

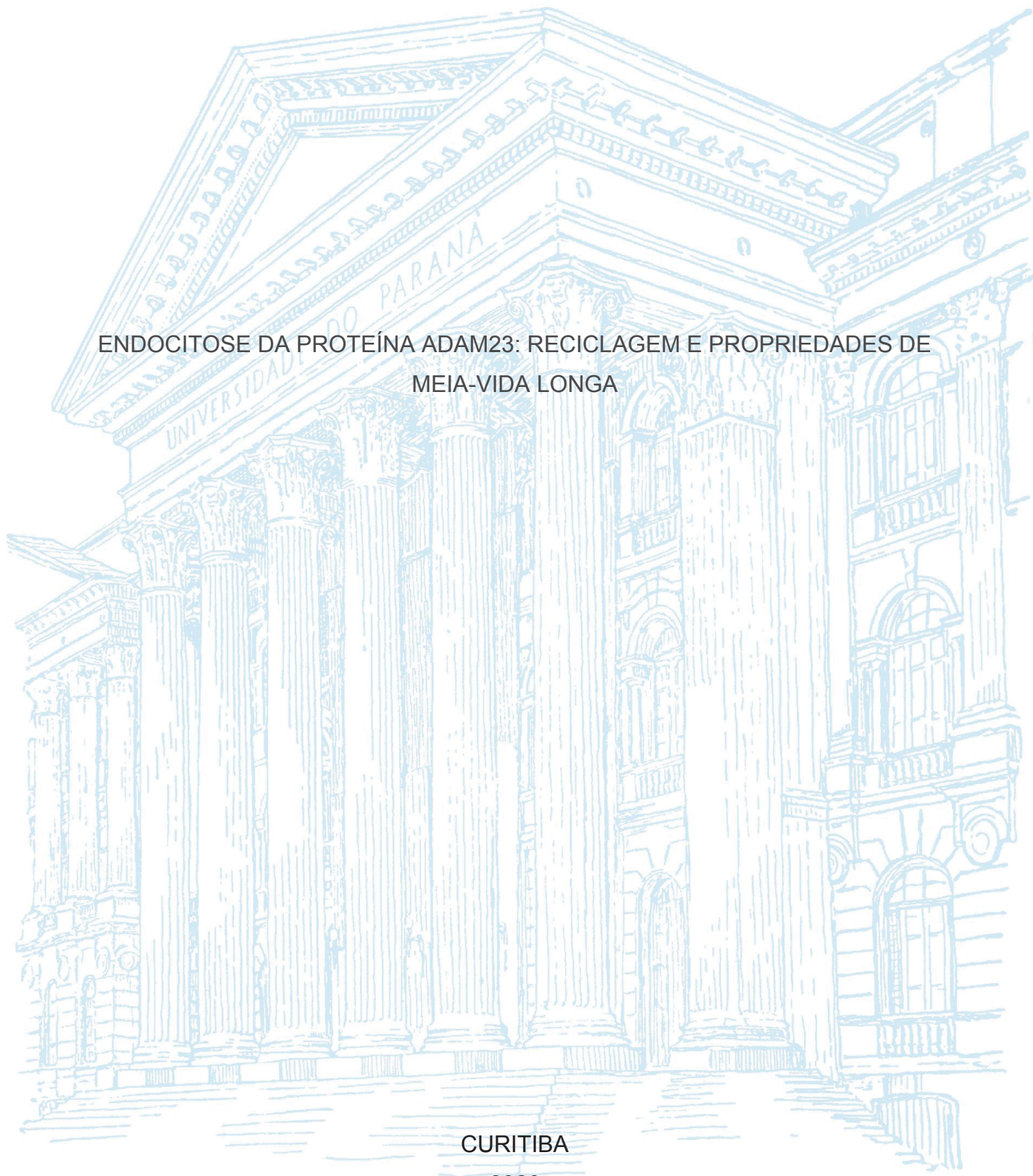
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATALIA HELOISA DE OLIVEIRA

ENDOCITOSE DA PROTEÍNA ADAM23: RECICLAGEM E PROPRIEDADES DE
MEIA-VIDA LONGA

CURITIBA

2020



NATALIA HELOISA DE OLIVEIRA

ENDOCITOSE DA PROTEÍNA ADAM23: RECICLAGEM E PROPRIEDADES DE
MEIA-VIDA LONGA

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

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Oliveira, Natalia Heloisa de
Endocitose da proteína ADAM23: reciclagem e propriedades de meia-
vida longa. / Natalia Heloisa de Oliveira. – Curitiba, 2020.
60 p.: il.

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 ADAM. 2. Endocitose. 3. Membrana celular. I. Título. II.
Zanata, Silvio Marques, 1974-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

CDD (22. ed.) 572.68



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de NATALIA HELOISA DE OLIVEIRA intitulada: ENDOCITOSE DA PROTEÍNA ADAM23: RECICLAGEM E PROPRIEDADES DE MEIA-VIDA LONGA, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 30 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

25/05/2020 15:42:19.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/05/2020 11:42:05.0

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA

Avallador Interno (IOC - FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica

19/05/2020 17:24:07.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgblocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte Identificação Única: 41690

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 41690

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente ao meu Orientador Prof. Dr. Silvio Marques Zanata pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório e por todas os ensinamentos e conselhos.

Agradeço à minha primeira orientadora, a Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa, por me apresentar ao professor Zanata e me ajudar a dar os primeiros passos dentro de um laboratório de biologia celular, juntamente com o futuro doutor Rubens e com as Profas. Dras. Iriane Eger e Kátia Sabrina Paludo.

Agradeço também os Profs. Drs. Lia S. Nakao, Adriana Frohlich Mercadante, Tércio Braga, Wanderson D. da Rocha, Francisco Filipak Neto, Marcel Ivan Ramírez Araya e aos meus colegas de laboratório Silvia, Ingrid, Sze, Pierina, Soraia, Valentin, Ricardo, Larissa, Karime Jordana, Pedro e Giovanna por todas as consultas técnicas e apoio, tanto nos momentos difíceis quanto nos momentos prazerosos dessa etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço à minha família; Nessi, José, Mariana, e ao meu irmão André, também pós-graduado, pelos conselhos e paciência.

Agradeço aos meus amigos e colegas de apartamento; Ana Luiza, Rodrigo, André, Sávio Fábio, Gillian e Lori que acompanharam de perto minhas dúvidas, anseios e conquistas ao decorrer desse período e cuja convivência tornou muito mais leve todo o trajeto.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à Universidade Federal do Paraná e as agências de fomento: CAPES, CNPq e Fundação Araucária, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

“Everything I’ve ever let go of has claw marks on it.”

— David Foster Wallace

RESUMO

ADAM23 é uma glicoproteína transmembrana tipo I expressa no encéfalo durante o desenvolvimento embrionário e na fase adulta, majoritariamente como uma proteína de superfície celular com provável localização em áreas de contato intercelular. Esta proteína atua em processos de adesão, crescimento de neuritos e arborização dendrítica e no tráfego e expressão de LGI1 na superfície celular neuronal, sugerindo que a endocitose de ADAM23 pode ser um mecanismo regulador dos receptores da membrana plasmática. A regulação da quantidade de ADAM23 na superfície celular através da reciclagem ou degradação pode influenciar nas interações proteína-proteína que afetam a transdução de sinal e os mecanismos celulares, como a adesão e a migração celular. Portanto, decidimos investigar as propriedades de internalização, reciclagem e meia-vida da proteína ADAM23. Com essa finalidade foram realizados ensaios de biotilação, seguidos do ensaio de internalização de ADAM23 em células N2A. A abordagem experimental de marcação da superfície das células revelou que aproximadamente 75% da ADAM23 biotinilada é internalizada dentro de 60 min (1h), indicando que a proteína é constitutivamente internalizada a partir da membrana plasmática, sendo observada somente a forma madura de 70KDa na membrana. Complementarmente, um ensaio baseado em anticorpos, verificamos que o ADAM23 é reciclado dos compartimentos internos para a membrana plasmática. Em adição, observamos que ADAM23 foi detectada nos lisados de células N2A tratadas com cicloheximida em todos os momentos, se mantendo estável por pelo menos 24 horas após o tratamento. Este dado indica que a proteína ADAM23 possui uma alta estabilidade, com meia-vida superior a 24 horas em células N2A. Em resumo, os resultados apresentados neste estudo sugerem que ADAM23 é uma proteína de meia-vida longa capaz de ser constitutivamente internalizada e reciclada à membrana plasmática.

Palavras-chave: Proteínas ADAM. Internalização. Membrana celular. Reciclagem. Disintegrina e Metalloprotease. ADAM23.

ABSTRACT

ADAM23 is a type I transmembrane glycoprotein expressed in the brain during embryonic development and in adulthood, mostly as a cell surface protein with probable localization in areas of intercellular contact. This protein acts in adhesion processes, neurite growth and dendritic arborization. In addition ADAM23 has been involved in the traffic and expression regulation of LGI1 on the neuronal cell surface, suggesting that ADAM23 endocytosis may be a regulatory mechanism for plasma membrane receptors. Because the regulation of the amount of ADAM23 on the cell surface through recycling or degradation could influence protein-protein interactions at cell surface and thereof affect signal transduction, we decided to investigate the internalization, recycling and half-life properties of the ADAM23 protein. For this purpose, biotinylation assays were performed, followed by the ADAM23 internalization assay in N2A cells. The experimental approach of protein labeling on the cell surface revealed that approximately 75% of biotinylated ADAM23 is internalized within 60 min, indicating that the protein is constitutively internalized from the plasma membrane. As expected, only the 70 kDa mature form of ADAM23 was labeled in the membrane and detected after internalization. Employing an antibody-based assay, we also found that ADAM23 is recycled from the intracellular compartments to the plasma membrane. In addition, after pharmacological blocking of protein synthesis by cycloheximide we observed that ADAM23 remained stable for at least 24 hours, indicating that ADAM23 has a high stability property. In summary, the results presented in this study suggest that ADAM23 is a long half-life protein capable of being constitutively internalized and recycled back to the plasma membrane.

Key-words: ADAM proteins. Internalization. Cellular membrane. Recycling. A Disintegrin and Metalloprotease. ADAM23.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA.....	11
1.2.	OBJETIVO.....	12
1.2.1	Objetivo Geral	12
1.2.2	Objetivos específicos.....	12
1.2.3	JUSTIFICATIVA.....	12
2	REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA	15
2.1	CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS METALOPROTEASES E DESINTEGRINAS.....	15
2.2	PROCESSAMENTO E ATIVAÇÃO.....	17
2.3	DOMÍNIOS DAS DESINTEGRINAS METALOPROTEINASES (ADAMS).....	19
2.3.1	O pró-domínio.....	19
2.3.2	O domínio metaloprotease.....	20
2.3.3	O domínio desintegrina.....	21
2.3.4	Os domínios rico em cisteína e semelhante ao fator de crescimento epidermal (<i>EGF-like</i>).....	21
2.3.5	Domínio transmembrana e cauda citoplasmática.....	22
2.4	ADAM23.....	23
3	METODOLOGIA	27
3.1	ALINHAMENTO COMPARATIVO DOS VETORES PCMV6- ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG E PCDNA3.1- ADAM23-HA (CAL).....	27
3.2	ANÁLISE DE HIDROFOBICIDADE DOS VETORES SEGUNDA A ESCALA KYTE & DOOLITTLE.....	27
3.3	CULTURA CELULAR.....	27
3.4	TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK-293T POR PRECIPITAÇÃO COM CÁLCIO.....	28
3.5	ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS ISOFORMAS DE ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23.....	28

3.6	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS N2A.....	29
3.7	ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR.....	29
3.8	AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE PROTEICA (MEIA-VIDA) PROTEICA.....	31
3.9	WESTERN BLOT.....	31
3.10	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	32
4	RESULTADOS.....	34
4.1	AS VARIANTES 1 E 2 DE ADAM23 (ORIGINE) POSSUEM DIVERGÊNCIAS NA CAUDA CITOPLASMÁTICA.....	34
4.2	AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS, RESULTANTES DA EXPRESSÃO DOS VETORES APRESENTAM DIFERENTES PERFIS DE HIDROFOBICIDADE EM SUA PORÇÃO C-TERMINAL...	36
4.3	pCMV6-ADAM23V2-FLAG É CAPAZ DE EXPRESSAR ADAM23 70 KDA E 100 KDA.....	37
4.4	ADAM23 É TEMPORARIAMENTE REDISTRIBUÍDA ENTRE A MEMBRANA PLASMÁTICA E COMPARTIMENTOS DO CITOSOL....	38
4.5	ADAM23 É RECICLADA DOS COMPARTIMENTOS INTRACELULARES PARA A MEMBRANA PLASMÁTICA.....	40
4.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PROTEICA.....	41
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO 1 – ARTIGO DE PRIMEIRA AUTORIA SUBMETIDO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 2020.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de proteínas de membrana que recebe seu nome devido ao seus domínios metaloprotease, que executa funções proteolíticas, e desintegrina que atua como receptor de superfície. As proteínas dessa família estão envolvidas em processos celulares como migração, adesão, desenvolvimento e sinalização celular. A importância das ADAMs é evidenciada pela essencialidade de alguns membros dessa família para que os eventos de fertilização, neurogênese e miogênese ocorram. (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; YANG *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2008; REISS & SAFTIG, 2009; GIEBELER & ZIGRINO, 2016).

Tendo em vista que as funções executadas pelas ADAMs ocorrem principalmente na superfície celular, é importante caracterizar os mecanismos que regulam a disponibilidade, a localização e a atividade destas proteínas, como os processos de internalização, reciclagem e meia-vida (NASLAVSKY & CAPLAN, 2018).

Um exemplo de como o processo de reciclagem desempenha um papel importante na regulação da atividade das proteínas da família pode ser visto para ADAM9. O knockdown de SNX9, proteína que atua na internalização ADAM9, resulta em maiores níveis ADAM9 na superfície celular e leva a um aumento correspondente na clivagem do receptor de Ephrin B4, um substrato conhecido de ADAM9 (MYGIND *et al.*, 2018).

O processo de endocitose e o processo de reciclagem foram estudados para as ADAMs 9, 10, 12, 17 e apresentaram características semelhantes, como a internalização pela via de clatrina (MARCELLO *et al.*, 2013; DOMBERNOWSKY *et al.*, 2015; MYGIND *et al.*, 2018), sugerindo que a endocitose e propriedades de reciclagem são um mecanismo comuns entre estas proteínas.

Mesmo com os estudos acima mencionados ADAMs importantes para o desenvolvimento e atividade das células animais ainda não tiveram sua cinética de internalização e reciclagem estudadas, um exemplo são as ADAMs 23, 11, e 22,

membros da família ADAM expressos predominantemente no sistema nervoso com domínio metaloprotease aparentemente inativo.

ADAM23 é uma proteína importante em processos celulares fisiológicos como adesão celular (CAL *et al.*, 2000) e neuritogênese (SUN *et al.*, 2007; OWUOR *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2017) assim como seu envolvimento em processos patológicos que resultam em doenças como hipertrofia cardíaca (XIANG *et al.*, 2018), epilepsia (OWUOR *et al.*, 2009; YAMAGATA & FUKAI, 2020), e a progressão de diferentes tipos de câncer (COSTA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2018; OTA *et al.*, 2016). Dadas as importantes funções atribuídas a ADAM23 na membrana celular é de grande interesse estabelecer as propriedades de internalização, reciclagem e meia-vida da ADAM23 e como estes processos podem regular a transdução de sinal na superfície celular em processos fisiológicos e patológicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Analisar a perfil de internalização e reciclagem da proteína ADAM23

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a cinética de internalização da proteína ADAM23 em uma linhagem neuronal (Neuro-2a).
- Avaliar a capacidade da proteína ADAM23 em ser reciclada na linhagem celular Neuro-2a.
- Analisar a meia-vida da proteína ADAM23.

