reconhecido pela integrina $\alpha 4\beta 1$ (BRIDGES *et al.*, 2002). A disADAM28-Fc (rDis-Fc) imobilizada foi utilizada em ensaios de adesão celular de linfoblastos transfectados com a subunidade $\alpha 4$ de integrina. O domínio desintegrina da ADAM28, sozinho ou associado com os domínios rico em cisteína e EGF, promoveu a adesão de linfoblastos K562 $\alpha 4\beta 1^{+/+}$ (BRIDGES *et al.*, 2002). Peptídeos de fibronectina inibiram a interação de células Jurkat com o domínio desintegrina da ADAM28.

A adesão celular e a ligação do domínio desintegrina da ADAM28 ao receptor foram inibidas pelo bloqueio com anticorpos monoclonais anti- $\alpha 4$ e anti- $\beta 1$. Semelhantemente à ligação de fibronectina e da molécula de adesão VCAM-1 às células Jurkat, o reconhecimento do domínio desintegrina da ADAM28 necessitou de ativação exógena da integrina $\alpha 4\beta 1$ pela adição de cátion divalente Mn^{2+} ou de anticorpo anti- $\beta 1$ (BRIDGES *et al.*, 2002). Segundo Bridges e colaboradores (2002),

a ligação da integrina $\alpha 4\beta 1$ com a ADAM28 pode estar envolvida nas interações linfócitos-leucócitos e/ou na regulação da atividade proteolítica sequestrando ou inativando a protease. O domínio desintegrina da ADAM28 também pode interagir com outras integrinas.

A interação de células Jurkat com ADAM28-Fc recombinante sem o domínio metaloprotease e sem a região citoplasmática também foi avaliada por Bridges e colaboradores (2002). Com o uso de anticorpos monoclonais anti-integrinas, peptídeos que mimetizam a ligação e células transfectadas, o mesmo grupo de pesquisa determinou que $\alpha 4\beta 1$ é especificamente responsável pela ligação de linfócitos Jurkat ao domínio desintegrina da ADAM28 imobilizado na superfície da placa de cultura. A interação $\alpha 4\beta 1$ -ADAM28 deve ocorrer na membrana celular ou envolvendo formas secretadas desta ADAM. Dessa forma, com os construtos da ADAM23-Fc desenvolvidos no presente trabalho, pode ser possível não apenas estudar a interação das integrinas com a ADAM23 solúvel ou não, mas também a localização dessas interações. Análise da ligação de rDis-Fc solúveis às células Jurkat por citometria de fluxo mostrou que este domínio desintegrina se ligou à integrina $\alpha 4\beta 1$ de uma maneira saturada dependente de concentração (BRIDGES *et al.*, 2002).

Outro estudo semelhante foi realizado com as proteínas Fc quiméricas disADAM28-Fc, disADAM7-Fc, disADAM33-Fc e disADAM12-Fc fusionadas a uma porção Fc de IgG3 humana para o reconhecimento do domínio desintegrina das ADAMs por integrinas de linfócitos (BRIDGES *et al.*, 2005). Nesse estudo, a cadeia pesada da porção Fc de IgG3 humana não possuía a região de dobradiça para evitar a dimerização das proteínas quiméricas mediada por Fc. Os sobrenadantes de cultura contendo as proteínas Fc quiméricas foram concentrados também com polietilenoglicol (PEG), purificados por proteína G-Sepharose e avaliados por SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras, o que mostrou que os domínios desintegrinas purificados não apresentaram nenhuma perturbação estrutural aberrante que resultaria na formação de uma ponte dissulfeto aberrante. As proteínas quiméricas Dis-Fc e fibronectina foram imobilizadas em placas de cultura nos ensaios de adesão celular. Os domínios desintegrinas da ADAM7 (disADAM7-Fc) e da ADAM33 (disADAM33-Fc) foram testados na adesão de células Jurkat. Foi

observado então que a disADAM7-Fc induz a adesão celular de linfócitos Jurkat de maneira dose-dependente (BRIDGES *et al.*, 2005), assim como previamente descrito para a disADAM28-Fc (BRIDGES *et al.*, 2002). Com os construtos contendo o ectodomínio da ADAM23 fusionada à região Fc da IgG desenvolvidos no presente trabalho, também pode ser possível avaliar o papel do domínio desintegrina da ADAM23 na adesão de vários tipos celulares de maneira dose-dependente ou não. Essas proteínas ADAM23-Fc quiméricas podem ser imobilizadas em placas de cultura nos ensaios de adesão.

Foi demonstrado que o domínio desintegrina da ADAM28 apresenta uma maior avidéz pela integrina $\alpha 4\beta 7$ do que o da ADAM7 e que os domínios desintegrinas das ADAMs 7, 28 e 33 são reconhecidos pela integrina $\alpha 9\beta 1$. Os domínios desintegrina homólogos de ADAM28 e ADAM7 são reconhecidos pelas integrinas de leucócitos $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha 9\beta 1$. Nesse estudo, os domínios desintegrinas foram escolhidos para a construção das proteínas Fc quiméricas (Dis-Fc) porque representam um sistema modelo para o endereçamento das propriedades das ADAMs em se ligar às integrinas (BRIDGES *et al.*, 2005). Ambos os domínios desintegrina da ADAM28 e da ADAM7 são reconhecidos pelas integrinas de superfície de linfócitos $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$. Em contraste com $\alpha 4\beta 1$, o domínio desintegrina da ADAM28 promoveu um nível maior de adesão celular dependente de $\alpha 4\beta 7$ se comparado com o domínio desintegrina da ADAM7, indicando que existe uma preferência da integrina por aquela ADAM (BRIDGES *et al.*, 2005). Inspirado nisso, com as três proteínas ADAM23-Fc quiméricas obtidas com o presente trabalho, seria possível, inclusive, avaliar a preferência de determinada(s) integrina(s) pelo domínio desintegrina da ADAM23 humana.

5.5 Avaliação da afinidade das proteínas quimeras ADAM23C1, C2 e C3 à proteína A-Sepharose

Na reação com anti-ADAM23, foi possível observar afinidade das três proteínas Fc quiméricas com proteína A-Sepharose apenas nos sobrenadantes de N2A e HEK-293T, confirmando a secreção das mesmas. De acordo com o manual

do fabricante da proteína A-Sepharose, a mesma tem maior afinidade pela região Fc de IgG humana do que pela região Fc de outros tipos de imunoglobulinas. As proteínas Fc quiméricas ADAM23C1 e ADAM23C2 dos sobrenadantes de N2A apresentaram maior afinidade à proteína A-Sepharose, confirmando a presença da etiqueta de Fc (Figura 27, painel da N2A). Nessa linhagem, foi possível identificar as formas processadas dessas duas proteínas tanto nas amostras de extratos celulares como nos sobrenadantes de cultura. A ADAM23C3 foi observada apenas em sua forma processada em ambas as amostras (extrato e sobrenadante). A presença das formas processadas das ADAMs quiméricas nos sobrenadantes, que apresentaram afinidade à proteína A-Sepharose pela região Fc da IgG, pode indicar que o processamento esteja ocorrendo em outro local da região Fc, clivando outro fragmento que não seja o sítio de ligação à proteína A-Sepharose. O processamento pode ter removido o epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG humana localizado na região Fc da IgG. Além disso, não ocorreu nenhum processamento aberrante do peptídeo sinal de secreção da IL-2, uma vez que o mesmo funcionou adequadamente no endereçamento das quimeras para a via de secreção. Neste caso, ainda não está claro qual região da molécula pode ter sofrido o processamento.

Na linhagem de HEK-293T, foi possível observar uma intensidade maior das formas processadas de todas as três proteínas Fc quiméricas em relação às formas não-processadas tanto nas amostras de extratos celulares como nos sobrenadantes de cultura. Além disso, foi possível observar uma intensidade maior de moléculas quiméricas intracelulares do que secretadas para o sobrenadante de cultura, inclusive se comparada com a linhagem N2A. Em 293T, a ADAM23C3 foi observada apenas em sua forma processada, embora tenha apresentado afinidade à proteína A-Sepharose (Figura 27, painel da HEK-293T). Constatou-se também que houve afinidade de C1 e C2 dos sobrenadantes pela proteína A-Sepharose, confirmando a presença da região Fc, indicando também que o processamento pode estar ocorrendo em outra região das moléculas que não esteja relacionada com a secreção das mesmas. O sítio de ligação à proteína-A deve estar situado em local diferente do epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG, pois a banda inferior do sobrenadante de ADAM23C1 incubado com A-Sepharose, forte em HEK-293T

(Figura 27), não aparece no sobrenadante não incubado com proteína-A nessa linhagem (Figura 26, painel superior da HEK-293T, reação com anti-IgG humana), indicando que houve um processamento do epítipo do anti-IgG mas não do sítio de ligação à proteína A. Sabe-se que a glicosilação das proteínas, variável em cada linhagem e espécie, pode ser reduzida ou eliminada com o processamento, influenciando também na estrutura e massa molecular das mesmas.

