

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ZAINE CIBELE LYRA MENDONÇA BORGONOVO

PAPEL DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23 NA
INTERNALIZAÇÃO E
DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA PRP^C

CURITIBA
2017

ZAINE CIBELE LYRA MENDONÇA BORGONOVO

PAPEL DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23 NA
INTERNALIZAÇÃO E
DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA PRP^C

Tese 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 Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA
2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Borgonovo, Zaine Cibele Lyra Mendonça

Papel da desintegrina e metaloprotease ADAM23 na internalização e distribuição celular da proteína PrP^C. / Zaine Cibele Lyra Mendonça

Borgonovo. – Curitiba, 2018.

86 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

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

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

CDD (20. ed.) 547.75



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

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 Tese de Doutorado de **ZAINE CIBELE LYRA MENDONÇA BORGONOVO** intitulada **“PAPEL DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23 NA INTERNALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA PRPc”**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Doutora 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, 19 de março de 2018.

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)

Profa. Dra. Ana Luiza Pamplona Mosimann
ICC-Fiocruz/PR (avaliador externo)

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador externo)

Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya
ICC-Fiocruz/PR (avaliador externo)

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Universidade Federal do Paraná – UFPR (avaliador interno)



*“O conhecimento serve para encantar
as pessoas, não para humilhá-las.”*

(Mario Sérgio Cortella)

AGRADECIMENTOS

A palavra agradecer vem de “grato”, do Latim GRATUS, que quer dizer “agradecido”. Não podia ser diferente diante da construção de um trabalho dessa imensidão. Muito aprendizado ao longo dos anos que se passaram. Muita troca de experiências. Não falo só em relação a pessoas, mas também a reflexões comigo mesma!

Falando em pessoas, não posso deixar de mencionar a primeira delas que me proporcionou concretizar essa pesquisa, meu orientador Professor Dr. Silvio Marques Zanata. À quem me iniciou nesse mundo do estudo das proteínas e do western blotting, o meu muito obrigada!

As professoras Dra. Lia Sumie Nakao e Dra. Adriana Mercadante pela disponibilidade e consultas científicas.

Ao Centro do Microscopia Confocal da UFPR, o técnico Israel, o doutorando Gustavo e o Prof. Dr. Edvaldo Trindade pelas consultas científicas e disponibilidade.

Aos colegas de laboratório de forma geral. Mas em especial àqueles que participaram lado a lado comigo nas discussões de bancada (Luiz – meu iniciante de experimentos; Larissa – minha parceira de western blotting e produção de ferramentas; Carol – minha consultora de experimentos e Ingrid – minha parceira de experimentos).

Preciso mencionar a Ingrid mais uma vez pelo seu apoio incondicional a mim e a finalização do meu trabalho!

Agora entrando no âmbito pessoal.

Tenho muito que agradecer aos meus pais (Veronica e Vicente) que sempre acreditaram em mim e fizeram com que eu não desistisse mediante as barreiras que encontrei pelo caminho!

As minhas irmãs, Zaíra e Zabele, pelo exemplo diário que cada uma me mostra dia após dia!

Ao meu esposo (Luciano) pela paciência, disponibilidade, e por acreditar que eu seria capaz de concretizar esse trabalho!

A minha sogra (Rosa Inês) pela seu apoio e disponibilidade em estar ao meu lado quando foi necessário!

A minha avó materna (Maria Rita) e meu avô paterno (Valdeci) *in memoriam* pelo amor e apoio incondicional a minha educação!

E por fim a agências de fomento à pesquisa no Brasil (CAPES e CNPq) que financiaram essa pesquisa!

RESUMO

ADAM23 é uma proteína cujo papel biológico não está completamente elucidado. Sabe-se que animais nocautes para esta molécula desenvolvem problemas neurológicos como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas, o que sugere seu papel fundamental no desenvolvimento do SNC. No entanto, os mecanismos pelos quais ela atua ainda permanecem obscuros. Informações sobre os ligantes celulares de ADAM23 podem ser importantes para que se possa entender seu papel fisiológico. Recentemente, caracterizamos sua interação *in vitro* com a proteína prion celular (PrP^c), entretanto a função biológica desta interação precisa ser melhor compreendida. Dados preliminares do nosso grupo sugerem que a co-expressão de ADAM23 e PrP^c em células HEK293T leva a uma redistribuição das duas proteínas na membrana plasmática. Nestas condições ADAM23 tornar-se uma molécula parcialmente residente de *lipid rafts* e PrP^c sai parcialmente destes microdomínios. Sendo assim, analisamos o papel de ADAM23 na internalização e distribuição celular da proteína prion celular. Resultados da presente pesquisa mostram que no encéfalo de camundongos, em culturas primárias de neurônios e na linhagem de neuroblastoma murino (Neuro-2a) a proteína ADAM23 encontra-se dentro dos *lipid rafts*. A PrP^c já foi descrita como aí residente, sugerindo que a interação entre essas moléculas possa ocorrer dentro desses microdomínios. Diante disso resolveu-se analisar a cinética de endocitose dessas proteínas frente ao agente externo, o íon Cu²⁺. Nossos resultados mostraram que ambas proteínas são encontradas em menor quantidade na superfície celular quando tratadas com esse íon sugerindo que ADAM23 e PrP^c foram internalizados. Sendo assim, foi avaliado como ocorria o trânsito das mesmas na membrana plasmática, bem como, o caminho que percorriam depois de serem endocitadas. Observamos que tanto PrP^c quanto ADAM23 saem dos microdomínios *lipid rafts* mediante o tratamento com o cobre, evidenciando uma potencial via de endocitose destas moléculas via vesículas de clatrina. E após esse deslocamento a molécula de ADAM23 segue para vias de endossomos de reciclagem. Já o PrP^c não foi encontrado nessas vesículas. Esses dados sugerem que ambas seguem caminhos distintos dentro da célula após a internalização. Contudo, nossos resultados trazem alguns achados inéditos. Primeiro que a proteína ADAM23 é residente de *lipid rafts*; depois é internalizada pelo íon Cu²⁺ e, por fim, segue a via endocítica de reciclagem de volta a superfície celular. O somatório desses dados abrem novos caminhos para a elucidação do papel biológico de ADAM23. E mostra que ela pode estar envolvida no processo do trânsito celular de PrP^c na membrana plasmática.

Palavras-chave: ADAM23, PrP^c, *lipid rafts*, endocitose.

ABSTRACT

ADAM23 is a protein whose biological role is not completely elucidated. It is known that knockout animals for this molecule develop neurological problems such as tremor and ataxia shortly after birth and survive at most two weeks, suggesting its key role in the CNS development. However, the mechanisms by which they are taken up by the cells still remain obscure. Information about ADAM23 cell binders may be important to understand its physiological role. Recently, we characterized its interaction in vitro with a cellular prion protein (PrP^c), although a biological function of this interaction needs to be further elucidated. Preliminary data from our group suggest that co-expression of ADAM23 and PrP^c in HEK293T cells leads to a redistribution of both proteins in the plasma membrane. Under these conditions ADAM23 becomes a partially resident molecule of lipid rafts and PrP^c leaves partitions of these microdomains. Thus, one aim of this work was to analyze ADAM23 role in the internalization and cellular distribution of the cellular prion protein. Further results of the present study in mice brain, in primary cultures of neurons and in the murine neuroblastoma lineage (Neuro-2a), show that ADAM23 protein lies within the lipid rafts. PrP^c has already been described as a lipid rafts resident, suggesting that the interaction between these molecules may occur within these microdomains. Therefore, the major aim of the present study was to analyze the kinetics of endocytosis of both proteins submitted or not to the treatment with the external agent, the Cu²⁺ ion. The present results showed that both proteins were found in less quantity on cell surface when treated with this ion suggesting that ADAM23 and PrP^c were internalized. Thus, it was evaluated how the transit of these proteins occurred in the plasma membrane, as well as, the pathway they followed after being endocytosed. We observed that both PrP^c and ADAM23 leave the lipid rafts microdomains by treatment with copper, evidencing a potential clathrin-dependent endocytic pathway of these molecules. After this displacement, the molecule of ADAM23 is directed to recycling endosomes pathway. PrP^c was not found in these vesicles. These data suggest that both follow distinct pathways within the cell after internalization. However, our results bring some unpublished findings. First, ADAM23 protein is a resident of lipid rafts; then it is internalized by the Cu²⁺ ion, follows the endocytic path and finally is recycled back to cell surface. The sum of these data opens new avenues for the elucidation of the biological role of ADAM23. This work also presents that ADAM23 may be involved in PrP^c transit in plasma membrane and within the cell.

Key words: ADAM23, PrP^c, lipid rafts, endocytosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS ADAMS.....	19
FIGURA 2 – COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS ADAMS	20
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS METALOPROTEASE E DESINTEGRINA DA ADAM23 E OUTRAS ADAMS HUMANAS	21
FIGURA 4 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DE PRP ^C HUMANO ..	26
FIGURA 5 – TIPOS DE CLIVAGEM QUE OCORREM A MOLÉCULA DE PRP ^C	27
FIGURA 6 – MECANISMOS DE INTERNALIZAÇÃO DE PRP ^C	30
FIGURA 7 – ENDOCITOSE DE PRP ^C VIA CLATRINA-DEPENDENTE MEDIADA PELA LIGAÇÃO AO ÍON COBRE	32
FIGURA 9 – DIAGRAMA DOS <i>LIPID RAFTS</i> PLANARES E CAVEOLARES.....	35
FIGURA 10 – FUNÇÕES DOS <i>LIPID RAFTS</i>	36
FIGURA 11 - CULTURA PRIMÁRIA NEURÔNIOS DO CÓRTEX E CEREBELO	38
FIGURA 12 - ESQUEMA DA PURIFICAÇÃO DOS MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i>	41
FIGURA 13 - VISUALIZAÇÃO DO ÍON CU ²⁺ NAS FRAÇÕES NÃO- <i>RAFTS</i>	43
FIGURA 14 - ADAM 23 MADURA IMATURA EXPRESSA NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LINHAGENS NEURONAIS.....	47
FIGURA 15 - A FORMA DE 70 kDA ADAM23 É PARCIALMENTE RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i> EM ENCÉFALO DE CAMUNDONGO ..	49
FIGURA 16 - A FORMA DE 70 kDA ADAM23 É PARCIALMENTE RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i> EM CEREBELO DE CAMUNDONGO..	50
FIGURA 17 - ADAM23 É ENCONTRADA DENTRO DOS <i>LIPID RAFTS</i> EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX E DO HIPOCAMPO E CÉLULAS GRANULARES CEREBELARES	51
FIGURA 18 - ADAM23 É ENCONTRADA DENTRO DOS <i>LIPID RAFTS</i> EM CULTURA DE CÉLULAS NEURO-2a	52
FIGURA 19 - A PROTEÍNA ADAM23 É RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i> EM ENCÉFALO DE CAMUNDONGO NOCAUTE (KO) PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR (PRP ^C).....	53
FIGURA 20 - ADAM23 RECOMBINANTE PROMOVE A INTERNALIZAÇÃO DE PRP ^C EM CÉLULAS NEURO-2a	55
FIGURA 21 - CAPTURA DA EXPRESSÃO DE GFP-PRPC POR 30 MIN.....	56
FIGURA 22 - ENDOCITOSE DE PRP ^C MEDIADA POR ÍONS CU ²⁺ EM CÉLULAS NEURO-2a	57
FIGURA 23 - ENDOCITOSE DE PRP ^C MEDIADA POR ADAM23.....	58
FIGURA 24 - ENDOCITOSE DE PRP ^C MEDIADA POR ADAM23 APÓS TRATAMENTO COM CU ²⁺	59
FIGURA 25 - A ENDOCITOSE DA PROTEÍNA ADAM23 É TAMBÉM MEDIADA PELO ÍON COBRE.....	60
FIGURA 26 - A PROTEÍNA PRION CELULAR É DESLOCADA PARA FORA DOS MICRODOMÍNIOS <i>LIPID RAFTS</i> PELA AÇÃO DO ÍON COBRE	61
FIGURA 27 - AS PROTEÍNAS ADAM23 E PRP ^C TRANSITAM PARA FORA DOS MICRODOMÍNIOS <i>LIPID RAFTS</i> MEDIANTE A AÇÃO DO ÍON COBRE	62

FIGURA 28 –ADAM23 ENTRA NA VIA DE RECICLAGEM NÃO MEDIANTE O TRATAMENTO COM ÍON COBRE	64
FIGURA 29 – ALTERAÇÕES NO PROCESSAMENTO DE ADAM23 E ACÚMULO DE PRP ^C PELA AÇÃO DO ÍON COBRE.....	65
FIGURA 30 – ALTERAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ADAM23 MEDIANTE A AÇÃO DO ÍON COBRE E NA AUSÊNCIA DA PRP ^C	66
FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRÂNSITO CELULAR DE ADAM23 E PRP ^C	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha\beta 3$	–	Integrina de subunidade αv e subunidade $\beta 3$
aa	–	aminoácido
ADAM	–	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
BSA	–	<i>bovine serum albumin</i> - albumina sérica bovina
CHO	–	<i>chinese hamster ovary cell</i> - Célula de ovário de hamster chinês
conA		Concanavalina A sepharose
Da	–	Dalton
DL11C8	–	Sobrenadante de hibridoma DL11C8 contendo anticorpo anti-ADAM23
DMEM	–	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	–	ácido etilenodiamino tetra-acético
E18	–	Cultura primária de neurônios com 18 dias de vida intra-uterina
GFP	–	<i>green fluorescent protein</i> – proteína verde fluorescente
GPI	–	glicosilfosfatidilinositol
G418	–	Antibiótico geneticina
HA	–	Hemaglutinina
HeLa	–	<i>Henrietta Lacks Cell</i> - células de câncer cervical
HEPES	–	N-[2-hidroxietil]piperazina-N´-[2-etanosulfonato]]
HRP	–	<i>horseradish peroxidase</i> – Enzima peroxidase de raiz de rábano silvestre
IgG	–	Imunoglobulina do tipo G
LGI1	–	<i>Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 1</i>
mAb		Anticorpo Monoclonal
MEM	–	Meio Mínimo Essencial
μg	–	Micrograma
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	–	Micrograma por microlitro
min	–	Minuto
MW	–	<i>Molecular Weight</i> - Peso Molecular
PBS	–	Solução salina tamponada com fosfato
PC	–	Enzima pró-proteína convertase
P7	–	Cultura primária de neurônios 7 dias após o nascimento

P19	–	Linhagem celular de carcinoma embrionário pluripotente
PI	–	Fosfatidilinositol
PrP ^C	–	Proteína príon celular
PrP ^{SC}	–	Proteína príon <i>scrapie</i>
RGD	–	Sequência de aminoácidos arginina, glicina, asparagina
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SFB	–	Soro fetal bovino
SNC	–	Sistema nervoso central
TACE	–	Enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também conhecida como ADAM-17, do inglês, TNF- α Converting Enzyme

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A DESINTEGRINA E METALOPROTEASE 23 (ADAM23)	19
2.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PRP ^C)	26
2.3 MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE MEMBRANA (<i>LIPID RAFTS</i>)	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 CULTIVO CELULAR.....	37
3.2 EXTRATOS CELULARES	38
3.3 EXTRATOS DE TECIDO NERVOSO DE CAMUNDONGO	39
3.4 ENRIQUECIMENTO DE EXTRATOS CELULARES EM GLICOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À CONCAVALINA A SEPHAROSE	39
3.5 MARCAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR COM BIOTINA EZ-LINK.....	40
3.6 PREPARAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA RICOS EM COLESTEROL E GLICOESFINGOLÍPÍDEOS (<i>LIPID RAFTS</i>).....	40
3.7 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DO METANOL- CLOROFÓRMIO.....	41
3.8 INTERNALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIADA PELO ÍON COBRE (Cu ²⁺) ..	42
3.8.1 ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE A PURIFICAÇÃO DOS <i>LIPID</i> <i>RAFTS</i>	42
3.8.2 ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR.....	43
3.8.3 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR MICROSCOPIA CONFOCAL <i>IN VIVO</i>	44
3.8.4 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR IMUNOFLORESCÊNCIA	44
4 RESULTADOS	46
4.1 PERFIL DE EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO NA SUPERFÍCIE CELULAR DE ADAM23 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.....	46
4.2 LOCALIZAÇÃO DE ADAM23 NOS MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS <i>LIPID</i> <i>RAFTS</i>	48
4.3 PRESENÇA DE ADAM23 NOS <i>LIPID RAFTS</i> E A POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM PRP ^C	53
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO ENTRE A INTERAÇÃO DE ADAM23 E PRP ^C	54
4.4.1 PROCESSO DE ENDOCITOSE MEDIADO PELO ÍON COBRE (Cu ²⁺) ...	54

4.4.2 PROCESSO DE ENDOCITOSE DE ADAM23 E PRP ^C E O TRÂNSITO NOS <i>LIPIDS RAFTS</i>	60
4.4.3 PROCESSO DE ENDOCITOSE DE ADAM23 E PRP ^C E VIAS DE RECICLAGEM	63
5 DISCUSSÃO	67
5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ADAM23 E SUA LOCALIZAÇÃO NOS <i>LIPID RAFTS</i>	67
5.2 PAPEL BIOLÓGICO PARA INTERAÇÃO ENTRE ADAM23 E PRP ^C	70
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) é uma família de proteínas transmembranas envolvidas em uma variedade de funções biológicas tais como: fertilização (interações espermatozoide-óvulo), liberação de fatores de crescimento e citocinas (diferenciação celular, migração celular, crescimento axonal, desenvolvimento muscular e imunidade). Além dos papéis fisiológicos, as ADAMs também estão envolvidas em patologias, como câncer, doenças neurológicas e cardíacas, asma, infecção e inflamação (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008; MURPHY, 2009; GIEBELER & ZIGRINO, 2016; MARKUS-KOCH *et al.*, 2017).