1.3 JUSTIFICATIVA

A proteína ADAM23 é um membro da família ADAM expresso predominantemente no sistema nervoso, e nessa região parece desempenhar múltiplos papéis biológicos e interagir com diversos parceiros moleculares, atuando

como molécula de adesão, sendo capaz de interagir com integrinas e estimular a diferenciação de células de linhagens neuronais (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2017).

A presença de ADAM23 na superfície celular já foi descrita em outros estudos, sendo encontrada majoritariamente em sua forma madura (70 KDa) dentro das balsas lipídicas em neurônios cultivados e linhas celulares neuronais (Borgonovo *et al.*, 2018).

Além de seu papel como ligante de integrina amplamente estudado, recentemente foi demonstrado que ADAM23 interage com a proteína LGI1 na superfície celular neuronal (HIVERT *et al.*, 2019). LGI1 é uma glicoproteína secretada que interage com membros da família ADAM, incluindo ADAM11, ADAM22 e ADAM23 (Fukata *et al.*, 2006; Owuor *et al.*, 2009; Sagane *et al.*, 2008).

Encefalites autoimunes são doenças inflamatórias causadas pela expressão de anticorpos contra proteínas da superfície celular neuronal, canais ou receptores iônicos resultando em sintomas neuropsiquiátricos. Uma das encefalites autoimunes mais comuns é consequente da expressão de anticorpos contra LGI1 (IRANI *et al.*, 2010; LAÍ *et al.*, 2010). Pacientes com esse distúrbio geralmente apresentam convulsões distônicas ou hiponatremia que precedem ou se desenvolvem juntamente com a síndrome do núcleo da disfunção límbica (IRANI *et al.*, 2013).

Usando frações de IgG pacientes com encefalite anti-LGI1, Petit-Pedrol e colaboradores (2018) demonstraram que todas as IgG derivadas de pacientes reagiram fortemente a domínios de LGI1 (LRR e EPTP) impedindo a ligação de LGI1 a ADAM23. Evidenciando a importância da disponibilidade de ADAM23 na superfície celular.

A presença e a regulação da quantidade de ADAM23 na superfície celular parece também ser importante para o controle da força das sinapses excitatórias. Fukata e colaboradores (2010) e Lovero e colaboradores (2015) propõem um modelo onde LGI1 seria parte de um complexo trans-sináptico ligando ADAM22 pós-sináptica a ADAM23 pré-sináptica, controlando a força das sinapses excitatórias. Nestes complexos as ADAM23 e ADAM22 também parecem atuar como receptores associados a complexos pré-sinápticos e axonais contendo canais Kv1.1 e complexos pós-sinápticos contendo AMPAR, respectivamente.

A expressão de ADAM22 e ADAM23 também é descrita como um forte modulador do direcionamento de LGI1, sugerindo que a associação com proteínas

ADAM23 é necessária para a ancoragem de LGI1 na superfície celular. Hivert e colaboradores (2018) demonstram que ADAM23 e ADAM22 estão atuando no tráfego LGI1 na saída do RE, processamento de N-glicosilações e no transporte vesicular axonal da proteína LGI1. A capacidade de ADAM23 em promover o direcionamento e ancoragem de LGI1 levanta a questão se processos como a endocitose da proteína ADAM23 poderia ser um mecanismo regulador de LGI1 e/ou outras da dos receptores da membrana plasmática.

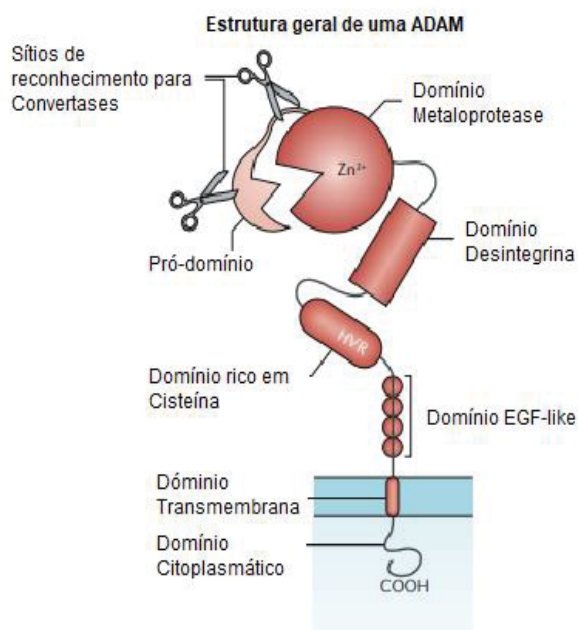
Entre todas as funções atribuídas a ADAM23 em processos fisiológicos e patológicos, a importância desta proteína e da sua disponibilidade na superfície celular parece ser evidente. No entanto, dados relativos a sua renovação, capacidade de internalização ou estabilidade são atualmente desconhecidos. Portanto, decidimos investigar as propriedades de internalização, reciclagem e meia-vida da proteína ADAM23.

2 REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS METALOPROTEASES DESINTEGRINAS

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de glicoproteínas transmembranas tipo I, caracterizada por possuir uma topologia única, composta por um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, uma região transmembrana e cauda citoplasmática, em uma única sequência peptídica (Figura 1) (SEALS, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008; GIEBELER & ZIGRINO, 2016).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS ADAM (A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE)



ADAMs possuem um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, uma região transmembrana e cauda citoplasmática, em uma única sequência peptídica. (SEALS, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008; GIEBELER & ZIGRINO, 2016).

FONTE: Lambrecht, Vanderkerken e Hammad (2018).

As ADAMs fazem parte da superfamília metzincina, que juntamente com as superfamílias: gluzincina, metzincina e aspizincina, compõem o grupo de metaloproteases dependentes de zinco. A superfamília metzincina é composta pela família das metaloproteases de matriz (MMP); pela família das adamalinas (subdividida em ADAMs, ADAMTS (ADAMs com motivo trombospondina) e reprotinas); pela família das astacinas e, pela família das serralinas (HUXLEY-JONES *et al.*, 2007).

Um domínio metaloprotease ativo confere às ADAMs funções proteolíticas, habilitando-as a promover clivagem do ectodomínio de proteínas da superfície celular. O domínio desintegrina, por sua vez, possibilita aos membros da família atuarem como receptores de superfície. A complexidade e variedade de seus domínios possibilita que membros dessa família atuem na regulação da migração, adesão, desenvolvimento e sinalização celular, participando em funções celulares de extrema importância, como fertilização, neurogênese e miogênese (YANG *et al.*, 2006; REISS & SAFTIG, 2009).

Além de sua atuação em eventos fisiológicos, ADAMs também estão envolvidos em eventos patológicos, como inflamação, infecção, doenças cardíacas, anomalias neurológicas e no câncer. (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008; MURPHY, 2009; GIEBELER & ZIGRINO, 2016).

2.2 PROCESSAMENTO E ATIVAÇÃO

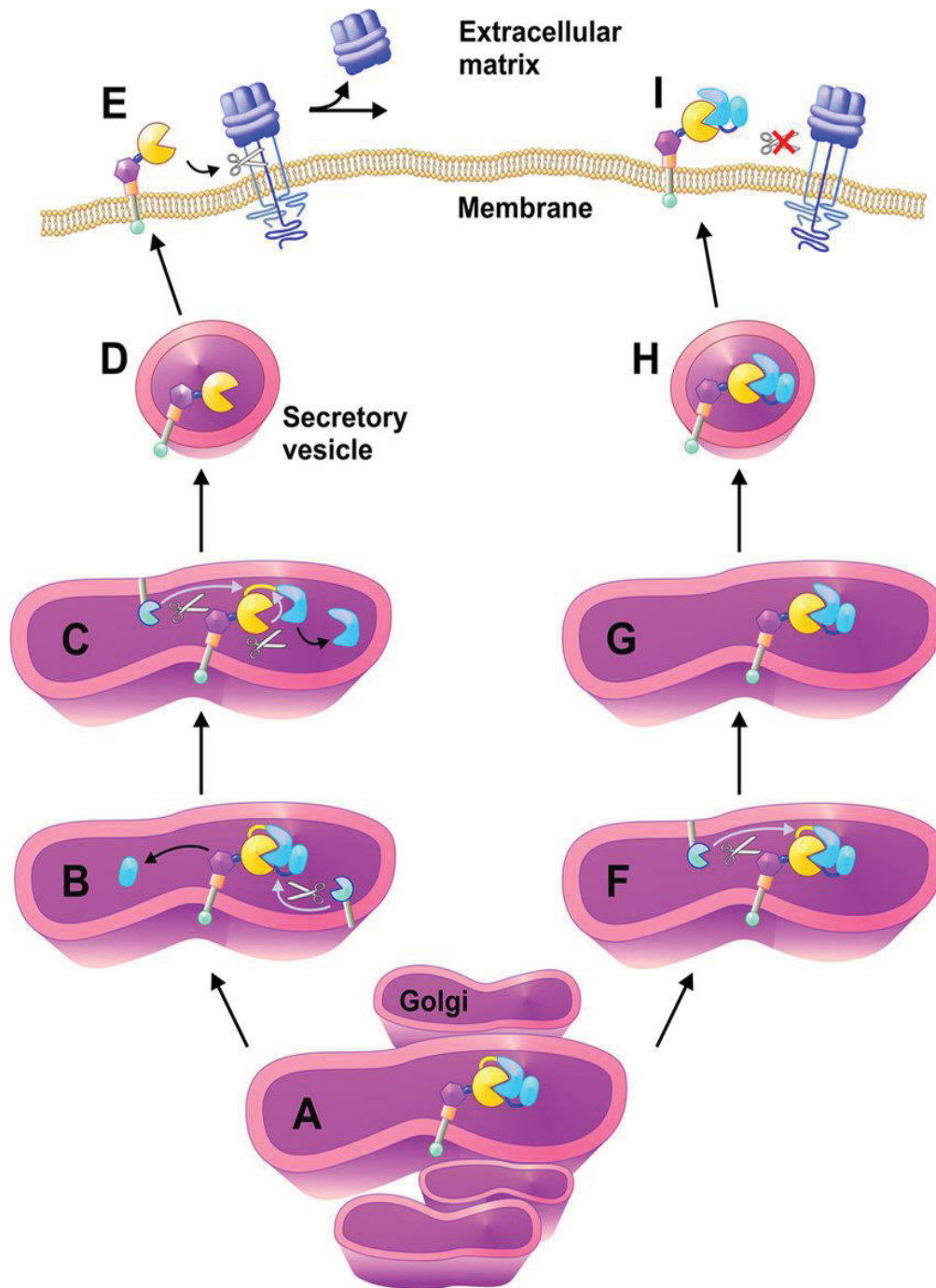
As ADAMs, possuem uma sequência sinal na região N-terminal que as direciona para a via de secreção. Estas proteínas são então sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi (SEALS, 2003). Inibidores farmacológicos da via secretora precoce, como brefeldina A e monensina, bloqueiam o processamento de ADAM9 e ADAM15, posicionando assim a localização do processamento e ativação de ADAMs na rede trans-Golgi (LUM *et al.*, 1998; ROGHANI *et al.*, 1999; HOWARD *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2002).

Membros da família ADAM são sintetizados como proenzimas, nas quais a latência é mantida por seus pró-domínios auto inibitórios. A remoção do pró-domínio através do processamento proteolítico transforma a pró-proteína em sua forma cataliticamente ativa. Dois mecanismos foram propostos para a ativação das proenzimas da família ADAM. Uma é a remoção do pró-domínio por autocatálise, o

que foi demonstrado para a ADAM8 (SCHLOMANN, *et al.*, 2002) e ADAM28 (HOWARD; MACIEWICZ; BLOBEL, 2000). O segundo é o processamento em um local de clivagem canônico para furina (RXXR) entre o domínio pró e metaloprotease, proposto e demonstrado como um pré-requisito para a ativação de várias ADAMs, incluindo ADAM9 (ROGHANI *et al.*, 1999), ADAM12 (LOECHEL *et al.*, 1998), ADAM15 (LUM, REID, BLOBEL, 1998), ADAM17 (SCHLÖNDORFF, BECHERER, BLOBEL, 2000) e ADAM19 (KANG *et al.*, 2002). Wong e colaboradores (2015) sugerem outro ponto crucial de clivagem para a ativação de proteínas da família ADAM, localizado a montante em relação ao ponto de clivagem canônico. Segundo os pesquisadores, o processamento neste novo sítio precisa ocorrer para permitir que o pró-domínio se dissocie do domínio catalítico na ADAM17. Segundo os pesquisadores a remoção do pró-domínio ocorre no compartimento trans Golgi e o primeiro evento de clivagem é realizado por furina ou pró-proteínas convertases (PCs) no sítio de clivagem a montante (Figura 2, B). Isso leva a alterações conformacionais, que expõem o sítio a jusante para uma clivagem rápida por PC (Figura 2, C) e a ADAM ativada é transportada para a membrana (D). As mutações no sítio regulatório a montante não impedem o processamento do sítio a jusante (canônico) no entanto, causam uma redução drástica na atividade catalítica em ADAM17, ADAM10 e ADAM9. (WONG *et al.*, 2015).

A metaloprotease e desintegrina fertilina (ADAM1) possui um processamento alternativo. A subunidade α da fertilina contém um local previsto de clivagem pró-proteína convertase (RX(K/R)R) entre o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina e é processado na via secretora, ao lado desse local de clivagem, levando a remoção do domínio da metaloprotease (LUM, BLOBEL, 1997).

FIGURA 2 - ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS ADAM POR REMOÇÃO DO PRÓ-DOMÍNIO.



As ADAMs são geradas como uma pró-enzima inativa com um domínio pró-inibidor autoinibitório (domínio em azul). A remoção do pró-domínio ocorre no compartimento trans Golgi (A) e o primeiro evento de clivagem é realizado por PCs no sítio de clivagem a montante (B, linha azul). Isso leva a alterações conformacionais, que expõem o sítio de clivagem a jusante (linha amarela) para que ocorra a segunda clivagem e a liberação do pró-domínio (C). A ADAM ativada é transportada para a membrana (D) para que possa atuar na remoção de ectodomínio de outras proteínas (E). No entanto, quando apenas o sítio a jusante é clivado (F), o pró-domínio permanece ligado ao domínio metaloprotease (domínio em amarelo), formando assim uma proteína inativa (G) que é entregue à membrana (H), mas é incapaz de clivar os seus substratos na superfície celular (I).

FONTE: Wong e colaboradores (2015)

2.3 DOMÍNIOS DAS DESINTEGRINAS METALOPROTEINASES (ADAMS)

2.3.1 O pró-domínio

A porção N-terminal das ADAMs contém uma sequência sinal responsável por direcionar estas proteínas para a via secretora, além de atuar como um domínio importante na maturação dos ADAMs. Primeiramente, o prodomínio mantém o sítio metaloprotease das ADAMs inativo, através de um interruptor de cisteína. Um resíduo de cisteína conservado dentro do prodomínio coordena o átomo de zinco no local ativo necessário e, assim, sequestra o domínio da metaloprotease em uma conformação inativa. As PCs clivam o prodomínio do restante da proteína, levando a coordenação do zinco para o domínio metaloprotease, disponibilizando-o para atividade catalítica (WART & BIRKEDAL-HANSEN 1990; BECKER *et al.*, 1995). Ademais, Moss e colaboradores (2007) relatam que o prodomínio de ADAM10 de camundongo apenas inibe fracamente outros membros da família ADAM e não inibem os membros da família da metaloprotease da matriz em condições semelhantes, sugerindo que os pro domínios das proteínas ADAMs atuam como inibidores seletivos.