A ADAM23C1 e a ADAM23C2, apesar de não possuírem o peptídeo sinal endógeno da ADAM23, foram satisfatoriamente secretadas no sobrenadante de cultura das linhagens N2A e HEK-293T, indicando que essa secreção foi garantida pela presença da sequência IL-2ss (sinal de secreção) na região amino terminal da quimera. Nessas duas linhagens, a ADAM23C3 foi observada na forma processada, no sobrenadante, indicando que pode ter ocorrido um processamento por enzimas proteolíticas como as PCs do tipo furinas em outra região da proteína que não tem relação com a secreção nem com a afinidade pela proteína A-Sepharose e pelo anti-IgG.

Na linhagem CHO-K1, foi possível observar as proteínas quiméricas apenas nos extratos celulares, indicando que não houve ligação das proteínas Fc quiméricas dos sobrenadantes à proteína A-Sepharose e/ou que a secreção pode não ter ocorrido (Figura 27, painel da CHO-K1). Comparando com o resultado anterior, parece que as proteínas quiméricas, quando secretadas por esta linhagem, são apenas as de menor massa molecular, isto é, que passaram por algum tipo de processamento por enzimas de clivagem como as PCs. No caso de C1 e C2 secretadas no sobrenadante de CHO-K1, pode ter ocorrido a remoção do sítio de afinidade à proteína A-Sepharose, impedindo a interação das quimeras com a mesma. No caso de C1 e C2 intracelulares presentes no extrato de CHO-K1, pode ter ocorrido a remoção do epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG e/ou a remoção do sítio de ligação à proteína-A. No caso da ausência ADAM23C3 no sobrenadante dessa linhagem, pode ter ocorrido o processamento aberrante do peptídeo sinal endógeno, impedindo o correto endereçamento da ADAM23 para a superfície celular e, conseqüentemente, a sua secreção. Além disso, podem ter ocorrido em conjunto a remoção do epítipo de reconhecimento pelo anti-IgG e a remoção do sítio de afinidade à proteína A-Sepharose. Dessa forma, C3 somente pôde ser reconhecida

pelo anti-ADAM23 e em extrato celular. Uma diferença nas enzimas e mecanismo de processamento de proteínas poderia explicar a diferença de processamento da ADAM23 quimérica entre a CHO-K1 e as demais linhagens.

5.6 Avaliação dos métodos de concentração dos sobrenadantes de cultura contendo as proteínas quimeras secretadas

Os sobrenadantes que passaram por testes de enriquecimento de proteínas foram obtidos a partir de células HEK-293T transfectadas com as três construções ou somente com pINFUSE-ADAM23C1-hIgG1-Fc2. Um exemplo de combinação mais eficiente entre dois métodos de enriquecimento de proteínas quiméricas foi a precipitação por sulfato de amônio seguida de precipitação por metanol-clorofórmio. Dentre os métodos de precipitação que desnaturam as proteínas o mínimo possível estão as concentrações por sistemas de ultrafiltração com membrana de corte (e.g. Amicon) e a precipitação protéica por sulfato de amônio como descrita por Harlow e Lane (1988). Foi possível observar que a purificação de proteínas por ultrafiltração foi ineficiente. Além disso, devido à baixa concentração de quimeras no sobrenadante, foi necessário realizar uma precipitação por metanol-clorofórmio, para facilitar a detecção dessas proteínas por SDS-PAGE (Figura 28A), apesar de ser um método desnaturante de proteínas (convém salientar que este não é um método de purificação). Dessa forma, foi possível, através de reação com anticorpo anti-ADAM23, identificar as três proteínas quiméricas nos sobrenadantes de HEK-293T. As proteínas C1 e C2 foram observadas tanto nas formas processadas como nas não-processadas, porém, a ADAM23C3 foi identificada apenas na forma processada, conforme observado anteriormente nas demais linhagens.

A combinação da precipitação por sulfato de amônio seguida de concentração através de ultrafiltração se apresentou a menos eficiente (Figura 29A), apesar de ser uma combinação de métodos menos desnaturantes, menos agressivos para a estrutura das proteínas. Através de reação com anti-ADAM23, a proteína ADAM23C1 quimérica foi identificada nos sobrenadantes submetidos a cada método de enriquecimento. No caso da amostra enriquecida por precipitação com sulfato de

amônio (Figura 29A, linha 2), a ADAM23C1 foi reconhecida apenas na forma processada. As outras duas amostras apresentaram a ADAM23C1 tanto na forma processada quanto não-processada, embora a primeira tenha ocorrido em maior intensidade (Figura 29A, linhas 1 e 3).

Em uma comparação entre os métodos de enriquecimento da proteína ADAM23C1 por liofilização a vácuo combinada à precipitação por metanol-clorofórmio e precipitação por sulfato de amônio, observou-se que este último foi o menos eficiente em termos de recuperação protéica (Figura 30A, linha 2), por outro lado pode vir a ser o método de escolha para a obtenção das quimeras, por ser de baixo custo e manter a estrutura das proteínas. O método de precipitação por sal seguido de diálise levou a uma purificação eficaz de C1. Entretanto, não se pode afirmar, que a quantidade obtida dessa proteína foi maior. Em relação ao método da liofilização, as proteínas de sobrenadante de cultura precipitadas por sulfato de amônio apresentaram menor intensidade de reação.

Dessa forma, o método da precipitação com sal seguida de diálise, apesar de ser um método pouco eficiente no quesito quantitativo, parece ser o método mais eficiente na obtenção de proteínas mais purificadas (Figura 30A, linha 2). O método da liofilização a vácuo foi satisfatório na questão de rendimento. Embora alguma proteína possa ser perdida por entupimento/bloqueio do elemento filtrante, o método da ultrafiltração parece adequado para a recuperação de proteína diretamente do sobrenadante, ainda com a possibilidade de mudança da solução tampão. O uso sequencial de precipitação com metanol-clorofórmio foi utilizado apenas para permitir a análise da amostra por SDS-PAGE, uma vez que a mesma ainda permanecia muito diluída após a diálise. Este método é incompatível na obtenção de moléculas biologicamente ativas, pois a proteína precipitada por metanol-clorofórmio é de difícil ressolubilização. O uso de métodos de enriquecimento protéico não-desnaturantes é importante para a utilização dessas proteínas quiméricas concentradas e purificadas como bioferramentas em outros ensaios biológicos funcionais.

Nos sobrenadantes enriquecidos por precipitação por sulfato de amônio seguida de diálise e por liofilização a vácuo seguida de precipitação por metanol-clorofórmio, a ADAM23C1 foi reconhecida tanto na forma processada, quanto na

não-processada. A quantidade das proteínas quiméricas obtidas com ambos os métodos de concentração foi muito baixa em relação à quantidade de outras proteínas presentes nos sobrenadantes. Apesar da baixa quantidade de proteína detectável na coloração por coomassie, a reação das proteínas quiméricas com o anticorpo anti-ADAM23 foi satisfatória.

O sobrenadante de HEK-293T submetido à precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise apresentou uma maior abundância de proteínas totais e da ADAM23C1 (Figura 30C, linha 4). As amostras que não foram enriquecidas por nenhum método apresentaram menor abundância de ADAM23C1.

6 CONCLUSÕES

- ADAM23 é expressa no encéfalo de camundongo em suas formas imatura não-processada de 100 kDa e a forma madura com 70 kDa.
- Não foi possível observar a presença de nenhuma das formas de ADAM23 nos extratos celulares murinos de pulmão, testículo e rim, corroborando dados da não-detecção de mRNA de pulmão e testículo humanos obtidos por outros grupos.
- A linhagem MDA-MB-435, apresentou expressão da forma não-processada da ADAM23 de 100 kDa, complementando os estudos prévios que indicavam a presença de transcritos para ADAM23 nesta linhagem.
- Na linhagem N2A, foram identificadas tanto a forma processada de 70 kDa quanto a não-processada de 100 kDa da ADAM23.
- O enriquecimento em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose foi bem-sucedido para identificar a ADAM23 em diferentes amostras.
- Na linhagem N2A foi demonstrado que a forma processada de 70 kDa da ADAM23 encontra-se na face externa da membrana plasmática.
- A clonagem de diferentes sequências de ADAM23 em dois diferentes vetores de expressão foi bem sucedida.
- As proteínas quiméricas ADAM23C1, C2 e C3 foram satisfatoriamente expressas em células N2A e HEK-293T.
- A linhagem N2A apresentou a mais eficiente secreção das três proteínas quiméricas.
- Na linhagem CHO-K1, a ADAM23C3 foi observada apenas no extrato celular.
- A afinidade das três proteínas Fc quiméricas por proteína A-Sepharose foi detectada apenas nos sobrenadantes de N2A e HEK-293T.

- Uma diferença no mecanismo de processamento de proteínas poderia explicar a variação entre as formas das proteínas quiméricas identificadas em CHO-K1 e nas outras duas linhagens.
- O anticorpo monoclonal anti-ADAM23 (clone DL11C8) gerado previamente no laboratório reconheceu satisfatoriamente as formas processada e não-processada da ADAM23.