No sistema nervoso muitos membros da família ADAM parecem ter papéis importantes no desenvolvimento, regulando proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de vários tipos celulares, bem como a regulação do crescimento axonal e mielinização (YANG *et al.*, 2006).

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

ADAM23 é um membro da família ADAM, o qual é predominantemente expresso no sistema nervoso central durante o desenvolvimento e sua expressão permanece até na fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Foi constatado que a mesma proteína possui um papel importante na diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrionário) e na neuritogênese, o que sugere uma participação tanto em eventos iniciais quanto tardios da diferenciação neuronal (SUN *et al.*, 2007).

Outro ponto que reforça a sua grande importância no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central é o fato de que camundongos deficientes para a proteína ADAM23 desenvolvem tremores e ataxia não sobrevivendo mais do que duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001).

Embora o papel biológico de ADAM23 ainda não seja completamente conhecido, é possível que esta proteína atue como molécula de adesão, por meio do seu domínio

desintegrina, já que seu domínio metaloprotease é considerado inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

Um dos primeiros relatos em que ADAM23 estaria atuando em processos de adesão foi apresentado por (CAL *et al.*, 2000) em que essa proteína interage *in vitro* com a integrina $\alpha\beta 3$ e promove a adesão de neuroblastomas humanos (NB100 e SH-Sy5y) por meio do seu domínio desintegrina.

Contudo, mais tarde outro trabalho mostrou que ADAM23 atua na modulação negativa da integrina $\alpha\beta 3$. Células MDA-MB 435 (linhagem tumoral de mama) tiveram a expressão de ADAM23 bloqueada e, desta forma, apresentaram uma aumento na ativação da integrina $\alpha\beta 3$. Esse processo resultou num maior potencial adesivo e migratório destas células na presença de vitronectina e fibronectina (VERBISCK *et al.*, 2009).

A compreensão da função da ADAM23 faz-se necessária diante a sua importância biológica. E uma forma de desvendar esse papel é encontrar parceiros moleculares para essa proteína. Como já foi reportado por diversos autores a proteína ADAM23 é altamente expressa no sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2001; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2004; GHILARDI *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009) e encontrar moléculas que interajam com a mesma nesse ambiente torna-se mais propício.

Nesse contexto é que resolveu-se investigar uma possível interação de ADAM23 com outra proteína encontrada em abundância no SNC, a proteína príon celular (PrP^c) (PRUSINER, 1998; CHEN *et al.*, 2003; LINDEN *et al.*, 2008).

Dados reportados por (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004) demonstraram por espectrometria de massa que muitas proteínas envolvidas na adesão celular e em neuritogênese estão presentes nas mesmas regiões especializadas de membrana nas quais PrP^c é expresso. Inclusive nesse estudo foi apresentada a ADAM23 como uma das proteínas presentes no cérebro de camundongos listadas como possível parceira de PrP^c.

De fato nosso grupo caracterizou a interação *in vitro* entre ADAM23 e a proteína príon celular, contudo a função biológica desta interação ainda não está esclarecida. Essa interação direta foi elucidada por meio de ensaios de pull-down (empregando preparações de encéfalo e células HEK293T super expressando ADAM23 e PrP^c), binding (proteínas recombinantes 6His-PrP^c e GST-ADAM23-Desintegrina) e co-

localização em microscopia confocal em neuroblastomas (Neuro-2a e ShSy5y) e cultura primária de neurônios (COSTA *et al.*, 2009).

A proteína príon celular (PrP^c) é uma sialoglicoproteína amplamente expressa no sistema nervoso central e está envolvida numa série de doenças neurodegenerativas (PRUSINER, 1998). É encontrada em microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicosíngolipídeos, denominados *lipid rafts* ou também conhecidos como regiões de membrana resistentes à determinados detergentes (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1997; TAYLOR & HOOPER, 2007). Embora PrP^c seja uma molécula encontrada em *lipid rafts* e, estes microdomínios não se apresentam recobertos por clatrina, muitos trabalhos têm demonstrado que a principal via endocítica de PrP^c é mediada por esse tipo de vesículas (SHYNG *et al.*, 1995; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005).

Dados preliminares do nosso grupo sugerem que a co-expressão de ADAM23 e PrP^c em células HEK293T leva a uma redistribuição das duas proteínas na membrana plasmática (Michele D. M. Costa e Silvio M. Zanata, dados não publicados). Nestas condições ADAM23 tornar-se uma molécula parcialmente residente em frações de *lipid rafts* e PrP^c sai em parte deste domínios. Com base nesse resultado levantamos a hipótese de que ADAM23 poderia estar envolvida no processo de endocitose de PrP^c mediado por vesículas revestidas de clatrina, já que está promovendo a retirada da proteína destes microdomínios específicos.

O mecanismo referente a endocitose de PrP^c é bastante estudado. Um dos mecanismos descritos é derivado da ligação ao íon Cu²⁺ na molécula, mais precisamente 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 (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2008).

Mesmo com a movimentação necessária de PrP^c para fora dos *rafts* onde residem as proteínas clatrinadas, ainda faltava um elemento chave para promover sua endocitose - receptores e/ou alguma proteína transmembrana que pudessem conectá-lo ao espaço intracelular- já que PrP^c trata-se de uma proteína ancorada a membrana por GPI. A proteína LRP1 já foi descrita executando esse papel, contudo a busca por outros parceiros moleculares se faz necessária para uma melhor compreensão desse mecanismo.

Nesse sentido o presente trabalho investigou se a distribuição de PrP^c na membrana plasmática sofre a influência de ADAM23, avaliando se a localização diferencial dessas duas proteínas (dentro ou fora dos *lipid rafts*) está diretamente relacionada ao processo de endocitose de PrP^c.

Foi possível investigar também qual a via de internalização de PrP^c a proteína ADAM23 estaria envolvida. Já que o trânsito da proteína príon celular (deslocamento na membrana) pode estar relacionado ao seu mecanismo endocítico.

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o papel da desintegrina e metaloprotease ADAM23 na internalização da proteína PrP^c, bem como o trânsito de ambas proteínas em domínios especializados de membrana (*lipid rafts* e endossomos).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analisar o perfil de expressão total da ADAM23 endógena e sua apresentação na superfície celular de neuroblastomas: Neuro-2a (Neuroblastoma murino), SH-SY5Y, CHLA-20 (Neuroblastomas humanos), na linhagem CF-10 (célula nervosa derivada de animal nocaute para PrP^c) e na linhagem CHO-K1 (ovário de hamster);
- II. Caracterizar a distribuição de ADAM23 e PrP^c por ultracentrifugação diferencial *in vivo*, empregando extratos de encéfalos de camundongos WT (selvagem) e KO (nocaute) para PrP^c;
- III. Caracterizar a distribuição endógena de ADAM23 e PrP^c por ultracentrifugação diferencial em culturas primárias de neurônios do córtex, hipocampo e cerebelo de camundongos e na linhagem celular Neuro-2a;
- IV. Analisar a cinética de internalização de PrP^c e ADAM23 mediada por íons Cu²⁺ na linhagem Neuro-2a.
- V. Avaliar o efeito do íon Cu²⁺ na expressão global e no processamento das proteínas PrP^c e ADAM23 na linhagem Neuro-2a e CF-10.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DESINTEGRINA E METALOPROTEASE 23 (ADAM23)

ADAMs são proteínas transmembranas do tipo I que possuem aproximadamente 750 aminoácidos em sua estrutura. Essa nomenclatura é devida aos domínios estruturais chave dessas proteínas: desintegrina e metaloprotease (A Disintegrin And Metalloprotease domain). Sendo também denominadas como MDC (Metalloprotease/Disintegrin/Cystein-rich protein). Seus multidomínios são descritos como: pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, domínio rico em cisteína, domínio semelhante a fator de crescimento epidermal (EGF-like), região transmembrana e cauda citoplasmática (PRIMAKOFF & MYLES, 2000; SEALS & COURTNEIDGE, 2003; GIEBELER & ZIGRINO, 2016) (Figura 1).

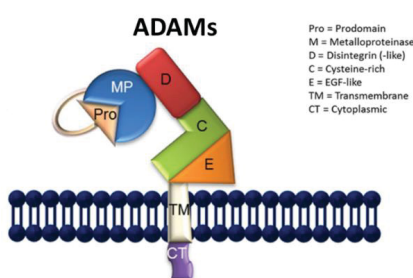


FIGURA 1- ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS ADAMs – Representação dos domínios encontrados nas proteínas da família ADAM: a parte extracelular contém um pró-domínio N-terminal, seguido pelo domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, a região rica em cisteína e um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF). Seguido do domínio transmembrana e da cauda citoplasmática na região C-terminal.

FONTE: Adaptado de GIEBELER & ZIGRINO, 2016.

As proteínas ADAMs possuem uma sequência sinal na região N-terminal que as direciona para a via de secreção. Elas são, portanto, sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi. As ADAMs são ativadas num processo dependente de protease tipo furina (proteínas pró-convertases), o qual consiste na clivagem e remoção do pró-domínio. Processo esse que pode ocorrer durante a passagem das proteases desde o Golgi até a membrana, ativando o domínio metaloprotease. Contudo, além de manter a latência da atividade metaloprotease, o pró-domínio possui outras funções. Ele pode atuar como chaperona no dobramento correto das ADAMs e, também, protegê-las da degradação que pode ocorrer na via secretória (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; NOVAK, 2004; MILLA *et al.*, 2006). A

ADAM23 contém uma sequência RRKR de reconhecimento para proteínas pró-convertases (PCs) entre seu pró-domínio e domínio metaloprotease apresentando uma forma imatura da proteína com 100 kDa e uma madura de 70 kDa, na qual o pró-domínio está ausente (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

As ADAMs são membros da superfamília Metzincina que está dentro do grupo das metaloproteases dependente de zinco. Essas proteínas apresentam uma região comum no domínio metaloprotease - a sequência consenso HEXXHXXGXXHD no sítio catalítico. O processo de ativação nesse local se dá mediante a ligação das três histidinas ao zinco, a segunda glicina permitindo um giro, e o ácido glutâmico atuando como base catalítica (GOMIS-RUTH, 2003). São proteínas de superfície celular e possuem um domínio desintegrina em sua conformação (WHITE, 2003). Esse, por sua vez, é derivado das desintegrinas de veneno de serpentes (DVS), sendo denominado de domínio desintegrina-*like*. Nas 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, apenas a ADAM15 humana foi identificada até o momento possuindo esse motivo (ZHANG *et al.*, 1998; WHITE, 2003; LU *et al.*, 2006). Inúmeros estudos demonstram que o domínio desintegrina-*like* das ADAMs é capaz de promover a adesão e migração pela ligação com integrinas (CAL *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2000; ETO *et al.*, 2002; BAX *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; ZIGRINO *et al.*, 2007) (Figura 2).

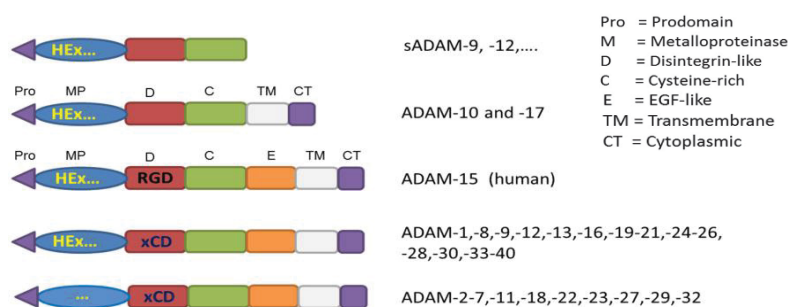


FIGURA 2 – COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS ADAMs – Domínios de metaloprotease com a sequência de consenso HEx (HEXGHXXGXXHD) para proteínas com atividade proteolítica. Domínios desintegrina: somente a ADAM-15 humana contém uma sequência de aminoácidos RGD, todas as outras ADAMs contém um motivo de ligação de consenso conservado xCD em seus domínios desintegrina-*like*.

Fonte: GIEBELER & ZIGRINO, 2016.

A ADAM23 apresenta estrutura típica dos membros da família, no entanto, não possui no seu domínio metaloprotease os três resíduos de histidina nem o resíduo do ácido glutâmico que formam o sítio ativo para a ligação de zinco, o qual é crítico para a atividade proteolítica, sugerindo que o domínio metaloprotease nessa ADAM possa ter um papel no dobramento e/ou nas interações com outras proteínas (RAWLINGS & BARRETT, 1995; SAGANE *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2008) (Figura 3).

O domínio desintegrina-*like* da ADAM23 foi caracterizado por promover adesão celular mediada pela integrina $\alpha\beta3$. O sítio desta interação específica é independente do motivo RGD, tendo como responsável por essa ligação a sequência de aminoácidos (AVNECDIT) na alça da desintegrina. A referida pesquisa revelou uma maior adesão quando neuroblastomas NB100 e SHSY-5Y, foram semeados sobre poços recobertos com ADAM23 recombinante. Sendo essa adesão bloqueada quando utilizado um anticorpo monoclonal anti- $\alpha\beta3$ (CAL *et al.*, 2000).

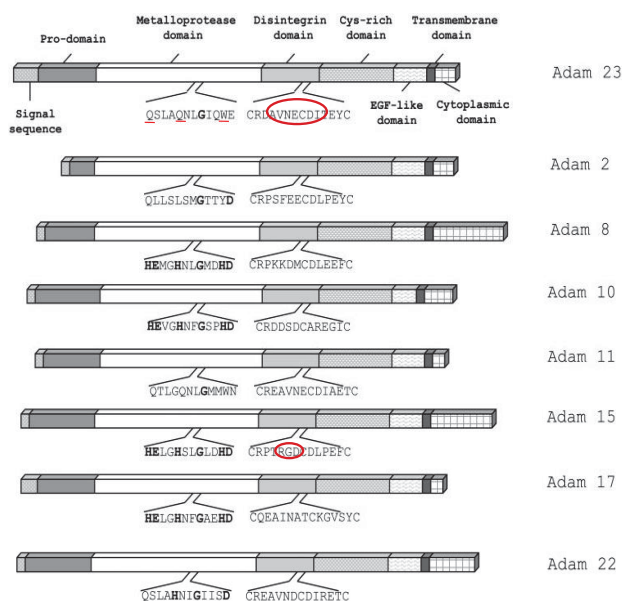


FIGURA 3 – COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS METALOPROTEASE E DESINTEGRINA DA ADAM23 E OUTRAS ADAMS HUMANAS - A sequência aminoacídica do domínio metaloprotease da ADAM23 difere das outras ADAMs que possuem a sequência consenso (HEXXHXXGXXH). As duas primeiras histidinas são substituídas pela glutamina e a última pelo triptófano; já o ácido glutâmico é substituído por uma serina. Essas diferenças aminoacídicas torna esse domínio sem atividade proteolítica. Em destaque a sequência (AVNECDIT) no domínio que se liga à integrina e o domínio RGD da ADAM15 de ligação às integrinas.
 FONTE: Adaptado de CAL *et al.*, 2000.

Já durante a progressão metastática foi verificado que ADAM23 atua modulando negativamente a integrina $\alpha\beta3$. Células da linhagem tumoral de mama MDA-MB 435 que tiveram o bloqueio da expressão de ADAM23 (knockdown) apresentaram uma maior ativação de $\alpha\beta3$ com o consequente aumento na migração e na adesão destas células na presença de vitronectina e fibronectina (VERBISCK *et al.*, 2009).

Recentemente o mesmo domínio desintegrina-*like* da ADAM23 foi caracterizado como ligante das integrinas $\alpha4\beta1$ e $\alpha4\beta7$, promovendo adesão de linfócitos T e B humanos. Essas células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do constructo recombinante (Des-Fc) da referida proteína, sendo observada uma interação dose-dependente. E mediante o bloqueio das integrinas com anticorpos monoclonais houve inibição da adesão (WANG *et al.*, 2017).

O domínio rico em cisteína das ADAMs foi descrito de forma geral como tendo propriedade adesiva, promovendo a fusão de membranas celulares (WOLFSBERG *et al.*, 1995). Mais tarde foi descoberta que a função específica deste domínio é ligar-se a molécula de adesão celular syndecan. Família de proteínas transmembranas capazes de carregar cadeias de heparan sulfato (HS - *heparan sulfate*) (IBA *et al.*, 2000).

As proteínas ADAMs possuem caudas citoplasmáticas incomuns, ricas em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina, variando de tamanho e sequência. Apresentam desde 11 até 231 resíduos, como é o caso das ADAMs 11 e 19 respectivamente (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). No geral possuem um ou mais motivos ricos em prolina (PXXP) atuando como sítios de ligação à proteínas de sinalização por meio do domínio SH3. Também podem apresentar resíduos de serina-treonina e/ou tirosina, nesse caso, atuando como sítio de ligação à proteínas que possuem o domínio SH2 (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS *et al.*, 2008). Esses domínios citoplasmáticos podem atuar em eventos de regulação proteolítica e sinalização celular. (YANG *et al.*, 2006). As modificações na cauda citoplasmática de uma ADAM poderiam afetar sua estabilidade, expressão e localização na superfície celular, associação com outras proteínas, bem como, sua habilidade em clivar substratos (WHITE, 2003).