Outra função do prodomínio é atuar como chaperona no dobramento adequado das ADAMs, particularmente no domínio da metaloprotease. Uma construção ADAM10 sem o seu prodomínio é cataliticamente inativa *in vivo*. Mas quando é co-transfecção juntamente com uma construção que expressa apenas o prodomínio de ADAM10, se torna proteoliticamente ativa (ANDERS *et al.* 2001). Da mesma forma, Milla e colaboradores (1999) mostram que a remoção do prodomínio de ADAM17 gera uma proteína sem atividade proteolítica. Além disso, uma forma da proteína ADAM12 sem prodomínio, não é secretada pela célula, permanecendo no sistema endomembranar inicial, mas a deleção dos domínios prodomínio e metaloprotease permite a secreção da proteína (LOECHEL *et al.* 1999). Estes dados sugerem que as construções de deleção do prodomínio são sintetizadas de forma inativa porque são dobradas incorretamente durante a síntese, sugerindo a necessidade do prodomínio para manter a latência destas proteínas além de auxiliar no dobramento adequado

das ADAMs, na estruturação do sítio ativo catalítico e no trânsito adequado das ADAMs pela via secretória.

2.3.2 O domínio metaloprotease

O sítio ativo do domínio metaloprotease encontrado na superfamília metzincina contém átomos de água e zinco necessários para o processamento hidrolítico de substratos e é localizado a jusante em relação ao pró-domínio. Este domínio apresenta um sítio ativo consenso (sequência HEXXHXXGXXHD), onde três histidinas ligam-se ao zinco e um resíduo de ácido glutâmico atua como base catalítica. Uma metionina conservada se situa alguns aminoácidos, a jusante em relação ao sítio catalítico, se insere no cerne da estrutura formada pelo sítio consenso quando ligado ao zinco (SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

O sítio catalítico é altamente conservado entre as várias metzincinas, no entanto, para que as proteínas possam conferir especificidade para substratos e inibidores de protease, características estruturais distintas são observadas nos diferentes membros da família (STÖCKER *et al.*, 2008). A partir de suas definições estruturais, prevê-se que 12 ADAMs humanas sejam proteoliticamente ativas (MASKOS *et al.*, 1998; STÖCKER *et al.*, 2008).

Algumas moléculas são capazes de agir como inibidores da atividade da metaloprotease das ADAM, atuando como agentes redutores ou agentes quelantes de zinco. Uma das classes de inibidores de MMPs e ADAMs são os inibidores à base de hidroxamato que atuam promovendo a inibição se ligando competitivamente ao local ativo. (MASKOS *et al.* 1998; revisado por MOSS *et al.* 2001). Os inibidores teciduais de metaloproteases, ou TIMPs, são reguladores endógenos das MMPs em geral (BREW *et al.*, 2000). A TIMP-3 em particular, inibe a ADAM17 (AMOUR *et al.*, 2000), ADAM12 (LOECHEL *et al.*, 2000), ADAM10 (também inibida por TIMP-1) (AMOUR *et al.*, 2000), ADAM-TS4 e a ADAM-TS5 (KASHIWAGI *et al.*, 2001). As ADAM8 e ADAM9, por sua vez, não são inibidas por nenhuma TIMP (AMOUR *et al.*, 2002).

Turk e colaboradores (2001) examinaram através de bibliotecas de peptídeos os sítios de clivagem de seis membros da família MMP. Os dados obtidos sugerem que as MMPs apresentam especificidade inata por sítios de clivagem particulares, entretanto, é esperado que outros fatores como a colocalização das MMPs em

membranas celulares com proteínas de superfície, como integrinas e com furinas nos contatos com substratos, apresentam um papel importante na seleção de substratos (PUYRAIMOND *et al.*, 2001; MU *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 2003).

2.3.3 O domínio desintegrina

O domínio desintegrina é nomeado por sua semelhança com as desintegrinas de veneno de serpentes (DVS), nas quais está envolvido na ligação de receptores de integrina plaquetária. O domínio desintegrina das proteínas ADAMs tem de 60-90 aminoácidos (WHITE, 2003). Os domínios desintegrina DVS é constituído de 50-90 aminoácidos e está envolvido em ligações com integrinas por meio do seu motivo RGD (HUANG, 1998; PRIMAKOFF & MYLES, 2000; TAKEDA *et al.*, 2012). Embora todas as desintegrinas de veneno de serpentes apresentem o motivo RGD, (dentro de um trecho de 13 aminoácidos chamado de loop de desintegrina, que se projeta da superfície da proteína e confere ligação aos receptores de integrina α IIb β 3 e α v β 3) (BLOBEL *et al.*, 1992), apenas a ADAM15 humana possui o motivo RGD, que permite sua associação com α v β 3 e α 5 β 1 (ZHANG *et al.*, 1998; WHITE, 2003; LU *et al.*, 2006), levando a suposição de que outras sequências de aminoácidos na região desintegrina seriam responsáveis por conferir às ADAMs suas propriedades de promoção de adesão e migração pela ligação com integrinas (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2002; BAX *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; ZIGRINO *et al.*, 2007).

2.3.4 Os domínios rico em cisteína e semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like)

É provável que as funções específicas do domínio rico em cisteína sejam complementar a capacidade de ligação e conferir maior especificidade às interações mediadas pelo do domínio desintegrina. Por exemplo, o domínio rico em cisteína da ADAM12 promove a adesão de fibroblastos e mioblastos (ZOLKIEWSKA, 1999), além de promover a ligação *in vitro* de várias linhas celulares tumorais, bem como uma variedade de células não tumorigênicas de origem óssea e muscular (IBA *et al.*, 1999, 2000). Além disso, o domínio desintegrina parece atuar como um andaime para os domínios vizinhos, como exemplo, Loechel e colaboradores (1999) mostram que o prodomínio da ADAM12 humana modula a atividade do domínio metaloprotease.

Pouco se sabe sobre o domínio semelhante ao fator epidermal encontrado em vários membro da família ADAM. ADAM17 e a ADAM10 são membros atípicos da família ADAM devido à falta do domínio rico em cisteína nestas proteínas, supõe-se que o domínio do semelhante ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), esteja participando na remoção do prodomínio (MILLA *et al.*, 1999) e no reconhecimento de substratos (JANES *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2000), assumindo funções normalmente relacionadas com o domínio rico em cisteína em outras ADAMs (TAKEDA., 2009; JANES *et al.*, 2005).

Lorezen e colaboradores (2011) demonstraram que a multimerização de ADAM17 é mediada pelo domínio semelhante ao EGF. Além de sua função na multimerização, o domínio semelhante ao EGF está envolvido no reconhecimento do substrato (JANES *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2000) e na ativação da enzima, facilitando a remoção do pró-peptídeo inibitório do domínio catalítico (MILLA *et al.*, 1999).

2.3.5 Domínio transmembrana e cauda citoplasmática

As caudas citoplasmáticas da família ADAMs são altamente variáveis tanto em comprimento quanto em sequência, apresentando de 11 até 231 resíduos, como é o caso das ADAMs 11 e 19 respectivamente. Estas caudas são ricas em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina e contém motivos especializados envolvidos na regulação de dentro para fora da atividade de metaloprotease, da sinalização celular e no controle da maturação e localização subcelular (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008).

Os motivos mais comuns são os locais de ligação a PxxP para proteínas contendo o domínio SH3. Esses locais de ligação a SH3 estão presentes nas ADAMs humanas 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 e 33. Este domínio também pode apresentar resíduos de serina-treonina e/ou tirosina, nesse caso, atuando como sítio de ligação à proteínas que possuem o domínio SH2. Conseqüentemente, as ADAMs podem servir funções adaptadoras para montar complexos de proteínas em locais críticos de atividade funcional (SEALS, 2003; YANG *et al.*, 2006).

As ADAMs podem ser expressas em diferentes isoformas, resultantes de processamento alternativo (SAGANE *et al.* 1998; GODDE *et al.*, 2007; CERRETTI *et al.* 1999) tendo de duas a três formas que variam somente no comprimento de suas

caudas citoplasmáticas. Em outras ADAMs o splicing alternativo produz isoformas sem domínio transmembrana que pode ser secretadas ou citoplasmáticas (KATAGIRI *et al.* 1995; SEALS & COURTNEIDGE, 2003; VAN EERDEWEGH *et al.* 2002; SUN *et al.*, 2004).

2.4 ADAM23

A proteína ADAM23 é amplamente expressa no sistema nervoso, do desenvolvimento embrionário a fase adulta, em camundongos é encontrada em grandes quantidades no hipocampo, no córtex cerebral e giros denteados, em células piramidais hipocámpais (regiões CA1/CA3), no estriado do encéfalo, em células de Purkinje e células granulares cerebelares, gânglios basais e em neurônios e células de Schwann do sistema nervoso periférico (BORGONOVO *et al.*, 2018; SAGANE *et al.*, 1998; 1999; LEIGHTON *et al.*, 2001; GOLDSMITH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009; DHAUNCHAK *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2011; KEGEL *et al.*, 2014)

Em galinhas ADAM23 é expressa em regiões restritas do neuroepitélio, substância cinzenta, glândula pineal, plexo coroide, em neurônios motores da medula espinhal e neurônios sensoriais da raiz de gânglios dorsais (LIN *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2011)

ADAM23 é expressa majoritariamente como uma proteína de superfície celular com provável localização em áreas de contato intercelular, sendo encontrada dentro e fora dos *lipid-rafts*. (BORGONOVO *et al.*, 2018). A proteína ADAM23 pode ser encontrada em duas formas 100 kDA (não processada) e 70 kDA (processada, sem pró-domínio) em lisados de diferentes regiões do encéfalo e linhagens celulares. A maior expressão de uma das duas formas também varia com o tipo celular (GOLDSMITH *et al.*, 2004; BORGONOVO *et al.*, 2018).

ADAM23, assim como as ADAMs 11 e 22 são exemplos de membros da família ADAM expressos predominantemente no sistema nervoso com domínio metaloprotease aparentemente inativo, tendo em vista que não apresentam 3 resíduos de histidina nem o resíduo do ácido glutâmico que fazem parte do sítio de ligação ao zinco, que é característico das metaloproteinases. Esse domínio possivelmente atua promovendo o dobramento correto da molécula e nas interações

com outras proteínas (RAWLINGS & BARRETT, 1995; KÄRKKÄINEN *et al.*, 2000; SAGANE *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2008).

A proteína ADAM23 parece desempenhar múltiplos papéis biológicos e interagir com diversos parceiros moleculares. O domínio desintegrina parece ser o grande responsável por mediar as funções e interação específicas de ADAM23, permitir sua atuação como molécula de adesão, por meio de um sítio independente do motivo RGD (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000). Cal e colaboradores (2000) relatam que ADAM23 interage *in vitro* com a integrina $\alpha v \beta 3$ e promove a adesão de neuroblastomas humanos (NB100 e SH-Sy5y) por meio da sequência de aminoácidos (AVNECDIT) na alça da desintegrina. Verbisck e colaboradores (2009) mostraram que células MDA-MB 435 com expressão de ADAM23 bloqueada apresentam um aumento na ativação da integrina $\alpha v \beta 3$, resultando num maior potencial adesivo e migratório destas células na presença de vitronectina e fibronectina, mostrando a atuação da ADAM23 na modulação negativa da integrina $\alpha v \beta 3$. Recentemente o domínio desintegrina-like da ADAM23 foi caracterizado como ligante também das integrinas $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 4 \beta 7$, promovendo adesão de linfócitos T e B humanos (WANG *et al.*, 2017).

Além de seus papéis enquanto molécula de adesão, ADAM23 parece ser importante em processos ligados a comprometimento celular, sendo decisiva na diferenciação de células P19 (linhagem multipotente de carcinoma embrionário de camundongo capaz em neurônios-like quando induzidas por ácido retinóico), apresentando uma distribuição polarizada na parte proximal dessas durante a formação dos neuritos (SUN *et al.*, 2007). Complementarmente, a ausência de ADAM23 (*knockdown*) faz PC19 permaneça na fase G1 do ciclo celular e a indução por ácido retinóico reduz os níveis de expressão da proteína ADAM23 (WANG *et al.*, 2012).

Owuor e colaboradores (2009) demonstraram que o crescimento de neuritos e de arborização dendrítica, em cultura primária de neurônios hipocampais e corticais, estão aumentados quando mediados por LGI1 (*Leucine rich glioma inactivated 1*) na presença de ADAM23, em contrapartida na ausência de ADAM23 o crescimento de neuritos e a arborização dendrítica são reduzidos drasticamente.

LGI1 é uma glicoproteína secretada predominantemente expressa em tecidos neurais; sua expressão é reduzida em tumores cerebrais de baixo grau e é significativamente reduzida ou ausente em gliomas malignos. LGI1 possui repetições

ricas em leucina e epitempina (EPTP) capazes de interagir com membros da família ADAM, incluindo ADAM11, ADAM22 e ADAM23 (Fukata et al., 2006; Owuor et al., 2009; Sagane et al., 2008).

Fukata e colaboradores (2010) e Lovero e colaboradores (2015) propõem um modelo onde LGI1 seria parte de um complexo trans-sináptico ligando ADAM22 pós-sináptica a ADAM23 pré-sináptica, controlando a força das sinapses excitatórias. A expressão de ADAM22 e ADAM23 também é descrita como um forte modulador do direcionamento de LGI1, sugerindo que a associação com proteínas ADAMs não é necessária apenas para a ancoragem de LGI1 na superfície celular, mas também estão atuando em seu tráfego, incluindo saída do RE, processamento de N-glicosilações e transporte vesicular axonal (HIVERT *et al.*, 2018).

Tomados em conjunto estes resultados evidenciam o papel crucial de ADAM23 no sistema nervoso. De fato esta proteína se mostra essencial, tendo em vista que camundongos nocautes para o gene *adam23* apresentam tremores e ataxia e embora não apresentem má formação no encéfalo, morrem em aproximadamente duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001), sugerindo um papel fundamental dessa proteína no desenvolvimento do sistema nervoso (MITCHELL *et al.*, 2001; OWUOR *et al.*, 2009; KEGEL *et al.*, 2014).

Análises por espectrometria de massas demonstraram que muitas proteínas envolvidas na adesão celular e em neuritogênese estão presentes nas mesmas regiões especializadas de membrana nas quais a proteína príon celular (PrP^c) é expressa, sendo ADAM23 uma das proteínas presentes no encéfalo de camundongos e que atua como possível parceira de PrP^c (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004).

De fato, Costa e colaboradores (2009) descreveram a interação entre ADAM23 e PrP^c através de ensaios de co-imunoprecipitação e de pull-down. O mesmo trabalho também caracterizou o domínio desintegrina presente em ADAM23 como o sítio de ligação direta ao PrP^c, sugerindo assim uma possível parceria molecular, de função ainda desconhecida, entre estas proteínas no sistema nervoso.

A proteína príon celular é uma sialoglicoproteína localizada na superfície celular, onde é ligada a bicamada lipídica via âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), sendo encontrada nos microdomínios *lipid rafts* ou regiões de membrana resistentes à determinados detergentes. Apesar de ser amplamente expressa no sistema nervoso central e de estar envolvida em uma série de doenças neurodegenerativas seu papel em processos fisiológicos ainda se mostrar elusivo (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY

et al., 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1997; PRUSINER, 1998; TAYLOR & HOOPER, 2007).

Os mecanismos referentes a endocitose de PrP^c são bastante estudados. Como o PrP^c é uma proteína ancorada em GPI e carece de domínio intracelular que medie sua internalização a macromolécula possui vários parceiros que atravessam a membrana responsáveis por facilitar o processo de internalização e reciclagem de PrP^c com a proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1) (PARKYN *et al.*, 2008) e o proteoglicano de heparan-sulfato (HSPG) (SHYNG *et al.*, 1995). Após a endocitose constitutiva de PrP^c em cerca de 60 min, a proteína internalizada se localiza principalmente nos endossomos, e não nos lisossomos, e a maioria das moléculas é reciclada para a membrana plasmática (SHYNG *et al.*, 1993). Um dos principais mecanismos descritos para a rápida internalização de PrP^c é derivado da ligação ao íon Cu²⁺ na molécula, em sua região de octapeptídeos repetidos (resíduos 51-90). Essa interação faz com que o PrP^c saia dos *lipid rafts* e seja internalizado via vesículas revestidas por clatrina, em uma velocidade aumentada em relação ao controle sem íons Cu²⁺ (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2008).