7 PERSPECTIVAS

O perfil de expressão e processamento das proteínas quiméricas desenvolvidas neste trabalho poderão ser estudados em outras linhagens celulares, como por exemplo, outras linhagens neuronais (e.g. SH-SY5Y, CF-10, NB100). Como a ADAM23 é bem expressa em células neuronais, pode ser que nestas linhagens haja uma maquinaria mais eficiente para a expressão e secreção das ADAM23 quiméricas. Essas informações seriam importantes para o entendimento das diferenças no mecanismo de processamento de proteínas entre linhagens celulares diferentes.

As proteínas Fc quiméricas poderão ser purificadas por cromatografia de afinidade à proteína A/G Sepharose e então utilizadas em estudos futuros sobre o trajeto intracelular e o processamento da ADAM23 e sobre os mecanismos de adesão, migração e proliferação celular envolvendo esta proteína.

REFERÊNCIAS

- ADLER, M., *et al.* Cysteine pairing in the glycoprotein IIb/IIIa antagonist kistrin using NMR, chemical analysis, and structure calculations. **Biochemistry**, v. 32. n. 1, p. 282-289, 1993.
- ALMEIDA, E. A., *et al.* Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. **Cell**, v. 81. n. 7, p. 1095-1104, 1995.
- AMOUR, A., *et al.* The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. **Febs Letters**, v. 524. n. 1-3, p. 154-158, 2002.
- AMOUR, A., *et al.* The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. **Febs Letters**, v. 473. n. 3, p. 275-279, 2000.
- ANDERS, A., *et al.* Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. **FASEB Journal**, v. 15. n. 10, p. 1837-1839, 2001.
- BARLAAM, B., *et al.* New alpha-substituted succinate-based hydroxamic acids as TNF alpha convertase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42. n. 23, p. 4890-4908, 1999.
- BARSHAVIT, R., *et al.* An Arg-Gly-Asp Sequence within Thrombin Promotes Endothelial-Cell Adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 112. n. 2, p. 335-344, 1991.
- BAX, D. V., *et al.* Integrin alpha(5)beta(1) and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279. n. 21, p. 22377-22386, 2004.
- BECKER, J. W., *et al.* Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. **Protein Sci**, v. 4. n. 10, p. 1966-1976, 1995.
- BLACK, R. A., *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385. n. 6618, p. 729-733, 1997.
- BLAUMUELLER, C. M., *et al.* Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. **Cell**, v. 90. n. 2, p. 281-291, 1997.
- BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v. 90. n. 4, p. 589-592, 1997.
- BLOBEL, C. P., *et al.* Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. **J Cell Biol**, v. 111. n. 1, p. 69-78, 1990.

BLOBEL, C. P.; WHITE, J. M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. **Curr Opin Cell Biol**, v. 4. n. 5, p. 760-765, 1992.

BLOBEL, C. P., *et al.* A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v. 356. n. 6366, p. 248-252, 1992.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477. n. 1-2, p. 267-283, 2000.

BRIDGES, L. C.; SHEPPARD, D.; BOWDITCH, R. D. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha 4 beta 1 and alpha 4 beta 7. **Biochemical Journal**, v. 387. p. 101-108, 2005.

BRIDGES, L. C., *et al.* The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin alpha(4)beta(1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 277. n. 5, p. 3784-3792, 2002.

BROOKS, P. C., *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the cell surface by interaction with integrin alpha v beta 3. **Faseb Journal**, v. 10. n. 6, p. 762-762, 1996.

CAL, S., *et al.* ADAM 23/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. n. 4, p. 1457-1469, 2000.

CALVETE, J. J. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Curr Pharm Des**, v. 11. n. 7, p. 829-835, 2005.

CHEN, M. S., *et al.* Evidence that distinct states of the integrin alpha 6 beta 1 interact with laminin and an ADAM. **Journal of Cell Biology**, v. 144. n. 3, p. 549-561, 1999.

CIDADE, D. A., *et al.* Molecular diversity of disintegrin-like domains within metalloproteinase precursors of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 48. n. 5, p. 590-599, 2006.

COHEN, S. N., *et al.* Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in-Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70. n. 11, p. 3240-3244, 1973.

COMINETTI, M. R., *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem**, v. 279. n. 18, p. 18247-18255, 2004.

COSTA, F. F., *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23. n. 7, p. 1481-1488, 2003.

COSTA, M. D. M. Caracterização da interação da proteína Adam23 com a proteína Prion Celular e avaliação da função biológica desta interação. v., 2011.

COSTA, M. D. M., *et al.* Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461. n. 1, p. 16-20, 2009.

D'ABACO, G. M., *et al.* ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain. **Neurosurgery**, v. 58. n. 1, p. 179-186; discussion 179-186, 2006.

ETO, K., *et al.* Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha(9)beta(1) - Implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277. n. 20, p. 17804-17810, 2002.

ETO, K., *et al.* RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **J Biol Chem**, v. 275. n. 45, p. 34922-34930, 2000.

EVANS, J. P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 8. n. 4, p. 297-311, 2002.

GALAZKA, G., *et al.* Spontaneous propeptide processing of mini-stromelysin-1 mutants blocked by APMA ((4-Aminophenyl)mercuric acetate). **Biochemistry**, v. 38. n. 4, p. 1316-1322, 1999.

GALLIANO, M. F., *et al.* Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha-actinin-2, is required for myoblast fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275. n. 18, p. 13933-13939, 2000.

GARLISI, C. G., *et al.* Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301. n. 1, p. 35-43, 2003.

GAULTIER, A., *et al.* ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277. n. 26, p. 23336-23344, 2002.

GHILARDI, C., *et al.* Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **Bmc Genomics**, v. 9. 2008.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78. n. 5, p. 647-658, 2004.

GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol Biotechnol**, v. 24. n. 2, p. 157-202, 2003.

GOMIS-RUTH, F. X., *et al.* Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. **Journal of Molecular Biology**, v. 239. n. 4, p. 513-544, 1994.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies : a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HAYASHI, K.; MADRI, J. A.; YURCHENCO, P. D. Endothelial-Cells Interact with the Core Protein of Basement-Membrane Perlecan through Beta-1 and Beta-3 Integrins - an Adhesion Modulated by Glycosaminoglycan. **Journal of Cell Biology**, v. 119. n. 4, p. 945-959, 1992.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 93. n. 3, p. 178-193, 2001.

HOWARD, L.; MACIEWICZ, R. A.; BLOBEL, C. P. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. **Biochem J**, v. 348 Pt 1. p. 21-27, 2000.

HOWARD, L., *et al.* Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. **J Biol Chem**, v. 274. n. 44, p. 31693-31699, 1999.

IBA, K., *et al.* The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **J Cell Biol**, v. 149. n. 5, p. 1143-1156, 2000.

INOUE, D., *et al.* Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. **J Biol Chem**, v. 273. n. 7, p. 4180-4187, 1998.

IZUMI, Y., *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKC delta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. **Embo Journal**, v. 17. n. 24, p. 7260-7272, 1998.

JACKSON, D. A.; BERG, P.; SYMONS, R. H. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40 - Circular Sv40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and Galactose Operon of Escherichia-Coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69. n. 10, p. 2904-&, 1972.

KANG, Q.; CAO, Y.; ZOLKIEWSKA, A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. **Biochem J**, v. 352 Pt 3. p. 883-892, 2000.

KANG, Q.; CAO, Y.; ZOLKIEWSKA, A. Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85 alpha activates

phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276. n. 27, p. 24466-24472, 2001.

KANG, T., *et al.* Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. **J Biol Chem**, v. 277. n. 28, p. 25583-25591, 2002.

KASHIWAGI, M., *et al.* TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276. n. 16, p. 12501-12504, 2001.

KLEIN, T. kuzbanian is required cell autonomously during Notch signalling in the Drosophila wing. **Development Genes and Evolution**, v. 212. n. 5, p. 251-255, 2002.

KOTTIRSCH, G., *et al.* Beta-aryl-succinic acid hydroxamates as dual inhibitors of matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha converting enzyme. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45. n. 11, p. 2289-2293, 2002.

KRATZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C. P. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **J Biol Chem**, v. 271. n. 9, p. 4593-4596, 1996.

KUNO, K., *et al.* Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. **J Biol Chem**, v. 272. n. 1, p. 556-562, 1997.

LAMMICH, S., *et al.* Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96. n. 7, p. 3922-3927, 1999.

LEE, D. C., *et al.* TACE/ADAM17 Processing of EGFR Ligands Indicates a Role as a Physiological Convertase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 995. n. 1, p. 22-38, 2003.

LINDMARK, R.; THORÉN-TOLLING, K.; SJÖQUIST, J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. **Journal of Immunological Methods**, v. 62. n. 1, p. 1-13, 1983.

LOECHEL, F., *et al.* ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 278. n. 3, p. 511-515, 2000.

LOECHEL, F., *et al.* Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. **J Biol Chem**, v. 273. n. 27, p. 16993-16997, 1998.

