

MICHELE DIETRICH MOURA COSTA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
6HIS-ADAM23 E SUA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENO NA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

**Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Patologia Básica como
requisito parcial à conclusão do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, modalidade
Bacharelado.**

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata

**CURITIBA
2005**

*“Quando sonhamos sozinhos é apenas um sonho.
Quando sonhamos juntos é o começo da realidade.”*

D. Hélder Câmara

*Dedico aos meus
Queridos pais
João e Sueli.*

SUMÁRIO

RESUMO	iv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <u>A DESINTEGRIN AND METALLOPROTEASE (ADAM)</u>	2
1.2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO DA PROTEÍNA ADAM23.....	9
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ϵ HIS-ADAM23.....	10
3.1.1 Preparação das cepas BL21 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3) de <i>E. coli</i> competentes eletricamente.....	10
3.1.2 Transformação das cepas de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	11
3.1.3 Purificação e obtenção do plasmídeo pela técnica de minipreparação de plasmídeo por lise alcalina.....	12
3.1.4 Protocolo de miniexpressão.....	13
3.1.5 Teste de solubilidade.....	15
3.1.6 Expressão e purificação da proteína ϵ His-ADAM23 em larga escala.....	14
3.1.7 Análise da purificação.....	15
3.1.8 Diálise da proteína purificada.....	16
3.2 IMUNIZAÇÃO DE COELHOS.....	16
3.3 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE.....	17
3.4 IMUNOENSAIO DE WESTERN BLOTTING E BLOQUEIO.....	17
3.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE TECIDOS NERVOSOS PARA A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA ENDÓGENA.....	19
4 RESULTADOS	19
4.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ϵ HIS-ADAM23.....	19
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	27
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células nervosas precursoras migram para seus destinos finais e os axônios crescem ao longo de um trajeto preciso e consistente até que encontrem seus alvos, com os quais estabelecem contatos especializados. Ao prosseguir sua navegação em direção ao alvo, axônios defrontam tanto com moléculas adesivas da matriz extracelular como da superfície das células, sendo que estas moléculas podem promover o crescimento axônico. ADAM23 é uma proteína potencial de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular e é principalmente expressa no sistema nervoso central. Estes fatos sugerem que ADAM23 pode ter um importante papel na manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso. Neste trabalho, a proteína recombinante ADAM23 foi expressa em sistema heterólogo de *Escherichia coli* com etiqueta de seis histidinas a partir do vetor de expressão pET32 e em seguida purificada, sob condições desnaturantes, por cromatografia de afinidade a metal imobilizado. A eficiência da purificação foi comprovada por ensaio de Western Blotting, no qual a proteína purificada foi reconhecida por dois diferentes anticorpos: anti-₅His e anti-peptídeo ADAM23. Um coelho da raça neozelandesa foi imunizado com a proteína recombinante. O soro hiperimune (após a quinta e a sétima imunização) foi empregado em ensaios de Western Blotting após a separação do antígeno por SDS-PAGE. Os anticorpos policlonais presentes no soro hiperimune foram capazes de reconhecer tanto a proteína recombinante, como ao antígeno expresso no cérebro de camundongos adultos e recém-natos, validando a capacidade dos anticorpos no reconhecimento da proteína ADAM23 endógena.

1 Introdução

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião e do recém-nato, as células nervosas precursoras devem necessariamente migrar aos seus destinos finais. Os axônios e dendritos (em conjunto chamados de neuritos) navegam para seus alvos a fim de estabelecer uma correta conectividade, que é de absoluta importância para o funcionamento do sistema nervoso. Neurônios de diferentes classes funcionais apresentam características distintas em sua superfície que determinam interações específicas com outras células, especialmente com células gliais, e com componentes da matriz extracelular. Tais interações são de grande importância para direcionar os cones de crescimento neuronais rumo aos seus alvos específicos, criando uma complexa rede funcional (KANDEL *et al.*, 2000).

ADAMs são proteínas transmembrânicas que atuam tanto como enzimas proteolíticas (através de seu domínio metaloprotease), como ligante de integrina (domínio desintegrina), sendo estas duas propriedades importantes na manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso (KARKKAINEN *et al.*, 2000). ADAM23 (SAGANE *et al.*, 1998) possui domínio metaloprotease inativo, entretanto, é um ligante de integrina, podendo assim, estar envolvida com adesão de células de origem neural.

A expressão predominante de ADAM23 expressa no cérebro tanto de embriões como de adultos, sugere sua participação no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2004).

1.1 A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)

A interação célula-célula e célula-matriz e a proteólise da matriz extracelular (ECM) são processos vitais na morfogênese e cicatrização de tecidos, bem como em processos patológicos tais como invasão e a metástase durante a progressão tumoral. Famílias de moléculas de superfície celular relacionadas com a adesão incluem caderinas, imunoglobulinas, selectinas, integrinas e sidecans. Uma nova classe de moléculas de adesão potencial tem sido descrita, sendo os membros desta classe de proteínas conhecidas como desintegrinas celulares. ADAMs são únicas entre proteínas de superfície celular relacionadas tanto no processo de adesão como no proteolítico (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

O nome ADAM, A Disintegrin And Metalloprotease, refere-se à presença dos potenciais domínios desintegrina e metaloprotease. Essas proteínas apresentam uma estrutura comum possuindo pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteína, domínio EGF (fator de crescimento epidermal), domínio transmembrânico e cauda citoplasmática. Embora estes domínios não sejam similares aos de outras moléculas de superfície com função de adesão ou proteases, os domínios estruturais das ADAMs são similares aos encontrados na família de proteínas solúveis do veneno de cobra, as metaloproteases de veneno de cobra (SVMPs) (WOLFSBERG *et al.*, 1995).

O pró-domínio mantém o sítio metaloprotease inativo. Pró-proteínas convertases (PCs) são responsáveis pela clivagem do pró-domínio do resto da proteína em um motivo conservado RxRKR presente entre o pró-domínio e o

domínio metaloprotease. A liberação do pró-domínio e a mudança da coordenação de zinco para o domínio metaloprotease, convertem o domínio metaloprotease para um estado cataliticamente ativo (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

Uma função secundária do pró-domínio é proporcionar as chaperonas o dobramento correto das ADAMs, particularmente o dobramento do domínio metaloprotease. Esta hipótese foi sugerida por estudos que mostram que remoção do pró-domínio da ADAM17 gera uma protease inativa (MILLA *et al.*, 1999), assim como uma construção de ADAM10 ausente do pró-domínio é cataliticamente inativa *in vivo* (ANDERS *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que o pró-domínio é necessário para manter a latência dessas metaloproteases, bem como para promover o dobramento correto das ADAMs (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

O domínio metaloprotease é expresso em todas as ADAMs, sendo que este domínio é muito similar ao das metaloproteases dependentes de zinco, as SVMPs (snake venom metalloproteinase). Todas as SVMPs são ativas proteoliticamente, mas nem todas as ADAMs são proteases ativas. O domínio metaloprotease das SVMPs contém o sítio ativo consenso com a seqüência HExxHxxGxxH, sendo que análise estrutural sugere que as 3 histidinas ligam-se ao zinco, já a glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8, 9 e 10 contém os resíduos do sítio ativo das SVMPs e assim são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 22 e 23 codificam seqüências diferentes neste domínio e apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico

não está ativo (WOLFSBERG *et al.*, 1995; SAGANE *et al.*, 1998; BRACHVOGEL *et al.*, 2002).

O domínio desintegrina de algumas das ADAMs é provavelmente ligante de integrinas ou outros receptores específicos. Todas as ADAMs, com exceção da proteína TACE (ADAM17), exibem uma similaridade com as desintegrinas de veneno de cobra. Desintegrinas solúveis de veneno de cobra são conhecidas como ligantes de integrinas de aproximadamente 50-80 aminoácidos. Estas proteínas interagem com as integrinas através de uma região chamada alça desintegrina, formada por um motivo de treze aminoácidos, o qual contém seqüência RGD, a qual se projeta da superfície da célula proporcionando a ligação de integrina. Todas as SVMPs, mas nem metade das ADAMs possuem no domínio desintegrina o resíduo carregado negativamente de ácido aspártico. Este resíduo nesta posição pode ser crítico para a função de ligante de integrinas. (WOLFSBERG *et al.*, 1995; KRÄTZSCHMAR *et al.*, 1996; SAGANE *et al.*, 1998).

O domínio fusogênico potencial das ADAMs é rico em cisteína onde atua como um suposto peptídeo de fusão de membranas celulares. Estes peptídeos possuem uma capa hidrofóbica e sua habilidade para esta função deve-se ao seu modelo de α -hélice com faces hidrofóbicas (WOLFSBERG *et al.*, 1995). Já a cauda ou domínio citoplasmático é rico em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina e pode estar envolvido na oligomerização ou na sinalização. Os receptores de um domínio semelhante à EGF, domínio transmembrânico e citoplasmático nas ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutoras de sinal entre o meio extracelular e intracelular via interações célula-célula e célula-matriz

extracelular (WOLFSBERG *et al.*, 1995; KARKKAINEN *et al.*, 2000; COURTNEIDGE & SEALS, 2003; BLOBEL, 2005).