Uma das hipóteses levantadas pelo grupo é que ADAM23 possa estar envolvida na internalização da PrP^c na presença e ausência de cobre, uma vez que ambas as moléculas interagem entre si e estão presentes nos domínios da membrana plasmática das balsas lipídicas. Para testar essa e outras hipóteses discutidas neste trabalho se mostrou necessário primeiramente caracterizar o perfil de internalização e reciclagem de ADAM23.

3 METODOLOGIA

3.1 ALINHAMENTO COMPARATIVO DOS VETORES PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG E PCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL)

Foi realizado um alinhamento comparativo das sequências de aminoácidos preditas, resultantes da expressão dos vetores PCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG, (Variante 1, NM_001177600), PCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG (Variante 2, NM_011780) (Origene) obtidas no site da do fabricante e PCDNA3.1-ADAM23-HA (sequência CAL, CAL *et al.*, 2000), previamente sequenciada no laboratório, através do software *Snappgene 4.0*. Em adição, as sequências previamente mencionadas foram inseridas separadamente na plataforma *Web Basic Local Alignment Search Tool* (BLASp, National Library of Medicine), (ALTSCHUL *et al.*, 1990, 1997).

3.2 ANÁLISE DE HIDROFOBICIDADE DOS VETORES SEGUNDA A ESCALA KYTE & DOOLITTLE

As sequências de aminoácidos preditas, resultantes da expressão dos vetores PCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG e PCDNA3.1-ADAM23-HA também foram avaliadas segundo a hidrofobicidade dos seus aminoácidos pela escala Kyte & Doolittle na plataforma ProtScale ExPASy (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics) (KYTE & DOOLITTLE, 1982).

3.3 CULTURA CELULAR

O cultivo da linhagem celular de neuroblastomas murino (N2A) foi realiza em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, (DMEM, Gibco) acrescido de 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), 0,1 mM aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 1,0 mM de piruvato de sódio (pH 7,2) 1% Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen).

A linhagem celular de rim de embrião humano 293 SV40 (HEK293-T) foi cultivada com meio Minimum Essential Medium (MEM, 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), 1% Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen).

As linhagens foram cultivadas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. A manutenção das células foi feita através de subcultivos em cerca de 70% de confluência com PBS-EDTA e 0,25% (v/v) de tripsina (Gibco).

3.4 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK-293T POR PRECIPITAÇÃO COM CÁLCIO

As células HEK-293T foram transfectadas com os plasmídeos comerciais pCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG e pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG, capazes de expressar a ADAM23 murina *full-length*, e com o plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA que codifica para a ADAM23 humana, por co-precipitação de fosfato de cálcio. Uma alíquota de 12 µg do plasmídeo foi adicionada em 750 µl de água ultrapura estéril, seguido de 250 µl de solução CaCl₂ 1M 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 MEM. A suspensão foi adicionada a placas de Petri de 100cm² contendo as células com confluência de aproximadamente 60-70%. As placas foram incubadas durante 5 horas em incubadora úmida a 37°C com 5% CO₂. Após o tempo de incubação, o meio foi removido e a placa foi lavada com 5ml de PBS. Em seguida, adicionou-se 8ml de meio MEM. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ por 48 horas.

3.5 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS ISOFORMAS DE ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23

As células HEK293-T transfectadas com os vetores pCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG e pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG e com o plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA foram lavadas três vezes e removidas das placas mecanicamente com jatos de PBS, centrifugadas por 3 min. a 605 xg. O sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a banho de gelo (30 min.) e lise mecânica com seringa (26G x ½”) em tampão de lise não desnaturante (20mM Tris HCl, 137mM NaCl, 1% Triton x-100, 2mM EDTA) com coquetel de inibidores de proteases (Roche).

Uma mistura de 50 µl de α-sepharose e 50 µl (GE Healthcare) de β-sepharose (GE Healthcare) foram equilibradas com três lavagens de 2 min. a 2419 xg e incubadas com 1 µg de DL11C8 purificado (α-ADAM23, BORGONOVO et al., 2018)

ou 1 μ G de uma IgG irrelevante (*Mouse IgG Isotype Control*, Invitrogen). O volume foi completado para 1 ml com o mesmo tampão de lise e incubadas por 4 horas a 4°C em agitação. Após o período de incubação as resinas foram novamente lavadas conforme descrito, e foi adicionado 1 mg de extrato celular, a mistura foi incubada a 4°C por 16 horas em agitação. Em seguida foram realizadas 3 lavagens da resina com o tampão de lise e adicionou-se a cada amostra 20 μ l de tampão de amostra 2,5 X redutor (contendo β -mercaptoetanol). As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 10 minutos e centrifugadas a 19.000 xg por 3 minutos. O eluato foi coletado e analisado por SDS-PAGE e immunoblotting.

3.6 TRANSFECCÃO DE CÉLULAS N2A

Células N2A foram transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG através de transfecção em suspensão com Lipofectamine 3000 (Invitrogen) em OPTI-MEM (Invitrogen).

Células N2A foram lavadas com PBS-EDTA e incubadas com tripsina por 5 minutos. A essa solução foi adicionado meio DMEM contendo SFB, para que ocorresse a inibição da enzima tripsina e a dispersão celular foi submetida a uma centrifugação (605 xg) por 3 minutos. Após a centrifugação as células foram suspensas em meio DMEM e contadas na câmara de Neubauer. Em paralelo uma solução de Lipofectamine 3000 (5 μ L/placa) com o plasmídeo pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG (2,5 μ g/placa) em OPTI-MEM foi preparada e incubada por 20 minutos. As células (4x10⁵/placa) foram adicionadas à solução que foi subsequentemente depositada em placas de petri. As placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% CO₂ por 48 horas.

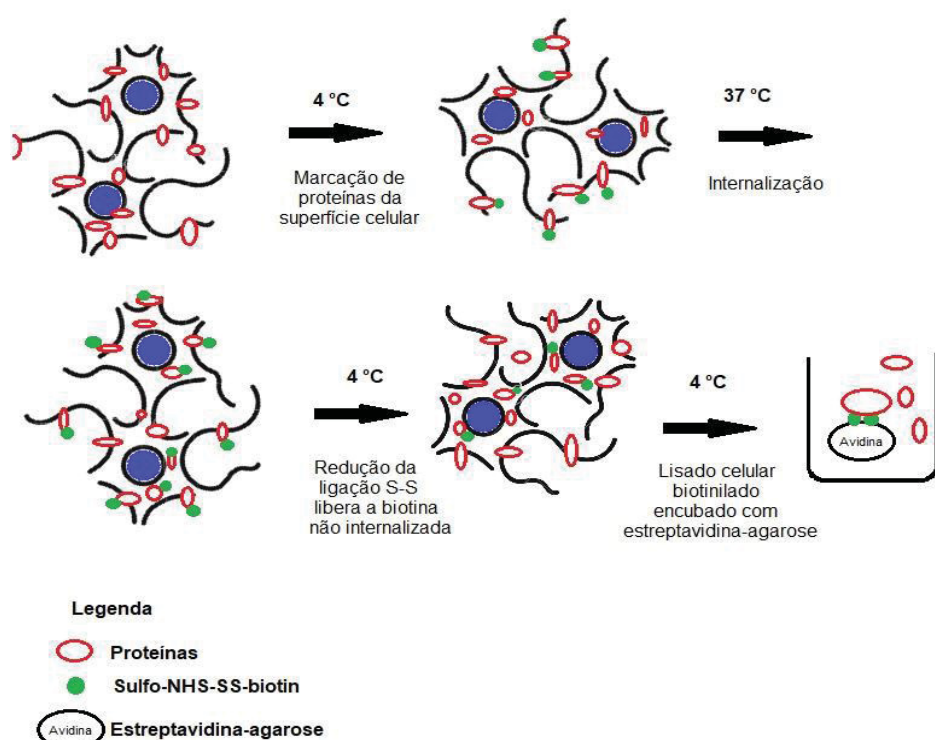
3.7 ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR

Células N2A transfectadas com o plasmídeo pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG e encubadas por 48 horas foram aclimatadas a 4°C por 15 minutos (com o intuito de pausar a internalização de proteínas), lavadas três vezes com PBS⁺⁺ (PBS, acrescido de 1,5mM MgCl₂, 0,2mM CaCl₂, pH 8.2) por dois minutos e incubadas com 0.3 mg/mL EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Thermo Scientific) por 30 minutos a 4°C

(Figura 3). Após a incubação as placas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com uma solução de bloqueio glicina 100 mM (GE, Healthcare), que se liga à biotina livre bloqueando-a.

Após o bloqueio foi adicionado PBS (pH 7,4) a 37 °C e as células foram incubadas a 37°C 5% CO², em diferentes tempos (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos), promovendo a internalização de proteínas de superfície celular. As células foram lavadas com PBS⁺⁺ a 4°C, e tratadas com Tampão L-Glutationa reduzida (80mM NaOH, 50mM L-GSH, 75mM NaCl, 1% BSA, pH 8,6) 3 vezes por 30 minutos, para que ocorresse o desligamento da biotina das proteínas não internalizadas (Figura 3). As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS⁺⁺ para remoção do excesso de tampão redutor e submetidas à lise por banho de gelo em tampão de lise (140 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Deoxycholate, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Triton x-100 , 10% Glicerol) contendo coquetel de inibidores de protease (ROCHE).

FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO DO PROTOCOLO DE ENDOCITOSE MEDIANTE BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR.



Células N2A transfectadas com o plasmídeo pCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene) foram aclimatadas a 4°C por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS⁺⁺ (PBS acrescido de 1,5mM MgCl₂, 0,2mM CaCl₂, pH 8.2) por dois minutos e incubadas com biotina EZ-Link-sulfo-LC Hydrazide-Biotin (Thermo Scientific) por 30 minutos a 4°C. Após a incubação com a biotina as placas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com uma solução de bloqueio (glicina 100mM). Após o bloqueio foi adicionado PBS (pH 7,4) a 37 °C e as células foram encubadas a 37°C 5% CO₂, em diferentes tempos (0, 15, 30, 45, 60

minutos), com o intuito de pausar a internalização de proteínas de superfície celular. As células foram lavadas com PBS++ a 4°C, e tratadas com Tampão Glutathiona reduzida.

Fonte: A autora, adaptado de GABRIEL.; STEVENS.; MELIKIAN (2009).

Os extratos foram submetidos 3 vezes ao vórtex por 20 segundos em intervalos de 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 18928 xg, e o sobrenadante foi recolhido e submetido à dosagem de proteínas pelo método de Bradford. 50µg de cada lisado foi submetida à cromatografia de afinidade com 200µl de resina Avidina-Agarose (Thermo Scientific Pierce) por 2 horas (Figura 3). A resina Avidina-Agarose foi previamente lavada por 2 vezes em PBS (pH7,4) e uma vez com o mesmo tampão de lise.

Após a incubação do lisado, foram realizadas 3 lavagens da resina com o tampão de lise previamente mencionado. Em seguida, adicionou-se a cada amostra 20µl de tampão de amostra 2,5 X redutor (contendo β-mercaptoetanol) e as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 10 minutos e centrifugadas a 19.000 xg por 3 minutos. O tampão de amostra juntamente com a alta temperatura levam ao desligamento das proteínas da resina. O eluato foi coletado e analisado por SDS-PAGE e immunoblotting. (protocolo adaptado de (GABRIEL et al., 2009; STAUTZ et al., 2012). As imagens foram analisadas e a ADAM23 internalizada foi quantificada com o software ImageJ FIJI e o gráfico foi elaborado com o software GraphPad Prism 7.

3.8 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE (MEIA-VIDA) PROTEICA

De modo a avaliar a meia-vida da proteína ADAM23, 4×10^5 células N2A foram tratadas com cicloheximida (100 µM) e incubadas até 24h (t = 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas). Após o período de incubação as células foram lisadas (140 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Deoxicolato, 10mM tris-HCl ph 8.0, 1% Triton x-100, 10% Glicerol), quantificadas por ensaio de Bradford e submetidas às técnicas de SDS-PAGE e immunoblotting.

3.9 WESTERN BLOT

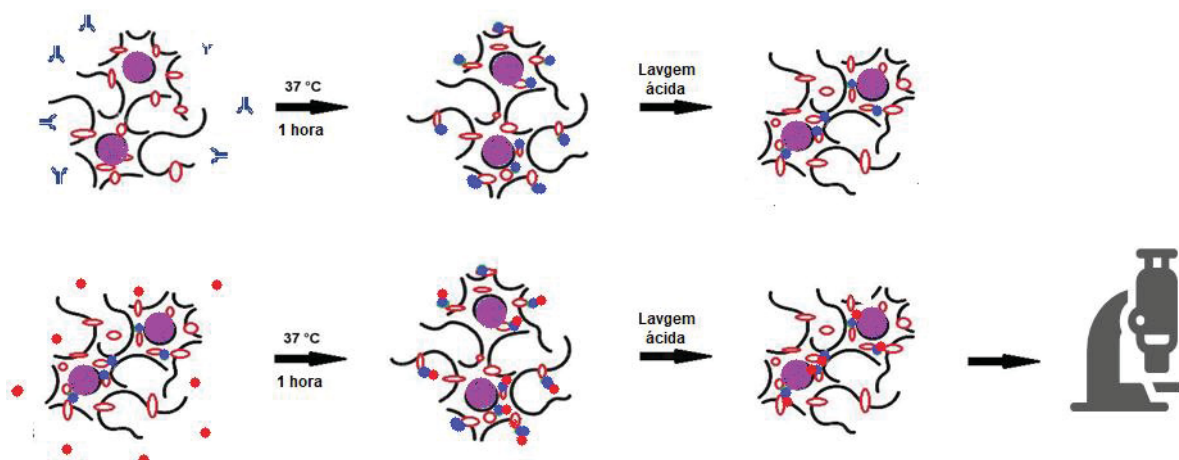
As concentrações totais de proteínas do N2A e foram sempre medidos pelo kit de reagentes Bradford protein assay (Bio-Rad). Os extratos celulares foram resolvidos com SDS-PAGE a 10%, seguido de transferência para membrana de

nitrocelulose com uma célula de eletrotransferência semi-seca (Bio-Rad). Após bloqueio com BSA a 2% em tampão salino-Tween tamponado com Tris por 1 hora, as membranas foram incubadas por 16h a 4°C sob agitação com o sobrenadante da cultura de hibridoma DL11C8, contendo anticorpos monoclonais contra ADAM23. Após várias lavagens, as membranas foram incubadas com IgG-HRP anti-camundongo (Sigma) por 1h à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida com o kit quimiluminescente SuperSignal® West Pico ECL (Thermo Scientific) e filmes Carestream Medical X-ray Green / MXG Film (Kodak).