LOECHEL, F., *et al.* Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. **J Biol Chem**, v. 274. n. 19, p. 13427-13433, 1999.

LUM, L.; BLOBEL, C. P. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. **Dev Biol**, v. 191. n. 1, p. 131-145, 1997.

LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J Biol Chem**, v. 273. n. 40, p. 26236-26247, 1998.

MASKOS, K., *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95. n. 7, p. 3408-3412, 1998.

MAYER, G.; BOILEAU, G.; BENDAYAN, M. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alpha V at specialized domains of renal cell plasma membrane. **Journal of Cell Science**, v. 116. n. 9, p. 1763-1773, 2003.

MBIKAY, M., *et al.* Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94. n. 13, p. 6842-6846, 1997.

MERLOS-SUAREZ, A., *et al.* Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. **J Biol Chem**, v. 276. n. 51, p. 48510-48517, 2001.

MERTZ, J. E.; DAVIS, R. W. Cleavage of DNA by R_I Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69. n. 11, p. 3370-&, 1972.

MILLA, M. E., *et al.* Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). **J Biol Chem**, v. 274. n. 43, p. 30563-30570, 1999.

MITCHELL, K. J., *et al.* Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nat Genet**, v. 28. n. 3, p. 241-249, 2001.

MONLEON, D., *et al.* Concerted motions of the integrin-binding loop and the C-terminal tail of the non-RGD disintegrin obtustatin. **J Biol Chem**, v. 278. n. 46, p. 45570-45576, 2003.

MOSS, M. L., *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. **Nature**, v. 385. n. 6618, p. 733-736, 1997.

MOSS, M. L., *et al.* TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6. n. 8, p. 417-426, 2001.

MU, D., *et al.* The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. **J Cell Biol**, v. 157. n. 3, p. 493-507, 2002.

MYLES, D. G., *et al.* Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91. n. 10, p. 4195-4198, 1994.

NAKAYAMA, K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. **Biochem J**, v. 327 (Pt 3). p. 625-635, 1997.

NATH, D., *et al.* Interaction of metargidin (ADAM-15) with α v β 3 and α 5 β 1 integrins on different haemopoietic cells. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 4). p. 579-587, 1999.

NATH, D., *et al.* Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through α (6) β (1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 12). p. 2319-2328, 2000.

NATH, D., *et al.* Meltrin gamma (ADAM-9) mediates cellular adhesion through α (6) β (1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **Journal of Cell Science**, v. 113. n. 12, p. 2319-2328, 2000.

NIEMIAROWSKI, S., *et al.* Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin Hematol**, v. 31. n. 4, p. 289-300, 1994.

OWUOR, K., *et al.* LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42. n. 4, p. 448-457, 2009.

OZKAYNAK, E., *et al.* Adam22 Is a Major Neuronal Receptor for Lgi4-Mediated Schwann Cell Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 30. n. 10, p. 3857-3864, 2010.

PAN, D.; RUBIN, G. M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. **Cell**, v. 90. n. 2, p. 271-280, 1997.

PARKIN, E. T., *et al.* Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor- α . **Biochemistry**, v. 41. n. 15, p. 4972-4981, 2002.

POGHOSYAN, Z., *et al.* Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. **J Biol Chem**, v. 277. n. 7, p. 4999-5007, 2002.

PRIMAKOFF, P.; HYATT, H.; TREDICK-KLINE, J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. **J Cell Biol**, v. 104. n. 1, p. 141-149, 1987.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet**, v. 16. n. 2, p. 83-87, 2000.

PUSCHEL, A. W.; ADAMS, R. H.; BETZ, H. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. **Neuron**, v. 14. n. 5, p. 941-948, 1995.

PUYRAIMOND, A., *et al.* MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 262. n. 1, p. 28-36, 2001.

QI, H., *et al.* Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. **Science**, v. 283. n. 5398, p. 91-94, 1999.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metalloproteases. **Methods Enzymol**, v. 248. p. 183-228, 1995.

ROGHANI, M., *et al.* Metalloprotease-disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274. n. 6, p. 3531-3540, 1999.

ROSENDAHL, M. S., *et al.* Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. **J Biol Chem**, v. 272. n. 39, p. 24588-24593, 1997.

RUOSLAHTI, E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. **Kidney Int**, v. 51. n. 5, p. 1413-1417, 1997.

RUOSLAHTI, E. The RGD story: a personal account. **Matrix Biol**, v. 22. n. 6, p. 459-465, 2003.

RUSNATI, M., *et al.* alpha(v)beta(3) integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8. n. 12, p. 2449-2461, 1997.

SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **Int J Biol Sci**, v. 4. n. 6, p. 387-396, 2008.

SAGANE, K., *et al.* Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J**, v. 334 (Pt 1). p. 93-98, 1998.

SAGANE, K., *et al.* Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**, v. 236. n. 1, p. 79-86, 1999.

SAMBROOK, J., *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual on the web**, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAWA, M., *et al.* New type of metalloproteinase inhibitor: design and synthesis of new phosphoramidate-based hydroxamic acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45. n. 4, p. 919-929, 2002.

SCHAFER, B., *et al.* Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. **J Biol Chem**, v. 279. n. 46, p. 47929-47938, 2004.

SCHLOMANN, U., *et al.* The metalloprotease disintegrin ADAM8 - Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277. n. 50, p. 48210-48219, 2002.

SCHLONDORFF, J.; BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 21). p. 3603-3617, 1999.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev**, v. 17. n. 1, p. 7-30, 2003.

SOTILLOS, S.; ROCH, F.; CAMPUZANO, S. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. **Development**, v. 124. n. 23, p. 4769-4779, 1997.

SOUZA, D. H., *et al.* The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys**, v. 384. n. 2, p. 341-350, 2000.

STOCKER, W., *et al.* The Metzincins - Topological and Sequential Relations between the Astacins, Adamalysins, Serralysins, and Matrixins (Collagenases) Define a Superfamily of Zinc-Peptidases. **Protein Science**, v. 4. n. 5, p. 823-840, 1995.

SUN, Y., *et al.* ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochem Res**, v. 32. n. 7, p. 1217-1223, 2007.

SUN, Y. P., *et al.* Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene**, v. 325. p. 171-178, 2004.

SUZUKI, A., *et al.* Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. **Oncogene**, v. 19. n. 51, p. 5842-5850, 2000.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824. n. 1, p. 164-176, 2012.

TKACHENKO, E.; RHODES, J. M.; SIMONS, M. Syndecans: new kids on the signaling block. **Circ Res**, v. 96. n. 5, p. 488-500, 2005.

TORTORELLA, M. D., *et al.* Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. **Science**, v. 284. n. 5420, p. 1664-1666, 1999.

TURK, B. E., *et al.* Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. **Nature Biotechnology**, v. 19. n. 7, p. 661-667, 2001.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87. n. 14, p. 5578-5582, 1990.

VARNER, J. A.; CHERESH, D. A. Integrins and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8. n. 5, p. 724-730, 1996.

VERBISCK, N. V., *et al.* ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. **Cancer Res**, v. 69. n. 13, p. 5546-5552, 2009.

WESKAMP, G., *et al.* MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. **J Cell Biol**, v. 132. n. 4, p. 717-726, 1996.

WESKAMP, G., *et al.* Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). **J Biol Chem**, v. 279. n. 6, p. 4241-4249, 2004.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15. n. 5, p. 598-606, 2003.

WOLFSBERG, T. G., *et al.* ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol**, v. 131. n. 2, p. 275-278, 1995.

WOLFSBERG, T. G.; WHITE, J. M. ADAMs in fertilization and development. **Dev Biol**, v. 180. n. 2, p. 389-401, 1996.

YAGAMI-HIROMASA, T., *et al.* A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. **Nature**, v. 377. n. 6550, p. 652-656, 1995.

YANG, P.; BAKER, K. A.; HAGG, T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Prog Neurobiol**, v. 79. n. 2, p. 73-94, 2006.

YUAN, R. Y.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. **Journal of Cell Biology**, v. 137. n. 1, p. 105-112, 1997.

ZHANG, X. P., *et al.* Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alpha v beta 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273. n. 13, p. 7345-7350, 1998.

ZHU, X.; EVANS, J. P. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. **Biology of Reproduction**, v. 66. n. 4, p. 1193-1202, 2002.

ZOLKIEWSKA, A. Disintegrin-like/cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. **Experimental Cell Research**, v. 252. n. 2, p. 423-431, 1999.