Até o momento 34 ADAMs com o domínio transmembrânico foram clonadas e seqüenciadas. Membros desta família têm sido encontrados em espécies de mamíferos, *Caenorhabditis*, *Xenopus* e *Drosophila*, mas nenhuma ADAM foi encontrada em eucariotos unicelulares e em planta (WOLFSBERG *et al.*, 1995; COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

A expressão das ADAMs pode variar consideravelmente. Em mamíferos muitas ADAMs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29 e 30) são exclusivas ou predominantemente expressas em testículos e/ou associadas a estruturas reprodutivas, estando envolvidas na fertilização e espermatogênese. Algumas ADAMs possuem uma expressão ampla como é caso da ADAM9/ADAM10/ADAM15 e ADAM17, já muitas outras ADAMs tem mostrado expressão tecidual específica: ADAM12 e ADAM19 no músculo, ADAM22 no cérebro e ADAM23 no cérebro e coração (WOLFSBERG and WHITE, 1996; SAGANE *et al.*, 1998; CERRETTI *et al.*, 1999, BRACHVOGEL *et al.*, 2002). Em adição MDC/ADAM11 é uma proteína supressora de tumor (KATAGIRI *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que 16 ADAMs são expressas no sistema nervoso central (KARKKAINEN *et al.*, 2000), sendo que algumas delas são expressa principalmente no cérebro, sugerindo que estas proteínas podem estar relacionadas com o desenvolvimento neural, uma vez que tanto os processos proteolíticos como de redobramento celular são essenciais para a manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso central. Kuzbanian/ADAM10 demonstra

um importante papel na neurogênese e Kuz é necessária para a extensão axonal em *Drosophila* (Qi *et al.*, 1999). ADAM13 pode ter um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central (CNS) em *Xenopus* (ALFANDARI *et al.*, 2001).

ADAM23/MCD3 é um importante membro da família ADAM que é expressa no sistema nervoso central, sendo expressa tanto em cérebro adulto quanto fetal. Esta desintegrina apresenta estrutura típica dos membros da família, no entanto, não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam sítio ativo para a ligação de zinco (HExxHxxGxxH), o qual é crítico para a atividade proteolítica. Portanto, ADAM23 é uma molécula potencialmente adesiva, mas não proteolítica e, provavelmente, possui um papel fundamental desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998). A importância desta proteína no desenvolvimento do sistema nervoso foi mostrada através da análise de camundongos deficientes para ADAM23, que desenvolvem problemas neurológicos tais como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas (MITCHELL *et al.*, 2001).

ADAM23 interage com integrinas específicas para promover a adesão celular. Uma maior adesão celular foi observada quando células que expressam integrina $\alpha v\beta 3$ funcional ($\beta 3$ -CHO -chinese hamster ovary) são semeadas sobre poços recobertos pelo domínio desintegrina de ADAM23. No entanto, tal adesão não foi observada para células CHO que expressam $\alpha 5\beta 1$ submetidas ao mesmo procedimento que $\alpha v\beta 3$. Esta interação entre ADAM23 e $\alpha v\beta 3$ foi evidenciada ao bloquear a função desta integrina usando um anticorpo monoclonal anti- $\alpha v\beta 3$. Foi

verificado que mesmo em presença de ADAM23 a adesão da linhagem β 3-CHO é diminuída substancialmente na presença do anticorpo anti- α v β 3 (CAL *et al.*, 2000). Interessantemente, α v β 3 atua na proliferação de precursores de oligodendrócitos em cérebros perinatais (BARON *et al.*, 2001) e parece ser necessária para maturação de sinapses hipocampais excitatórias (CHAVIS & WESTBROOK, 2002), além disso, α v β 3 é abundantemente expressa nas células gliais radiais durante o desenvolvimento de camundongos (CAL *et al.*, 2000 *apud* Hirsh, 1994). Assim, pode estar ocorrendo uma interação entre ADAM23 e α v β 3, no sentido de facilitar a migração dos neurônios no SNC (CAL *et al.*, 2000), uma vez que as células gliais radiais dão suporte aos neurônios para que estes possam migrar (ZIGMOND *et al.*, 1999). Sabendo-se que eventos de adesão célula-célula e célula matriz extracelular são de grande importância para a formação da rede neural, pode ser que alguns destes eventos estejam sendo modulados pela ADAM23 que interage especificamente com α v β 3 (CAL *et al.*, 2000).

O processo de interação específica entre α v β 3 e ADAM23 é mediado por uma pequena seqüência de aminoácidos na alça da desintegrina ADAM23 (AVNECDIT). Neste aspecto também se mostrou ausência de qualquer motivo ou domínio RGD, sugerindo que esta desintegrina interage especialmente com α v β 3 independentemente da seqüência RGD (CAL *et al.*, 2000).

ADAM23 humana foi mapeada no cromossomo 2q33 e ADAM23 de camundongo na região central do cromossomo 1, mostrando que esta proteína ocupa um único locus (SAGANE *et al.*, 1999). No entanto, esta proteína apresenta

três isoformas que são transcritos variantes do mesmo gene e que também são expressas apenas no cérebro (predominantemente) e coração. Estas isoformas são ADAM23, também designada de ADAM23 α (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM23 β e ADAM23 γ (SUN *et al.*, 2004). ADAM23 β e ADAM23 γ possuem diferentes estruturas de exón-intron transcritas, mas provenientes do mesmo locus de ADAM23. ADAM23 β difere-se de ADAM23 em alguns dos aminoácidos que formam o domínio transmembrânico (TM), compartilhando 54% (13/24aa) de similaridade no TM. ADAM23 γ difere-se de ADAM23 pela ausência do domínio transmembrânico e com relação expressão temporal, pois ADAM23 γ é expressa principalmente em cérebros de embriões e neonatais, excedendo a expressão de ADAM23 e ADAM23 β , tendo uma diminuição na sua expressão após o nascimento. Este perfil de expressão de ADAM23 γ condiz com o estágio de formação da rede neural, inferindo que esta isoforma pode ter um papel importante nesta etapa de desenvolvimento (SUN *et al.*, 2004).

Sabendo que os níveis de ADAM23 γ e da integrina αv diminuem depois do nascimento e ambas desaparecem no camundongo adulto, a interação destas duas proteínas pode ser importante para o desenvolvimento do cérebro (SUN *et al.*, 2004).

Com relação à localização de ADAM23 no cérebro, foi mostrada recentemente (GOLDSMITH *et al.*, 2004) a presença de altos níveis nos campos CA1/CA3 do hipocampo, nos giros denteados e nos neurônios hipocampais. No cerebelo sua expressão concentra-se nas células de Purkinje e nas células granulares cerebelares (CGC). Nas diferentes regiões do cérebro (tronco

cerebral, cerebelo e córtex) foi verificada a expressão de um antígeno de 70 kDa correspondente a ADAM23, através da comparação com amostras provenientes de animal *Adam23* knock-out (MITCHELL *et al.*, 2001). Interessantemente, células granulares cerebelais expressam uma outra forma de ADAM23, que possui massa de aproximadamente 100 kDa que foi designada de forma imatura. Essas duas formas da proteína ADAM23 podem ser explicadas pelo processamento do seu pró-domínio pela proteína convertase (PC), sendo a forma imatura (100 kDa) não processada e, a forma madura (70 kDa), processada e na qual falta o pró-domínio (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Este processo de clivagem do pró-domínio do resto da proteína ocorre normalmente nas ADAMs e parece ser pré requisito para gerar a atividade metaloprotease (COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

ADAM23 imatura e madura são proteínas glicosiladas e que estão presentes na superfície celular, sendo que a forma imatura está em menor quantidade. Foi descrito para outros membros da família das ADAMs a existência de formas imatura e madura, sendo a última resultado do processamento por PC (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

Foi demonstrado que a expressão de ADAM23 é diminuída através da hipermetilação 5' do gene em tumores de mama, sugerindo que esta molécula de adesão pode ter um papel importante na progressão do câncer (COSTA *et al.*, 2004). No entanto, este tipo de regulação diminuída por metilação é um evento raro em tumores de cérebro, podendo explicar porque este tipo de metástase é raramente encontrado em outras partes do corpo (COSTA *et al.*, 2005).

1.2 Justificativa do estudo da proteína ADAM23

Um dos grandes desafios da neurociência é explicar como os axônios e dendritos crescem, encontram seus alvos e estabelecem seletivamente sinapses com estes alvos, formando uma complexa rede funcional.