A ADAM23 dentre os membros desta família destaca-se por uma ampla expressão no sistema nervoso, particularmente nos neurônios e células de Schwann do sistema

nervoso periférico. Ela é expressa tanto no encéfalo fetal nos estágios iniciais de desenvolvimento, bem como, mantém-se presente até a fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009; DHAUNCHAK *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2011; KEGEL *et al.*, 2014).

Mais especificamente os grupos de pesquisa demonstraram uma forte expressão de ADAM23 no estriado do encéfalo de camundongo (LEIGHTON *et al.*, 2001), em células Purkinje no cerebelo e gânglios basais de camundongo (MITCHELL *et al.*, 2001), em células piramidais do hipocampo (regiões CA1/CA3), no córtex cerebral e giros denteados do hipocampo. No cerebelo foi observada sua expressão também em células granulares cerebelares (GOLDSMITH *et al.*, 2004; OWUOR *et al.*, 2009). Mais tarde o grupo de (LIN *et al.*, 2008) revelaram os padrões de expressão de ADAM23 no encéfalo em desenvolvimento de galinha, sendo essa expressa em regiões restritas do neuroepitélio, substância cinzenta, glândula pineal e o plexo coroide. O mesmo grupo também demonstrou anos depois que a ADAM23 está presente em neurônios motores da medula espinhal e neurônios sensoriais da raiz de gânglios dorsais (LIN *et al.*, 2010). E, por fim, o grupo de (MARKUS *et al.*, 2011) apresentou a expressão de ADAM23 em diferentes regiões do encéfalo e cerebelo durante estágios de desenvolvimento de galinha.

Essa vasta expressão reflete um alto grau de importância desta proteína no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central. Tanto que sua ausência causa tremores severos e ataxia em camundongos homocigotos (nocautes para o gene *Adam23*). Esse genótipo os torna animais inviáveis que morrem duas semanas após o nascimento (LEIGHTON *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2001; OWUOR *et al.*, 2009).

A importância da proteína ADAM23 está ligada a distintos processos. Foi descrito que ela atua na diferenciação de células P19 (linhagem multipotente de carcinoma embrionário de camundongo que se diferenciam em neurônios-*like* quando induzidas por ácido retinóico), apresentando uma distribuição polarizada na parte proximal dessas durante a formação dos neuritos. Esse perfil de localização pode caracterizar o seu papel no envolvimento do destino celular (SUN *et al.*, 2007). Mais tarde um estudo com essa mesma linhagem celular (P19) mostrou que a ausência de ADAM23 nessa célula (*knockdown*) faz com que a mesma permaneça na fase G1 do ciclo celular, ou seja, contribui com sua diferenciação neuronal. E quando essas células

são induzidas a diferenciar-se pelo ácido retinóico os níveis de expressão da proteína ADAM23 estão reduzidos (WANG *et al.*, 2012).

A atuação de ADAM23 se dá mediante a ação conjunta com outras proteínas, por exemplo: a proteína LGI1 (*Leucine-rich glioma inactivated 1*) foi caracterizada por sua forte interação com ADAM23 e, em menor grau, com a LGI4 (SAGANE *et al.*, 2008). Recentemente descreveram a proteína LGI3 também como um dos seus ligantes (KIM *et al.*, 2012). Owuor e colaboradores (2009) demonstraram que ADAM23 é receptor para a molécula LGI1. Eles observaram que os mecanismos: crescimento de neuritos e de arborização dendrítica, em cultura primária de neurônios, estão aumentados quando mediados por LGI1 na presença de ADAM23. Já que na sua ausência (animais nocautes para o gene *Adam23*) esses mecanismos foram significativamente reduzidos. A função específica da proteína LGI1 ainda permanece sendo investigada e recentemente foi descrita como molécula atuante na manutenção da excitabilidade fisiológica do cérebro (FUKATA *et al.*, 2017). Já Kim e colaboradores (2012) identificaram que a diferenciação de adipócitos pode ser mediada pela ligação de ADAM23 a LGI3. Visto que nas células 3T3-L1 (fibroblastos que se diferenciam em adipócitos) a expressão das duas proteínas decresceu durante o avanço da diferenciação e a adipogênese apresentou-se aumentada quando foram feitos os *knockdowns* das referidas proteínas. Estudos acerca do papel biológico da LGI3 tem descrito que a mesma atua como molécula envolvida em processos dentro das sinapses neuronais, crescimento de neuritos e diferenciação neuronal (PARK *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2010).

O gene da ADAM23 foi encontrado sendo expresso na diferenciação de células tronco mesenquimais (medula óssea humana) em condrócitos, num processo denominado condrogênese. Um aumento significativo de sua expressão foi observado nos estágios tardios da diferenciação (após 21 dias). Infere-se, com esse achado que a proteína ADAM23 pode estar envolvida na modulação desse mecanismo a partir da comunicação dessas células com componentes da matriz extracelular (DJOUAD *et al.*, 2007).

As pesquisas sugerem que a ADAM23 possa estar envolvida não apenas em processos fisiológicos mas em patologias como o câncer. Foram encontradas evidências para uma regulação epigenética negativa (hipermetilação do promotor) do gene *Adam23* estando sua expressão reduzida em alguns tipos de câncer: mama

(COSTA *et al.*, 2004; VERBISCK *et al.*, 2009; FRIDRICOVA *et al.*, 2015), pâncreas (HAGIHARA *et al.*, 2004), glioma (COSTA *et al.*, 2005), gástrico (TAKADA *et al.*, 2005), cabeça e pescoço (CALMON *et al.*, 2007), colorretal (CHOI *et al.*, 2009) e pulmão (HU *et al.*, 2011).

Estudos revelam que a proteína ADAM23 mesmo estando ausente nas células tumorais (carcinomas de ovário e rim), está altamente expressa em células endoteliais provenientes destes tecidos neoplásicos quando comparadas as células endoteliais normais. Esses resultados sugerem que a presença dessa proteína deva ser importante durante o processo de formação de novos vasos sanguíneos no interior do tumor (GHILARDI *et al.*, 2008). Um padrão de comportamento semelhante foi observado quando células ADAM23-negativas estavam presentes na metástase do carcinoma de pulmão aumentando a proliferação e a invasão de células ADAM23-positivas adjacentes. Mecanismo esse mediado pela produção de óxido nítrico e da proteína LGI4, já que a ablação dos mesmos atenuou significativamente a capacidade proliferativa e invasiva destas células (COSTA *et al.*, 2015). A proteína LGI4 já havia sido caracterizada como molécula participante de processos de proliferação e diferenciação neuronal (NISHINO *et al.*, 2010).

A busca por parceiros e ligantes moleculares de ADAM23 torna-se crucial para compreender sua função biológica. Nesse sentido foi que nosso grupo caracterizou a interação entre a Proteína Prion Celular (PrP^c) e ADAM23. Por meio de alguns ensaios como: pull-down, co-imunoprecipitação, co-localização por imunofluorescência, demonstrou-se uma interação física entre ADAM23 e PrP^c tanto endógena como recombinante. Além disso, ensaios de ligação *in vitro* (*Bind*) sugeriram que o domínio desintegrina de ADAM23 é capaz de interagir diretamente com PrP^c (COSTA *et al.*, 2009).

2.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C)

A proteína prion celular (PrP^C) é codificada numa sequência de 253 aminoácidos. Desses, os resíduos 1 a 22 constituem o peptídeo sinal N-terminal, enquanto os resíduos 232 a 253 compõem o peptídeo hidrofóbico C-terminal. A molécula de PrP^C madura contém 209 resíduos e estende-se do 23 ao 231. No retículo endoplasmático rugoso é submetida às seguintes modificações pós-traducionais antes que atinja a superfície celular: remoção dos peptídeos N e C-terminal, adição de glicanos N-ligados aos resíduos N-181 e N-197, formação de uma ponte dissulfeto entre os resíduos C-179 e C-214 e a adição da âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) no resíduo 231 após a clivagem do peptídeo hidrofóbico C-terminal. O domínio N-terminal contém cinco ou seis repetições de oito resíduos ricos em glicina que formam a região de octapeptídeos repetidos. Essas, por sua vez, ligam-se ao íon Cu²⁺. Quando adequadamente montada, a estrutura terciária de PrP^C é composta de três alfa-hélices e duas folhas beta antiparalelas (STAHL *et al.*, 1987; TURK *et al.*, 1988; HARAGUCHI *et al.*, 1989; RIEK *et al.*, 1996; VILES *et al.*, 1999; DAMBERGER *et al.*, 2011) (Figura 4).

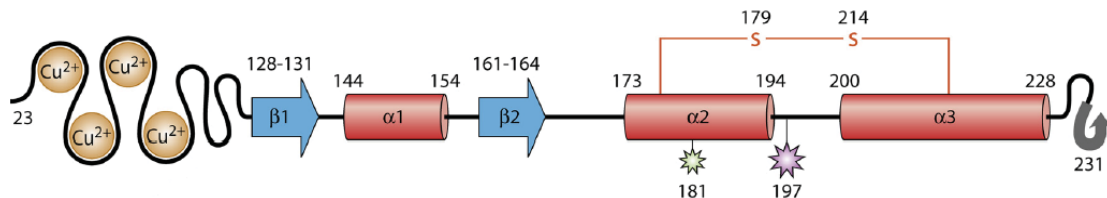


FIGURA 4 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DE PRP^C HUMANO - A estrutura da proteína prion humana madura consiste em um domínio N-terminal flexível contendo quatro repetições de octapeptídeos para ligação ao cobre e um domínio C-terminal dobrado contendo duas folhas-beta e três estruturas alfa-helicoidais. As cisteínas nas posições 179 e 214 formam uma ligação dissulfeto entre os domínios alfa-2 e alfa-3. Dois sítios de glicosilação estão nos resíduos 181 e 197 e a âncora GPI está ligada ao resíduo 231.

FONTE: Adaptado de Das & Zou, 2016.

É uma molécula encontrada predominantemente como uma glicoproteína extracelular de 32-35 kDa, podendo se apresentar nas formas não glicosilada, mono e diglicosilada (MEYER *et al.*, 1986; LAWSON *et al.*, 2005). Embora a grande maioria do PrP^C encontrado na célula esteja situado na membrana plasmática ancorado por GPI, uma pequena porcentagem (10%) pode usar a porção hidrofóbica do centro da

molécula como região transmembrana e apresentar-se numa forma solúvel citoplasmática também é possível. A proteína prion celular é comumente encontrada no SNC, mas também expressa em vários tecidos do corpo como: coração, músculo, tecidos linfoides, rins, trato gastrointestinal, pele, pulmão, testículos, ovários e endotélio (BENDHEIM *et al.*, 1992; HARRIS, 2003; AGUZZI & HEIKENWALDER, 2006; AGUZZI & STEELE, 2009; PETIT *et al.*, 2013).

A proteína prion celular pode sofrer três importantes processos de endoproteólise: α -clivagem, β -clivagem e clivagem do ectodomínio, sendo a primeira delas mais importante (NOTARI *et al.*, 2004; OWEN *et al.*, 2007; CRONIER *et al.*, 2008; NICOT & BARON, 2010). A PrP^C é composta por duas partes estruturalmente divergentes: a N-terminal menos estruturada e flexível e a C-terminal compacta e globular. A α -clivagem, portanto, quebra a molécula quase ao meio gerando dois fragmentos: N1 solúvel com 11 kDa e C1 glicosilado e associado a membrana com 18 kDa (BREMER *et al.*, 2010; ALTMEPPEN *et al.*, 2011; ALTMEPPEN *et al.*, 2012) (Figura 5).

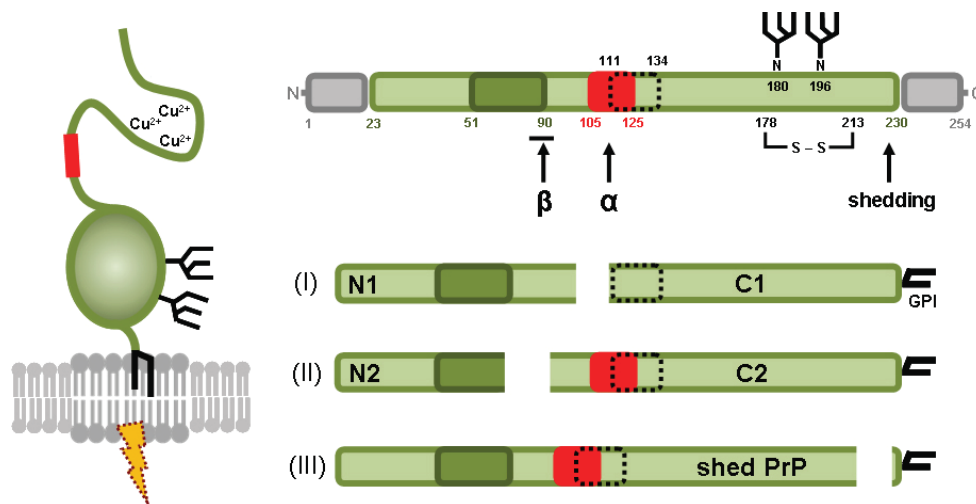


FIGURA 5 – TIPOS DE CLIVAGEM QUE OCORREM A MOLÉCULA DE PRP^C - Esquema tridimensional da proteína prion celular inserida na membrana plasmática. Evidencia-se a ligação ao íon Cu²⁺ e em vermelho destaca-se o domínio neurotóxico que compreende a sequência que vai dos aminoácidos (105-125). Ao lado a representação esquemática linear da sequência murina de PrP^C, bem como, as endoproteólise que ocorrem molécula. Os pontilhados mostram um núcleo hidrofóbico. Em (I) a clivagem tipo alpha que ocorre com mais frequência na molécula gerando os domínios N1 (solúvel) e C1 (ligado a membrana) e que destrói o domínio neurotóxico. Em (II) a beta clivagem que gera os fragmentos N2 e C2 e, por fim, o shedding do ectodomínio perto da âncora que libera a molécula quase em sua totalidade.

FONTE: Adaptado de ALTMEPPEN *et al.*, 2012.

Estudos em homogeneizados cerebrais humanos mostraram que a formação do fragmento C1 de PrP^c podia ser bloqueada com inibidores de metaloproteases (JIMENEZ-HUETE *et al.*, 1998). As pesquisas em busca das proteases responsáveis por essa endoproteólise identificaram as proteínas da família ADAM. Muitas dessas proteases dependentes de zinco realizam ectodomínio proteolítico de uma gama de substratos em vários processos fisiológicos e patológicos (REISS & SAFTIG, 2009; KLEIN & BISCHOFF, 2011). Principalmente dois membros desse grupo, ADAM10 e ADAM17 foram sugeridos como responsáveis pela α -clivagem do PrP^c (VINCENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005).

A proteína prion celular foi descrita como residente na superfície celular dos microdomínios de membrana organizados, ricos em colesterol e glicoesfingolípídeos - *lipid rafts*. Denominados também de domínios cavéola-like (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1997; MADORE *et al.*, 1999). Esse endereçamento para os *lipid rafts* ocorre já no início da síntese de PrP^c no retículo endoplasmático, sendo necessário para que haja o seu correto enovelamento (SARNATARO *et al.*, 2004).

Quando está na superfície celular a PrP^c é endocitada para compartimentos endossômicos, sendo reciclada de volta a superfície ou enviada a vias de degradação. A biossíntese e transporte de PrP^c para a superfície leva em torno de 30 minutos, e sua degradação possui uma meia-vida de 3 a 6 horas (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). Recentes pesquisas indicam que PrP^c sofre ubiquitinação sendo degradada via proteossomo (MA & LINDQUIST, 2001; YEDIDIA *et al.*, 2001).

A rota e o mecanismo pelos quais PrP^c é internalizado ainda são debatidos, já que foram descritos o envolvimento de processos dependentes e independentes de vesículas recobertas por clatrina e, também, dependentes de cavéolas (MARELLA *et al.*, 2002; HARRIS, 2003; PETERS *et al.*, 2003; PRADO *et al.*, 2004; SARNATARO *et al.*, 2009). As pesquisas acerca do tráfego de PrP^c identificaram que a molécula converge, quando internalizada, direta ou indiretamente para os endossomos iniciais e depois direciona-se para os endossomos tardios (MAGALHAES *et al.*, 2002; KIRKHAM *et al.*, 2005; PIMPINELLI *et al.*, 2005; DONALDSON *et al.*, 2009).

A endocitose mediada por clatrina em proteínas ancoradas por GPI, como PrP^c, ocorre com o auxílio de moléculas receptoras transmembrana que se comunicam com o meio intracelular. Já que as proteínas ancoradas não apresentam domínio

citoplasmático para associar-se diretamente com as proteínas adaptadoras e com a clatrina (LAKHAN *et al.*, 2009). Já foi identificada a molécula da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, a LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related 1*), altamente expressa em células neuronais, como responsável em promover a endocitose de PrP^c pela via clatrina-dependente (TAYLOR & HOOPER, 2007; PARKYN *et al.*, 2008).

As vias endocíticas independentes de clatrina ocorrem principalmente por vias dependentes de colesterol (cavéola/flotilina dependentes). E são uma alternativa celular mediante diferentes distribuições de lipídeos e proteínas na membrana. Também podendo ocorrer em resposta a alguma tensão membranar e/ou ao estresse (DOHERTY & MCMAHON, 2009).