APÊNDICE

Amino acid modifications

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Glycosylation ⁱ	76 – 76		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Glycosylation ⁱ	96 – 96		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Glycosylation ⁱ	100 – 100		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Glycosylation ⁱ	263 – 263		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Disulfide bond ⁱ	408 ↔ 491		By similarity	
Disulfide bond ⁱ	450 ↔ 475		By similarity	
Disulfide bond ⁱ	452 ↔ 459		By similarity	
Glycosylation ⁱ	547 – 547		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Glycosylation ⁱ	548 – 548		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Disulfide bond ⁱ	560 ↔ 580		By similarity	
Glycosylation ⁱ	664 – 664		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Glycosylation ⁱ	732 – 732		1 N-linked (GlcNAc...) Sequence Analysis	
Disulfide bond ⁱ	736 ↔ 751		By similarity	
Disulfide bond ⁱ	745 ↔ 757		By similarity	
Disulfide bond ⁱ	759 ↔ 768		By similarity	

FIGURA A1 - DADOS DO UNIPROT PARA A ESTRUTURA DA ADAM23 HUMANA

NOTA: Existem quatro sítios putativos glicosilados na região do pró-domínio (posição 76 a 263) e outros quatro distribuídos pela molécula. Com a clivagem do pró-domínio, ocorre uma perda de quatro sítios glicosilados, levando a uma redução da massa molecular da proteína.

FONTE: Uniprot.

```

ref_seq      CTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAAC 480
col_24_184  -----AC 2
              **

ref_seq      TCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC 540
col_24_184  TCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC 61
              *****

ref_seq      CTACCTGAGATCACCGGCGAAGGAGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCA 600
col_24_184  CTACCTGAGATCACCGGCGAAGGAGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCA 121
              *****

ref_seq      TTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGTCCCGGCCCGCGCCTGGGGGGCTGCTG 660
col_24_184  TTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGTCCCGGCCCGCGCCTGGGGGGCTGCTG 181
              *****

ref_seq      CGCCAGCGCTCCGCATTGGAATGAAACTGCAGAAAAAATTTGGGAGTCTGGCAGATG 720
col_24_184  CGCCAGCGCTCCGCATTGGAATGAAACTGCAGAAAAAATTTGGGAGTCTGGCAGATG 241
              *****

ref_seq      AAGACAATACATTGCAACAGAATAGCAGCAGTAATATCAGTTACAGCAATGCAATGCAGA 780
col_24_184  AAGACAATACATTGCAACAGAATAGCAGCAGTAATATCAGTTACAGCAATGCAATGCAGA 301
              *****

ref_seq      AAGAAATCACACTGCCTTCAAGACTCATATATTACATCAACCAAGACTCGGAAAGCCCTT 840
col_24_184  AAGAAATCACACTGCCTTCAAGACTCATATATTACATCAACCAAGACTCGGAAAGCCCTT 361
              *****

ref_seq      ATCACGTTCTTGACACAAAGGCAAGACACCAGCAAAAACATAATAAGGCTGTCCATCTGG 900
col_24_184  ATCACGTTCTTGACACAAAGGCAAGACACCAGCAAAAACATAATAAGGCTGTCCATCTGG 421
              *****

ref_seq      CCCAGGCAAGCTTCCAGATTGAAGCCTTCGGCTCCAATTCATTCTTGACCTCATACTGA 960
col_24_184  CCCAGGCAAGCTTCCAGATTGAAGCCTTCGGCTCCAATTCATTCTTGACCTCATACTGA 481
              *****

ref_seq      ACAATGGTTTGTGTTCTTCTGATTATGTGGAGATTCACACGAAATGGGAAACCACAGT 1020
col_24_184  ACAATGGTTTGTGTTCTTCTGATTATGTGGAGATTCACACGAAATGGGAAACCACAGT 541
              *****

ref_seq      ACTCTAAGGGTGGAGAGCACTGTTACTACCATGGAAGCATCAGAGGCGTCAAAGACTCCA 1080
col_24_184  ACTCTAAGGGTGGAGAGCACTGTTACTACCATGGAAGCATCAGAGGCGTCAAAGACTCCA 601
              *****

ref_seq      AGGTGGCTCTGTCAACCTGCAATGGACTTCATGGCATGTTTGAAGATGATACCTTCGTGT 1140
col_24_184  AGGTGGCTCTGTCAACCTGCAATGGACTTCATGGCATGTTTGAAGATGATACCTTCGTGT 661
              *****

ref_seq      ATATGATAGAGCCACTAGAGCTGGTTCATGATGAGAAAAGCACAGGTCGACCACATATAA 1200
col_24_184  ATATGATAGAGCCACTAGAGCTGGTTCATGATGAGAAAAGCACAGGTCGACCACATATAA 721
              *****

ref_seq      TCCAGAAAACCTTGGCAGGACAGTATTCTAAGCAAATGAAGAATCTCACTATGGAAGAG 1260
col_24_184  TCCAGAAAACCTTGGCAGGACAGTATTCTAAGCAAATGAAGAATCTCACTATGGAAGAG 781
              *****

ref_seq      GTGACCAGTGGCCCTTCTCTCTGAATTACAGTGGTTGAAAAGAAGGAAGAGAGCAGTGA 1320
col_24_186  GTGACCAGTGGCCCTTCTCTCTGAATTACAGTGGTTGAAAAGAAGGAAGAGAGCAGTGA 169
              *****

ref_seq      ATCCATCACGTGGTATATTTGAAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATGTTAATGATC 1380
col_24_186  ATCCATCACGTGGTATATTTGAAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATGTTAATGATC 229
              *****

ref_seq      ACAAACGTATAAGAAGCATCGCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTTGCAAAGTCCG 1440
col_24_186  ACAAACGTATAAGAAGCATCGCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTTGCAAAGTCCG 289
              *****

ref_seq      TGGTCAACCTTGTGGATTCTATTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCCTGGTGG 1500
col_24_186  TGGTCAACCTTGTGGATTCTATTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCCTGGTGG 349
              *****

```

ref_seq	CTGTAGAGACCTGGACTGAGAAGGATCAGATTGACATCACCACCAACCCTGTGCAGATGC	1560
col_24_186	CTGTAGAGACCTGGACTGAGAAGGATCAGATTGACATCACCACCAACCCTGTGCAGATGC	409

ref_seq	TCCATGAGTTCTCAAATACCGGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCA	1620
col_24_186	TCCATGAGTTCTCAAATACCGGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCA	469

ref_seq	TCTCGGGGTGACATTTCACTATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGTCTGTT	1680
col_24_186	TCTCGGGGTGACATTTCACTATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGTCTGTT	529

ref_seq	CTCGCACAGAGGAGTTGGTGTGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAAGTAT	1740
col_24_186	CTCGCACAGAGGAGTTGGTGTGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAAGTAT	589

ref_seq	TATCGCAGAGCCTGGCTCAAACCTTGGAAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAA	1800
col_24_186	TATCGCAGAGCCTGGCTCAAACCTTGGAAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAA	649

ref_seq	AATGTGACTGCACAGAATCCTGGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCATT	1860
col_24_188	AATGTGACTGCACAGAATCCTGGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCATT	89

ref_seq	CTCGAAAATTTTCAAAGTGCAGCATTTTGGAGTATAGAGACTTTTTACAGAGAGGAGGTG	1920
col_24_188	CTCGAAAATTTTCAAAGTGCAGCATTTTGGAGTATAGAGACTTTTTACAGAGAGGAGGTG	149

ref_seq	GAGCCTGCCTTTTCAACAGGCCAACAAAGCTATTTGAGCCACGGAATGTGGAATGGAT	1980
col_24_188	GAGCCTGCCTTTTCAACAGGCCAACAAAGCTATTTGAGCCACGGAATGTGGAATGGAT	209

ref_seq	ACGTGGAAGCTGGGGAGGAGTGTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGGATTATGCT	2040
col_24_188	ACGTGGAAGCTGGGGAGGAGTGTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGGATTATGCT	269

ref_seq	GTAAGAAATGTTCCCTCTCCAACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATA	2100
col_24_188	GTAAGAAATGTTCCCTCTCCAACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATA	329

ref_seq	CCTCATGTCTTTTTTCAGCCACGAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATA	2160
col_24_188	CCTCATGTCTTTTTTCAGCCACGAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATA	389

ref_seq	TTACTGAATATTGTACTGGAGACTCTGGTCAAGTCCCAAAATCTTCATAAGCAAGACG	2220
col_24_188	TTACTGAATATTGTACTGGAGACTCTGGTCAAGTCCCAAAATCTTCATAAGCAAGACG	449

ref_seq	GATATGCATGCAATCAAAATCAGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGAAGACCAGAGACA	2280
col_24_188	GATATGCATGCAATCAAAATCAGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGAAGACCAGAGACA	509

ref_seq	ACCAGTGTGAGTACATCTGGGGAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTCTGCTATGAAA	2340
col_24_188	ACCAGTGTGAGTACATCTGGGGAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTCTGCTATGAAA	569

ref_seq	AGCTGAATACAGAAGGCACTGAGAAGGGAACTGCGGGAAGGATGGAGACCGGTGGATTC	2400
col_24_188	AGCTGAATACAGAAGGCACTGAGAAGGGAACTGCGGGAAGGATGGAGACCGGTGGATTC	629

ref_seq	AGTGCAGCAAACATGATGTGTTCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTC	2460
col_24_188	AGTGCAGCAAACATGATGTGTTCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTC	689

ref_seq	CACGTATTGGTCAACTTCAGGGTGAAGATCATTCCAACCTCCTTCTACCATCAAGGCCGGG	2520
col_24_188	CACGTATTGGTCAACTTCAGGGTGAAGATCATTCCAACCTCCTTCTACCATCAAGGCCGGG	749