Sabendo que a proteína ADAM23 está relacionada com interações adesivas e possivelmente proteolíticas e, possui expressão principalmente no sistema nervoso central, torna-se importante estudar seu papel neste sistema.

Para que tal estudo seja eficiente, faz-se necessário a produção de reagentes específicos que possam reconhecer a proteína ADAM23 em diversos ensaios bioquímicos e funcionais. Neste contexto, anticorpos policlonais que reconheçam o antígeno de interesse mostram-se adequados como ferramenta no estudo da função biológica da proteína ADAM23.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

2 Objetivos

- ✓ Expressão da proteína ADAM23 em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* e sua purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC).
- ✓ Obtenção de anticorpos policlonais anti-₆HisADAM23.
- ✓ Utilização dos reagentes obtidos em ensaios bioquímicos e de localização tecidual.

3 Materiais e métodos

3.1 Purificação da proteína recombinante ϵ His-ADAM23

O vetor de expressão utilizado na clonagem dos domínios metaloprotease e desintegrina do gene *Adam23* foi o vetor pET32 (Novagen Co). A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* foi feito como descrito por Sambrook *et al.* (2001), a partir da inserção do plasmídeo pET32-*Adam23* (ZANATA *et al.*, dados não publicados) inicialmente na cepa de *E. coli* BL 21 (DE3) (Novagen Co.) e, posteriormente, devido aos problemas encontrados na purificação, cepas C41 e C43 (MIROUX & WALKER, 1996) também foram utilizadas para expressão da proteína recombinante ADAM 23.

3.1.1 Preparação das cepas BL21(DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3) de *E. coli* competentes eletricamente

As cepas de *E. coli* foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001) que consiste nas seguintes etapas: 5 ml de LB (10 g/l NaCl, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/l de peptona) foram inoculados com colônias das diferentes cepas de *E. coli* e cultivadas por 16 horas a 37 °C com agitação (pré-cultura).

Um ml da pré-cultura foi utilizado para inocular 100 ml de LB. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até a absorbância 0,4 – 0,5 a 600 nm. Após esse tempo a cultura foi resfriada no gelo por 10-15 minutos, e as células coletadas por centrifugação a 4000 x g por 5 minutos a 0 °C. Então o sobrenadante foi

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

descartado e as células foram ressuspensas em água deionizada previamente autoclavada e resfriada. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 16000 x g por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensado em metade do volume original com uma solução de glicerol 10% (v:v). A suspensão celular foi novamente centrifugada por 10 minutos a 16000 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas num pequeno volume de glicerol 10% e armazenada a -70 °C em alíquotas 40µl em tubos de microcentrífuga.

3.1.2 Transformação das cepas de *E. coli* eletrocompetentes

As células competentes (40 µl) foram retiradas do freezer -70 °C e descongeladas lentamente em gelo. Após o descongelamento, foi adicionado 1µl (aproximadamente 25ng) do plasmídeo de interesse (pET32-*Adam23*), ficando as células incubando no gelo durante 1 minuto. Após isto, as células foram submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV, para a introdução do DNA na célula. Após o choque elétrico, foi adicionado as células 800µl de meio LB e esta cultura foi incubada a 37 °C durante uma hora para recuperação das células.

Após a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido (LB-Ágar, 17g/l Ágar) contendo antibiótico apropriado na concentração de 100µg/ml (o plasmídeo pET32 possui um gene que codifica resistência a ampicilina, por isso, as células, após a transformação, são cultivadas em meio LB-Ágar contendo o antibiótico ampicilina).

3.1.3 Purificação e obtenção do plasmídeo pET32–Adam23 pela técnica de minipreparação de plasmídeo por lise alcalina

Os plasmídeos foram purificados de acordo com procedimento descrito por Sambrook *et al.* (2001). Uma colônia contendo o plasmídeo de interesse foi cultivada em 2ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado (LB/Amp) a 37 °C por 16 horas com agitação. A cultura (1,5 ml) foi coletada por centrifugação por 2 minutos em velocidade máxima (13.000 x g) numa micro-centrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado (meio LB/Amp) e foram adicionados ao sedimento bacteriano 100 µl da Solução I de miniprep (50mM Glicose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0), em seguida foram adicionados 200 µl da Solução II (0,2 M NaOH, 1%SDS) que foram homogeneizados por inversão, 150 µl da Solução III (Acetato de Potássio 3M pH 4,8) foi adicionado e misturado por inversão por aproximadamente 15 segundos. O material foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g e temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi extraído com um volume de fenol-clorofórmio e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado, o DNA foi coletado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, lavado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em água deionizada autoclavada e livre de DNAases.

3.1.4 Protocolo de miniexpressão

Primeiramente, foi realizada uma miniexpressão com a finalidade de se identificar as colônias com expressão protéica mais eficiente. Colônias recombinantes provenientes do plaqueamento, foram inoculadas em 2 ml de meio

LB/Amp e cultivadas durante 16 horas a 37 °C (pré-inóculo). 200 µl do pré-inóculo foram inoculados em tubos contendo 10 ml de meio LB/Amp. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até a absorbância de 0,4 – 0,6 a 600 nm a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,4 mM. As culturas foram incubadas a 37°C por mais quatro horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos e então ressuspensas em tampão de amostra duas vezes concentrado (90 mM Tris•Cl pH 6,8, 20% glicerol, 0,02% azul de bromofenol e 20 µl/ml β-Mercaptoetanol), submetido a 10% SDS-PAGE e corado com azul de comassie.

3.1.5 Teste de solubilidade

Para testar a solubilidade da proteína recombinante ADAM23 expressa pelas colônias da cepa BL21 (DE3), repetiu-se o procedimento descrito no item 3.1.4.

Após a indução, as culturas foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 30 a 35 ml de tampão de lise nativa (300mM de NaCl, 50mM de NaH₂PO₄ e 10mM de Imidazol, pH 8,0). As células foram submetidas à pressão física em prensa de French, e o extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000xg por 20 minutos). Após a lise, o sobrenadante e o sedimento (solubilizado com tampão 8M Uréia, 100mM NaH₂PO₄ e 10mM de Tris-CL pH 8,0) foram submetidos à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), em tubo de poliestireno, por 12 horas a 4°C. Amostras da proteína purificada foram separadas por eletroferese em gel de

poliacrilamida desnaturante e redutor (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de Western Blotting com anticorpo que reconhece etiqueta de cinco histidinas (anti-₅His) (Invitrogen, Co).

Para as cepas C41(DE3) e C43(DE) este procedimento foi repetido utilizando para a lise o seguinte tampão: 500mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM β -mercaptoetanol (β -ME) e 10% de glicerol acrescido de diferentes agentes solubilizadores: N-lauril-sarcosil 0,5%, tween-20%, triton X-100 0,25% e NP40 0,25% ou 6M de uréia. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 10 ml de tampão de lise com seus respectivos agentes solubilizadores e submetidas à pressão física na prensa de French e centrifugadas. As frações solúvel e insolúvel foram separadas e amostras destas frações foram separadas por 10% SDS-PAGE e posteriormente coradas com azul de coomassie, para verificar em qual das frações estava a proteína de interesse. As frações solúveis provenientes da solubilização dos diferentes agentes foram submetidas à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), em tubo de 2,0 ml durante 1h a 4 °C, exceto fração solubilizada com 6M uréia que ficou a temperatura ambiente. Amostras da proteína purificada foram analisadas por Western Blotting usando anticorpo anti-₅His (Invitrogen, Co).

3.1.6 Expressão e purificação da proteína ₆His-ADAM23 em larga escala

Clones com alta taxa de expressão da proteína ADAM23 foram expandidos em 500 ml de meio de cultura líquido, com agitação, a 37°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600 nm, foram induzidas à expressão utilizando

0,4 mM de IPTG, deixando-se então as células crescerem por mais quatro horas. O meio de cultura foi centrifugado e as células utilizadas para a purificação.

As células foram ressuspendidas em solução de lise desnaturante (8M uréia, 100mM de NaH₂PO₄ e 10mM de Tris pH 8,0). As células foram submetidas à pressão física em prensa de French, lisando a parede celular e membrana plasmática e dissociando os corpos de inclusão. O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000xg por 20 minutos) e então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). As proteínas contendo a etiqueta de 6 histidinas ligaram à fase estacionária NTA-Ni-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha) através de ligação de coordenação do cátion Ni²⁺ imobilizado e das histidinas presentes na quimera protéica ₆His-ADAM23. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com tampão de lise desnaturante contendo 10mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas seqüenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. As proteínas foram então eluídas com 250mM de imidazol em tampão de lise e armazenadas em alíquotas a -20°C.

3.1.7 Análise da purificação

Amostras da proteína purificada foram separadas por eletroferese em gel de poliacrilamida desnaturante e redutor (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de immunoblot com anticorpo anti-₅His (Invitrogen Co.) e anti- ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005).