A endocitose mediada por cavéolas está caracterizada pela sua associação com glicosíngolipídeos associados aos *rafts* (como por exemplo gangliosídeo - GM1) (FRA *et al.*, 1995). A abundância da cavéola em muitos tipos celulares é certamente consistente com um importante papel no tráfico, e algumas moléculas são capazes de sofrer endocitose em “vesículas” caveolina1-positivas (estruturas intracelulares de pH neutro, denominadas caveosomas), tais como: o vírus SV40, subunidade B da toxina da cólera e proteínas ligadas a glicofosfatidilinositol (GPI) (KIRKHAM & PARTON, 2005; CHENG *et al.*, 2006; PARTON & SIMONS, 2007). A endocitose mediada por cavéolas já foi descrita como sendo um possível mecanismo envolvido no tráfico de PrP^c ((MARELLA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009; SARNATARO *et al.*, 2009).

A via endocítica mediada pela proteína flotilina-1 tem sido recentemente caracterizada e parece ocorrer de forma dependente de dinamina mas independente de cavéola e clatrina (GLEBOV *et al.*, 2006; PAYNE *et al.*, 2007). Já que a mesma foi encontrada numa diferente subpopulação de endossomos tardios ricos em *lipid rafts* (FIVAZ *et al.*, 2002). Essa recentemente foi descrita como uma possível via endocítica da forma patogênica scrapie PrP^{sc} (PIMPINELLI *et al.*, 2005) (Figura 6).

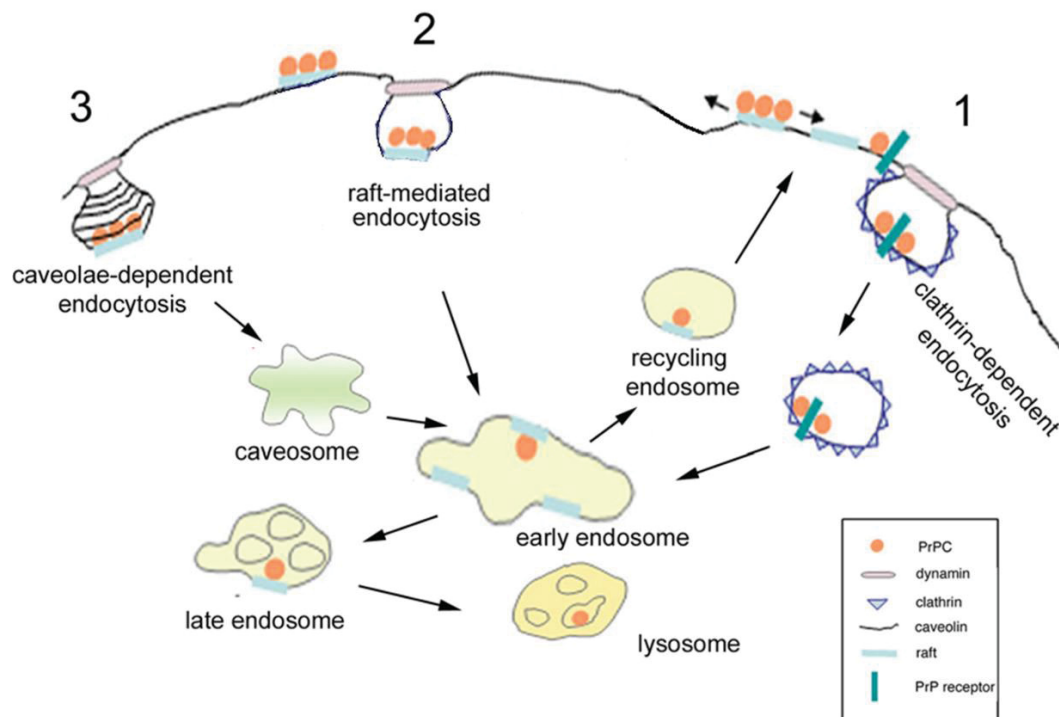


FIGURA 6 – MECANISMOS DE INTERNALIZAÇÃO DE PRPC - A internalização da molécula pode ocorrer em vários caminhos diferentes: a via clássica, mediada por clatrina (1); a via dependente de rafts (flotilina-1) (2) e a via dependente de cavéola (3). Nota-se que todas as vias de internalização convergem ao ponto comum: os endossomos precoces e são encaminhados aos endossomos tardios e posteriormente para degradação via lisossomos.
 FONTE: Adaptado de SARNATARO *et al.*, 2009.

Alterações no metabolismo da molécula PrPC confere a mesma capacidade de ser convertida à forma patogênica scrapie (PrP^{Sc}). As duas formas possuem a mesma sequência aminoacídica, contudo diferem em suas estruturas secundárias: a forma não patogênica contém domínios α -hélice em predominância é solúvel e susceptível a digestão por proteases. Já a forma infecciosa possui estrutura predominante em folhas- β é insolúvel e resistente à protease, forma agregados compactos, podendo acumular-se no cérebro (BASLER *et al.*, 1986; MEYER *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 1994; PRUSINER, 1998). Ao contrário de outros agentes infecciosos, tais como bactérias, vírus e fungos, os prions não contêm materiais genéticos como DNA ou RNA. Eles são codificados dentro da estrutura conformacional e modificações pós-tradicionais das proteínas. De fato, o comportamento semelhante ao prion foi observado recentemente em outras proteínas celulares - não apenas em papéis patogênicos, mas também desempenhando funções fisiológicas (DAS & ZOU, 2016).

A PrP^{Sc} é uma partícula infecciosa transmissível, sendo responsável por causar as encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE). Doenças neurodegenerativas fatais caracterizadas por vacuolização e morte neural, astrogliose e deposição de agregados proteicos que afetam homens e outros animais mamíferos (CHESEBRO, 1998). Nessas patologias ocorrem o acúmulo de PrP^{Sc} nas células e em depósitos extracelulares similares a placas, mecanismo que converte mais PrP^C à forma patogênica, disparando um processo de neurodegeneração. As doenças causadas por prions podem ocorrer na forma familiar (Doença de Creutzfeldt-Jacob – CJD, Insônia Familiar Fatal), adquirida (Encefalopatia Espongiforme Bovina, Kuru, Doença de Creutzfeldt-Jacob iatrogênica e variante – iCJD e vCJD) ou esporádica (sCJD). E sob circunstâncias ainda não descobertas parecem que todas elas podem se tornar transmissíveis (HEAD *et al.*, 2004).

A proteína prion celular é altamente conservada entre diferentes espécies, contudo sua função fisiológica ainda é motivo de intensa pesquisa (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010). Estudos realizados em camundongos nocautes, nos quais o gene que codifica PrP^C foi removido, demonstraram que esses animais desenvolveram-se normalmente. Não apresentaram patologias severas durante toda vida e os mesmos tornaram-se resistentes às doenças causadas por prions (BUELER *et al.*, 1993; STEELE *et al.*, 2007).

Entretanto, parece pouco provável que PrP^C tenha evoluído apenas para permitir o desenvolvimento de doenças. De fato, inúmeras funções têm sido atribuídas à proteína, como: processos de neuritogênese e neuroproteção, de adesão celular, imunidade, estresse oxidativo, entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Muitas destas foram elucidadas com a descoberta de ligantes de PrP^C. Pela associação com a proteína STI1 (*Stress Inducible Protein-1*), PrP^C promove a ativação de mecanismos neuritogênese e neuroproteção (CHIARINI *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2005). Pela interação com N-CAM (*Neural cell adhesion molecule*) e com proteínas de matriz como: laminina e vitronectina promove neuritogênese, adesão neuronal e crescimento axonal (GRANER *et al.*, 2000; SANTUCCIONE *et al.*, 2005; HAJJ *et al.*, 2007). Atua em processos imunológicos quando interage com a proteína ZAP70 (encontrada na membrana de células T e natural-killer) atuando na ativação dessas células (MATTEI *et al.*, 2004). Foi encontrado associado a moléculas do citoesqueleto como a α -espectrina (proteína periférica mais abundante da membrana

eritrocitária) atuando na manutenção e integridade da membrana plasmática e estrutura do citoesqueleto (PETRAKIS & SKLAVIADIS, 2006). Interage com a enzima neuronal nNOS (*Neuronal nitric oxide synthase*) em *lipid rafts* associando-se a esta em processos neurotransmissão (KESHET *et al.*, 2000).

Evidências embasam à hipótese de que PrP^C possa estar envolvida no metabolismo do cobre já que esta proteína pode ser endocitada ao ligar-se a este íon (Cu²⁺). Sendo, desta forma, relacionada às respostas celulares ao estresse oxidativo (PERERA & HOOPER, 2001; CUI *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2008). A deficiência em PrP^C causa uma diminuição da oferta de cobre aumentando a susceptibilidade celular a agentes que induzem o estresse oxidativo. Fenômeno explicado pela redução da atividade de Cu/Zn superóxido dismutase (BROWN *et al.*, 2002) (Figura 7).

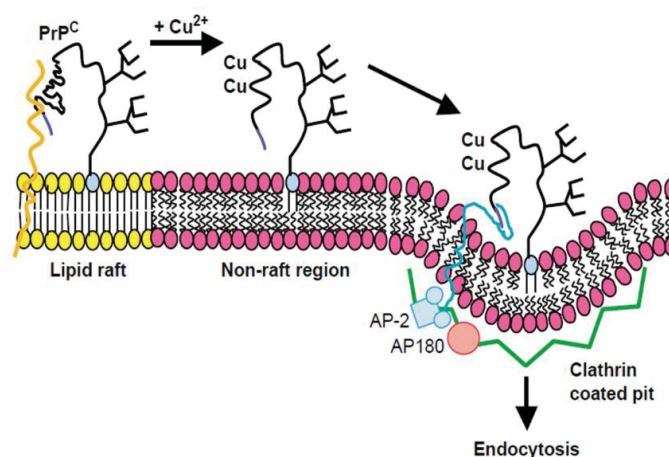


FIGURA 7 – ENDOCITOSE DE PRP^C VIA CLATRINA-DEPENDENTE MEDIADA PELA LIGAÇÃO AO ÍON COBRE – A proteína prion celular encontra-se dentro dos domínios de membrana *lipid rafts*. E após a ligação do íon Cu²⁺ transloca-se para fora desta região específica desencadeando o processo de endocitose via vesículas recoberta por clatrina. Bem como evidencia-se a participação de proteínas adaptadoras (AP-2 e AP180) que auxiliam nesse mecanismo de internalização de PrP^C. FONTE: TAYLOR *et al.*, 2006.

Esses achados sugerem que PrP^C está envolvida em múltiplos complexos proteicos, participando de variados processos biológicos. Sendo assim, fica claro que essa proteína não possui uma única função específica, mas desempenha diferentes papéis celulares, de acordo com a interação realizada (AGUZZI *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010).

2.3 MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE MEMBRANA (*LIPID RAFTS*)

O modelo do mosaico fluido proposto por Nicolson há cerca de 46 anos caracterizando a organização e a estrutura das proteínas e lipídeos das membranas (SINGER & NICOLSON, 1972); foi revisto mediante inúmeras descobertas das suas interações biológicas. A formação de domínios especializados foi considerada muito importante na dinâmica e arquitetura da membrana. Juntamente com citoesqueleto e o arcabouço extracelular, permitem um longo alcance na macro-organização das membranas. Esses domínios denominados *lipid rafts* são importantes na manutenção do sistema membranar que está em fluxo dinâmico e cooperativo (NICOLSON, 2014).

Os *lipid rafts* são definidos como regiões de membranas resistentes à detergente (DRMs). Eles formam uma fase ordenada da membrana rica em esfingolipídeos saturados com moléculas de colesterol (BROWN & LONDON, 1998). Outras nomenclaturas podem ser utilizadas para denominá-los: membranas enriquecidas em colesterol, membranas enriquecidas em glicosfingolipídeos, membranas enriquecidas em glicosfingolipídeos insolúveis a detergente (PIKE, 2004).

São áreas especializadas com diâmetro de 10 a 200 nm as quais são caracterizadas por uma alta dinamicidade e heterogeneidade (PIKE, 2006). Os rafts podem ser considerados como microdomínios lipídicos associados à proteína de forma organizada. E podem ser encontrados na membrana plasmática ou em outras membranas do meio intracelular. Eles se associam e dissociam num curto espaço de tempo variando em tamanho, forma, composição molecular e estabilidade (SIMONS & GERL, 2010). Por sua vez, são considerados transitórios e enriquecidos em alguns tipos de lipídeos e proteínas modificadas por porções lipídicas; conferindo-lhes algumas propriedades físicas e biológicas: atuar como plataformas de sinalização e em processos de endocitose (SEZGIN *et al.*, 2017).

Esses microdomínios especializados são compostos por esfingolipídeos (esfingomielina), gangliosídeos (GM1) e colesterol. Na sua composição lipídica são predominantemente encontrados lipídeos com longas cadeias de hidrocarbonetos saturados o que favorece a interação com o colesterol. Algumas proteínas residem nessas regiões de maneira restrita ou aí se concentram. Algumas moléculas ancoradas por GPI são encontradas nesses microdomínios do lado externo da

membrana plasmática. Já as proteínas aciladas, como a flotilina, as quinases da família Src, as proteína G e as que se ligam ao colesterol, como caveolinas, estão concentradas no lado citoplasmático dos *lipid rafts* (BROWN & LONDON, 1998; KURZCHALIA & PARTON, 1999; HOLOWKA *et al.*, 2000; CHATTERJEE & MAYOR, 2001; DRABER & DRABEROVA, 2002; RAJENDRAN *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2011; RESH, 2016) (Figura 8).

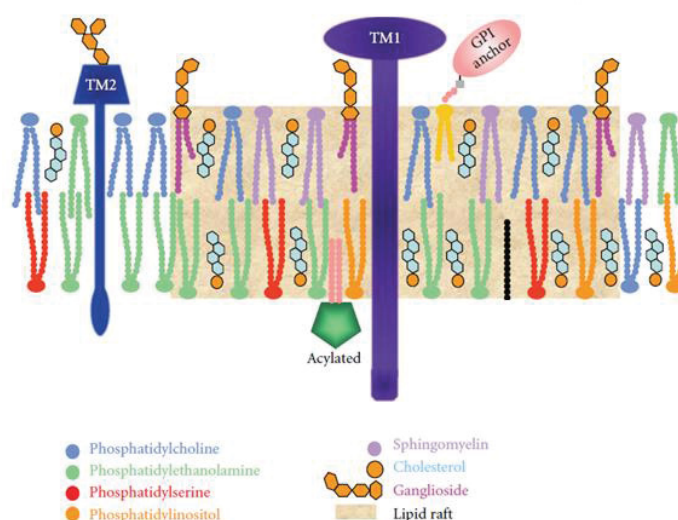


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS *LIPIDS RAFTS* – Esses microdomínios de membrana são enriquecidos em colesterol, esfingolipídios e gangliosídeos. As proteínas ancoradas via GPI, esfingomielina, fosfatidilcolina e gangliosídeos estão presentes no lado externo da membrana. Proteínas acetiladas, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina estão presentes no lado citoplasmático. O colesterol está presente em ambos os lados e funciona como uma molécula de preenchimento espacial sob a cabeça os grupos de esfingolipídios. TM1, TM2, representação de dois tipos de proteínas transmembrana.

FONTE: SILVEIRA *et al.*, 2011.

Os *lipid rafts* são insolúveis em detergentes não-iônicos sendo a extração com 1% de Triton X-100 a 4°C a ferramenta bioquímica tradicional adotada para isolá-los dos domínios de membrana não-rafts (HOLOWKA *et al.*, 2000). Estudos posteriores empregaram outros detergentes, incluindo Lubrol, Brij, NP-40 e CHAPS em diferentes concentrações (SUZUKI *et al.*, 2011; MINOGUE & WAUGH, 2012).

Análises desses microdomínios têm revelado que entre 35-50% do total dos *rafts* são compostos por lipídios como o colesterol; esfingomielina entre 10-15%; glicoesfingolipídios, como o gangliosídeo GM1 entre 10-20% e menos que 30% de glicerofosfolípidios, incluindo os maiores fosfolípidios da membrana, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (revisto por PIKE, 2004). Dois tipos comuns de *lipids rafts* foram

propostos: planares (que também são referidos como não-caveolar,) e caveolares, ambos estimados em 25-100 nm de diâmetro. Cavéolas estão ausentes da maioria dos neurônios e células de neuroblastomas; no entanto, os neurônios possuem *lipid rafts* planares e flotilina (ALLEN *et al.*, 2007) (Figura 9).

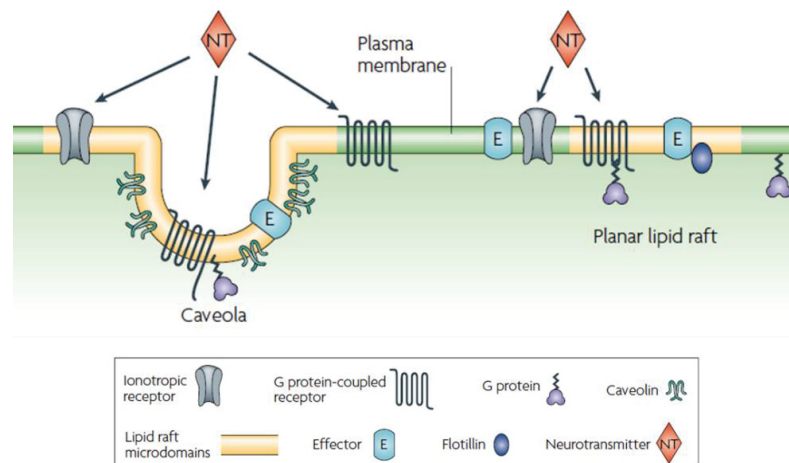


FIGURA 9 – DIAGRAMA DOS *LIPID RAFTS* PLANARES E CAVEOLARES - Ambos possuem uma composição lipídica semelhante. Os rafts planares são essencialmente contínuos com o plano da membrana. Em contraste, os caveolares são pequenas invaginações de membrana. As proteínas caveolina e flotilina podem recrutar moléculas de sinalização em *lipid rafts*, caveolares e planares respectivamente. Muitos receptores de neurotransmissores - tanto ionotrópicos quanto de proteína G - e efetores de sinalização são encontrados em *lipid rafts*. Os neurotransmissores podem ativar receptores que estão localizados dentro e fora desse microdomínios.