ref_seq	GTGATTGACTGCAGTGGTCCCATGTAGTTTATAGATGATGATACGGATGTGGGCTATGTA	2579
col_24_185	GTGATTGACTGCAGTGGTCCCATGTAGTTTATAGATGATGATACGGATGTGGGCTATGTA	254

```

ref_seq      GAAGATGGAACGCCATGTGGCCCGTCTATGATGTGTTTAGATCGGAAGTGCCACAAATT 2639
col_24_185   GAAGATGGAACGCCATGTGGCCCGTCTATGATGTGTTTAGATCGGAAGTGCCACAAATT 314
*****

ref_seq      CAAGCCCTAAATATGAGCAGCTGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCGGGCCAT 2699
col_24_185   CAAGCCCTAAATATGAGCAGCTGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCGGGCCAT 374
*****

ref_seq      GGGGTGTGTAGTAATGAAGCCACCTGCATTTGTGATTTACCTGGGCAGGGACAGATTGC 2759
col_24_185   GGGGTGTGTAGTAATGAAGCCACCTGCATTTGTGATTTACCTGGGCAGGGACAGATTGC 434
*****

ref_seq      AGTATCCGGGATCCAGTTAGGAACCTTCACCCCCCAAGGATGAAGGACCCAAGGGTCCT 2819
col_24_185   AGTATCCGGGATCCAGTTAGGAACCTTCACCCCCCAAGGATGAAGGACCCAAGGGTCCT 494
*****

ref_seq      AGTGCCACCAGATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGGTAAGCCAGCCAG 2879
col_24_185   AGTGCCACCAGATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGGTAAGCCAGCCAG 554
*****

ref_seq      GCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAG 2939
col_24_185   GCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAG 614
*****

ref_seq      GCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGG 2999
col_24_185   GCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGG 674
*****

ref_seq      GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC 3059
col_24_185   GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATG----- 723
*****

```

FIGURA A2 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 24 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PINFUSE-ADAM23C1-HIGG1-FC2

NOTA: Alinhamento da sequência referência contendo a sequência do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 (com base na sequência deste vetor no manual do fabricante Invivogen) e a sequência da ADAM23 sem o peptídeo sinal (com base na sequência da ADAM23 inteira, código NM_003812.3 do NCBI) (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_24). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisadas que coincidem com aquelas da referência. Em azul, pode-se ver a sequência de Kozak. Observa-se em verde e amarelo os sítios de ação das enzimas de restrição, *EcoRI* e *BglII* respectivamente. Em cinza, a sequência sinal da IL-2ss, sequência de secreção. Em rosa, pode-se ver a sequência da região Fc da IgG1 humana. Em vermelho, a mutação com alteração de uma T por C, na posição 212 da sequência da colônia 24. FONTE: A Autora (2015).

```

ref_seq      TCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC 540
col_1_184   TCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC 60
*****

ref_seq      CTACCTGAGATCACCGGCGAAGGAGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCA 600
col_1_184   CTACCTGAGATCACCGGCGAAGGAGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCA 120
*****

ref_seq      TTGCACTAAGTCTTGCACCTGTCACTGAATTCAGCAGTCAATCCATCACGTGGTATATTTG 660
col_1_184   TTGCACTAAGTCTTGCACCTGTCACTGAATTCAGCAGTCAATCCATCACGTGGTATATTTG 180
*****

ref_seq      AAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATTGTTAATGATCACAAAACGTATAAGAAGCATC 720
col_1_184   AAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATTGTTAATGATCACAAAACGTATAAGAAGCATC 240
*****

ref_seq      GCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTTGCAAAGTCCGTGGTCAACCTTGTGGATTCTA 780
col_1_184   GCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTTGCAAAGTCCGTGGTCAACCTTGTGGATTCTA 300
*****

ref_seq      TTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCTGGTGGCTGTAGAGACCTGGACTGAGA 840
col_1_184   TTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCTGGTGGCTGTAGAGACCTGGACTGAGA 360
*****

ref_seq      AGGATCAGATTGACATCACCAACCCCTGTGCAGATGCTCCATGAGTTCTCAAATACC 900
col_1_184   AGGATCAGATTGACATCACCAACCCCTGTGCAGATGCTCCATGAGTTCTCAAATACC 420
*****

ref_seq      GGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCATCTCGCGGGTGACATTTCACT 960
col_1_184   GGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCATCTCGCGGGTGACATTTCACT 480
*****

ref_seq      ATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGTCTGTTCTCGCACAAGAGGAGTTGGTG 1020
col_1_184   ATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGTCTGTTCTCGCACAAGAGGAGTTGGTG 540
*****

ref_seq      TGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAGTATTATCGCAGAGCCTGGCTCAAA 1080
col_1_184   TGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAGTATTATCGCAGAGCCTGGCTCAAA 600
*****

ref_seq      ACCTTGGAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAAAATGTGACTGCACAGAATCCT 1140
col_1_184   ACCTTGGAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAAAATGTGACTGCACAGAATCCT 660
*****

ref_seq      GGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCCATTTCTCGAAAATTTTCAAAGTGCA 1200
col_1_188   GGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCCATTTCTCGAAAATTTTCAAAGTGCA 105
*****

ref_seq      GCATTTTGAGTATAGAGACTTTTTACAGAGAGGAGGTGGAGCCTGCCTTTTCAACAGGC 1260
col_1_188   GCATTTTGAGTATAGAGACTTTTTACAGAGAGGAGGTGGAGCCTGCCTTTTCAACAGGC 165
*****

ref_seq      CAACAAAGCTATTTGAGCCCACGGAATGTGAAAATGGATACGTGGAAGCTGGGGAGGAGT 1320
col_1_188   CAACAAAGCTATTTGAGCCCACGGAATGTGAAAATGGATACGTGGAAGCTGGGGAGGAGT 225
*****

ref_seq      GTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGGATTATGCTGTAAGAAATGTTCCCTCTCCA 1380
col_1_188   GTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGGATTATGCTGTAAGAAATGTTCCCTCTCCA 285
*****

ref_seq      ACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATACCTCATGTCTTTTTTCAGCCAC 1440
col_1_188   ACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATACCTCATGTCTTTTTTCAGCCAC 345
*****

ref_seq      GAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATATTACTGAATATTGTACTGGAG 1500
col_1_188   GAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATATTACTGAATATTGTACTGGAG 405
*****

ref_seq      ACTCTGGTCAGTGCCACCAATCTTCATAAGCAAGACGGATATGCATGCAATCAAATC 1560
col_1_188   ACTCTGGTCAGTGCCACCAATCTTCATAAGCAAGACGGATATGCATGCAATCAAATC 465
*****

```

ref_seq	AGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGCAAGACCAGAGACAACCAGTGTACAGTACATCTGGG	1620
col_1_188	AGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGCAAGACCAGAGACAACCAGTGTACAGTACATCTGGG	525

ref_seq	GAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTTCTGCTATGAAAAGCTGAATACAGAAGGCACTG	1680
col_1_188	GAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTTCTGCTATGAAAAGCTGAATACAGAAGGCACTG	585

ref_seq	AGAAGGGAAACTGCGGGAAGGATGGAGACCGGTGGATTGAGTGCAGCAACATGATGTGT	1740
col_1_188	AGAAGGGAAACTGCGGGAAGGATGGAGACCGGTGGATTGAGTGCAGCAACATGATGTGT	645

ref_seq	TCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTCCACGTATTGGTCAACTTCAGG	1800
col_1_188	TCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTCCACGTATTGGTCAACTTCAGG	705

ref_seq	GGTGAGATCATTCACACTTCCTTCTACCATCAAGGCCGGGTGATTGACTGCAGTGGTGCC	1859
col_1_185	GGTGAGATCATTCACACTTCCTTCTACCATCAAGGCCGGGTGATTGACTGCAGTGGTGCC	216

ref_seq	CATGTAGTTTTAGATGATGATACGGATGTGGCTATGTAGAAGATGGAACGCCATGTGGC	1919
col_1_185	CATGTAGTTTTAGATGATGATACGGATGTGGCTATGTAGAAGATGGAACGCCATGTGGC	276

ref_seq	CCGTCTATGATGTGTTTTAGATCGGAAGTGCCACAAATTCAGCCCTAAATATGAGCAGC	1979
col_1_185	CCGTCTATGATGTGTTTTAGATCGGAAGTGCCACAAATTCAGCCCTAAATATGAGCAGC	336

ref_seq	TGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCCGGCCATGGGGTGTGTAGTAATGAAGCC	2039
col_1_185	TGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCCGGCCATGGGGTGTGTAGTAATGAAGCC	396

ref_seq	ACCTGCATTTGTGATTTACCTGCGGCAGGGACAGATTGCAGTATCCGGGATCCAGTTAGG	2099
col_1_185	ACCTGCATTTGTGATTTACCTGCGGCAGGGACAGATTGCAGTATCCGGGATCCAGTTAGG	456

ref_seq	AACCTTCAACCCCAAGGATGAAGGACCAAGGGTCTTAGTGCCACCAGATCTGACAAA	2159
col_1_185	AACCTTCAACCCCAAGGATGAAGGACCAAGGGTCTTAGTGCCACCAGATCTGACAAA	516

ref_seq	ACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGG	2219
col_1_185	ACTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGG	576

ref_seq	CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACAC	2279
col_1_185	CGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACAC	636

ref_seq	GTCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT	2339
col_1_185	GTCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT	696

ref_seq	CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT	2399
col_1_185	CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT	725