3.10 ENSAIO DE RECICLAGEM DE PROTEÍNAS MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-ADAM23 (DL11C8)

Para o ensaio baseado na reciclagem de proteínas marcadas com anticorpos, células N2A foram transfectadas com 1 µg por poço de pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG, plaqueadas em lamínulas de vidro (2×10^5 células por poço) e cultivadas por 48 h. As células foram incubadas com o anticorpo anti-ADAM23 (DL11C8) por 1 h a 37°C, para que ocorresse a internalização de ADAM23. O anticorpo não ligado e não internalizado foi removido por uma breve lavagem (2 vezes por 30 segundos) em tampão glicina (0.2M glicina, 0.15M NaCl, pH 3.0) e depois duas vezes em DMEM regular. As células foram marcadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* secundário 488 (diluição de 1:400) por 1 h a 37 °C e a etapa de lavagem com tampão glicina ácido foi repetida, assim como a lavagem em DMEM. Os controles incluíram amostras mantidas a 4 °C com ou sem lavagem em tampão glicina ácido. As células foram fixadas em PFA a 2% com PBS Triton X-100 a 0,1% por 30 minutos. Os núcleos foram corados com DAPI em PBS (1 mg / ml). As imagens foram adquiridas com um microscópio confocal a laser Nikon A1R MP + (Confocal Microscopy Facility, CTAF, UFPR).

FIGURA 4 -ENSAIO DE RECICLAGEM DE PROTEÍNAS MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-ADAM23 (DL11C8)



Células N2A foram transfectadas com pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG plaqueadas em lamínulas de vidro e cultivadas por 48 h. As células foram incubadas com o anticorpo anti-ADAM23 (DL11C8) por 1 h a 37°C, para que ocorresse a internalização de ADAM23. O anticorpo não ligado e não internalizado foi removido por uma breve lavagem em tampão glicina ácido e depois duas vezes em DMEM regular. As células foram marcadas com o anticorpo secundários anti-mouse secundário 488 (diluição de 1:400) por 1 h a 37 °C e a etapa de lavagem com tampão glicina ácido foi repetida, assim como a lavagem em DMEM. Os controles incluíram amostras mantidas a 4 °C com ou sem lavagem em tampão glicina ácido. Em roxo o núcleo celular; em azul o anticorpo anti-ADAM23 (DL11C8); em vermelho anticorpo secundário anti-mouse secundário 488.

Fonte: A autora (2020)

4 RESULTADOS

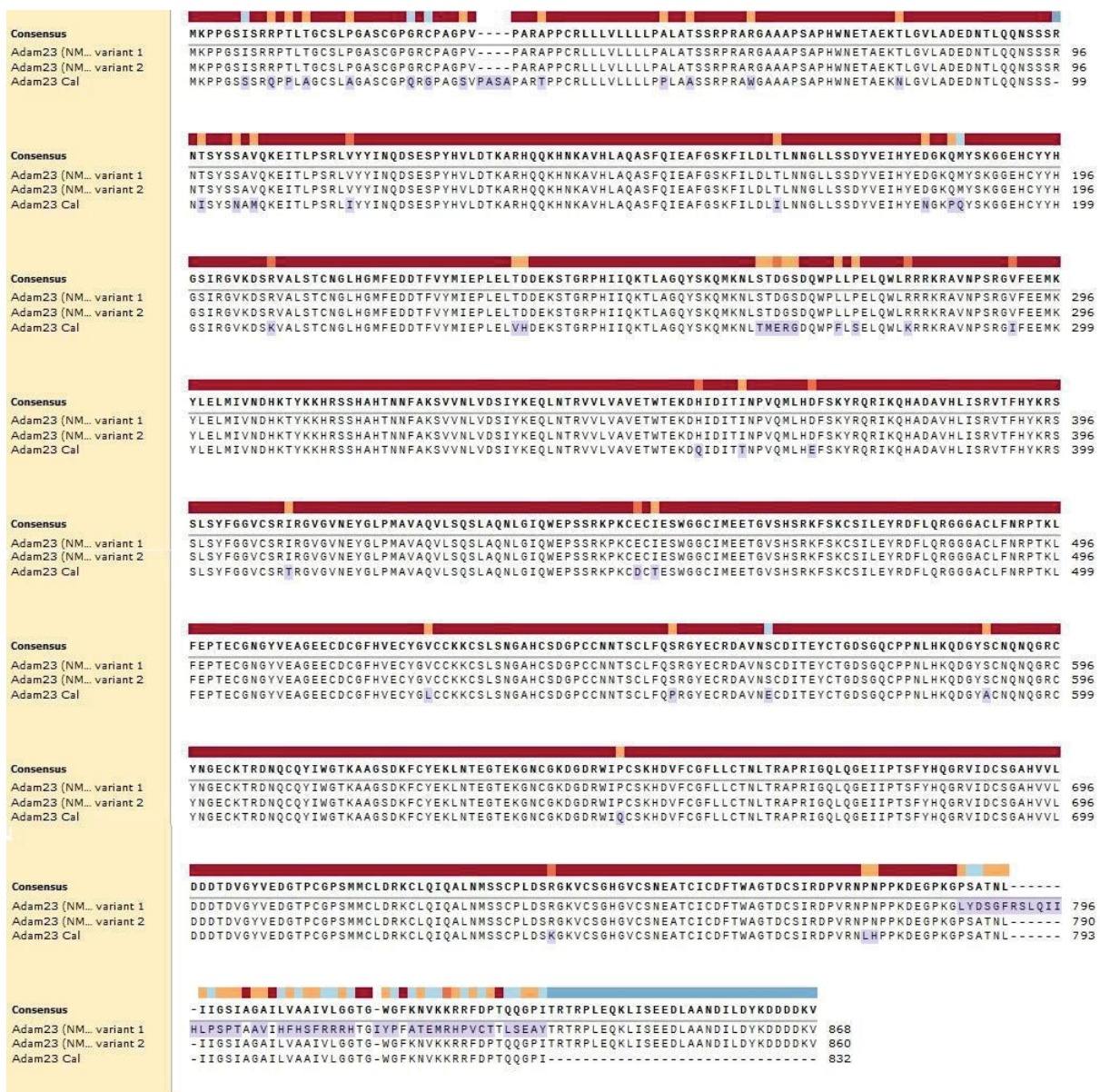
4.1 AS VARIANTES 1 E 2 DE ADAM23 (ORIGINE) POSSUEM DIVERGÊNCIAS na SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS REFERENTE AO DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO.

Para a realização desse projeto foram adquiridos vetores comerciais codificantes para a proteína ADAM23, pCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG e pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG (ORIGENE). Através do alinhamento comparativo das sequências de aminoácidos preditas, resultantes da expressão dos vetores pCMV6-ADAM23V1-Myc-FLAG, pCMV6-ADAM23V2-Myc-FLAG (obtidas no site do fabricante) e pCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000) (sequência previamente sequenciada no laboratório) (Figura 5) é possível notar uma grande similaridade entre os aminoácidos das três sequências. Variante 2 e CAL possuem a mesma sequência de aminoácidos nas regiões de membrana (**LIIGSIAGAILVAAIVLGGTG**) e cauda citoplasmática (**WGFKNVKKRRFDPTQQGPI**), a Variante 1 por sua vez apresenta diferença em quase todos os aminoácidos dessa mesma região em relação a Variante 2 e CAL (Figura 6, marcações em roxo). O inserto CAL apresenta diferenças pontuais nos aminoácidos referentes a outros domínios proteicos das sequências Variante 1 e Variante 2, que exceto os domínios de cauda citoplasmática e transmembrana possuem sequência aminoacídica idênticas.

O BLASTp relacionou a sequência de aminoácidos preditas, resultantes da expressão do vetor Variante 2 com a sequência *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23 preproprotein* de *Mus musculus* (NP_035910.1). O critério de avaliação para identificar as sequências foi a porcentagem de identidade. A porcentagem de identidade da Variante 2 com pré-ADAM23 de *Mus musculus* foi de 100%. A Variante 1 foi relacionada com *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23 isoform X1* de *Mus caroli* (XP_029333382.1) com 97.86% de porcentagem de identidade entre as sequências, sendo a ADAM23 X1 de *Mus caroli* a única sequência, encontrada no banco de dados, com cauda citoplasmática e domínio transmembrana semelhantes aos mesmos domínios da Variante 1.

A sequência CAL corresponde a *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23 preproprotein* de *Homo sapiens* (*NP_003803.1*), com porcentagem de identidade de 100%, como esperado.

FIGURA 5 - ALINHAMENTO COMPARATIVO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO RESULTANTES DA EXPRESSÃO DOS VETORES PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG (ORIGENE) E PCDNA3.1-ADAM23-HÁ (CAL ET AL., 2000)



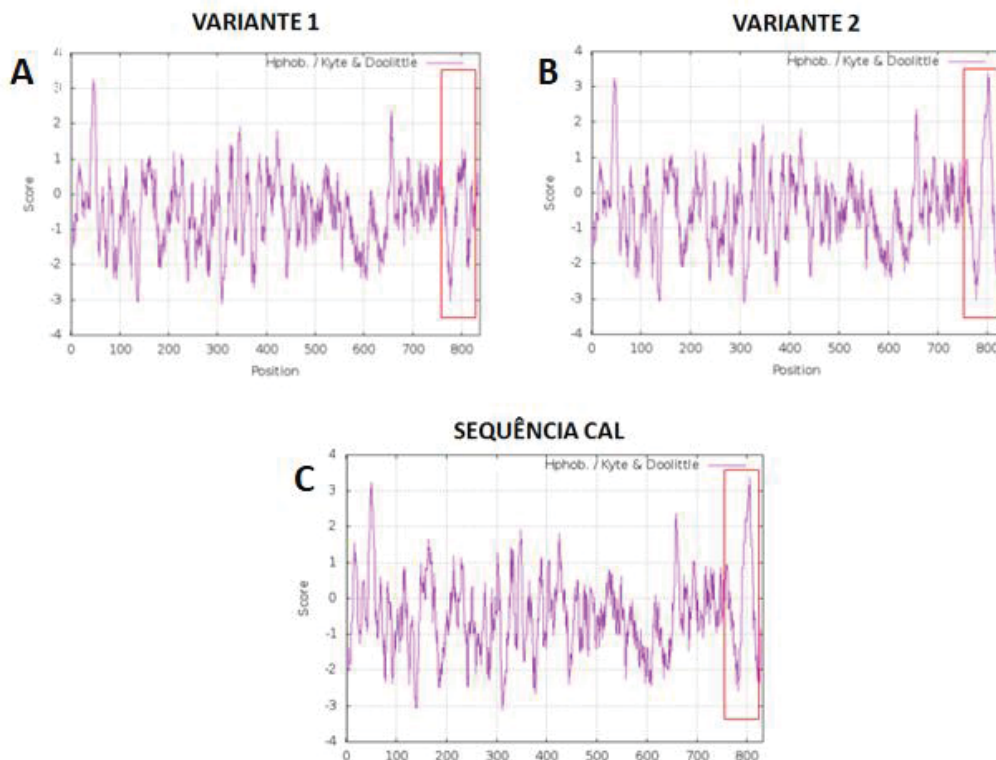
Foi realizado um alinhamento comparativo entre as sequências de aminoácido resultantes da expressão dos vetores PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene) e PCDNA3.1-ADAM23-HÁ (CAL *et al.*, 2000) através do software *Snappgene 4.0*. É possível ver diferenças (marcações em roxo/laranja) entra a composição de aminoácidos das três sequencias. Os blocos em vermelhos representam regiões com aminoácidos idênticos entre as três sequências e os blocos azuis representam regiões onde existe ausência de aminoácidos em relação a outra sequência.

FONTE: A autora, através do alinhamento pelo software *Snappgene 4.0* (2018).

4.2 AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS, RESULTANTES DA EXPRESSÃO DOS VETORES APRESENTAM DIFERENTES PERFIS DE HIDROFOBICIDADE EM SUA PORÇÃO C-TERMINAL

Quando avaliadas segundo a hidrofobicidade dos seus aminoácidos pela escala *Kyte & Doolittle* na plataforma ProtScale ExPASy (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics) as sequências de aminoácidos previstas, resultantes da expressão dos vetores apresentaram diferenças entre a hidrofobicidade de aminoácidos nas regiões intermembrana e cauda citoplasmática (Figura 6, região marcada em vermelho). As Variante 2 (B) e CAL (C) tiveram o mesmo perfil em toda a sequência, possuindo porções intermembranas hidrofóbica (região marcada em vermelho). A Variante 1 (A), por sua vez, apresentou perfil hidrofílico em sua porção prevista como intermembrana (região marcada em vermelho).

FIGURA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL HIDROFÓBICO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO RESULTANTES DA EXPRESSÃO DOS VETORES PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG (ORIGENE) E PCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL ET AL., 2000)



As sequências de aminoácidos previstas, resultantes da expressão dos vetores apresentaram diferenças entre a hidrofobicidade de aminoácidos nas regiões intermembrana e cauda citoplasmática (Figura 6, região marcada em vermelho). A. PCMV6-ADAM23V1-FLAG (Origene), B. PCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene), C. PCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL et al., 2000).

FONTE: A autora através da Kyte & Doolittle na plataforma ProtScale ExpASy (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics (2018)

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXPRESSÃO DE ADAM23 PELOS VETORES PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG (ORIGENE) E PCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL ET AL., 2000).

Para avaliar a expressão adequada da proteína ADAM23 em linhagens celulares de mamíferos, 60µg de lisados de células HEK-293T transfectadas com os vetores previamente mencionados, foram submetidos a reações de imunoprecipitação com a resina anti-ADAM23-Sepharose (produzida no laboratório).

Foi possível observar que com a super expressão da Variante 2 da ADAM23 (figura 7, linha V2 input) ambas as formas de 70 e 100 kDa foram imunoprecipitadas (figura 7, linha V2 ip). A variante 1 da ADAM23 (figura 7, linha v1 input) e a variante CAL (Figura 7, Linha CAL input) super expressam apenas a forma não-processada de 100 kDa, nas células HEK2393-T, e estas também foram eficientemente imunoprecipitadas (figura 7, linha v1 ip, linha CAL ip). Como controle negativo foram utilizados extratos de células HEK2393-T não-transfectadas, que expressam pouca ou nenhuma ADAM23 endógena (Figura 7, linha nt ip).

FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXPRESSÃO DE ADAM23 PELOS VETORES PCMV6-ADAM23V1-FLAG, PCMV6-ADAM23V2-FLAG (ORIGENE) E PCDNA3.1-ADAM23-HA (CAL ET AL., 2000).



Imunoprecipitação (IP) das Variantes de ADAM23 presentes no extrato de células HEK-293T transfectadas. V1: ADAM23 decorrente da transfecção com pCMV6-ADAM23V1-FLAG; V2: ADAM23 decorrente da transfecção com pCMV6-ADAM23V2-FLAG; CAL: ADAM23 decorrente da transfecção com pcDNA3.1-ADAM23-HA; NT: controle negativo células HEK-293T não-transfectadas. Input: controles com extratos não imunoprecipitados. No extrato de células transfectadas com a Variante 2 foi possível detectar ADAM23 madura (70 kDa) e imatura (100 kDa), tanto no input quanto no imunoprecipitado. Reações com anti-ADAM23 (sobrenadante de hibridoma DL11C8), anticorpo secundário anti-mouse HRP (1:4.000).