3.1.8 Diálise da proteína purificada em uréia

Uma vez que a proteína purificada estava em tampão contendo 8M de uréia foi necessário remover o agente caotrópico por diálise. Foram feitas três trocas de dois litros (seis litros no total) de tampão PBS pH 7,4 (137mM NaCl; 2,07mM KCl; 10mM Na₂PO₄; 1,8mM KH₂PO₄) a 4 °C. A concentração da proteína após a diálise foi medida pelo método de Bradford (1976).

3.2 Imunizações de coelhos

Com o intuito de produzir soro policlonal específico para a proteína ADAM23, foi imunizado um coelho adulto (1,2kg) da raça neozelandesa com aproximadamente 80µg de proteína nas primeiras cinco imunizações e 500µg na 6^a e 7^a imunizações. Para a primeira imunização foi preparada uma emulsão 1:1 (V/V) de proteína e adjuvante completo de Freud como descrito por Harlow & Lane (1988).

Nas demais imunizações, a proteína ⁶His-ADAM23 que estava ligada à resina NTA-Ni-Agarose foi separada por SDS-PAGE 10%. O gel foi corado com azul de coomassie, em seguida descorado e lavado com água deionizada 2 vezes por trinta minutos, a banda correspondente a proteína recombinante foi retirada do gel e macerada em PBS, totalizando um volume de 2ml. As suspensões contendo o antígeno foram inoculadas no coelho em três pontos, dois pontos intramusculares e um ponto subcutâneo (HARLOW & LANE, 1988).

3.3 Separação eletroforética por SDS-PAGE

A proteína recombinante purificada, a proteína ligada à resina de NTA-Ni-Agarose e extratos de cérebros de camundongos foram submetidos à eletroforese SDS – PAGE 10% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As proteínas utilizadas no experimento foram diluídas em tampão de amostra redutor na proporção de 3:1, sendo que esta mistura amostra/tampão foi fervida durante cinco minutos. A separação eletroforética foi realizada em sistema Mini Protean3 (Bio Rad) com corrente de 10mA até o momento da entrada das proteínas no gel de separação, e em seguida a corrente foi elevada para 15mA, sendo que essa corrente permaneceu constante até a saída da frente de migração do gel, visualizada com o auxílio do azul de bromofenol contido na frente de migração.

3.4 Imunoensaio de Western Blotting

As amostras separadas através de SDS – PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μ m – Amersham Biosciences, USA) durante 16 horas sob voltagem de 25V. As membranas foram bloqueadas durante duas horas com TBST (129mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé). Dois anticorpos foram usados para a detecção da proteína recombinante: o anticorpo primário anti- γ His (Invitrogen) e o anticorpo primário anti-ADAM23 peptídeo (COSTA *et al.*, 2004; 2005) usados nas concentrações de 1:5000 e 1:500 respectivamente, ambos diluídos em tampão de bloqueio. As membranas ficaram incubando com o anticorpo primário durante 16 horas à 4°C. Após este tempo, fez-se a lavagem das

membranas em ciclos de cinco vezes por cinco minutos com TBST e em seguida, adicionaram-se os anticorpos secundários: anti-imunoglobulina de camundongo (nas membranas incubadas com anti- 3 HHis-tag) e anti imunoglobulina de coelho (nas membranas incubadas com anti-peptídeo ADAM23), ambos conjugados a peroxidase e na diluição de 1:10000 durante uma hora à temperatura ambiente. As membranas foram submetidas a novo ciclo de lavagem, e então foram incubadas com o substrato adequado para a reação quimioluminescente (Amersham Pharmacia). Um auto-radiograma (Kodak) foi exposto à membrana em diversos tempos até a visualização adequada do antígeno.

Após as imunizações, o soro do coelho foi utilizado como anticorpo primário no lugar do anticorpo anti- 3 HHis, para verificar se os animais produzem anticorpos capazes de reconhecer o antígeno, tanto proteína recombinante como a endógena proveniente de extratos de cérebros de camundongos. O anticorpo produzido foi utilizado na diluição de 1:500.

No caso dos experimentos de bloqueio do anticorpo, uma solução do anticorpo primário foi pré-incubada com membrana contendo 3 HHis-ADAM23 imobilizada durante seis horas. Em seguida tal solução foi utilizada nos ensaios de Western Blotting convencionais sobre extratos de cérebro de camundongo. Neste tipo de ensaio, o controle negativo consistiu em pré-incubar a solução do anticorpo primário com membrana de nitrocelulose sem nenhum antígeno imobilizado.

3.5 Extração de proteínas de tecidos nervosos para obtenção da proteína endógena

Extrações de proteínas de tecidos nervosos de camundongos foram feitas como previamente descrito (MARTINS *et al.*, 1997). Foram preparados extratos de cérebros totais de camundongos adultos e pós-natos (P0) e também frações de 30% de sulfato de amônio. Os extratos tiveram a concentração protéica medida pelo método de Bradford (1976) e foram submetidos à separação eletroforética (SDS-PAGE), transferência à membrana de nitrocelulose e reação de immunoblot com o soro pré-imune e imune do coelho.

4 Resultados

4.1 Purificação da proteína $_6$ His-ADAM23

O plasmídeo pQE30-*Adam23*, após sua purificação pela técnica de minipreparação, foi utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe BL21(DE3). Clones contendo o plasmídeo foram selecionados por antibiótico (ampicilina), expandidos e induzidos com IPTG para expressar a proteína recombinante $_6$ HisADAM23. Extratos de bactérias induzidas foram ressuspensos em tampão de amostra e submetidos à SDS-PAGE 10% e corados com coomassie, para verificar se a proteína de interesse estava sendo expressa (dados não mostrados). Sabendo que a expressão da proteína estava de acordo com o esperado, o passo seguinte foi verificar se a proteína estava na

fração insolúvel do extrato bacteriano ou na fração solúvel através do teste de solubilidade (fig.1).

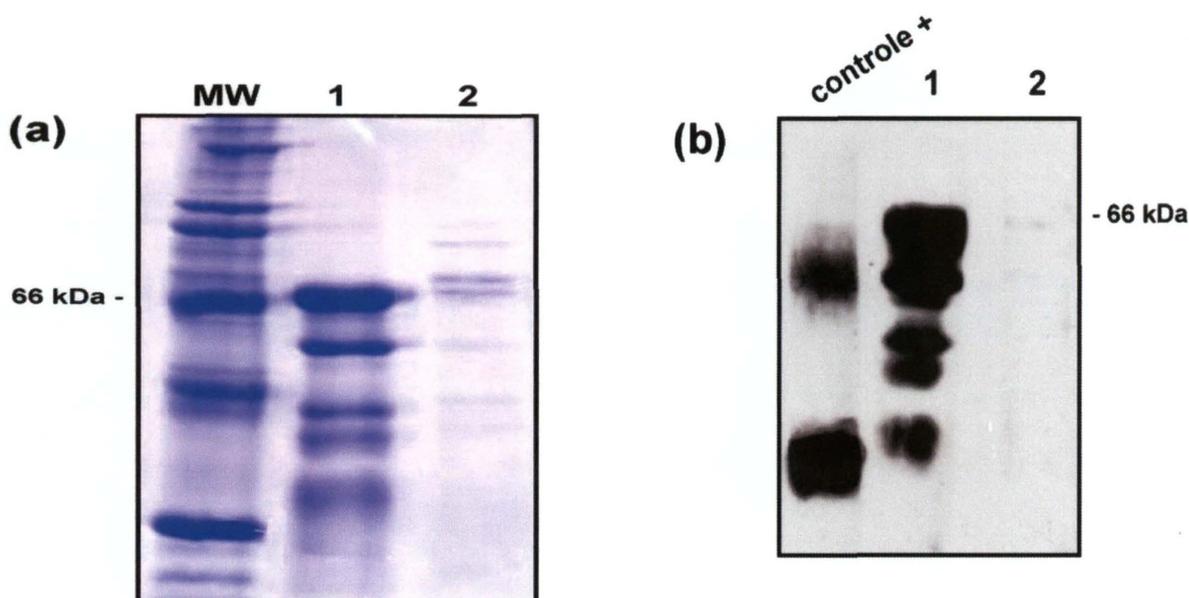


Figura 1: Análise da solubilidade da proteína ADAM23 expressa em sistema heterólogo de *E. coli*. (a) Perfil eletroforético do lisado do clone utilizado para a expressão da proteína recombinante mostrando a fração solúvel (canaleta 2) e a fração insolúvel (canaleta 1). (b) Ensaio de Western Blotting utilizando o anticorpo anti ϵ His-tag. Na canaleta + está o controle positivo, a proteína recombinante ϵ His-Rnd1, na canaleta 1 está a fração insolúvel e na 2 a fração solúvel, ambas purificadas por IMAC. Como pode ser observada, a proteína de interesse está presente na fração insolúvel.