FONTE: Adaptado de ALLEN *et al.*, 2007.

Os *rafts* medeiam muitos processos biológicos importantes, incluindo vias de transdução de sinais, apoptose, adesão/migração celular, organização do citoesqueleto, sinapses imunológicas, avanço do cone de crescimento e orientação axonal em neurônios, bem como em eventos de endocitose e exocitose, (SIMONS & TOOMRE, 2000; HARRIS & SIU, 2002; FEUK-LAGERSTEDT *et al.*, 2007; PRAG *et al.*, 2007; HEAD *et al.*, 2014; SEZGIN *et al.*, 2017). Esses últimos, em especial, foram identificados como mecanismos para a invasão e propagação de patógenos virais, tais como: o vírus ebola (BAVARI *et al.*, 2002), o vírus SV40 (PELKMANS & HELENIUS, 2002), o influenza vírus (TAKEDA *et al.*, 2003).

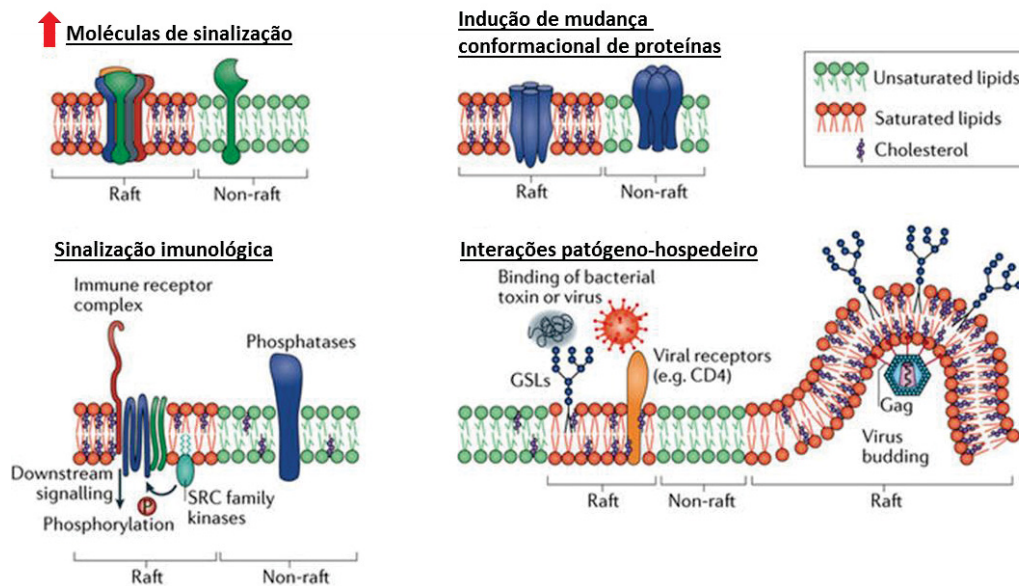


FIGURA 10 – FUNÇÕES DOS *LIPID RAFTS* – Esse microdomínios especializados podem concentrar moléculas formando plataformas catalíticas funcionais. Ocasionalmente, por exemplo, o aumento da probabilidade de encontro entre enzimas e substratos desencadeando reações de transdução de sinal. Na sinalização imunológica, onde quinases SRC associadas aos rafts, devido à sua palmitoilação, estão envolvidas na regulação do estado de fosforilação e, portanto, na transdução de sinal, de vários receptores imunes (incluindo o receptor de células T e o receptor de IgE). Muitos agentes patogênicos e seus produtos (toxinas bacterianas) se ligam seletivamente aos *rafts* de membrana devido à presença de receptores específicos, como glicosfingolípídeos - GSLs (toxina da cólera) ou CD4 (vírus da imunodeficiência humana (HIV)) nesses domínios, conseguindo assim acesso às células hospedeiras. Embora o mecanismo do brotamento viral ainda não esteja totalmente esclarecido, as proteínas virais, como as Gag do HIV, são sensíveis à fluidez da membrana e associam-se a domínios enriquecidos com colesterol.

FONTE: Adaptado de SEZGIN *et al.*, 2017.

Devido ao seu enriquecimento em colesterol, os *lipid rafts* são sensíveis a remoção ou diminuição do mesmo na membrana. Isso pode redistribuir as proteínas para fora desses microdomínios. Algumas técnicas de manipulação do colesterol são utilizadas para alcançar esse efeitos, como por exemplo: o uso de agentes que o sequestram – antibióticos – (filipina, nistatina e anfotericina) e formadores de poros na membrana (saponina e estreptolisina – O), que o removem - metil- β -ciclodextrina (M β CD) ou interferem na sua síntese - inibidores da enzima HMG-CoA redutase (via metabólica do colesterol) (SIMONS & TOOMRE, 2000; ALLEN *et al.*, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens de neuroblastomas murino, Neuro-2a, e humano, CHLA-20, foram cultivadas com meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco alta glicose-Cultilab) contendo 2 mM de L-glutamina, 10% de SFB (soro fetal bovino), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), 0,1 mM aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio, pH 7,2, gamicina (40 µg/ml) (Schering Plough). E a linhagem de neuroblastoma humano ShSy5y foi cultivada nas mesmas condições citadas acima com a diferença que foi utilizado 15% de SFB (soro fetal bovino).

O cultivo da linhagem celular CHO-k1 foi realizado com meio F-12 (M) contendo 2 mM de L-glutamina, 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), pH 7,2, 10% de SFB (soro fetal bovino), gamicina (40 µg/ml) (Schering Plough).

A CF-10 é uma linhagem neuronal derivada de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^c 129/Ola Prnp0/0 (MANSON *et al.*, 1994) de 15 dias de vida intrauterina imortalizada com o plasmídeo pSV3-Neo (ATCC®37150) e selecionada com o uso do antibiótico G-418. Essas células foram gentilmente cedidas pela Dra. Suzette Priola, do National Institutes of Health (NIH) em Hamilton, Estados Unidos. A célula foi cultivada em meio DMEM (cultilab) e penicilina (100IU) e estreptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (MACHADO *et al.*, 2012).

Para o preparo das culturas primárias do córtex foram utilizados embriões com 18 dias de vida intra-uterina (E18) e do cerebelo animais com 7 dias após o nascimento (P7). A utilização dos camundongos swiss foi submetida a análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas sendo indentificada com o processo 23075.073824/2015-15 e prévia aprovação (código número 888). Um prévio tratamento foi realizado nas placas de cultivo com poli-L-lisina (5 µg/ml) por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas com PBS e realizou-se o tratamento com matrigel 10 µg/ml (produzida no próprio laboratório) por 16 horas a 37°C. Os embriões foram coletados mediante o sacrifício da mãe e os animais pós-natos foram separados da mãe com 7 dias após o nascimento. As estrutura do córtex e do cerebelo foram separadas com o auxílio de pinças e bisturi. Os tecidos foram submetidos ao processo desagregação enzimática pela ação da tripsina em meio HBSS (Solução Balanceada

de Hank's contendo tripsina – 0,5 mg/ml) por 15 min a 37 °C. A suspensão celular foi lavada por 3 vezes em tampão contendo 10 µg/ml de desoxirribonuclease I, Soro de cavalo inativado (10% v/v), 8 mM MgCl₂ e tampão Hepes (10 mM). Com as células já dissociadas colocamos nas placas de cultivo previamente tratadas com meio de cultivo neurobasal suplementado com fator B27, glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina (100 µg/ml). Após 24 horas foi realizada a troca do meio para um da mesma composição apenas sem o SFB. E as mesmas foram mantidas em cultura por 5-7 dias (GRANER *et al.*, 2000) (Figura 11).

Todas as células supracitadas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂ à 37°C.

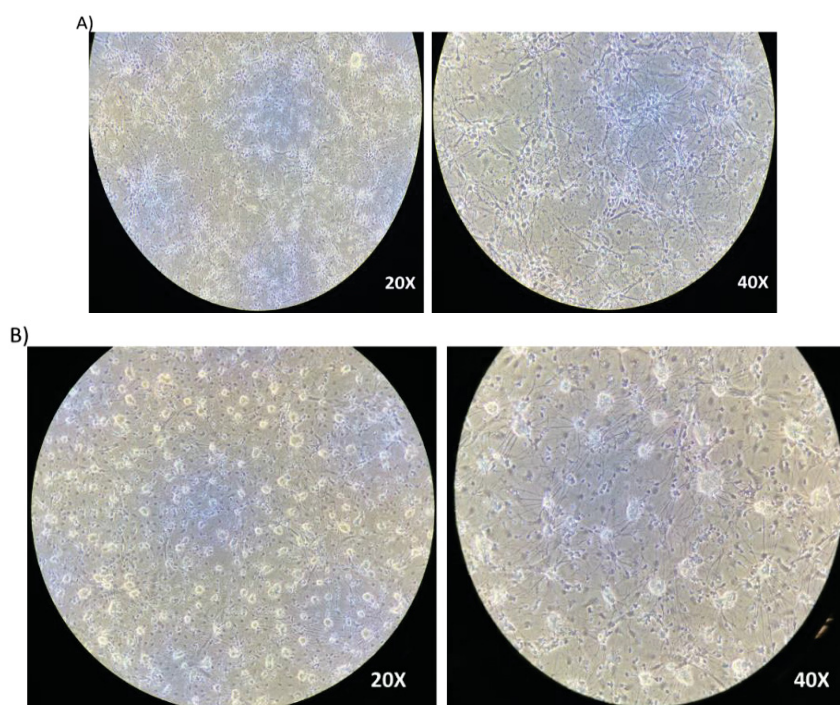


FIGURA 11 - CULTURA PRIMÁRIA NEURÔNIOS DO CÓRTEX E CEREBELO - A) Células do córtex oriundas de embriões de camundongos com 18 dias de vida intrauterina (E18). B) Células derivadas do cerebelo de camundongos pós-natos de 7 dias de vida. Ambas as culturas foram mantidas por 5 dias em condições de cultivo celular (Atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C), meio neurobasal, fator B27, glutamina e penicilina/estreptomicina. FONTE: A AUTORA, 2016.

3.2 EXTRATOS CELULARES

As células foram previamente lavadas com 2 vezes PBS 1X gelado, e em seguida, foi adicionado 400 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4) com inibidores de protease (coquetel Roche). Em seguida, foram lisadas por 40' em banho de gelo e posteriormente as amostras foram submetidas à centrifugação a 19.000 *xg* por 10

minutos a 4°C em microcentrífuga Sorvall. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubo.

3.3 EXTRATOS DE TECIDO NERVOSO DE CAMUNDONGO

Foram pesados aproximadamente 50 mg de tecido (encéfalo e cerebelo); lavados em PBS 1X gelado com posterior lise em tampão (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4) (800 µl) com inibidores de protease (coquetel Roche). Os tecidos foram lisados em banho de gelo com intervalo de 10' cada. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 19.000 *xg* por 10 minutos a 4°C, na microcentrífuga Sorvall. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubo.

3.4 ENRIQUECIMENTO DE EXTRATOS CELULARES EM GLICOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À CONCANAVALINA A SEPHAROSE

A resina Concanavalina A Sepharose (ConA) foi previamente lavada por 3 vezes em tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4 e deixada de um dia para o outro a 4°C) para equilibrá-la. Os extratos celulares foram lisados no mesmo tampão (800 µl) com inibidores de protease (coquetel Roche). Em seguida, as amostras foram lisadas por 40' em banho de gelo. Posteriormente as amostras foram submetidas à centrifugação a 19.000 *xg* por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga Sorvall. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubo.

Foi realizada a dosagem de proteína total dos extratos pelo método de Bradford (PETERSON, 1983) e, em seguida, essas amostras foram incubadas em orbital com a ConA (50 µl) por 3 horas a 4°C. Cada amostra foi centrifugada a 600 *xg* por 5 minutos e o sobrenadante "void" foi coletado. Logo após, a resina foi lavada 3 vezes com o tampão para retirada do resíduo de proteínas que não foram ligadas. E por fim, para a eluição das proteínas a resina foi ressuspensa em 40µl tampão 2,5X 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 imunoblotting.

3.5 MARCAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR COM BIOTINA EZ-LINK

A marcação de proteínas de superfície celular com biotina foi feita com células de neuroblastomas: Neuro-2a, ShSy5y e CHLA-20; nas células CF-10 e CHO-K1. As células lavadas 2 vezes com PBS 1X gelado e, em seguida, incubadas com 0,2 mg/ml de biotina EZ-Link-sulfo-LC Hydrazide-Biotin (Thermo Scientific) diluída em PBS gelado por 40 minutos a 4°C.

As células foram então submetidas à centrifugação a 600 xg por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado glicina 0,1 M por 3 vezes. As células foram lisadas lise em tampão (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4).

O lisado foi submetido à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (PETERSON, 1983) e posteriormente foi realizada à cromatografia de afinidade com 50 μ l de resina Avidina-Agarose (Thermo Scientific) por 3 horas sob agitação em orbital a 4° C. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens da resina com PBS. Em seguida, adicionou-se a cada amostra 40 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 imunoblotting.

3.6 PREPARAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA RICOS EM COLESTEROL E GLICOESFINGOLIPÍDEOS (*LIPID RAFTS*)

Os microdomínios ricos em colesterol e glicosfingolipídeos foram preparados segundo (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000).

As amostras (50 mg de tecidos e $1,2 \times 10^7$ células) foram submetidas à preparação de *lipid rafts* por flutuação dos complexos insolúveis em Triton-X100. Inicialmente ressuspendidas em 700 μ l de tampão TNE gelado (150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA e 1% Triton X-100) e foram lisadas mecanicamente por meio de passagens em seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40' em banho de gelo com intervalo de 10' cada.

As partículas insolúveis foram separadas por centrifugação (10 min, 19.000 xg a 4°C) e o lisado (porção insolúvel em Triton X-100) foi separado sendo colocado em tubo de ultracentrífuga. Um volume (700 μ l) de solução 70% Nycodenz AG (Axis-Shield) foi

adicionado e homogeneizado com o lisado. Um gradiente linear de 35-8% de Nycodenz em TNE foi sobreposto ao lisado (200 µl de cada gradiente: 35; 25; 22,5; 20; 18; 15; 12 e 8%). Os tubos foram centrifugados 200.000 xg por 4h, 4°C usando o rotor MLS-50 (Beckman). Frações (13 unidades) de mesmo volume foram recuperadas do tubo de centrifugação (180 µl). As primeiras frações (01-07) correspondem aos *lipid rafts* e as demais frações (08-13) todo o resto de membrana e as demais porções do citoplasma, como mostrado na figura 12.

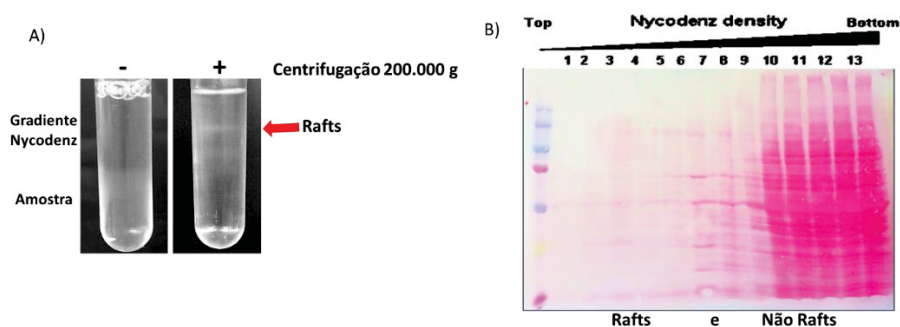


FIGURA 12 - ESQUEMA DA PURIFICAÇÃO DOS MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* - A) Amostras em tubos de ultracentrifugação antes e após o processo de purificação. Observa-se que depois da centrifugação forma-se uma névoa esbranquiçada no topo do tubo – esses são os *lipid rafts*. B) Membrana de nitrocelulose corada com ponceau após corrida e transferência eletroforética dos *lipid rafts*. As primeiras frações (08-13) são aquelas que correspondem a esses microdomínios específicos, nos quais, notam-se uma densidade proteica bem menor quando comparada as frações não *lipid rafts* (08-13).

FONTE: A AUTORA, 2015.

3.7 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DO METANOL-CLOROFÓRMIO

Os extratos (50 mg tecidos e $1,2 \times 10^7$ células) foram submetidos a preparação dos *lipids rafts* e em seguida submetidos a separação das 13 frações (180 µl cada). Essas frações foram precipitadas de forma individual adicionando-se a esse volume, 400 µl de metanol 100% (Merck). Cada amostra foi então homogeneizada por vórtex e submetida à centrifugação de 19.000 xg por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de clorofórmio 100% (Merck). As amostras foram submetidas à homogeneização por vórtex e, a seguir, centrifugadas a 19.000 xg por 15 segundos. Após a centrifugação, cada amostra recebeu 300 µl de H₂O Milli-Q (Millipore) estéril e foi submetida à homogeneização por vórtex e à centrifugação a 19.000 xg por 1 minuto. Com isso formou-se 3 fases: superior, interface e inferior.