FONTE: Ingrid Larissa Souza de Mello e a autora (2018)

4.4 ADAM23 É TEMPORARIAMENTE REDISTRIBUÍDA ENTRE A MEMBRANA PLASMÁTICA E COMPARTIMENTOS DO CITOSOL

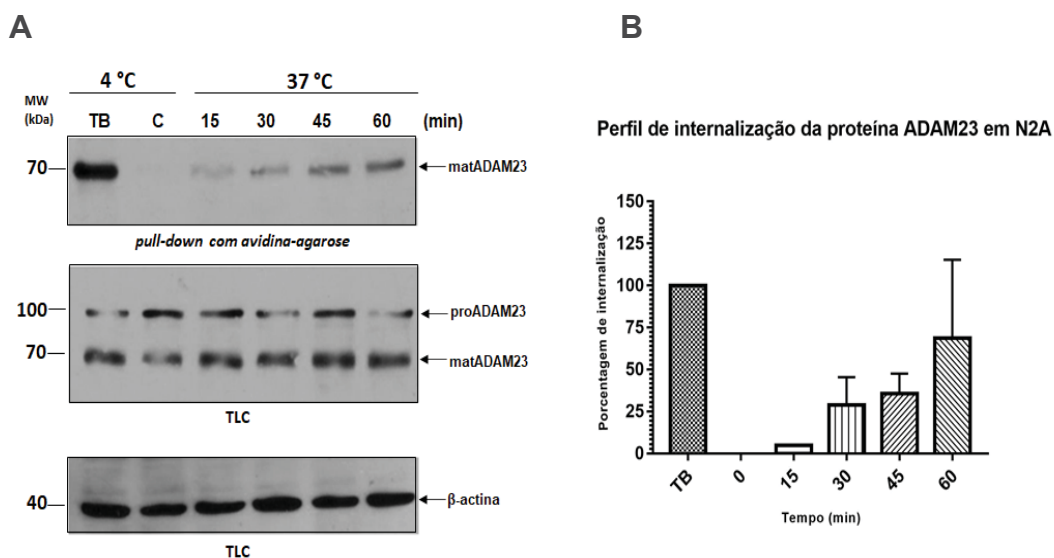
Com o intuito de estudar a cinética de internalização de ADAM23 foram realizados ensaios empregando a biotilação de proteínas de superfície celular como estratégia para o acompanhamento temporal da sua incorporação pela célula. O reagente de derivatização NHS-SS-Biotin não é permeável a membrana celular e contém uma ligação dissulfeto sensível a agentes redutores, permitindo assim que apenas proteínas presentes na face extracelular da membrana plasmática sejam marcadas por biotina e que esta possa ser convenientemente removida, dependendo do desenho experimental.

As proteínas não internalizadas em diversos pontos temporais tiveram sua biotina removida através da redução do dissulfeto através de tratamento com agente redutor glutathiona reduzida. No experimento de internalização é fundamental que após a entrada das moléculas biotiniladas nas células, aquelas que permaneceram no ambiente extracelular tenham a etiqueta de biotina eficientemente removida, permitindo a comparação entre a população de proteínas endocitadas, em dado tempo da curva, com o total de moléculas marcadas com biotina (Figura 8, TB). Células submetidas à biotilação, mantidas a 4°C e tratadas com agente redutor foram empregadas como controle da eficiência de remoção de biotina das proteínas não internalizadas. Este mesmo ponto experimental pode ser considerado como o tempo 0 minuto na curva da cinética de internalização. Vários autores descrevem a glutathiona-reduzida (GSH) como um agente redutor eficiente para a remoção da biotina conjugada às proteínas de superfície celular (CIHIL; SWIATECKA-URBAN, 2003; STAUTZ et al., 2012), apesar de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) também ter sido utilizado por outros grupos (GABRIEL.;STEVENS.; MELIKIAN, 2009).

ADAM23 70kDa biotinilada presente em compartimentos intracelulares foram detectadas após 15 minutos a 37 °C (Figura 8, banda 15 min), a quantidade da proteína nestes compartimentos aumentou nos tempos subsequentes até o último ponto analisado (Figura 8, 60 min). ADAM23 não foi detectada nos pontos temporais 5 e 10 minutos (dados não mostrados) ou no controle mantido a 4°C (tempo 0, coluna C). Um décimo do extrato celular total (TLC) foi usado como controle do carregamento de proteínas em cada ponto temporal, a partir da detecção direta de ADAM23 e β -

actina. Este controle de carregamento proteico (Figura 8, actina, painel inferior) e transfecção (Figura 8, ADAM23, painel intermediário) evidenciam que quantidades muito semelhantes e comparáveis de proteína foram empregadas em cada ponto experimental. Como esperado, tanto ADAM23 70 kDa quanto ADAM23 100 kDa foram detectadas no lisado total (BORGONOVO *et al.*, 2018) porém somente ADAM23 70 kDa foi detectada na superfície celular, indicando a prevalência, se não a exclusividade, de ADAM23 madura (70 kDa) presente na superfície celular nessas condições experimentais (Figura 8, painel superior).

FIGURA 8 - ADAM23 É REDISTRIBUÍDA TEMPORALMENTE DA MEMBRANA PLASMÁTICA PARA OS COMPARTIMENTOS DO CITOSOL.



Células N2A transfectadas foram biotinizadas a 4°C e perseguidas a 37°C por vários pontos temporais. (A) A biotina acoplada a dissulfeto das proteínas não internalizadas foi reduzida e removida da superfície celular através do uso de um tampão contendo L-glutaciona. Os lisados celulares totais foram incubados com estreptavidina-agarose e analisados através de SDS-PAGE. Os controles foram ADAM23 biotinizada na superfície total a 0 min (TB) e células mantidas a 4°C (4 °C, C). Um décimo do lisado celular total (TCL) foi testado contra anticorpos anti-ADAM23 (painel do meio) e anti-actina (painel inferior) como controles de carregamento de amostras. Os anticorpos usados foram o anti-ADAM23 (sobrenadante de hibridoma DL11C8), anti-β-actina (1:10.000) e o anticorpo secundário anti-mouse HRP (1:4.000). (B) O gráfico representa a quantidade de ADAM23 internalizada em relação ao total de ADAM23 na membrana plasmática no ponto inicial (TB). O gráfico é um resultado representativo de três experimentos independentes. As bandas foram densitometradas através do software FIJI ImageJ e o gráfico foi construído no software GraphPad Prism 7.

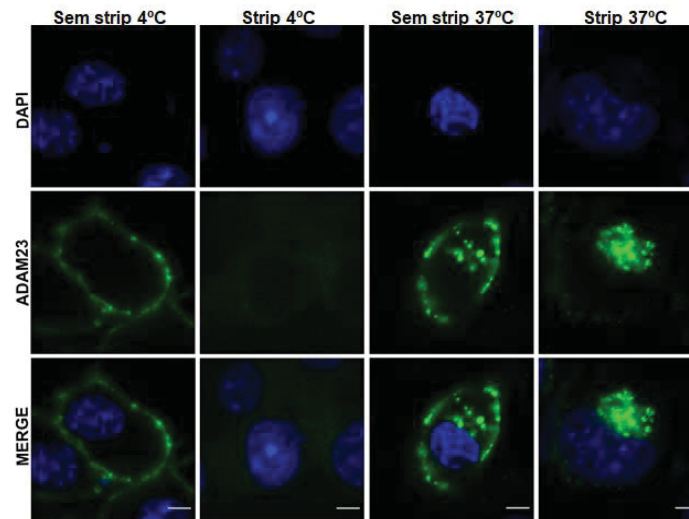
FONTE: A autora (2019)

4.5 ADAM23 É RECICLADA DOS COMPARTIMENTOS INTRACELULARES PARA A MEMBRANA PLASMÁTICA

Como observamos que uma fração de ADAM23 da superfície celular foi constitutivamente internalizada ao longo do tempo (Figura 8), concluímos que ADAM23 também poderia ser reciclada para a membrana plasmática. Para verificar essa possibilidade, foi empregado um ensaio baseado em anticorpos para rastrear a reciclagem de receptores entre a membrana plasmática e os compartimentos internos (MITCHELL *et al.*, 2004; STAUTZ *et al.*, 2012). Células N2A transfectadas com plasmídeo Variante 2 foram incubadas com o anticorpo DL11C8 e mantidas a 37°C. O anticorpo restante na superfície celular foi removido por lavagem ácida. Em seguida, as células foram incubadas com um anticorpo secundário marcado com fluorescência a 37°C, após 1 hora foram retiradas novamente com uma solução ácida, fixadas e processadas para análise microscópica confocal. Assim, os sinais intracelulares fluorescentes permanecem apenas na molécula ADAM23 que se apresentou duas vezes na superfície celular, e portanto foram recicladas.

As células mantidas a 4°C e não lavadas com uma solução ácida (Figura 9, Sem strip 4°C) apresentaram apenas padrão de imunomarcação de superfície celular com ADAM23, não indicando a internalização da proteína. Por outro lado, quando as células foram lavadas com uma solução ácida (Figura 9, Strip 4°C), todos os imunocomplexos ADAM23/DL11C8 foram removidos da superfície celular e, conseqüentemente, nenhum sinal de fluorescência foi detectado. Paralelamente, as células mantidas a 37°C e incubadas com os anticorpos primário e secundário e nenhuma remoção de ácido apresentaram membrana plasmática e ADAM23 intracelular (Figura 9, Sem strip, 37°C). No entanto, quando lavagens ácidas foram incluídas em um conjunto experimental paralelo (Figura 9, Strip, 37°C), foi observado um desaparecimento dramático da imunomarcação de ADAM23 na superfície celular e apenas ADAM23 reciclada pôde ser detectada no meio intracelular, indicando a reciclagem constitutiva do receptor.

FIGURA 9 - ADAM23 É RECICLADA DOS COMPARTIMENTOS INTRACELULARES PARA A MEMBRANA PLASMÁTICA.



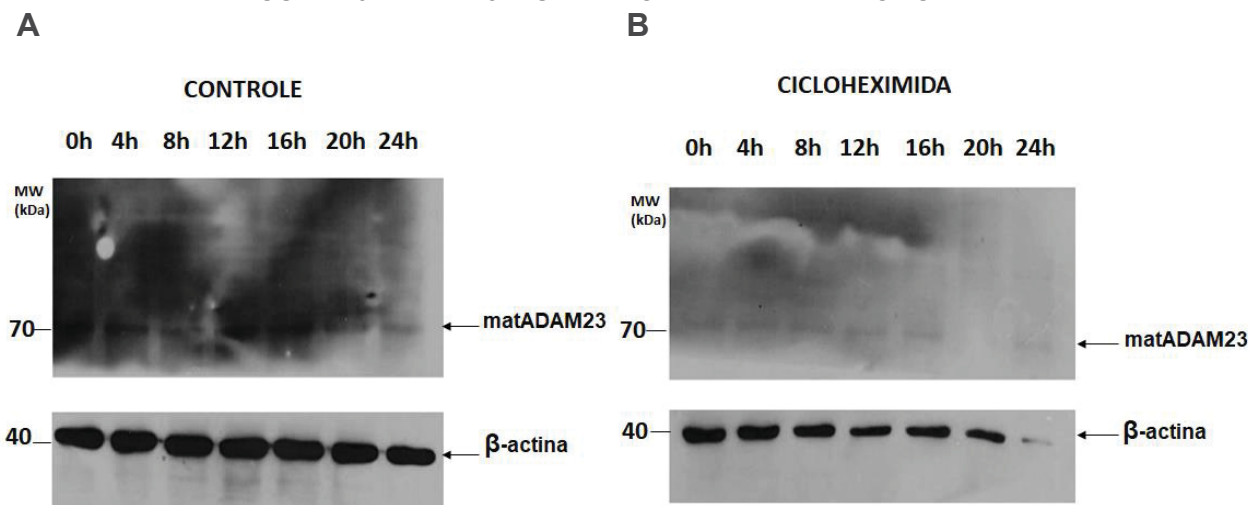
Células N2A foram transfectadas transientemente com ADAM23 e incubadas com o anticorpo monoclonal DL11C8 por 2h a 4°C. O imunocomplexo ADAM23/DL11C8 foi deixado na superfície da célula (Sem strip, 4°C) ou retirado por lavagem ácida (Strip, 4°C). As células foram então incubadas por mais 1 hora a 37 °C com anticorpo secundário conjugado com Alexa488 contra IgG de camundongo. Os complexos de anticorpos da superfície celular foram removidos subsequentemente (Strip, 37°C) ou não (Sem strip, 37°C). Como o sinal fluorescente no grupo Strip 37°C permanece apenas em moléculas que se apresentaram duas vezes na superfície celular, é possível concluir que ADAM23 é reciclada dos compartimentos intracelulares para a membrana plasmática de forma constitutiva. As amostras foram fixadas e processadas para microscopia confocal. Núcleos marcados com DAPI (1 µg / µl). Barra de escala = 5 µm.

FONTE: A autora (2019).

4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE (MEIA-VIDA) DA PROTEÍNA ADAM23

De modo a avaliar a meia-vida da proteína ADAM23, células N2A foram tratadas com cicloheximida, inibidor da síntese de proteínas em eucariotos produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*. Os resultados obtidos não mostram uma diminuição significativa de ADAM23 após 24 horas de tratamento, sugerindo que esta proteína possui uma estabilidade relativamente longa em células N2A (Figura 10).

FIGURA 10 - ADAM23 É UMA PROTEÍNA DE VIDA LONGA



Extratos de células N2A transfectadas com o vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG e tratadas (B, CICLOHEXIMIDA) ou não (A, CONTROLE) com cicloheximida (t= 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24h). Os Resultados obtidos não mostram uma diminuição significativa de ADAM23 (70 kDa) após 24 horas de tratamento, em relação ao controle, mas é possível ver uma diminuição progressiva no controle β -actina. Reações com anti-ADAM23 (sobrenadante de hibridoma DL11C8), anti- β -actina (1: 5.000), anticorpo secundário anti-mouse HRP (1:4.000).

FONTE: A autora (2019).

5 DISCUSSÃO

ADAM23 é um membro cataliticamente inativo da família ADAM, suas principais funções são relacionadas às propriedades de adesão neural sináptica em associação às proteínas da família LGI1. (WANG *et al.*, 2017; HIVERT *et al.*, 2019; LANCASTER *et al.*, 2019). Embora o perfil de internalização e o tráfego de proteínas tenham sido estudadas para alguns membros catalíticos da família ADAM, quase nada se sabe sobre membros não catalíticos. Tendo em vistas a importância e a alta expressão de ADAM23 no sistema nervoso (SAGANE *et al.*, 1998; 1999; LEIGHTON *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2001; GOLDSMITH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009; DHAUNCHAK *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2011; KEGEL *et al.*, 2014) e seu papel no transporte retrógrado de LGI1 (HIVERT *et al.*, 2019) decidimos estudar a redistribuição de ADAM23 do espaço extracelular para o citoplasma. Neste trabalho mostramos que ADAM23 super expressa em células N2A sofre internalização constitutiva da membrana plasmática para os compartimentos do citosol, sendo capaz de reciclar de volta à superfície celular. Ainda, dados preliminares apresentados neste estudo sugerem que ADAM23 é uma proteína de vida longa.

Múltiplas ADAMs são expressas em diferentes isoformas, resultantes de splicing alternativo. Por exemplo, ADAM29 (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM22 (SAGANE *et al.*, 1998; GODDE *et al.*, 2007) e ADAM30 (CERRETTI *et al.*, 1999) têm de duas a três formas que variam no comprimento de suas caudas citoplasmáticas, embora não tenham sido relatadas diferenças funcionais nessas isoformas. Em outras ADAMs o splicing alternativo produz isoformas com atividades diferentes entre si. Um motivo comum entre as proteínas desta família é a produção de uma ou duas isoformas ligadas a membrana e uma isoforma secretada, sendo encontrado na ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM28 e ADAM8. (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). Há evidências de que os genes *adam11*, *adam33* e *adam23* produzam produtos de splicing alternativo (KATAGIRI *et al.*, 1995; VAN EERDEWEGH *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2004).

São propostas três isoformas de splicing alternativo para o gene ADAM23 humano: ADAM23-alfa (sequência canônica), ADAM23-beta e ADAM23-gama. Estas isoformas variam somente nos domínios transmembranares, que possuem diferentes composições de aminoácidos. As proteínas ADAM23 codificadas pelas isoformas alfa

e beta são presas à membrana por diferentes domínios transmembranares (codificados pelo exon 26 na isoforma alfa e pelo exon 25 na isoforma beta) e prevê-se que tenham localizações distintas de subdomínios da membrana. A ADAM23-gama é gerada ausência dos exons 25 e 26 e, portanto, não possui o domínio transmembranar sendo possivelmente uma isoforma segregada ou citoplasmática da proteína ADAM23 (SUN *et al.*, 2004).