FIGURA A3 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 1 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PINFUSE-ADAM23C2-HIGG1-FC2

NOTA: Alinhamento da sequência referência contendo a sequência do plasmídeo pINFUSE-hlgG1-Fc2 (com base na sequência deste vetor no manual do fabricante Invivogen) e a sequência da ADAM23 sem o peptídeo sinal e sem o pró-domínio (com base na sequência da ADAM23 inteira, código NM_003812.3 do NCBI) (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_1). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisadas que coincidem com aquelas da referência. Em azul, pode-se ver a sequência de Kozak. Observa-se em verde e amarelo os sítios de ação das enzimas de restrição, *EcoRI* e *BglII* respectivamente. Em cinza, a sequência sinal da IL-2ss, sequência de secreção. Em rosa, pode-se ver a sequência da região Fc da IgG1 humana. Em vermelho, a mutação de uma T por C, na posição 202 da sequência da colônia 1.

FONTE: A Autora (2015).

```

ref_seq      GCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAATTCGGCCATGGTTAGATCTGACAAAACCTCACA 300
col_8_204   GCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAATTCGGCCATGGTTAGATCTGACAAAACCTCACA 105
*****

ref_seq      CATGCCACCCTGCCCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGCGGGGACA 360
col_8_204   CATGCCACCCTGCCCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGCGGGGACA 165
*****

ref_seq      GGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACC 420
col_8_204   GGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACC 225
*****

ref_seq      TCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA 480
col_8_204   TCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA 285
*****

ref_seq      AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAC 540
col_8_204   AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAC 345
*****

ref_seq      GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT 600
col_8_204   GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT 405
*****

ref_seq      AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC 660
col_8_204   AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC 465
*****

ref_seq      CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC 720
col_8_204   CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC 525
*****

ref_seq      AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGG 780
col_8_204   AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGG 585
*****

ref_seq      GTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACTGC 840
col_8_211   GTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACTGC 163
*****

ref_seq      TGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC 900
col_8_211   TGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC 223
*****

ref_seq      ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTA 960
col_8_211   ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTA 283
*****

ref_seq      TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC 1020
col_8_211   TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC 343
*****

ref_seq      CACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGA 1080
col_8_211   CACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGA 403
*****

ref_seq      CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA 1140
col_8_211   CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA 463
*****

ref_seq      CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGGTACCAGCTTAA 1200
col_8_211   CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGGTACCAGCTTAA 523
*****

```

FIGURA A4 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 8 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1-HIGG1-FC2

NOTA: Alinhamento da sequência referência contendo a sequência do plasmídeo pcDNA3.1(-) (com base na sequência deste vetor no manual do fabricante Invitrogen) e a sequência da IgG1 humana (com base na sequência da IgG1 humana, domínios CH2-CH3, presente no vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2, conforme manual do fabricante Invivogen) (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_8). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisadas que coincidem com aquelas da referência. Em azul, pode-se ver a sequência de Kozak. Observa-se em verde e amarelo os sítios de ação das enzimas de restrição, *EcoRI* e *Acc65I* respectivamente, com um *stop codon*, códon de término de tradução (TGA) em rosa logo antes do sítio de ação da *Acc65I*.
FONTE: A Autora (2015).

```

ref_seq      AAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATAC 180
col_15_204  -----CCCATCCCTTAC-----AAATTAATAC 22
*****

ref_seq      GACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGCTAGCGCCATGAGCCGCCGGCAGCAGCTCGC 240
col_15_204  GACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGCTAGCGCCATGAGCCGCCGGCAGCAGCTCGC 82
*****

ref_seq      GGCAGCGCCCCTGGCGGGCTGCAGCCTTGC CGCGCTTCTGCGGCCCAACGCGGCC 300
col_15_204  GGCAGCGCCCCTGGCGGGCTGCAGCCTTGC CGCGCTTCTGCGGCCCAACGCGGCC 142
*****

ref_seq      CCGCCGGCTCGGTGCCTGCCAGCGCCCGGCCCGCACGCGCCCTGCCGCTGCTTCTCG 360
col_15_204  CCGCCGGCTCGGTGCCTGCCAGCGCCCGGCCCGCACGCGCCCTGCCGCTGCTTCTCG 202
*****

ref_seq      TCCTTCTCCTGCTGCCTCCGCTCGCCGCTCGTCCCGGCCCGCGCTGGGGGGCTGCTG 420
col_15_204  TCCTTCTCCTGCTGCCTCCGCTCGCCGCTCGTCCCGGCCCGCGCTGGGGGGCTGCTG 262
*****

ref_seq      CGCCCAGCGCTCCGCATTGGAATGAAACTGCAGAAAAAATTTGGGAGTCTGGCAGATG 480
col_15_204  CGCCCAGCGCTCCGCATTGGAATGAAACTGCAGAAAAAATTTGGGAGTCTGGCAGATG 322
*****

ref_seq      AAGACAATACATTGCAACAGAATAGCAGCAGTAATATCAGTTACAGCAATGCAATGCAGA 540
col_15_204  AAGACAATACATTGCAACAGAATAGCAGCAGTAATATCAGTTACAGCAATGCAATGCAGA 382
*****

ref_seq      AAGAAATCACACTGCCTTCAAGACTCATATATTACATCAACCAAGACTCGGAAAGCCCTT 600
col_15_204  AAGAAATCACACTGCCTTCAAGACTCATATATTACATCAACCAAGACTCGGAAAGCCCTT 442
*****

ref_seq      ATCACGTTCTTGACACAAAGGCAAGACACCAGCAAAAAACATAATAAGGCTGTCCATCTGG 660
col_15_204  ATCACGTTCTTGACACAAAGGCAAGACACCAGCAAAAAACATAATAAGGCTGTCCATCTGG 502
*****

ref_seq      CCCAGGCAAGCTTCCAGATTGAAGCCTTCGGCTCCAAATTCATTCTTGACCTCATACTGA 720
col_15_204  CCCAGGCAAGCTTCCAGATTGAAGCCTTCGGCTCCAAATTCATTCTTGACCTCATACTGA 562
*****

ref_seq      ACAATGGTTTGTGTCTTCTGATTATGTGGAGATTCACTACGAAAATGGGAAACCACAGT 780
col_15_204  ACAATGGTTTGTGTCTTCTGATTATGTGGAGATTCACTACGAAAATGGGAAACCACAGT 622
*****

ref_seq      ACTCTAAGGGTGGAGAGCACTGTTACTACCATGGAAGCATCAGAGGCGTCAAAGACTCCA 840
col_15_187  ACTCTAAGGGTGGAGAGCACTGTTACTACCATGGAAGCATCAGAGGCGTCAAAGACTCCA 14
*****

ref_seq      AGGTGGCTCTGTCAACCTGCAATGGACTTCATGGCATGTTTGAAGATGATACCTTCGTGT 900
col_15_187  AGGTGGCTCTGTCAACCTGCAATGGACTTCATGGCATGTTTGAAGATGATACCTTCGTGT 80
*****

ref_seq      ATATGATAGAGCCACTAGAGCTGGTTCATGATGAGAAAAGCACAGGTCGACCACATATAA 960
col_15_187  ATATGATAGAGCCACTAGAGCTGGTTCATGATGAGAAAAGCACAGGTCGACCACATATAA 140
*****

ref_seq      TCCAGAAAACCTTGGCAGGACAGTATTC TAAGCAAATGAAGAATCTCCTATGGAAAGAG 1020
col_15_187  TCCAGAAAACCTTGGCAGGACAGTATTC TAAGCAAATGAAGAATCTCCTATGGAAAGAG 200
*****

ref_seq      GTGACCAGTGGCCCTTCTCTCTGAATTACAGTGGTTGAAAAGAAGGAAGAGAGCAGTGA 1080
col_15_187  GTGACCAGTGGCCCTTCTCTCTGAATTACAGTGGTTGAAAAGAAGGAAGAGAGCAGTGA 260
*****

ref_seq      ATCCATCAGTGGTATATTTGAAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATTGTTAATGATC 1140
col_15_187  ATCCATCAGTGGTATATTTGAAGAAATGAAATATTTGGAACCTATGATTGTTAATGATC 320
*****

ref_seq      ACAAACGTATAAGAAGCATCGCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTGC AAAGTCCG 1200
col_15_187  ACAAACGTATAAGAAGCATCGCTCTTCTCATGCACATACCAACAACCTTGC AAAGTCCG 380
*****