A fase superior foi removida e descartada. A interface e fase inferior correspondem à fase do clorofórmio, onde estão as proteínas e, por isso, foram mantidas. Em seguida, foram adicionados 300 µl de metanol 100% (Merck). Cada amostra foi então homogeneizada por vórtex e submetida à centrifugação a 19.000 xg por 2 minutos. Formou-se duas fases: superior descartada e o precipitado “pellet” de proteína deixado em fluxo laminar por 15 minutos, para a evaporação de qualquer resíduo de metanol. Em seguida, as frações de 01 a 07 foram ressuspensas em 20 µl de tampão de amostra 2,5 X redutor e as frações de 08 a 13 em 50 µl. Posteriormente as amostras foram fervidas a 95°C por 10 minutos e sendo avaliados por ensaios de SDS-PAGE e imunoblotting.

3.8 INTERNALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIADA PELO ÍON COBRE (CU²⁺)

As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X a 37°C em seguida foram mantidas em Meio HBSS (Solução Balanceada de Hank's) com 1000 µM CuSO₄ por 1 hora a 37°C para indução da endocitose das proteínas - metodologia adaptada de (LEE *et al.*, 2001).

3.8.1 ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE A PURIFICAÇÃO DOS *LIPID RAFTS*

As células Neuro-2a foram lavadas 2 vezes com PBS a 37°C e, em seguida, incubadas com 1000 µM CuSO₄ por 1 hora a 37°C. Após esse período as células foram submetidas a purificação dos *lipid rafts*. Inicialmente ressuspensas em 700 µl de tampão TNE gelado e lisadas. Um gradiente linear de 35-8% de Nycodenz em TNE foi sobreposto ao lisado. As amostras foram centrifugadas 200.000 xg por 4h, 4°C. As 13 frações (01-07 *rafts*) e (08-13 não-*rafts*) foram coletadas e precipitadas por metanol-clorofórmio (Figura 13).

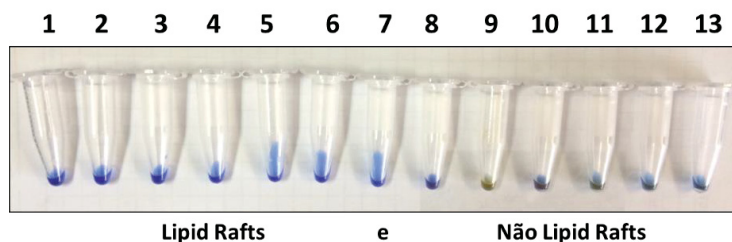


FIGURA 13 - VISUALIZAÇÃO DO ÍON Cu^{2+} NAS FRAÇÕES NÃO-RAFTS - As amostras foram submetidas ao tratamento com o íon Cu^{2+} ($1000 \mu\text{M}$) por 1 hora a 37°C . Após esse período foram submetidas a purificação dos *lipid rafts*. Observa-se o acúmulo do cobre nas últimas frações do gradiente indicando que o mesmo é direcionado para as demais porções da membrana ou para o citoplasma da célula.

FONTE: A AUTORA, 2015.

3.8.2 ENSAIO DE ENDOCITOSE MEDIANTE BIOTINILAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR

As células (Neuro-2a, CF-10) foram lavadas com 2 vezes PBS 1X gelado e, em seguida, incubadas com $0,2 \text{ mg/ml}$ de biotina EZ-Link-sulfo-LC Hydrazide-Biotin (Thermo Scientific) por 40 minutos a 4°C . Após a incubação com a biotina as placas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos cada com uma solução de glicina 50 mM (diluída em PBS 1X) (PERERA & HOOPER, 2001).

Posteriormente as células foram mantidas em Meio HBSS (Solução Balanceada de *Hank's*) sem vermelho de fenol com $1000 \mu\text{M}$ CuSO_4 por 1 hora a 37°C para indução da endocitose das proteínas - metodologia adaptada de (LEE *et al.*, 2001). Após a incubação com o CuSO_4 as células foram tratadas com 2 ml tripsina/EDTA (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) por 5 minutos a 37°C para remoção das proteínas de superfície. A ação da tripsina foi bloqueada com 5 ml de Meio DMEM com 10% SFB. As células foram soltas da placas e peletadas. O pellet foi lavado uma vez com PBS e depois foi realizada a lise celular em tampão (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4). As amostras foram lisadas mecanicamente por meio de passagens em seringa com agulha $13 \text{ mm} \times 0,30 \text{ mm}$ 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40' em banho de gelo com intervalo de 10' cada. Posteriormente as amostras foram submetidas à centrifugação a 19.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado.

Foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (PETERSON, 1983) e o lisado foi submetido à cromatografia de afinidade com 50 µl de resina Avidina-Agarose (Thermo Scientific). A mesma foi previamente lavada por 3 vezes no mesmo tampão de lise e deixada de um dia para o outro a 4°C para equilibrar. Após a incubação do lisado foram realizadas 3 lavagens da resina com PBS. Em seguida, adicionou-se a cada amostra 40 µl 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 imunoblotting.

3.8.3 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

As células Neuro-2a ($2,0 \times 10^4$) foram transfectadas pela metodologia da lipofectamina com os plasmídeos GFP-PrP^c e pcDNA 3.1 ADAM23 após 48 horas de expressão foram lavadas e mantidas em meio HBSS para a captura de imagens em microscopia confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 60X, imersas em óleo (com abertura numérica de 1.40). Para a captura do GFP-PrP^c foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo (“band pass”) de 500-550 nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices).

As células Neuro-2a foram submetidas ao tratamento com íon Cu^{2+} na concentração de 500 µM. Em seguida foi realizado vídeo para observação do comportamento da proteína PrP^c frente ao agente externo (Cu^{2+}). Durante 30 minutos as imagens das células foram capturadas de 5 em 5 minutos (time-lapse).

3.8.4 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células Neuro-2a ($2,0 \times 10^4$) foram plaqueadas em lamínulas de vidro, mantidas em meio de cultivo DMEN com 10% SFB e deixadas a 37° em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após 48 horas as mesmas foram lavadas e mantidas em meio HBSS para a realização do tratamento com o íon Cu^{2+} na concentração de 1000 µM.

A exposição ao íon foi realizada em três diferentes tempos 0,15 e 30 minutos e, em seguida, as células foram submetidas a reação de imunofluorescência. As amostras foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 minutos, bloqueadas com PBS/BSA 0,1% por 1 hora e expostas aos anticorpos primários anti-PrP^c policlonal (1:100), mAbDCL118 (ADAM23 – sobrenadante de cultura) e anti-RAB11 abcam (1:50) por 1 hora e depois marcadas com o anticorpos secundários anti-mouse alexa 488 para PrP^c e ADAM23 e anti-rabbit Texas Red para a proteína RAB11. No dia seguinte as imagens foram capturadas no microscópio confocal.

A captura de imagens foi realizada em microscopia confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, *Japan*), utilizando objetivas de 100X, imersas em óleo (com abertura numérica de 1.45). Para o GFP (Captura de PrP^c e ADAM23) foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo ("*band pass*") de 500-550 nm. Para o Texas-Red (Captura da proteína RAB11) foi utilizado o laser de excitação 570-620 nm e para o DAPI foi utilizado laser 405 para excitação e filtro de intervalo ("*band pass*") de 425 - 475 nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, *Japan*) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (*Z slices*).

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DE EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO NA SUPERFÍCIE CELULAR DE ADAM23 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Nosso primeiro resultado vem demonstrar a expressão global de ADAM23 em algumas linhagens de origem nervosa como os neuroblastomas: murino (Neuro-2a) e humanos (SH-SY5Y e CHLA-20) e CF-10 (linhagem neuronal derivada de animal nocaute para a proteína prion celular). Bem como outra linhagem que não está inserida dentro do contexto do sistema nervoso: CHO-K1 (Ovário de hamster) a fim de comparar o perfil de expressão da referida molécula. Uma vez que ADAM23 é uma glicoproteína (GOLDSMITH *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009) usamos a abordagem de cromatografia de afinidade à concanavalina A (conA) para enriquecer nossas amostras. Quando os extratos totais dessas linhagens foram analisados pôde-se identificar as formas imatura e madura de ADAM23 (100 e 70 kDa respectivamente). Estudos de (GOLDSMITH *et al.*, 2004) em células granulares cerebelares (CGC) revelaram que ADAM23 é sintetizada como um precursor glicosilado de 100 kDa, cuja maturação depende da clivagem realizada por pró-proteínas convertases (PCs) - por exemplo furinas - para que ela atinja sua forma de 70 kDa (Figura 14A e 4B).

A quantidade de ADAM23 em sua forma processada (70 kDa) nos neuroblastomas analisados é relativamente superior a forma imatura (100 kDa), pois a observação desta última só se fez quando as amostras são enriquecidas. No entanto, quando a expressão ADAM23 foi analisada em células tumorais (COSTA *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2011), principalmente a sua forma não processada (100 kDa) foi observada. Além disso, as linhagens aqui analisadas apresentaram as formas ADAM23 em proporções diferentes. Isso pode ser explicado devido a uma expressão diferencial dentro do contexto celular estabelecido por cada linhagem de acordo com sua função fisiológica.

A fim de elucidar melhor o processamento das formas endógenas de ADAM23 optou-se em estudar inicialmente sua localização na membrana plasmática. As proteínas com domínios expostos para a face extracelular da membrana plasmática foram marcadas com biotina e submetidas ao pull-down com Avidina-Agarose. O resultado da figura 14C mostrou que as duas formas (100 e 70k Da) desta proteína encontram-se presentes na superfície externa da membrana plasmática de todas as células

analisadas, confirmando achados anteriores (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Podemos excluir a marcação intracelular de ADAM23 ou outras proteínas, uma vez que as reações de β -actina (proteína intracelular residente conhecida) não apresentou reação em um WB paralelo, indicando que não foi retida pela matriz de Avidina-Agarose.

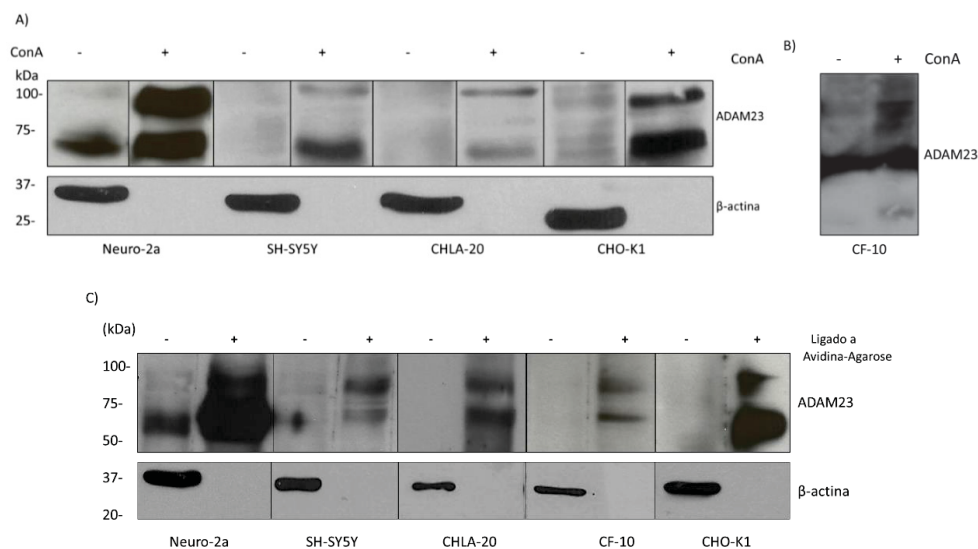


FIGURA 14 - ADAM 23 MADURA IMATURA EXPRESSA NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LINHAGENS NEURONAIAS - A) Extratos totais dos neuroblastomas e da linhagem CHO-K1 foram enriquecidos com conA (5 mg) e em paralelo foram resolvidos os inputs (100 μ g). B) Extrato total da CF-10 (5 mg) foi enriquecido e o input (100 μ g) resolvido ao lado como controle. As amostras foram incubadas com a resina concanavalina A Sepharose (conA) por 3 horas a 4°C. Depois foram submetidas a reação de *immunoblotting* com o anticorpos mAb DCL118 e anti- β actina sigma (1:10.000) over-night. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse sigma (1:4000). A reação foi revelada com quimioluminescente Super Sinal (Thermo Scientific) para o neuroblastoma Neuro-2a. Já para os neuroblastomas SH-SY5Y e CHLA-20, CF-10 e CHO-K1 a reação foi realizada com quimioluminescente Super Sinal West Femto (Thermo Scientific). O resultado evidencia que a forma de 100 kDa é menos expressa que a forma de 70 kDa, já que a mesma somente foi observada após o processo de enriquecimento. A linhagem Neuro2a apresenta uma expressão de ADAM23 consideravelmente maior em relação as demais neuroblastomas analisados. C) Os neuroblastomas Neuro-2a, SH-SY5Y e CHLA-20, a CF-10 e CHO-K1 foram submetidas ao procedimento de biotinylação de superfície com EZ-Link-sulfo-LC-biotin e posterior lise celular. Foi realizada uma cromatografia de afinidade dos lisados com a resina Pierce Avidina-Agarose (AA ligado) com (4,5 mg) de extrato total para as linhagens Neuro-2a, SH-SY5Y e CHO-k1. Para CF-10 foi utilizado 3,0 mg de proteína total. Já para a linhagem CHLA-20 foi utilizado 160 μ g de proteína total. Depois as amostras foram submetidas a reação de *immunoblotting* com o anticorpo mAb DCL118 over-night. Para a reação do neuroblastoma CHLA-20 foi necessário utilizar o substrato Quimioluminescente Super Sinal West Pico Femto Thermo Scientific) devido a menor quantidade de partida da amostra. As duas formas de ADAM23 (70 e 100 kDa) foram devidamente encontradas na face externa da membrana plasmática.

FONTE: A AUTORA, 2015.

4.2 LOCALIZAÇÃO DE ADAM23 NOS MICRODOMÍNIOS ESPECÍFICOS *LIPID RAFTS*

As balsas lipídicas são definidas como domínios de membrana plasmática pequenos e transitórios que são enriquecidos em vários tipos de lipídeos e proteínas modificadas por porções lipídicas conferindo-lhes algumas características como distintas propriedades físicas e biológicas (SEZGIN *et al.*, 2017). Como alguns ligantes descritos anteriormente para ADAM23 são moléculas *lipid rafts* residentes (COSTA *et al.*, 2009), ou movem-se entre os *rafts* e domínios não-rafts após a ativação (URBINATI *et al.*, 2012), argumentamos que ADAM23 também pode estar presente nesses microdomínios de membrana. Para verificar essa possibilidade, empregamos o gradiente de densidade ou flutuação de Nycodenz, (NASLAVSKY *et al.*, 1997; KESHET *et al.*, 2000), como um método bem estabelecido para isolamento de *lipid rafts* e estruturas cerebrais de camundongo. Assim este material foi empregado como uma fonte abundante de ADAM23 (Figura 15A-B, córtex, Figura 16A-B, cerebelo) (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Observa-se nas figuras 15A e 16A a partir do extrato total destes tecidos que a forma de 70 kDa de ADAM23 encontra-se parcialmente nas frações correspondentes aos *lipid rafts* e a forma de 100 kDa apresentou-se completamente fora deste domínios. O resultado obtido trouxe uma visão até então inédita do ponto de vista da localização de ADAM23 (70 kDa) nesses domínios de membrana. Sendo, portanto, a primeira vez que observa-se a molécula endógena na forma madura presente nos *lipid rafts*. O fato dela estar distribuída através do gradiente sugere que ADAM23 madura transita entre uma fração solúvel e os *rafts*. Vale ressaltar que mesmo um pequena quantidade de ADAM23 nas frações de baixa densidade que representam os *rafts* indica um grande enriquecimento porque apenas uma proporção muito pequena de proteína total está presente nessas frações. Isso também foi demonstrado anteriormente para outras proteínas residentes de *rafts*, incluindo flotilina (EVANS *et al.*, 2003; SEPULVEDA *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2010; ALICHE-DJOUDI *et al.*, 2013), caveolina (PARTON & SIMONS, 2007) e a proteína de prion celular (KESHET *et al.*, 2000), usadas aqui como proteínas marcadoras de *lipid rafts*. Para marcador citoplasmático foi utilizada a proteína de citoesqueleto vinculina.

Como forma de confirmar se apenas a forma madura de ADAM23 (70 kDa) estava presente dentro dos *lipids rafts* foi realizado após a purificação dos mesmos uma combinação das frações *rafts* (01-06) que foi resolvida por SDS-PAGE em sua totalidade. Mesmo assim o resultado encontrado não foi alterado, mostrando que no extrato dos tecidos analisados (córtex e cerebelo) apenas encontramos dentro dos *lipid rafts* a forma madura de ADAM23 (Figuras 15B e 16B).

Ainda nessas mesmas figuras 15B e 16B, observa-se uma alta expressão da referida proteína em sua forma processada (70 kDa) com relação a sua forma não processada (100 kDa). Desta forma, não resta dúvidas de que esta molécula é residente nessa microrregião da membrana e está presente em quantidade relativamente maior do que a forma não processada (100 kDa) no tecido nervoso de camundongos.