Antes de iniciarmos os experimentos relacionados aos processos de internalização e reciclagem de N2A, achamos pertinente definir o vetor de expressão e o inserto mais adequado ao estudo. Uma vez que a análise das sequências por BLAST, classificou o inserto CAL como pró-ADAM23 humana, e o modelo celular usado no estudo foi uma linhagem murina (N2A), o uso deste vetor foi considerado inapropriado. A sequência de aminoácidos preditas, resultantes da expressão do vetor Variante 2 foi caracterizada como pró-ADAM23 de *Mus musculus*, A Variante 1 por sua vez, foi relacionada com ADAM23 isoforma X1 de *Mus caroli*.

Interessantemente observou-se que as construções Variante 1 e CAL quando transfectadas em células 293 produzem apenas a forma imatura (não processada, 100 kDA) de ADAM23. Foi possível também observar uma diferença nos aminoácidos da região c-terminal das variantes 1 e 2, referente ao final dos domínios transmembrana e da cauda citoplasmática. No caso das variantes 1 e 2 estas diferenças na composição aminoacídica talvez sejam as responsáveis pela expressão diferencial das duas variantes. De fato, quando analisamos o perfil hidropático do domínio transmembrana da variante 1 observamos que o mesmo é hidrofílico e portanto talvez incompatível com sua inserção adequada na membrana plasmática. Já é bem estabelecido bioquimicamente que a inserção de receptores de membrana plasmática começa durante sua síntese no citoplasma através da interação do domínio transmembrânico hidrofóbico com a membrana no retículo endoplasmático. Neste contexto, uma sequência transmembrânica com características hidrofílicas poderiam conduzir a um padrão aberrante de expressão, por exemplo, expressão ectópica do receptor (*i.e.* fora da membrana plasmática) ou resistência á modificações pós-traducionais (*e.g.* processamento proteolítico por furinas ou glicosilação aberrante). Por meio dessas observações sugerimos que a região transmembrana e/ou o domínio citoplasmático sejam determinantes no processamento de ADAM23. Curiosamente a região c-terminal da Variante 2 e da sequência CAL são idênticas, fato que representaria uma aparente contradição ao que foi acima discutido para as

variantes 1 e 2. Entretanto não pode ser desconsiderada as diferenças nas sequencias extracelulares da variante 2 e CAL, indicando que outros sítios presentes em domínios contidos nas porção extracelular do receptor são decisivos na maturação da proteína.

Como já discutido nesse trabalho, algumas isoformas resultantes do processamento alternativo das ADAMs, não possuem a região responsável por ancorar a proteína na membrana, o que inviabilizaria a realização dos experimentos de internalização e reciclagem. Por expressar ADAM23 com domínio transmembrana, capaz de ser processada e gerar a proteína madura (70 kDA) a Variante 2 foi escolhida para superexpressar ADAM23 na linhagem celular N2A usada nos experimentos subsequentes.

A abordagem experimental de marcação da superfície das células revelou que aproximadamente 75% da ADAM23 biotinilada é internalizada dentro de 60 min (1h), indicando que a proteína é constitutivamente internalizada a partir da membrana plasmática, sendo observada somente a forma madura de 70 kDA na membrana. Um perfil parecido com o obtido para ADAM23 foi observado para ADAM9 onde, uma quantidade substancial da proteína madura foi observada na membrana plasmática, enquanto as duas formas, pró (100 kDA) e madura (84 kDA) foram detectadas no total de lisados celulares. ADAM9 internalizada foi detectada logo após 15 minutos atingindo um platô após 30–60 minutos, sendo internalizada pela via de clatrina. ADAM12 super expressa em células HEK, parece atingir o pico de internalização, cerca de 65%, em 1 hora e permanecer praticamente estável por 5 horas, quando começa a declinar. Os resultados para a internalização de ADAM12 e ADAM9 foram obtidos através da mesma técnica utilizada neste trabalho, ou seja, a biotinição de proteínas da superfície celular (STAUTZ *et al.*, 2012).

Walcheck e colaboradores (2006) apontam que ADAM17 apresenta alta estabilidade na membrana, assim como ADAM12, mantendo os níveis da proteína na superfície celular de neutrófilos humanos inalterados por 20 horas, independentemente de serem estimulados por formil peptídeos derivados de bactérias (WALCHECK *et al.*, 2006). Eschenbrenner e colaboradores (2020) trazem dados muito relevantes á discussão, demonstrando que a fração de ADAM10 internalizado variava de acordo com a linhagem celular estudada. Por exemplo, em células PC3 a internalização de ADAM10 foi de 5% enquanto em células HeLa foi de 18%, em 1 hora a 37°C, sugerindo que a expressão diferenciada de um conjunto

gênico poderia levar a diferentes taxas de internalização de proteínas da família ADAM.

Após a internalização, moléculas são direcionadas para os endossomos iniciais, onde são redistribuídos para diferentes destinos. Os alvos internalizados podem ser direcionadas para endossomos tardios e lisossomos seguindo a via de degradação ou devolvidas à membrana plasmática, diretamente ou por endossomos de reciclagem justa nucleares (NASLAVSKY & CAPLAN, 2018).

ADAM12, ADAM9, ADAM10 e ADAM17 foram descritas como sendo internalizadas por via dependente de clatrina e distribuídas nos endossomos iniciais seguindo a rota de reciclagem (DOMBERNOWSKY *et al.*, 2015; MYGIND *et al.*, 2018; STAUTZ *et al.*, 2012). Estudos mostram que ADAM10 tem seu tráfego modulado pelas proteínas AP2 (MARCELLO *et al.*, 2013) e a Tspan5 / Tspan15 (ESCHENBRENNER *et al.*, 2020), enquanto a proteína nexina 9 (SNX9) regula a endocitose do ADAM9 (MYGIND *et al.*, 2018). No conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que as ADAMs podem ter propriedades endocíticas semelhantes, sendo constitutivamente internalizadas e relativamente estáveis na membrana celular, independentemente de suas propriedades catalíticas. Ademais levantamos a hipótese de que ADAM23, pode seguir vias endocíticas semelhantes após sua internalização.

De fato, mostramos através de um ensaio baseado em anticorpos, que ADAM23 é reciclada dos compartimentos internos para a membrana plasmática, assim como outros membros da família. No entanto, a hipótese de que ADAM23 pode ser internalizada por uma via dependente de clatrina, ainda não foi esclarecida.

Estabelecida a capacidade de ADAM23 ser internalizada e reciclada de volta para a membrana celular surgiu a curiosidade em avaliar a estabilidade dessa proteína. Observamos que ADAM23 foi detectada nos lisados de células N2A tratadas com cicloheximida em todos os momentos, se mantendo estável por pelo menos 24 horas após o tratamento. Este dado indica que a proteína ADAM23 possui uma alta estabilidade, com meia-vida superior a 24 horas em células N2A. Estes dados vão ao encontro de resultados semelhantes obtidos por outros membros do grupo (Ingrid Souza, tese, 2020), a partir de abordagens de pulso-caça, com a marcação de ADAM23 por biotina ou anticorpos e o acompanhamento da expressão de ADAM23 em diferentes tempos. Tais dados sugerem que a meia-vida de ADAM23 está situada entre 24-36 horas (SOUZA & OLIVEIRA *et al.*, submetido).

Em células Jurkat, ADAM17 biotinizada na superfície celular apresenta meia-vida de 8 horas (DOEDENS & BLACK, 2000), uma característica semelhante observada para o ADAM9 superexpresso em células MDA-MB-231 (MYGIND *et al.*, 2018). A meia-vida da proteína ADAM10, assim como sua fração internalizada, varia de acordo com a linhagem celular analisada, variando de 5 horas em U2OS a mais de 8 horas em células PC3. Ademais, a expressão de um conjunto de tetraspaninas TspanC8 parece regular a renovação do ADAM10, através do controle do tráfego e da estabilidade da proteína na célula. (ESCHENBRENNER *et al.*, 2020). Células HEK293VnR tratadas com cicloheximida mantiveram a mesma quantidade de ADAM12 por pelo menos 12 horas, apresentando a meia-vida mais longa até então verificada experimentalmente para membros da família ADAM (STAUTZ *et al.*, 2012).

Um possível motivo para a maior estabilidade de ADAM23 em relação aos seus familiares catalíticos, pode ser resultante da função que a proteína exerce como molécula adesiva (WANG *et al.*, 2017) e de seu papel na estabilização e tráfego de receptores (HIVERT *et al.*, 2019; LANCASTER *et al.*, 2019)

Entre vários parceiros moleculares já descritos para a proteína ADAM23, está a família LGI (KIM *et al.*, 2012; SAGANE *et al.*, 2008) Foi relatado que LGI1 pode ligar ADAM23 (SAGANE *et al.*, 2008) e atuar como uma ponte pré-sinapse, (FUKATA *et al.*, 2010). Hivert e colaboradores (2019) demonstraram que ADAM23 se associa ao LGI1 ao longo da via secretora. Vesículas contendo ADAM23 (co-localizada ou não com LGI1) podem ser transportadas para o segmento inicial do axônio. Segundo os pesquisadores, estas vesículas apresentam, em sua maior parte, orientação na direção anterógrada (HIVERT *et al.*, 2019). Especulamos que os resultados obtidos nesse estudo sobre a internalização e reciclagem de ADAM23 podem estar relacionados com a localização e distribuição de LGI1 em células neuronais.

6 CONCLUSÕES

- A análise das sequências por BLAST, classificou o inserto CAL como pró-ADAM23 humana. A sequência de aminoácidos preditas, resultantes da expressão do vetor Variante 2 foi caracterizada como pró-ADAM23 de *Mus musculus*. A Variante 1 por sua vez, foi relacionada com ADAM23 isoforma X1 de *Mus caroli*.
- Foi possível observar uma diferença nos aminoácidos da região c-terminal das Variantes 1 e 2, referente ao final dos domínios transmembrana e da cauda citoplasmática
- As construções Variante 1 e CAL quando transfectadas em células 293 produzem apenas a forma imatura (não processada, 100 kDA) de ADAM23.
- Quando transfectada em células 293 a Variante 2 produz as formas imatura e matura (100 kDA e 70 kDA) de ADAM23.
- O perfil hidropático do domínio transmembrana da Variante 1 é hidrofílico enquanto o perfil da mesma região das Variantes 1 e 2 são hidrofóbicos.
- A abordagem experimental de marcação da superfície das células revelou que aproximadamente 75% da ADAM23 biotinizada é internalizada dentro de 60 min (1h), indicando que a proteína é constitutivamente internalizada a partir da membrana plasmática, sendo observada somente a forma madura de 70 kDA na membrana.
- Através do ensaio baseado em anticorpos conclui-se que ADAM23 é reciclada dos compartimentos internos para a membrana plasmática.
- ADAM23 foi detectada nos lisados de células N2A tratadas com cicloheximida em todos os momentos, se mantendo estável por pelo menos 24.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AMOUR, A.; KNIGHT, C.; ENGLISH, W. R.; 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.; KNIGHT, C.; WEBSTER, 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.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 10, p. 1837–1839, 2001.
- BAX, D. V.; MESSENT, A. J.; TART, J.; 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.; MARCY, A. I.; ROKOSZ, L. L.; et al. Stromelysin-1: Three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. **Protein Science**, v. 4, n. 10, p. 1966–1976, 1995.
- BLOBEL, C. P.; WHITE, J. M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. **Current Biology**, v. 2, n. 12, p. 672, 1992.
- BORGONOVO, Z. L.; RIBEIRO, C. F.; COSTA, M. D.; et al. Monoclonal Antibody DL11C8 Identifies ADAM23 as a Component of Lipid Raft Microdomains. **Neuroscience**, v. 384, p. 165–177, 2018.
- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 267–283, 2000.
- CAL, S.; FREIJE, J. M.; LÓPEZ, J. M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN CARLOS. ADAM 23/MDC3, a Human Disintegrin That Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha\beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 4, 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, n. 3, p. 810–815, 1999.

CHEN, N.; KOOPMANS, F.; GORDON, A.; et al. Interaction proteomics of canonical Caspr2 (CNTNAP2) reveals the presence of two Caspr2 isoforms with overlapping interactomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 7, p. 827–833, 2015.

CHEUNG, Y.-T.; LAU, W. K.-W.; YU, M.-S.; et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, n. 1, p. 127–135, 2009.

CIHIL, K. M.; SWIATECKA-URBAN, A. The Cell-based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins. **Journal of Visualized Experiments**, , n. 82, 2013.

COSTA, M. D.; PALUDO, K. S.; KLASSEN, G.; et al. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461, n. 1, p. 16–20, 2009.

DHAUNCHAK, A. S.; HUANG, J. K.; FARIA, O. D.; et al. A proteome map of axoglial specializations isolated and purified from human central nervous system. **Glia**, v. 58, n. 16, p. 1949–1960, 2010.

DOEDENS, J. R.; BLACK, R. A. Stimulation-induced Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14598–14607, 2000.

DOMBERNOWSKY, S. L.; SAMSØE-PETERSEN, J.; PETERSEN, C. H.; et al. The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 2015.

EDWARDS, D.; HANDSLEY, M.; PENNINGTON, C. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 258–289, 2008.

EERDEWEGH, P. V.; LITTLE, R. D.; DUPUIS, J.; et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 426–430, 2002.

ELIZONDO, D. M.; ANDARGIE, T. E.; MARSHALL, K. M.; ZARIWALA, A. M.; LIPSCOMB, M. W. Dendritic cell expression of ADAM23 governs T cell proliferation and cytokine production through the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 855–864, 2016.

ESCHENBRENNER, E.; JOUANNET, S.; CLAY, D.; et al. TspanC8 tetraspanins differentially regulate ADAM10 endocytosis and half-life. **Life Science Alliance**, v. 3, n. 1, 2019.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; et al. Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin $\alpha9\beta1$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17804–17810, 2002.

ETO, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; SHEPPARD, D.; et al. RGD-independent Binding of Integrin $\alpha9\beta1$ to the ADAM-12 and -15 Disintegrin Domains Mediates Cell-Cell Interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 34922–34930, 2000.

- FUKATA, Y.; YOKOI, N.; MIYAZAKI, Y.; FUKATA, M. The LGI1–ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. **Neuroscience Research**, v. 116, p. 39–45, 2017.
- GABRIEL, L.; STEVENS, Z.; MELIKIAN, H. Measuring Plasma Membrane Protein Endocytic Rates by Reversible Biotinylation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 34, 2009.
- GAULTIER, A.; COUSIN, H.; DARRIBÈRE, T.; ALFANDARI, D. 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.
- GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 122, 2016.
- 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.
- GÖDDE, N.; D'ABACO, G.; PARADISO, L.; NOVAK, U. Differential coding potential of ADAM22 mRNAs. **Gene**, v. 403, n. 1-2, p. 80–88, 2007.
- HIVERT, B.; MARIEN, L.; AGBAM, K. N.; FAIVRE-SARRAILH, C. ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 2, 2018.
- HOOPER, N. M.; TAYLOR, D. R.; WATT, N. T. Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1272–1276, 2008.
- HORNSHAW, M.; MCDERMOTT, J.; CANDY, J. Copper Binding to the N-Terminal Tandem Repeat Regions of Mammalian and Avian Prion Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, n. 2, p. 621–629, 1995.
- 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. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 1, p. 21, 2000.
- HOWARD, L.; MACIEWICZ, R. A.; BLOBEL, C. P. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 1, p. 21, 2000.
- HUANG, T.-F. What have snakes taught us about integrins? **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 54, n. 6, p. 527–540, 1998.
- HUXLEY-JONES, J.; CLARKE, T.-K.; BECK, C.; et al. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 63, 2007.
- IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-Rich Domain of Human ADAM 12 (Meltrin α) Supports Tumor Cell Adhesion. **The American Journal of Pathology**, v. 154, n. 5, p. 1489–1501, 1999.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; et al. The Cysteine-Rich Domain of Human Adam 12 Supports Cell Adhesion through Syndecans and Triggers Signaling Events That Lead to β 1 Integrin-Dependent Cell Spreading. **Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 5, p. 1143–1156, 2000.