```

ref_seq	TGGTCAACCTTGTGGATTCTATTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCCCTGGTGG	1260
col_15_187	TGGTCAACCTTGTGGATTCTATTTACAAGGAGCAGCTCAACACCAGGGTTGTCCCTGGTGG	440

ref_seq	CTGTAGAGACCTGGACTGAGAAGGATCAGATTGACATCACCACCAACCCTGTGCAGATGC	1320
col_15_187	CTGTAGAGACCTGGACTGAGAAGGATCAGATTGACATCACCACCAACCCTGTGCAGATGC	500

ref_seq	TCCATGAGTTCTCAAATACCGGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCA	1380
col_15_187	TCCATGAGTTCTCAAATACCGGCAGCGCATTAAAGCAGCATGCTGATGCTGTGCACCTCA	560

ref_seq	TCTCGGGGTGACATTTCACTATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGCTGTGT	1440
col_15_187	TCTCGGGGTGACATTTCACTATAAGAGAAGCAGTCTGAGTTACTTTGGAGGTGCTGTGT	620

ref_seq	CTCGCACAAGAGGAGTTGGTGTGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAGTAT	1500
col_15_187	CTCGCACAAGAGGAGTTGGTGTGAATGAGTATGGTCTTCCAATGGCAGTGGCACAAGTAT	690

ref_seq	TATCGCAGAGCCTGGCTCAAACCTTGAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAA	1560
col_15_188	TATCGCAGAGCCTGGCTCAAACCTTGAATCCAATGGGAACCTTCTAGCAGAAAGCCAA	56

ref_seq	AATGTGACTGCACAGAATCCTGGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCATT	1620
col_15_188	AATGTGACTGCACAGAATCCTGGGGTGGCTGCATCATGGAGGAAACAGGGGTGTCCATT	116

ref_seq	CTCGAAAATTTTCAAAGTGCAGCATTTTGGAGTATAGAGACTTTTACAGAGAGGAGTG	1680
col_15_188	CTCGAAAATTTTCAAAGTGCAGCATTTTGGAGTATAGAGACTTTTACAGAGAGGAGTG	176

ref_seq	GAGCCTGCCTTTTCAACAGGCCAACAAGCTATTTGAGCCCACGGAATGTGAAATGGAT	1740
col_15_188	GAGCCTGCCTTTTCAACAGGCCAACAAGCTATTTGAGCCCACGGAATGTGAAATGGAT	236

ref_seq	ACGTGGAAGCTGGGGAGGAGTGTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGATTATGCT	1800
col_15_188	ACGTGGAAGCTGGGGAGGAGTGTGATTGTGGTTTTTCATGTGGAATGCTATGATTATGCT	296

ref_seq	GTAAGAAATGTTCCCTCTCCAACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATA	1860
col_15_188	GTAAGAAATGTTCCCTCTCCAACGGGGCTCACTGCAGCGACGGGCCCTGCTGTAACAATA	356

ref_seq	CCTCATGTCTTTTTTCAGCCACGAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATA	1920
col_15_188	CCTCATGTCTTTTTTCAGCCACGAGGGTATGAATGCCGGGATGCTGTGAACGAGTGTGATA	416

ref_seq	TTACTGAATATTGTACTGGAGACTCTGGTCAGTGCCACCAAATCTTCATAAGCAAGACG	1980
col_15_188	TTACTGAATATTGTACTGGAGACTCTGGTCAGTGCCACCAAATCTTCATAAGCAAGACG	476

ref_seq	GATATGCATGCAATCAAATCAGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGCAAGACCAGAGACA	2040
col_15_188	GATATGCATGCAATCAAATCAGGGCCGCTGCTACAATGGCGAGTGCAAGACCAGAGACA	267

ref_seq	ACCAGTGTCAGTACATCTGGGGAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTTCTGCTATGAAA	2100
col_15_188	ACCAGTGTCAGTACATCTGGGGAACAAAGGCTGCAGGGTCTGACAAGTTCTGCTATGAAA	267

ref_seq	AGCTGAATACAGAAGGCACTGAGAAGGGAAACTGCGGGAAGGATGGAGACCAGGTTGATTC	2160
col_15_188	AGCTGAATACAGAAGGCACTGAGAAGGGAAACTGCGGGAAGGATGGAGACCAGGTTGATTC	267

ref_seq	AGTGCAGCAAACATGATGTGTCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTC	2220
col_15_189	AGTGCAGCAAACATGATGTGTCTGTGGATTCTTACTCTGTACCAATCTTACTCGAGCTC	42

ref_seq	CACGTATTGGTCAACTTCAGGGTGAATCATTCACACTTCTTACCATCAAGGCCGGG	2280
col_15_189	CACGTATTGGTCAACTTCAGGGTGAATCATTCACACTTCTTACCATCAAGGCCGGG	102

```

ref_seq      TGATTGACTGCAGTGGTGCCCATGTAGTTTGTAGATGATGATACGGATGTGGGCTATGTAG 2340
col_15_189  TGATTGACTGCAGTGGTGCCCATGTAGTTTGTAGATGATGATACGGATGTGGGCTATGTAG 162
*****

ref_seq      AAGATGGAACGCCATGTGGCCCGTCTATGATGTGTTAGATCGGAAGTGCCACAAATTC 2400
col_15_189  AAGATGGAACGCCATGTGGCCCGTCTATGATGTGTTAGATCGGAAGTGCCACAAATTC 222
*****

ref_seq      AAGCCCTAAATATGAGCAGCTGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCGGGCCATG 2460
col_15_189  AAGCCCTAAATATGAGCAGCTGTCCACTCGATTCCAAGGGTAAAGTCTGTTCGGGCCATG 282
*****

ref_seq      GGGTGTGTAGTAATGAAGCCACCTGCATTTGTGATTTCCACTGGGCAGGGACAGATTGCA 2520
col_15_189  GGGTGTGTAGTAATGAAGCCACCTGCATTTGTGATTTCCACTGGGCAGGGACAGATTGCA 342
*****

ref_seq      GTATCCGGGATCCAGTTAGGAACCTTCACCCCCCAAGGATGAAGGACCAAGGGTCTTA 2580
col_15_189  GTATCCGGGATCCAGTTAGGAACCTTCACCCCCCAAGGATGAAGGACCAAGGGTCTTA 402
*****

ref_seq      GTGCCACCGAATTCCGGCCATGGTTAGATCTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCC 2640
col_15_189  GTGCCACCGAATTCCGGCCATGGTTAGATCTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCC 461
*****

ref_seq      AGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGC 2700
col_15_189  AGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGC 521
*****

ref_seq      CTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAG 2760
col_15_189  CTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAG 581
*****

ref_seq      CACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC 2820
col_15_189  CACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC 641
*****

ref_seq      TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC 2880
col_15_189  TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC 701
*****

ref_seq      CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC 2940
col_15_189  CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC 761
*****

ref_seq      CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACC 3000
col_15_189  CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACC 821
*****

ref_seq      AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC 3060
col_15_211  AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC 383
*****

ref_seq      CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCACATG 3120
col_15_211  CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCACATG 443
*****

ref_seq      GACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACTGCTGTACCAACCTCTGTC 3180
col_15_211  GACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACTGCTGTGTACCAACCTCTGTC 503
*****

ref_seq      CCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG 3240
col_15_211  CCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG 563
*****

ref_seq      ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC 3300
col_15_211  ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC 623
*****

ref_seq      GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG 3360
col_15_211  GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG 683
*****

```

```

ref_seq      GACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC 3420
col_15_211  GACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC 743
*****

ref_seq      AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA 3480
col_15_211  AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA 802
*****

ref_seq      GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCG 3531
col_15_211  GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCG 853
*****

```

FIGURA A5 - SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DO PLASMÍDEO PURIFICADO A PARTIR DA COLÔNIA Nº 15 DE BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O VETOR DE EXPRESSÃO PCDNA3.1-ADAM23C3-HIGG1-FC2

NOTA: Alinhamento da sequência referência contendo a sequência do plasmídeo pcDNA3.1(-) (com base na sequência deste vetor no manual do fabricante Invitrogen), a sequência da IgG1 humana (com base na sequência da IgG1 humana, domínios CH2-CH3, presente no vetor pINFUSE-hIgG1-Fc2, conforme manual do fabricante Invivogen) e a sequência da ADAM23 inteira sob o código NM_003812.3 do banco de dados do NCBI (ref_seq) com o resultado do sequenciamento de nucleotídeos (col_15). O símbolo (*) representa bases nitrogenadas da sequência analisadas que coincidem com aquelas da referência. Em azul, pode-se ver a sequência de Kozak. Observa-se em verde e amarelo os sítios de ação das enzimas de restrição, *NheI* e *EcoRI* respectivamente. Em cinza, o início da sequência da região Fc de IgG1 humana. Em rosa, pode-se ver a sequência do códon de terminação, *stop codon*. Em vermelho, a mutação pontual com alteração de uma T por C, na posição 303 da sequência da colônia 15.

FONTE: A Autora (2015).