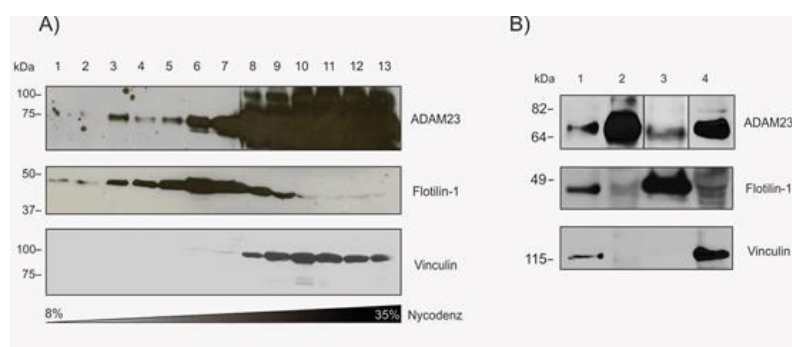


FIGURA 15 - A FORMA DE 70 kDa ADAM23 É PARCIALMENTE RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* EM ENCÉFALO DE CAMUNDONGO - A) O extrato total dos tecidos (50 mg) foi submetido ao procedimento de separação dos *lipids rafts*. Treze frações foram separadamente precipitadas pelo método de metanol-clorofórmio. As frações de 01 a 07 foram resolvidas por SDS-PAGE em sua totalidade, já nas frações de 08 a 13 utilizou-se 10% do total de amostra. A ADAM23 de 70 kDa foi encontrada de forma parcial e inédita nos *lipid rafts* juntamente com a flotilina-1 marcador destes domínios. Já a ADAM23 de 100 kDa foi encontrada apenas nas frações de alta densidade do gradiente que correspondem a não-rafts juntamente com o marcador citoplasmático a vinculina. B) 100 µg de proteína total foram colocados na linha 1; 1 mg de proteína foi enriquecido por cromatografia por afinidade (ConA) na linha 2. Linhas 3 e 4 correspondem às frações combinadas de *rafts* e não-rafts, respectivamente (4,5 mg de proteína total foi submetido). A fração raft foi resolvida por SDS -PAGE em sua totalidade, enquanto que apenas 10% do total das amostras não rafts foi resolvido. Apenas a forma madura de ADAM23 (70 kDa) foi encontrada dentro dos microdomínios *lipid rafts*.

FONTE: A AUTORA, 2015.

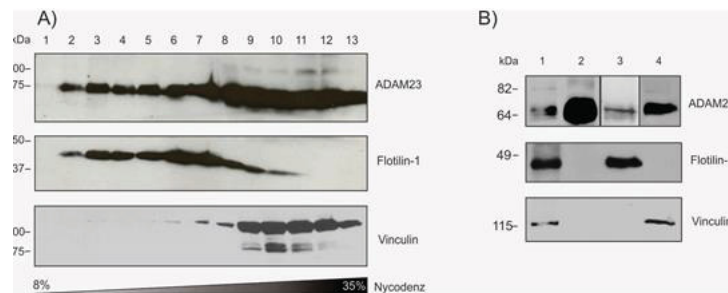


FIGURA 16 - A FORMA DE 70 kDa ADAM23 É PARCIALMENTE RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* EM CEREBELO DE CAMUNDONGO - A) O extrato total dos tecidos (50 mg) foi submetido ao procedimento de separação dos *lipid rafts*. Treze frações foram separadamente e precipitadas pelo método de metanol-clorofórmio. As frações de 01 a 07 foram resolvidas por SDS-PAGE em sua totalidade, já nas frações de 08 a 13 utilizou-se 10% do total de amostra. A ADAM23 de 70 kDa foi encontrada de forma parcial e inédita nos *lipid rafts* juntamente com a flotilina-1 marcador destes domínios. Já a ADAM23 de 100 kDa foi encontrada apenas nas frações de alta densidade do gradiente que correspondem a não-rafts juntamente com o marcador citoplasmático a vinculina. B) 100µg de proteína total foram colocados na linha 1; 1 mg de proteína foi enriquecido por cromatografia por afinidade (ConA) na linha 2. Linhas 3 e 4 correspondem às frações combinadas de rafts e não rafts, respectivamente (4,5 mg de proteína total foi submetido). A fração raft foi resolvida por SDS - PAGE em sua totalidade, enquanto que apenas 10% do total das amostras não rafts foi resolvido. Apenas a forma madura de ADAM23 (70 kDa) foi encontrada dentro dos microdomínios *lipid rafts*. FONTE: A AUTORA, 2015.

Embora seja importante verificar a expressão de ADAM23 em amostras não manipuladas (isto é, homogenizado do tecido inteiro), esta metodologia tem uma limitação de não determinar a relativa contribuição de cada tipo de célula para a expressão ADAM23. No caso do sistema nervoso a expressão de ADAM23 nos neurônios, células gliais e vasculares pode ser diferente, refletindo sua função em cada tipo de célula. A fim de dissecar a expressão de ADAM23 em neurônios localizados nas mesmas regiões anatômicas analisadas acima (córtex cerebral, cerebelo e hipocampo) isolamos e cultivamos neurônios de diferentes partes do cérebro. As culturas primárias de camundongo: neurônios do córtex e do hipocampo (Embriões com 18 dias de vida intrauterina) e células CGC (animais pós-natos com 7 dias de vida) foram submetidos a lise celular com posterior ultracentrifugação e reação WB com mAb DL11C8 (anticorpo monoclonal anti-ADAM23).

As formas maduras e imaturas do ADAM23 podem ser encontradas no neurônio cortical e culturas cerebelar e culturas de hipocampo (Figuras 17A e 17B, linha 1 e 17C, linhas 1 e 2), de forma semelhante aos resultados obtidos para o respectivo tecido inteiro (Figuras 15B e 16B, linha 2). Quando amostras do cultivo de neurônios

foram usados para separação de *lipid rafts*, ambas formas ADAM23 foram encontradas predominantemente em frações não-rafts (Figuras 17A e 17B, linha 3 e 17C, linhas 5 e 6) e apenas ADAM23 (70 kDa) estava presente em frações rafts (Figuras 17A e 17 B, linha 2 e 17C, linhas 3 e 4). Curiosamente, em neurônios cerebelares, ADAM23 (100 kDa) também foi detectado na fração rafts (Figura 17B, linha 2), sugerindo que pelo menos para nesse tipo de célula específica, a forma imatura de ADAM23 pode estar presente neste domínio específico da membrana.

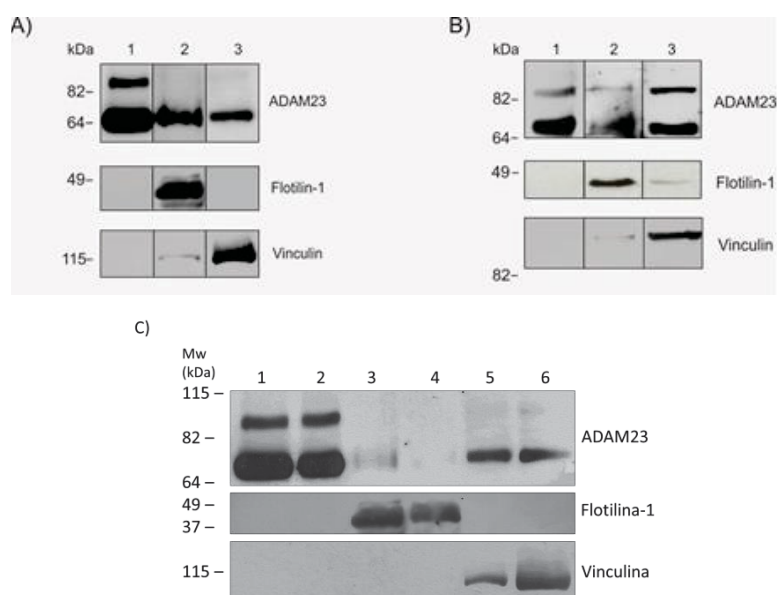


FIGURA 17 - ADAM23 É ENCONTRADA DENTRO DOS *LIPID RAFTS* EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX E DO HIPOCAMPO E CÉLULAS GRANULARES CEREBELARES - A e B) Na linha 1 (2,4 mg) de extrato total das células do córtex e cerebelo foram submetidos ao enriquecimento com a glicoproteína concanavalina (ConA). Nas Linhas 2 e 3 correspondem a fração *rafts* e não *rafts*, respectivamente. C) Nas linhas 1 e 2 temos os extratos totais (800 µg) das culturas primárias de neurônios do córtex e hipocampo enriquecidos com Concanavalina A Sepharose. Nas linhas 3 e 4 temos as frações *rafts* e nas linhas 5 e 6 as frações não *rafts* do córtex e hipocampo respectivamente. Todas as frações rafts foram resolvidas por SDS-PAGE em sua totalidade, enquanto que apenas 10% do total das frações não rafts foram resolvidas. Ambas as formas maduras e imaturas de ADAM23 foram encontrados em domínios *lipid rafts*. Foram utilizados os marcadores anti-flotina-1 Abcam (1:1000) e anti-vinculina sigma (1:4000) para evidenciar as frações correspondentes aos *lipid rafts* e ao citoplasma respectivamente.
FONTE: AUTORA, 2016.

Diante desses resultados resolveu-se investigar se essa localização de ADAM23 não-rafts/rafts era caracterizada por um comportamento apenas fisiológico da molécula (in vivo – encéfalo e cerebelo e in vitro – culturas primárias de neurônios). Como modelo experimental tumoral foi escolhido o neuroblastoma Neuro-2a pois, como já visto

acima, apresenta expressão consideravelmente maior de ADAM23 em relação aos outros neuroblastomas aqui estudados. Assim ADAM23 pode ser mais facilmente investigada, como pode ser observado nas figuras 18A e 18B. Os resultados obtidos são semelhantes àqueles observados nos neurônios cerebelares (comparar a Figuras 17B e 18B, linhas 2 e 3).

Além dos homogenatos do tecido completo do córtex e do cerebelo (Figuras 15B e 16B, linhas 1 e 2, respectivamente), neurônios: cortical (Figuras 17A, linha 1 e 17C, linha 1), cerebelar (Figura 17B, linha 1) e hipocampal (Figura 17C, linha 2) de camundongos cultivados expressaram ADAM23 (100 kDa) e ADAM23 (70 kDa), porém a forma madura é a mais abundante, sugerindo que ADAM23 não processada é apenas expressa de forma transitória durante o mecanismo de maturação. E a contribuição de outros tipos celulares do SNC, diferentes dos neurônios (por exemplo, células gliais), não altera o perfil de expressão ADAM23 observado em culturas neuronais puras.

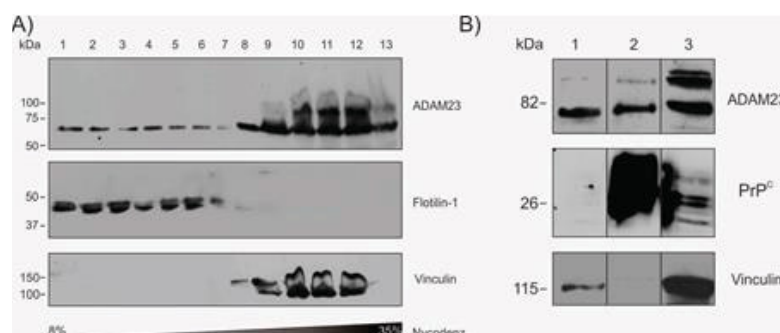


FIGURA 18 - ADAM23 É ENCONTRADA DENTRO DOS *LIPID RAFTS* EM CULTURA DE CÉLULAS NEURO-2a - A) Cerca de $1,2 \times 10^7$ células foram lisadas e submetidas ao fracionamento dos *lipid rafts*. Treze frações foram coletadas e precipitadas pelo método de metanol-clorofórmio, e, em seguida, resolvidas por SDS-PAGE para reação de imunoblotting com mAb DL11C8 para ADAM23 e com anti-flotilina-1 santa cruz (1:500) como marcador de *lipids rafts*. A proteína ADAM23 madura foi encontrada dentro e fora dos *rafts*, enquanto que a forma imatura só foi detectada fora destes domínios de membrana. B) As células ($1,2 \times 10^7$) foram lisadas e submetidas a preparação dos *lipid rafts*. Na linha 01 temos o input da amostra (100 µg); linhas 02 e 03 correspondem as frações de 01 a 06 combinadas que correspondem aos *rafts* e as frações de 08 a 13 referentes a porção não *rafts*, respectivamente. A fração *rafts* foi resolvida por SDS-PAGE em sua totalidade, enquanto que apenas 10% do montante da amostra não *rafts* foi resolvido. Ambas as formas maduras e imaturas de ADAM23 foram encontradas dentro dos *lipid rafts*. Como marcadores de *lipid rafts* e de citoplasma foram utilizados o anti-PrP^c policlonal (1:1000) produzido no nosso laboratório e o anti-vinculina sigma (1:4000) respectivamente. FONTE: A AUTORA, 2015.

4.3 PRESENÇA DE ADAM23 NOS *LIPID RAFTS* E A POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM PRP^C

Com base nos resultados de ADAM23 como molécula residente dos microdomínios *lipid rafts* resolveu-se investigar se essa localização na membrana era dependente da proteína príon celular (PrP^C). Nesse sentido foi realizada a purificação desses domínios específicos partindo-se do encéfalo de animais nocautes para PrP^C. As purificações dos *lipid rafts* foram feitas de forma a coletar as 13 frações e precipitá-las de forma independente e, em seguida combinar as frações – rafts (01-06) e não-rafts (08-13) (Figura 19). A expressão das formas imatura e madura foi semelhante aos resultados anteriormente obtidos para o encéfalo de animais selvagens (comparar Figuras 15B e 19, linhas 1 e 2). Contudo, foi observada a presença da ADAM23 imatura (100 kDa) nos *lipid rafts* (Figura 19, linha 2). A localização desta molécula nesses domínios específicos parece ser influenciada pela ausência da proteína prion celular no SNC.

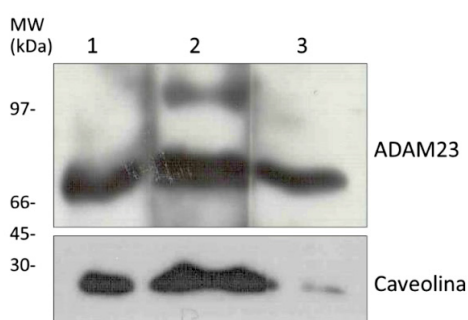


FIGURA 19 - A PROTEÍNA ADAM23 É RESIDENTE DOS DOMÍNIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* EM ENCÉFALO DE CAMUNDONGO NOCAUTE (KO) PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR (PRP^C) - O extrato total do tecido (50mg) foi lisado em tampão TNE e submetido ao procedimento de separação dos *lipids rafts*. Treze frações foram separadamente precipitadas pelo método de metanol-clorofórmio e, em seguida combinadas em frações *rafts* (01-06) e frações não-*rafts* (08-13). As frações *rafts* foram resolvidas por SDS-PAGE em sua totalidade, já nas frações de 08 a 13 utilizou-se 10% do total de amostra. A ADAM23 foi encontrada mais uma vez nos *lipid rafts* juntamente com a caveolina, uma das proteínas marcadora destes domínios. Na linha 01 temos um input com 80 µg de proteína total. As linhas 2 e 3 correspondem às frações combinadas de rafts e não rafts, respectivamente (4,5 mg de proteína total foi submetido).
FONTE: A AUTORA, 2015.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO ENTRE A INTERAÇÃO DE ADAM23 E PrP^c

4.4.1 PROCESSO DE ENDOCITOSE MEDIADO PELO ÍON COBRE (Cu²⁺)

Os dados que seguem foram realizados com o intuito de mostrar o papel biológico para a interação entre ADAM23 e PrP^c. Resultados anteriormente obtidos pelo laboratório (M. D. Costa e S.M. Zanata, dados não publicados) – no modelo de superexpressão de células HEK293T co-transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1ADAM23-HA e pEGFP-PrP^c mostraram uma redistribuição das duas proteínas na membrana plasmática. Nestas condições ADAM23 tornou-se uma molécula parcialmente residente em frações de *lipid rafts* e PrP^c transitou, em parte, para fora deste domínios. Como a proteína prion celular é uma molécula que sai dos *lipid rafts* para ser endocitada através de vesículas recoberta de clatrina (SHYNG *et al.*, 1995; NUNZIANTE *et al.*, 2003; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005) - a hipótese levantada é que a proteína ADAM23 pudesse estar envolvida nesse processo de endocitose de PrP^c.

Contudo, esse modelo não seria o ideal para tal estudo já que a proteína ADAM23 não é expressa de forma endógena nesta célula. Dessa forma escolhemos um modelo neuronal (linhagem Neuro-2a) que reflete melhor o comportamento fisiológico da interação entre as moléculas aqui analisadas.

O processo de endocitose da proteína prion celular já foi largamente descrito na literatura. Muitos autores já evidenciaram o papel do íon cobre Cu²⁺ como sendo um dos agentes causadores dessa internalização (LEE *et al.*, 2001; PERERA & HOOPER, 2001; MAGALHAES *et al.*, 2002; SUNYACH *et al.*, 2003; CISSE *et al.*, 2005; CAETANO *et al.*, 2008). Contudo, nosso trabalho visa elucidar a participação da ADAM23 nesse processo; pois a busca por moléculas parceiras continuam a ser necessárias para uma melhor elucidação do mecanismo.