IRANI, S. R.; ALEXANDER, S.; WATERS, P.; et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. **Brain**, v. 133, n. 9, p. 2734–2748, 2010.

IRANI, S. R.; STAGG, C. J.; SCHOTT, J. M.; et al. Faciobrachial dystonic seizures: the influence of immunotherapy on seizure control and prevention of cognitive impairment in a broadening phenotype. **Brain**, v. 136, n. 10, p. 3151–3162, 2013.

JANES, P. W.; SAHA, N.; BARTON, W. A.; et al. Adam Meets Eph: An ADAM Substrate Recognition Module Acts as a Molecular Switch for Ephrin Cleavage In trans. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 291–304, 2005.

JANES, P. W.; SAHA, N.; BARTON, W. A.; et al. Adam Meets Eph: An ADAM Substrate Recognition Module Acts as a Molecular Switch for Ephrin Cleavage In trans. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 291–304, 2005.

KANG, T.; ZHAO, Y.-G.; PEI, D.; SUCIC, J. F.; SANG, Q.-X. A. Intracellular Activation of Human Adamalysin 19/Disintegrin and Metalloproteinase 19 by Furin Occurs via One of the Two Consecutive Recognition Sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25583–25591, 2002.

KASHIWAGI, M.; TORTORELLA, M.; NAGASE, H.; BREW, K. 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.

KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M.; NAKAMURA, Y. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 68, n. 1-2, p. 39–44, 1995.

KEGEL, L.; JAEGLE, M.; DRIEGEN, S.; et al. Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. **Development**, v. 141, n. 8, p. 1749–1756, 2014.

KIM, H. A.; PARK, W.-J.; JEONG, H.-S.; et al. Leucine-rich glioma inactivated 3 regulates adipogenesis through ADAM23. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 6, p. 914–922, 2012.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 1982.

KÄRKKÄINEN, I.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.-P. J. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes Are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 547–560, 2000.

- LAI, M.; HUIJBERS, M. G.; LANCASTER, E.; et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 776–785, 2010.
- LAMBRECHT, B. N.; VANDERKERKEN, M.; HAMMAD, H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 12, p. 745–758, 2018.
- LANCASTER, E.; BURNOR, E.; ZHANG, J.; LANCASTER, E. ADAM23 is a negative regulator of Kv1.1/Kv1.4 potassium currents. **Neuroscience Letters**, v. 704, p. 159–163, 2019.
- LEIGHTON, P. A.; MITCHELL, K. J.; GOODRICH, L. V.; et al. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 174–179, 2001.
- LIN, J.; LUO, J.; REDIES, C. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken brain. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 360–375, 2008.
- LIN, J.; YAN, X.; MARKUS, A.; et al. Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 4, p. 1246–1254, 2010.
- LOECHEL, F.; GILPIN, B. J.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U. M. Human ADAM 12 (Meltrin α) Is an Active Metalloprotease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 27, p. 16993–16997, 1998.
- LOECHEL, F.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U. M. Regulation of Human ADAM 12 Protease by the Prodomain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13427–13433, 1999.
- LORENZEN, I.; TRAD, A.; GRÖTZINGER, J. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, p. 330–336, 2011.
- LORENZEN, I.; TRAD, A.; GRÖTZINGER, J. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, p. 330–336, 2011.
- LOVERO, K. L.; FUKATA, Y.; GRANGER, A. J.; FUKATA, M.; NICOLL, R. A. The LGI1–ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 30, 2015.
- LU, D.; CHUNG, K.; XIA, M.; et al. Integrin binding characteristics of the disintegrin-like domain of ADAM-15. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 96, n. 11, p. 642–651, 2006.

- LUM, L.; BLOBEL, C. P. Evidence for Distinct Serine Protease Activities with a Potential Role in Processing the Sperm Protein Fertilin. **Developmental Biology**, v. 191, n. 1, p. 131–145, 1997.
- LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular Maturation of the Mouse Metalloprotease Disintegrin MDC15. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 26236–26247, 1998.
- MA, R.; TANG, Z.; SUN, K.; et al. Low levels of ADAM23 expression in epithelial ovarian cancer are associated with poor survival. **Pathology - Research and Practice**, v. 214, n. 8, p. 1115–1122, 2018.
- MARCELLO, E.; SARACENO, C.; MUSARDO, S.; et al. Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2523–2538, 2013.
- MARKUS, A.; YAN, X.; ROLFS, A.; LUO, J. Quantitative and dynamic expression profile of premature and active forms of the regional ADAM proteins during chicken brain development. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 16, n. 3, 2011.
- MASKOS, K.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; HUBER, R.; et al. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3408–3412, 1998.
- MAYER, G. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin α v at specialized domains of renal cell plasma membrane. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 9, p. 1763–1773, 2003.
- MCKENZIE, D.; BARTZ, J.; MIRWALD, J.; et al. Reversibility of Scrapie Inactivation Is Enhanced by Copper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25545–25547, 1998.
- MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L.; et al. Specific Sequence Elements Are Required for the Expression of Functional Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (TACE). **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30563–30570, 1999.
- MITCHELL, K. J.; PINSON, K. I.; KELLY, O. G.; et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2001.
- MOSS, M. L.; BOMAR, M.; LIU, Q.; et al. The ADAM10 Prodomain Is a Specific Inhibitor of ADAM10 Proteolytic Activity and Inhibits Cellular Shedding Events. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35712–35721, 2007.
- MOSS, M. L.; WHITE, J. M.; LAMBERT, M. H.; ANDREWS, R. C. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 8, p. 417–426, 2001.
- MU, D.; CAMBIER, S.; FJELLBIRKELAND, L.; et al. The integrin α v β 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1. **Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 3, p. 493–507, 2002.

- MURPHY, G. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases.' **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 138–145, 2009.
- MYGIND, K. J.; SCHWARZ, J.; SAHGAL, P.; IVASKA, J.; KVEIBORG, M. Loss of ADAM9 expression impairs β 1 integrin endocytosis, focal adhesion formation and cancer cell migration. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 1, 2017.
- MYGIND, K. J.; STÖRIKO, T.; FREIBERG, M. L.; et al. Sorting nexin 9 (SNX9) regulates levels of the transmembrane ADAM9 at the cell surface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 21, p. 8077–8088, 2018.
- NASLAVSKY, N.; STEIN, R.; YANAI, A.; FRIEDLANDER, G.; TARABOULOS, A. Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6324–6331, 1997.
- NASLAVSKY, N.; CAPLAN, S. The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 13, 2018.
- NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 227–235, 2004.
- OTA, M.; MOCHIZUKI, S.; SHIMODA, M.; et al. ADAM23 is downregulated in side population and suppresses lung metastasis of lung carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 107, n. 4, p. 433–443, 2016.
- OWUOR, K.; HAREL, N. Y.; ENGLLOT, D. J.; et al. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42, n. 4, p. 448–457, 2009.
- PARKYN, C. J.; VERMEULEN, E. G. M.; MOOTOOSAMY, R. C.; et al. LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 6, p. 773–783, 2008.
- PAULY, P. C.; HARRIS, D. A. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33107–33110, 1998.
- PERERA, W. S.; HOOPER, N. M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. **Current Biology**, v. 11, n. 7, p. 519–523, 2001.
- PETIT-PEDROL, M.; SELL, J.; PLANAGUMÀ, J.; et al. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. **Brain**, 2018.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 2, p. 83–87, 2000.
- PRUSINER, S. B. Nobel Lecture: Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13363–13383, 1998.

PUYRAIMOND, A.; FRIDMAN, R.; LEMESLE, M.; ARBEILLE, B.; MENASHI, S. MMP-2 Colocalizes with Caveolae on the Surface of Endothelial Cells. **Experimental Cell Research**, v. 262, n. 1, p. 28–36, 2001.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. [13] Evolutionary families of metallopeptidases. **Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases Methods in Enzymology**, p. 183–228, 1995.

REDDY, P.; SLACK, J. L.; DAVIS, R.; et al. Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14608–14614, 2000.

REISS, K.; SAFTIG, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 126–137, 2009.

REISS, K.; SAFTIG, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 126–137, 2009.

ROGHANI, M.; BECHERER, J. D.; MOSS, M. L.; et al. Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular Maturation and Catalytic Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3531–3540, 1999.

SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **International Journal of Biological Sciences**, p. 387–396, 2008.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochemical Journal**, v. 334, n. 1, p. 93–98, 1998.

SCHLOMANN, U.; WILDEBOER, D.; WEBSTER, A.; et al. The Metalloprotease Disintegrin ADAM8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48210–48219, 2002.

SCHLÖNDORFF, J.; BECHERER, J. D.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). **Biochemical Journal**, v. 347, n. 1, p. 131, 2000.

SCHLÖNDORFF, J.; BECHERER, J. D.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). **Biochemical Journal**, v. 347, n. 1, p. 131, 2000.

SCHMITT-ULMS, G.; HANSEN, K.; LIU, J.; et al. Time-controlled transcatheter perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 724–731, 2004.

SEALS, D. F. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 7–30, 2003.

SHYNG, S.L.; HUBER, M.T.; HARRIS, D.A. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **The Journal of biological chemistry** v. 268, p. 15922-15928, 1993.

Shyng, S.L., Lehmann, S., Moulder, K.L., Harris, D.A. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. **The Journal of biological chemistry** v. 270, p. 30221-30229, 1995.

SMITH, K. M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; et al. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 5, p. 893–902, 2002.

STAUTZ, D.; LEYME, A.; GRANDAL, M. V.; et al. Cell-surface Metalloprotease ADAM12 is Internalized by a Clathrin- and Grb2-dependent Mechanism. **Traffic**, v. 13, n. 11, p. 1532–1546, 2012.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; REINEMER, P.; et al. The metzincins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, n. 5, p. 823–840, 2008.

SUN, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; et al. ADAM23 Plays Multiple Roles in Neuronal Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma cells. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 7, p. 1217–1223, 2007.

SUN, Y.; DENG, K.; WANG, F.; et al. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene**, v. 325, p. 171–178, 2004.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 164–176, 2012.

TAKEDA, S. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 146–152, 2009.

TARABOULOS, A. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform [published erratum appears in J Cell Biol 1995 Jul;130(2):501]. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 1, p. 121–132, 1995.

TAYLOR, D. R. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 21, p. 5141–5153, 2005.

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

TURK, B. E.; HUANG, L. L.; PIRO, E. T.; CANTLEY, L. C. Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 661–667, 2001.

VERBISCK, N. V.; COSTA, É. T.; COSTA, F. F.; et al. ADAM23 Negatively Modulates $\alpha\beta 3$ Integrin Activation during Metastasis. **Cancer Research**, v. 69, n. 13, p. 5546–5552, 2009.

VEY, M.; PILKUHN, S.; WILLE, H.; et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 25, p. 14945–14949, 1996.

WALCHECK, B.; HERRERA, A. H.; HILL, C. S.; et al. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 4, p. 968–976, 2006.

WANG, L.; HOGGARD, J. A.; KORLESKI, E. D.; et al. Multiple non-catalytic ADAMs are novel integrin $\alpha 4$ ligands. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 442, n. 1-2, p. 29–38, 2017.

WANG, Y.; SUN, Y.; QIAO, S. ADAM23 knockdown promotes neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by up-regulating P27KIP1 expression. **Cell Biology International**, v. 36, n. 12, p. 1275–1279, 2012.

WART, H. E. V.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 14, p. 5578–5582, 1990.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 598–606, 2003.

WONG, E.; MARETZKY, T.; PELEG, Y.; BLOBEL, C. P.; SAGI, I. The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 19, p. 12135–12146, 2015.

YAMAGATA, A.; FUKAI, S. Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 2, p. 267–274, 2019.

YANG, P.; BAKER, K. A.; HAGG, T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 2, p. 73–94, 2006.

ZHANG, X.-P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific Interaction of the Recombinant Disintegrin-like Domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) with Integrin $\alpha\beta 3$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7345–7350, 1998.

ZHAO, Z.; GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J.; CHEUVRONT, T.; et al. Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin $\alpha 7\beta 1$. **Experimental Cell Research**, v. 298, n. 1, p. 28–37, 2004.

ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; FOX, J. W.; et al. Role of ADAM-9 Disintegrin-Cysteine-rich Domains in Human Keratinocyte Migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30785–30793, 2007.

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.

ANEXO 1 – ARTIGO DE PRIMEIRA AUTORIA SUBMETIDO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 2020

European Journal of Cell Biology

Endocytosis of the non-catalytic ADAM23: recycling and long half-life properties

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research paper
Keywords:	ADAM23; endocytosis; internalization; recycling endosome; early endosome; epilepsy
Corresponding Author:	Silvio Marques Zanata, Ph.D. Universidade Federal do Parana Curitiba, Paraná BRAZIL
First Author:	Ingrid L. M. Souza, MSc
Order of Authors:	Ingrid L. M. Souza, MSc Natália H. Oliveira, BSc Pierina A. M. Huamani, MSc Zaine L. M. Borgonovo, PhD Lia S. Nakao, PhD Silvio Marques Zanata, Ph.D.
Abstract:	ADAM23 (A Disintegrin And Metalloprotease 23) is a member of the ADAMs family of transmembrane proteins, mostly expressed in nervous system, and is involved in traffic and stabilization of Kv1-potassium channels, synaptic transmission, neurite outgrowth, neuronal morphology and cell adhesion. Also, ADAM23 has been linked with human pathological conditions, such as epilepsy, cancer metastasis and cardiomyopathy. ADAM23 functionality depends on the molecule presence at the cell surface and along the secretory pathway, as expected for a cell surface receptor. Because endocytosis is an important functional regulatory mechanism of plasma membrane receptors and no information is available about the traffic or turnover of non-catalytic ADAMs, we investigated ADAM23 internalization, recycling and half-life properties. Here, we show that ADAM23 undergoes constitutive internalization from the plasma membrane and is redistributed to intracellular vesicles, specially early and recycling endosomes. Furthermore, we observed that ADAM23 is recycled from intracellular compartments back to the plasma membrane and thus has a long half-life and cell surface stability. Our findings suggest that regulation of ADAM23 endocytosis/stability could be exploited therapeutically in diseases in which ADAM23 is directly involved, such as epilepsy, the progression of different cancers and cardiac hypertrophy.
Suggested Reviewers:	Koji Sagane, PhD Researcher, Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd. k-sagane@hmc.eisai.co.jp non-catalytic ADAMs specialist Frederic Checler, PhD Professor, Institut de Pharmacologie Moléculaire et cellulaire du CNRS - Université Nice-Sophia-Antipolis checler@ipmc.cnrs.fr ADAMs specialist. Santiago Cal, PhD Instituto Universitario de Oncología, IUOPA, Universidad de Oviedo, santical@uniovi.es ADAM23 specialist Eric Lancaster, PhD Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania eric.lancaster@uphs.upenn.edu ADAM23/22 cell biology specialist Jiankai Luo, PhD

Oi professor,Enviei a dissertação no siga, o senhor deve entrar no portal e validar o trabalho de conclusão.Tudo certo, dentro do possível né professor. A pandemia e o caos politico, e agora até os ciclones, estão cada dia mais intensos aqui no Paraná e no Brasil, e o pior é não poder nem protestar. O senhor está conseguindo ir para o laboratório normalmente? pelas noticias a situação parece estar próxima da normalidade na Alemanha.

Consegui fazer o IELTS e obter 7.5, nota boa o suficiente para a maioria das universidades, agora estou procurando vagas e bolsas para o Doutorado, se o senhor encontrar alguma oportunidade por aí me avise ;). Abraços para o senhor e para a professora Lia, saudades de ambos.Nat.