Sabendo que a proteína ϵ His-ADAM23 está na fração insolúvel do lisado bacteriano, prosseguiu-se a purificação em larga escala sob condições desnaturantes (tampão contendo 8M de uréia), que foi posteriormente removido por diálise contra PBS. Na diálise parte da proteína purificada precipitou. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). E as frações dialisadas foram analisadas por Western Blotting (fig.2).

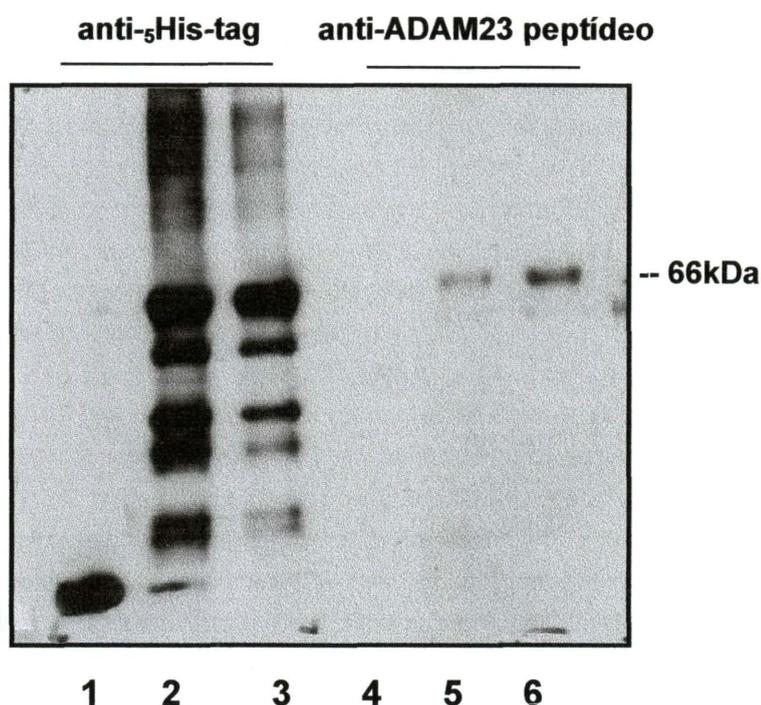


Figura 2: Análise das amostras da proteína ADAM23 após sua purificação por IMAC. Western Blotting para detecção da proteína ADAM23 pelos anticorpos anti-₅His (Invitrogen) e anti-peptídeo ADAM23 (COSTA *et al.*, 2004; 2005). Nas canaletas 2 e 3 está a proteína recombinante após a diálise (frações A e B respectivamente) e na canaleta 1 está ₆His-PrPc. Essas três amostras foram reagidas com o anticorpo anti-₅His. Pode se observar que este anticorpo reconhece as duas proteínas recombinantes possuidoras da etiqueta de seis histidinas e neste caso, a proteína ₆His-PrPc foi utilizada como controle positivo. No lado direito, tem-se as mesmas amostras, nas canaletas 5 e 6 está a proteína ADAM23 após a diálise (frações B e A, respectivamente) e a amostra na canaleta 4 é ₆His-PrPc, sendo que todas foram reagidas com o anticorpo anti-peptídeo ADAM23, podendo ser observado que este anticorpo reconhece a proteína ADAM23 expressa e purificada, não reconhecendo a proteína ₆His-PrPc (controle negativo).

Como não foi possível obter a proteína solúvel após a remoção do agente desnaturante e a proteína na condição precipitada ou solubilizada em tampão desnaturante não pode ser utilizada em ensaios de funcionalidade, optou-se na

execução de um protocolo de purificação sob condições nativas. Para otimizar a expressão da proteína de interesse e obter esta na forma solúvel, utilizou-se uma temperatura mais baixa (24° a 26° C) durante a indução da expressão protéica pela bactéria. Mesmo com a diminuição da temperatura de expressão, não foi possível obter a proteína através da lise em condição nativa (fig. 3).

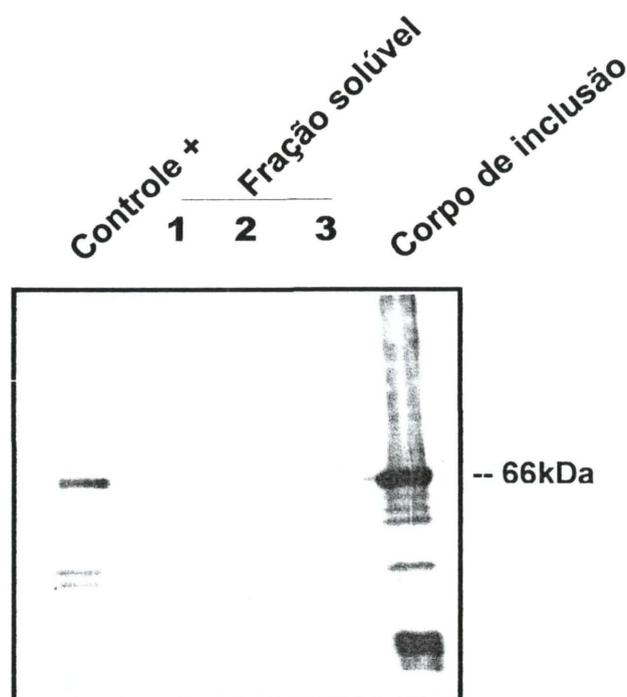


Figura 3: Análise das amostras da proteína ADAM23 após sua purificação por IMAC sob condições nativas. Western Blotting para detecção da proteína ADAM23 pelo anticorpo anti-₅His (Invitrogen). Na linha da esquerda está o controle positivo, a proteína ₆His-ADAM23 purificada sob condições desnaturantes. Nas linhas 1 a 3 estão as frações purificadas sob condições nativas e na linha da direita está a fração do corpo de inclusão (fração insolúvel do lisado bacteriano). Todas as amostras foram reagidas com o anticorpo anti-₅His, mas apenas o controle positivo e o corpo de inclusão foram reconhecidos pelo anticorpo, mostrando assim que não foi possível purificar a proteína de interesse sob condições nativas.

Não sendo possível a purificação da proteína de interesse sob condição nativa, outra metodologia foi empregada para sua obtenção numa forma mais solúvel e não em tampão 8M de uréia. Foi realizada lise desnaturante e durante a purificação foi realizado o redobramento da proteína imobilizada na coluna de NTA-Ni-Agarose. Neste processo, o agente desnaturante é removido lentamente a partir da geração de um gradiente de linear, partindo de maior concentração para menor concentração do agente desnaturante. Neste caso, a faixa de gradiente empregado foi 8M-1M de uréia. Este método para a obtenção da proteína solúvel também não foi eficaz, pois não foi possível eluir a proteína, nem por aumento na concentração de imidazol e nem por diminuição do pH, permanecendo a proteína ligada à coluna de NTA-Ni-Agarose (fig.4).

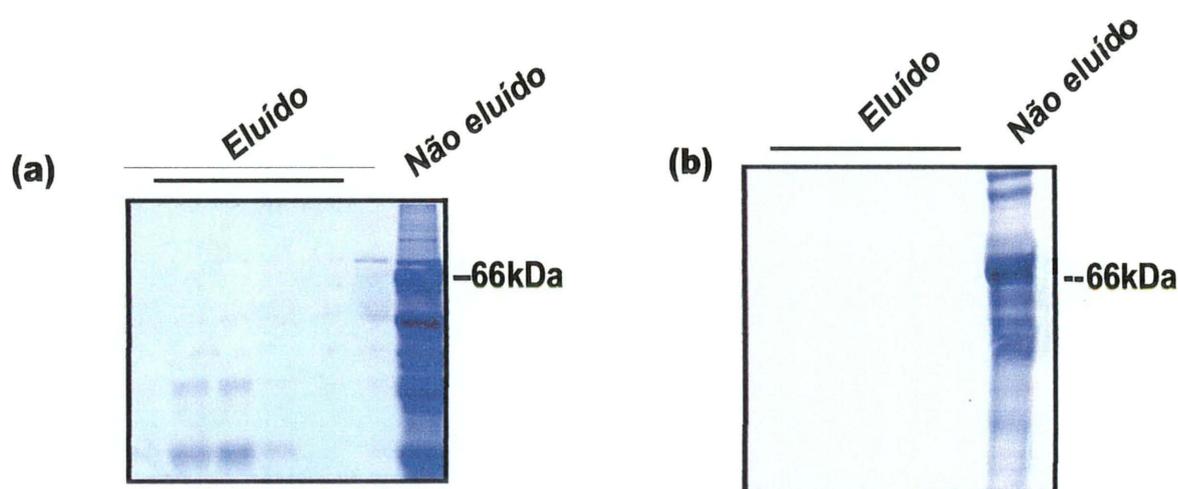


Figura 4: Análise das amostras da proteína ADAM23 após sua purificação por IMAC sob condições desnaturantes utilizando a metodologia de redobramento durante a purificação. (a) SDS-PAGE 10% corado com coomassie blue, evidenciando as frações purificadas empregando imidazol para a eluição das proteínas. Na linha da direita está a proteína recombinante que ficou ligada à resina (indicada em 66 kDa, massa correspondente a proteína recombinante), e nas demais linhas estão as frações eluídas após o

redobramento da proteína. **(b)** SDS-PAGE 10% corado com coomassie blue, evidenciando proteínas eluídas pela diminuição do pH. Na linha da direita está a proteína que ficou ligada a resina (altura de 66 kDa) e nas demais linhas estão as frações eluídas após o redobramento. Pode ser observado que a proteína fica toda ligada na resina de Níquel-NTA-Agarose, utilizando tanto o imidazol quanto diminuição de pH para a eluição da proteína.

Novas purificações em larga escala foram feitas sob condições desnaturantes e sem realizar o redobramento da proteína, mas mesmo assim não foi possível obter a proteína purificada, pois esta ficava fortemente ligada na resina ou estava precipitando na resina (dados não mostrados). Levando em conta estes resultados, resolveu-se mudar a estirpe de *E. coli*, a fim de se obter a proteína de interesse solúvel. Novas purificações foram feitas utilizando as estirpes C41 (DE3) e C43 (DE3) (MIROUX & WALKER, 1996), bem como a utilização de diferentes agentes solubilizadores e um novo tampão.

As estirpes supracitadas são mutantes da estirpe BL21 (DE3) e são capazes de produzir proteínas que formam corpos de inclusão em elevados níveis sem ter efeitos tóxicos (MIROUX & WALKER, 1996). O tampão agora utilizado apresenta alguns agentes que podem melhorar a solubilidade, estes agentes são o β -mercaptoetanol (β -ME) que mantém as cisteínas reduzidas, evitando assim a interação entre as proteínas e o glicerol que previne interações hidrofóbicas entre proteínas.

Para a estirpe C41 foi realizado o teste de solubilidade utilizando os seguintes agentes solubilizadores: 0,5% de sarcosil; 0,5% de tween 20; 0,25% de triton X-100 e 0,25% de NP40 e 6M de uréia. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas e, a partir das frações solúveis foi realizada a purificação por IMAC (fig. 5).

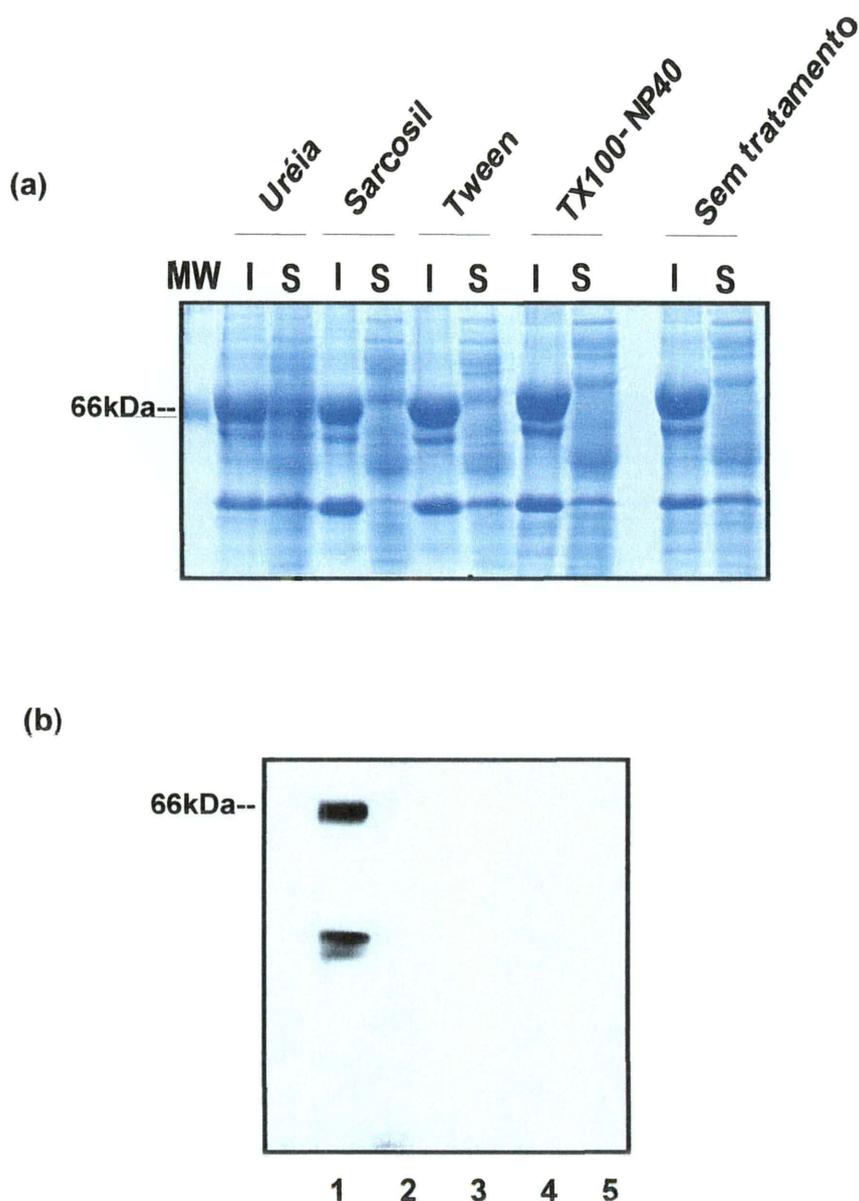


Figura 5: Análise das frações solúveis e insolúveis do lisado bacteriano proveniente da estirpe C41 tratado com diferentes agentes solubilizadores. (a) Células de *E. coli* C41 contendo o plasmídeo pET32-*Adam23* foram lisadas na presença do tampão Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, Glicerol 10%, β -ME 5mM e 0,5% do detergente indicado ou 6M de uréia. Após o tratamento as frações insolúvel (I) e solúvel (S) foram analisadas em 10% SDS-PAGE. MW indica o padrão de massa molecular em kDa. As proteínas foram coradas com coomassie blue. (b) A fração solúvel do lisado bacteriano foi purificada por IMAC. Em 1 está a fração eluída proveniente da lise com uréia, em 2 a fração purificada a partir do sarcosil, em 3 proveniente do Tween 20, em 4 proveniente do Triton X-100 e do NP40 e em 5 a fração purificada sem a adição de nenhum agente solubilizador. A massa da proteína purificada a partir da lise com uréia é de 66kDa, correspondente a massa esperada, a banda mais a baixo da massa de 66kDa provavelmente é produto de degradação da proteína purificada.

A mesma metodologia utilizada para a estirpe C41 foi empregada para a estirpe C43, entretanto utilizando somente os agentes solubilizadores uréia (6M) e sarcosil (1%). As frações insolúvel e solúvel proveniente do tratamento de cada um destes agentes foram analisadas por Western Blotting usando o anticorpo anti $_5\text{His}$ (fig.6).

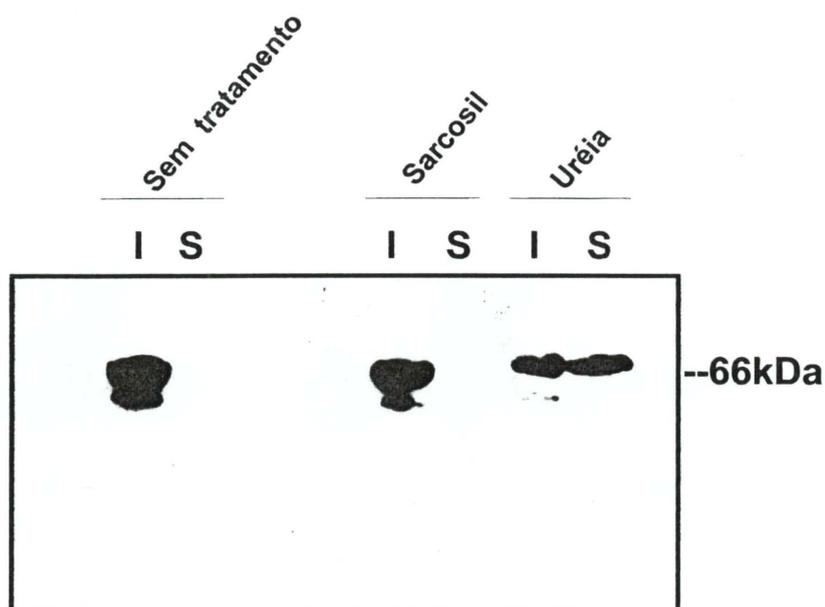


Figura 6: Análise das frações solúvel e insolúvel do lisado bacteriano proveniente da estirpe C43 tratado com diferentes agentes solubilizadores. Células de *E. coli* C43 contendo o plasmídeo pET32-Adam23 foram lisadas na presença do tampão Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, Glicerol 10%, β -ME 5mM e 1% de sarcosil ou 6M de uréia. Após o tratamento as frações insolúvel (I) e solúvel (S) foram analisadas através de Western Blotting. Pode ser observado que a proteína recombinante de interesse está na fração insolúvel do lisado bacteriano e apenas a uréia é capaz de promover a solubilização da proteína de interesse.

4.2 Produção de anticorpos

A proteína que permaneceu ligada e/ou precipitou na coluna Níquel-NTA-Agarose foi utilizada para imunizar um coelho da raça neozelandesa. Quinze dias após a 5^a e a 7^a imunização, o sangue foi coletado através de punção cardíaca e o soro obtido após a retração do coágulo. A capacidade do soro do coelho submetido às imunizações de reconhecer a proteína ADAM23 foi avaliada por reações de immunoblotting. A proteína recombinante ₆His-ADAM23 foi submetida à reação de immunoblot (fig. 7a) usando o soro hiperimune do coelho. Para testar se a proteína ADAM23 endógena de camundongo era reconhecida pelos soros, foram preparadas frações 30 % de extratos de cérebros de camundongos recém-natos e adultos. Esses extratos também foram submetidos à reação de immunoblot (fig. 7b) usando o soro hiperimune do coelho.

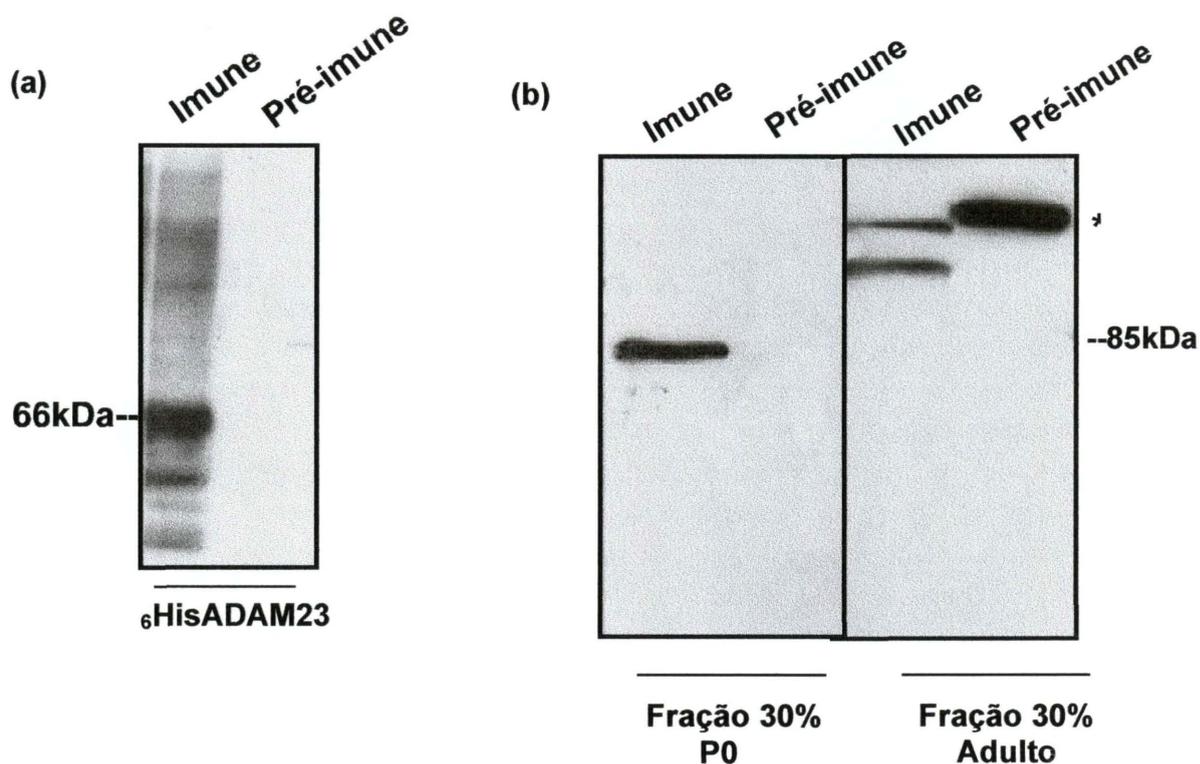


Figura 7: O soro hiperimune reconhece a proteína ADAM23. Reação de Western Blotting empregando o soro policlonal anti-₆HisADAM23. **(a)** A proteína recombinante ADAM23 foi reconhecida fortemente pelo soro policlonal e nenhuma reação foi observada com o soro pré-imune. **(b)** 175ug / poço de fração 30% de extrato de cérebro de camundongo adulto e de recém nato foram utilizados neste ensaio. O soro policlonal reconhece na fração 30% de recém-nato um antígeno de massa inferior que 85kDa que não é reconhecida pelo soro pré-imune e que pode ser a isoforma γ da ADAM23 que está presente apenas em embriões e neonatos. Na fração 30% de adulto, o soro policlonal reconhece um antígeno com massa de aproximadamente 90 kDa que corresponde a proteína ADAM23, sendo que esta banda não é reconhecida pelo soro pré-imune. O asterisco (*) indica uma banda inespecífica.

Com o intuito de verificar se as bandas reconhecidas pelos anticorpos presente no soro do animal hiperimune eram específicas, foi feito ensaio de bloqueio da reação antígeno-anticorpo. Este ensaio consiste em pré-incubar o soro hiperimune com o seu antígeno (neste caso usou-se a proteína recombinante purificada imobilizada na membrana de nitrocelulose). Após isso, o sobrenadante

é recuperado e incubado novamente com a proteína recombinante e também com frações 30% de extrato de cérebro de adulto, ambas as amostras imobilizadas em membranas de nitrocelulose (fig. 8).

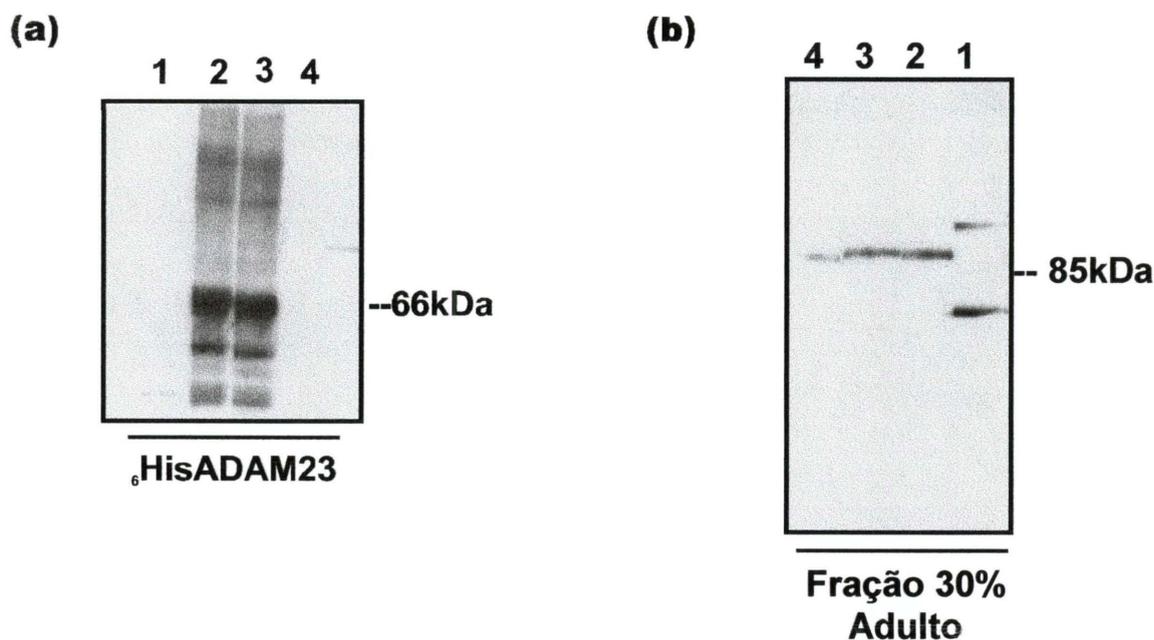


Figura 8: Ensaio de bloqueio para verificar a especificidade dos anticorpos presente no soro do coelho imunizado. (a) A proteína recombinante ADAM23 foi resolvida por SDS-PAGE e reagida sob diversas condições descritas a seguir: na canaleta 1, a proteína purificada foi reagida com o soro pré-imune do coelho; na canaleta 2, a proteína purificada foi reagida com o soro hiperimune. Na canaleta 3, a reação foi realizada com o sobrenadante proveniente da pré-incubação do soro hiperimune com membrana de nitrocelulose sem nenhum antígeno imobilizado e na canaleta 4 a reação foi realizada com o sobrenadante proveniente da pré-incubação do soro hiperimune com o antígeno ϵ HisADAM23 imobilizado em nitrocelulose. **(b)** Fração 30% de extrato de cérebro de camundongo adulto foi submetida ao procedimento descrito anteriormente, e os números correspondem aos mesmos tratamentos descritos no painel a. Observa-se que o soro pré-imune não reconhece a proteína recombinante (painel a, número 1), no entanto reconhece duas bandas inespecíficas no cérebro de camundongo (painel b, número 1). O soro hiperimune reconhece fortemente ϵ His-ADAM23 (a2) e também reconhece uma banda na altura de aproximadamente 90kDa no extrato de cérebro (b2). Tanto a banda correspondente a proteína recombinante (a4), como a banda de ~ 90kDa reconhecida pelo anticorpo no extrato de cérebro de camundongo adulto (b4), desaparecem quando o soro hiperimune é pré-incubado com a proteína recombinante imobilizada na membrana de nitrocelulose, mostrando assim que os anticorpos presente no soro do coelho imunizado são específicos para a proteína ADAM23.

De acordo com o ensaio de bloqueio, verifica-se que os anticorpos presentes no soro policlonal do coelho imunizado são específicos para a proteína ADAM23.

5 Discussão

O teste de solubilidade mostrou que a proteína de interesse está presente na fração insolúvel do lisado bacteriano, sendo, portanto, necessário sua purificação sob condições desnaturantes. No entanto, essa condição de purificação não permite a realização de ensaios de funcionalidade, como por exemplo, ensaios de interação com outras proteínas de interesse presentes no sistema nervoso. Uma possível modificação no sistema de expressão para obter-se proteínas solúveis é a diminuição da temperatura de expressão, esta diminuição permite que o peptídeo tenha um maior tempo para alcançar suas estruturas terciárias e quaternárias (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Mesmo diminuindo a temperatura durante a expressão não foi possível purificar a proteína sob condições nativas (fig. 3).

O redobramento (refolding) da proteína durante a purificação foi realizado, a fim de se obter a proteína solúvel e em condições não desnaturantes, no entanto esta metodologia não foi eficaz, uma vez que não foi possível eluir a proteína que estava ligada a matriz de Níquel-NTA Agarose. Duas possíveis causas para a não eluição da proteína, após o processo de redobramento, foram levantadas. A primeira é que a proteína poderia estar escondendo sua etiqueta de histidinas por impedimento estérico, não podendo ser eluída nem por diminuição de pH e nem

por adição de imidazol (fig.4). A outra possibilidade seria a precipitação da proteína na matriz de Níquel-NTA Agarose. Esta última possibilidade foi comprovada com ensaios de purificação nos quais não foi realizado o processo de redobramento, e mesmo assim, não foi possível eluir a proteína devida sua precipitação na matriz de Níquel-NTA Agarose (dados não mostrados).

Algumas mudanças foram implantadas para se conseguir a proteína recombinante ADAM23 em um estado mais solúvel. Duas novas estirpes de *E. coli* foram testadas, bem como um outro tampão de lise e outros agentes solubilizadores. Mesmo utilizando duas estirpes apropriadas para a expressão de proteínas transmembrânicas (estirpes C41 e C43), bem como reagentes que poderiam otimizar a solubilização da proteína de interesse, foi possível obter a proteína solúvel somente quando o lisado bacteriano era tratado com uréia, comprovando assim que a proteína de interesse forma corpo de inclusão, provavelmente pela não formação de estrutura terciária correta, fato esse decorrente da incapacidade do hospedeiro (no caso *E. coli*) promover o enovelamento correto da proteína exógena (SAMBROOK & RUSSEL,2001).

O anticorpo anti₆His-ADAM23 é eficaz no reconhecimento tanto do antígeno recombinante como do antígeno proveniente do cérebro de camundongos. Todavia, o antígeno recombinante é mais fortemente reconhecido que o antígeno endógeno, isso porque provavelmente, a proteína recombinante ADAM23 purificada em tampão desnaturante e a proteína ADAM23 proveniente dos extratos de cérebros expõem epítomos diferentes.

Nos ensaios de Western Blotting nos quais as membranas de nitrocelulose possuíam proteínas provenientes da fração 30% de extratos de cérebros de camundongos adultos (fig.7 b), os anticorpos do soro hiperimune reagiram com proteínas de massa molecular aparente de aproximadamente 90kDa correspondente com a massa descrita por Sagane *et al.*, 1998, sendo que a proteína correspondente a esta massa foi bloqueada quando soro policlonal foi pré-incubado com a proteína recombinante ADAM23, mostrando assim, que a proteína de aproximadamente 90kDa que havia sido reconhecida pelos anticorpos presentes no soro policlonal é específica e corresponde a ADAM23. O ensaio de bloqueio foi realizado devido à necessidade de se averiguar a especificidade dos anticorpos presentes no soro hiperimune, uma vez que foi descrito para a proteína ADAM23 mais de uma isoforma (SUN *et al.*, 2004), e formas matura e imatura (GOLDSMITH *et al.*, 2004), tornando difícil o reconhecimento das bandas específicas das amostras, mesmo que estas bandas não estejam presentes nestas mesmas amostras reagidas com o soro pré-imune do coelho.

Na fração 30% de extratos de cérebros de recém-natos, os anticorpos reagiram com proteínas de massa molecular menor que 90kDa (fig. 7 a), que pode ser que seja a isoforma γ de ADAM23 descrita por Cal *et al.*, 2000. Sendo que esta isoforma está presente somente em embriões e neonatais, excedendo a expressão de ADAM23 e ADAM23 β . Para saber se o antígeno presente no cérebro de recém-nato é específico, é necessário realizar a mesma abordagem de bloqueio realizada para o antígeno expresso no cérebro do animal adulto.

6 Conclusão

- ✓ A proteína recombinante ADAM23 foi expressa em sistema heterólogo de *E. coli*, a partir do vetor de expressão pET32-Adam23.
- ✓ A proteína de interesse foi purificada sob condições desnaturantes, pois está presente na fração insolúvel do lisado bacteriano.
- ✓ Os anticorpos policlonais produzidos são eficientes no reconhecimento tanto da proteína recombinante, como da proteína expressa no sistema nervoso de camundongos adultos e de recém-natos.

7 Referências Bibliográficas

ALFANDARI, D., COUSIN, H., GAULTIER, A., SMITH, K., WHITE, J. M., DERRIBERE, T., DESIMONE, D. W. Xenopus ADAM13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. **Curr. Biol.** 11: 918-930, 2001.

ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W., POSTINA, R.; FAHRENHOLTZ, F. regulation of the α secretase ADAM10 its prodomain and proprotein convertase. **FASEB J.** 15/ 1837-1839, 2001.

BLOBEL, C., P. ADAMS: key componentes in EGFR sinalling and development. **Nature** 6: 32-42, 2005.

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

BRACHVOGEL, B.; REICHENBERG, D.; BEYER, S.; JEHN.; MARK, K.VON DER.; BIELKE, W. Molecular cloning and expression analysis of a novel member of the Disintegrin and Metalloprotease-Domain (ADAM) family. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 288, p. 203-201, 2002.

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

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

CERRETTI, D.P.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R.A.; NELSON, N. Isolation of Two Novel Metalloproteinase-Disintegrin (ADAM) cDNAs That Show Testis-Specific Gene Expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, p. 810-815, 1999.

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

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

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

COSTA, F.F; VERBISCK, N.V; SALIM, A.C; IERARDI, D.F; PIRES, L.C; SASAHARA, R.M; SOGAYAR, M.C; ZANATA, S.M; MACKAY, A; O'HARE, M; SOARES, F; SIMPSON, A.J; CAMARGO, A.A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumores. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481-1488, 2004.

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

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

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Essentials of Neural Science and Behavior**. Appleton & Lange, United States of America, 1995.

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

KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M.; NAKAMURA, Y. Human metalloprotease-desintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenet.** 68: 39-44, 1995.

KRÄTZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C.P. Metargidin. Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4593-4596, 1996.

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

MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L. *et al.* Specific sequence elements are required for expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **J. Biol. Chem.** 274:30563-30570, 1999.

MIROUX, B. & WALKER, J. E. Over-production of Proteins in *Escherichia coli* : Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. **J. Mol. Biol.** 260: 289-298, 1996.

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

QI, H.; RAND, D. R.; XU, T., et al. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. **Science**. 283: 61-70, 1999.

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

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

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

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

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, 1995.

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