Nesse sentido realizamos um experimento de endocitose da proteína prion celular, baseando-se nos estudos de (PERERA & HOOPER, 2001; CAETANO *et al.*, 2008). As células Neuro-2a foram tratadas com íon Cu²⁺ (500 µM) ou com a proteína ADAM23 recombinante (6His-Des-Cis) (1µM), em seguida, a superfície celular foi marcada com biotina para que as proteínas fossem submetidas ao pull-down com

Avidina-Agarose e resolvidas por SDS-PAGE (Figura 20). Nesse resultado ficou evidenciado que íons Cu^{2+} induz a endocitose de PrP^c como previamente descrito (Figura 20, linha 1). Somado a isso, identificou-se a molécula de ADAM23 como possível agente causador e/ou adjuvante do processo de internalização de PrP^c , uma vez que mais PrP^c é endocitado quando a célula é desafiada com 6His-Des-Cis (comparar linha 2 com 3, Figura 20), de forma semelhante ao observado para a endocitose mediada por Cu^{2+} (linha 1).

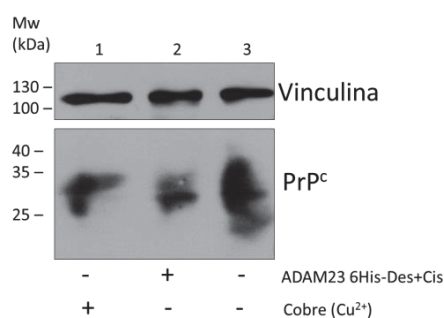


FIGURA 20 - ADAM23 RECOMBINANTE PROMOVE A INTERNALIZAÇÃO DE PrP^c EM CÉLULAS NEURO-2a - As células sofreram tratamentos distintos para promoção da endocitose de PrP^c . Na linha 1 $2,0 \times 10^4$ células Neuro-2a foram tratadas com Cu^{2+} , na linha 2 as células foram tratadas com ADAM23 recombinante 6His-des+cis. Ambos os tratamentos ocorreram a 37°C em estufa de CO_2 por 40 min. Já na linha 3 não houve tratamento. Após esse período as células foram submetidas ao procedimento de biotilação de superfície com biotina *EZ-Link™ Hydrazide* e posterior cromatografia de afinidade por resina Pierce Avidina Agarose. As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE e analisadas por immunoblotting com o anti- PrP^c monoclonal (1:2000), anti-vinculina (1:8000) e anti-mouse sigma (1:4000). A proteína PrP^c da superfície celular mostrou-se reduzida após o tratamento com Cu^{2+} e ADAM23 comparadas com as amostras controle. Células Neuro-2a tiveram sua superfície biotilada após os tratamentos com o íon Cu^{2+} ($500\mu\text{M}$) e a proteína recombinante ADAM23 6His-Des+Cis na concentração de $1\mu\text{M}$. Ambos foram submetidos as células por 40 minutos a 37°C em estufa de CO_2 . Em seguida as células tiveram sua superfície biotilada e as amostras foram submetidas a cromatografia de afinidade a resina avidina agarose para a purificação de proteínas da superfície celular. Evidencia-se com esse resultado que o íon cobre internaliza PrP^c já que uma menor quantidade dessa proteína está presente na parte exterior na membrana celular, bem como, que a proteína ADAM23 é eficiente é promover a endocitose de PrP^c através de seu domínio Desintegrina-Cisteína. FONTE: A AUTORA, 2016.

Com base nesse resultado resolvemos realizar um estudo *in vivo* com as células Neuro-2a. Utilizou-se microscopia confocal a fim de visualizar esse processo de internalização da proteína PrP^c mediado pelo íon cobre e pela proteína ADAM23. Este ensaio baseou-se na captura de imagens das células (time lapse) por um período total de 30 min em que as células permaneceram numa atmosfera de CO_2 a 37°C . As células foram transfectadas com os respectivos vetores de superexpressão em eucariotos - GFP- PrP^c e pcDNA3.1ADAM23-HA em quatro condições experimentais: 1) PrP^c , 2) PrP^c + íon Cu^{2+} , 3) PrP^c + ADAM23 e 4) PrP^c + ADAM23 + íon Cu^{2+} . Após

48 horas de expressão as células foram levadas ao microscópio confocal e realizou-se o ensaio de time lapse durante 30 minutos. A fluorescência captada deve-se a expressão da proteína PrP^c fusionada ao GFP.

As figuras 21, 22, 23 e 24 mostram imagens representativas de células nos momentos 0, 15 e 30 minutos nas diferentes condições experimentais. A figura 21A e 21B refere-se a amostra controle do experimento em que apenas foi observada a proteína PrP^c sendo expressa e não sofrendo alteração significativa de sua localização na célula durante todo os 30 minutos.

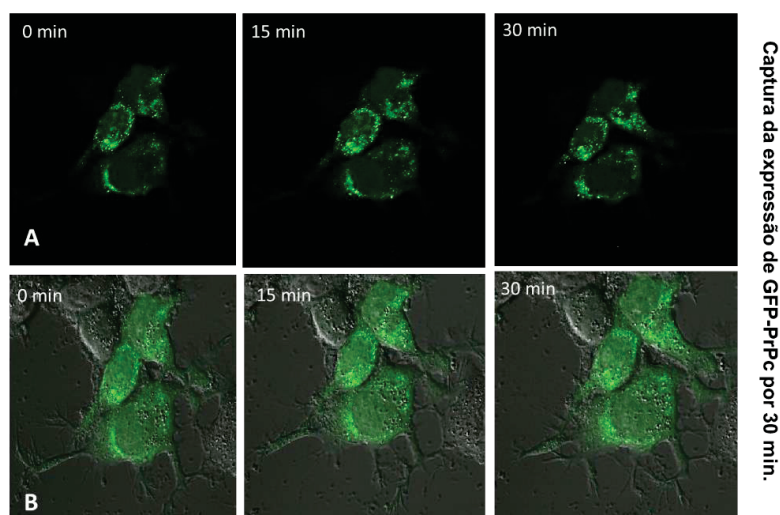


FIGURA 21 - CAPTURA DA EXPRESSÃO DE GFP-PRPC POR 30 MIN - Células (10^4) Neuro-2a foram transfectadas com o vetor GFP-PrP^c e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas. Após esse intervalo de tempo as amostras foram submetidas a captura de imagens em microscópio confocal com objetiva de 60X em imersão a óleo. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices 1µm). A) Apenas imagens da fluorescência em verde (GFP-PrP^c). B) Imagens do Contraste de Interferência diferencial (DIC) mais a fluorescência. Observa-se nessa projeção que a proteína PrP^c não teve seu perfil de expressão e de localização alterados.

FONTE: A AUTORA, 2015.

O segundo resultado foi a obtido mediante o tratamento das células Neuro-2a com o íon Cu²⁺ na concentração de 500 µm. A captura foi realizada no tempo 0 min sem a adição do cobre e seguiu-se após a administração do mesmo durante 30 minutos ininterruptos. O deslocamento de PrP^c em algumas regiões foi observado sutilmente gerando um acúmulo da proteína numa localização mais próxima do núcleo.

No resultado apontado pela figura 22 foi visualizada uma discreta internalização de PrP^c. A proteína mostrou-se mais concentrada em determinados pontos do citoplasma quando comparada ao momento inicial. Talvez faz-se necessário um aumento da concentração do íon Cu²⁺ para uma observação mais evidente.

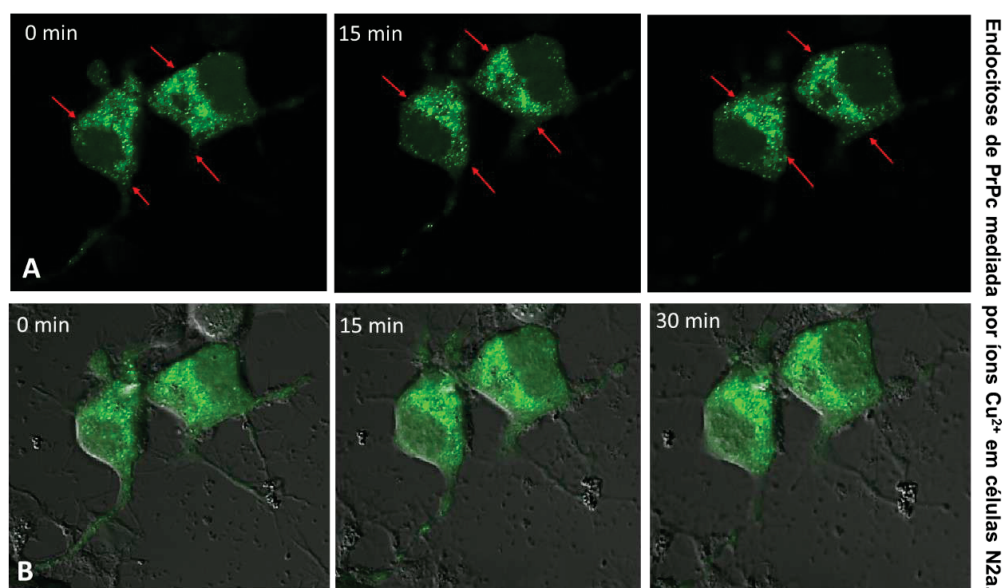


FIGURA 22 - ENDOCITOSE DE PRP^c MEDIADA POR ÍONS CU²⁺ EM CÉLULAS NEURO-2a - Após 48 horas de transfecção com o vetor pEGFP-PrPc as células (10⁴) foram tratadas com Cu²⁺ (500 µM) e as imagens foram obtidas durante 30 minutos de exposição ao referido íon. A captura foi realizada em objetiva 60X em imersão a óleo. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices 1µm). A) Apenas imagens da fluorescência em verde (GFP-PrPc). B) Imagens do Contraste de Interferência diferencial (DIC) mais a fluorescência. Em comparação com o tempo 0 observa-se de forma sutil que a localização de PrP^c vai acumulando-se na região perinuclear ficando menos dispersa no citoplasma. O trânsito da proteína evidencia-se das regiões mais periféricas para regiões mais centrais da célula.

FONTE: A AUTORA, 2015.

O terceiro resultado partiu-se da observação do trânsito de PrP^c quando esta molécula foi superexpressa juntamente com a proteína ADAM23 (essa proteína não foi visualizada pois nossa construção não possui etiqueta fluorescente). Contudo, fica bastante nítido que o padrão de expressão de PrP^c é diferente daquele observado nas imagens anteriores. Quando há a co-expressão das duas proteínas o PrP^c acumula-se na região mais perinuclear. Deixa de apresentar um padrão disperso pela célula e

fica mais concentrado em determinadas regiões do citoplasma com um aspecto bem mais vesiculado (comparar figuras 21 e 23). A expressão simultânea das duas proteínas parece estimular a endocitose PrP^c ou ainda favorecer o aprisionamento do mesmo dentro do citoplasma.

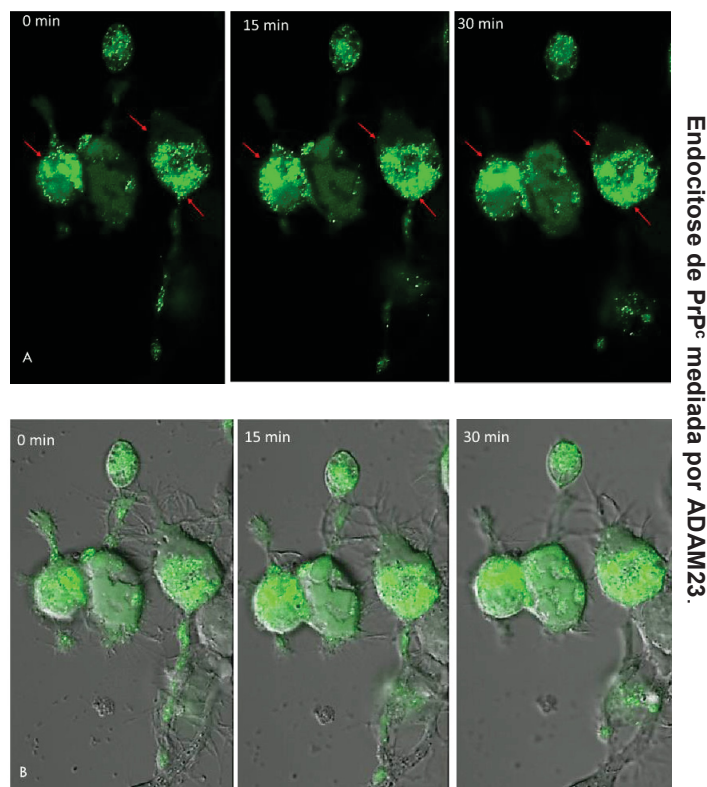


FIGURA 23 - ENDOCITOSE DE PRP^c MEDIADA POR ADAM23 - As células (10^4) de Neuro-2a foram co-transfectadas com os vetores pEGFP-PrPc e pcDNA3.1 ADAM23 -HA. Após 48 horas de transfecção as imagens foram obtidas durante 30 minutos. A captura foi realizada em objetiva 60X em imersão a óleo. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices $1\mu\text{m}$). A) Apenas imagens da fluorescência em verde (GFP-PrPc). B) Imagens do Contraste de Interferência diferencial (DIC) mais a fluorescência. Em comparação com o tempo 0 observa-se que a localização de PrP^c vai acumulando-se na região perinuclear ficando menos dispersa no citoplasma. O trânsito da proteína evidencia-se das regiões mais periféricas para regiões mais centrais da célula. FONTE: A AUTORA, 2015.

O quarto resultado referente a captura de imagens corroborando o resultado visto acima (PrP^c endocitado) pela ação conjunta do cobre e da expressão de ADAM23. Mais um vez observa um aspecto mais vesiculado de PrP^c e numa célula em particular visualizamos a proteína praticamente concentrada em um ponto único no citoplasma.

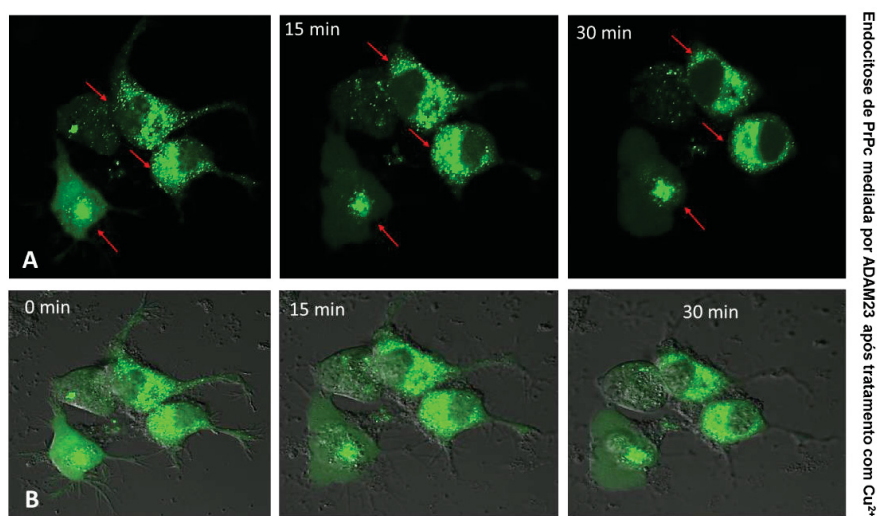


FIGURA 24 - ENDOCITOSE DE PRP^c MEDIADA POR ADAM23 APÓS TRATAMENTO COM CU²⁺ - As células (10⁴) de Neuro-2a foram co-transfectadas com os vetores pEGFP-PrPc e pcDNA3.1 ADAM23 -HA. Após 48 horas de transfecção com o vetor GFP-PrPc as células foram tratadas com Cu²⁺ (500 µm) e as imagens foram obtidas durante 30 minutos de exposição ao referido íon. A captura foi realizada em objetiva 60X em imersão a óleo. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (Z slices 1µm). A) Apenas imagens da fluorescência em verde (GFP-PrPc). B) Imagens do Contraste de Interferência diferencial (DIC) mais a fluorescência. Em comparação com o tempo 0 observa-se que a localização de PrP^c vai acumulando-se na região perinuclear ficando menos dispersa no citoplasma. O trânsito da proteína evidencia-se das regiões mais periféricas para regiões mais centrais da célula.

FONTE: A AUTORA, 2015.

Com base nessas imagens fica evidenciada a influência da proteína ADAM23 no comportamento de PrP^c dentro e fora da célula. Contudo, a concentração do íon Cu²⁺ em 500 µm demonstrou um comportamento discreto do processo de endocitose desta molécula. Nesse sentido resolvemos aumentar a concentração do íon cobre para os experimentos que se seguem a fim de obter resultados mais significativos. Os estudos de (PERERA & HOOPER, 2001) utilizaram concentrações de até 1000 µm de cobre por 90 minutos.

Além disso, nosso intuito foi também verificar se a proteína ADAM23 era endocitada juntamente com o PrP^c mediante a influência do íon cobre. As células Neuro-2a foram submetidas a marcação de sua superfície com biotina a 4°C. Depois um grupo de células foi tratado com o íon Cu²⁺ (1000 µm) a 37°C e outro grupo não sofreu tratamento. Proteínas de superfície marcadas com biotina e não internalizadas foram

removidas por digestão com tripsina. No grupo desafiado com Cu^{2+} nós detectamos uma quantidade maior de PrP^c e ADAM23 sugerindo que ambas as proteínas foram internalizadas. Já o grupo que não foi tratado teve a redução na quantidade de ambas proteínas, pois estavam na superfície e foram amplamente digeridas (Figura 25).

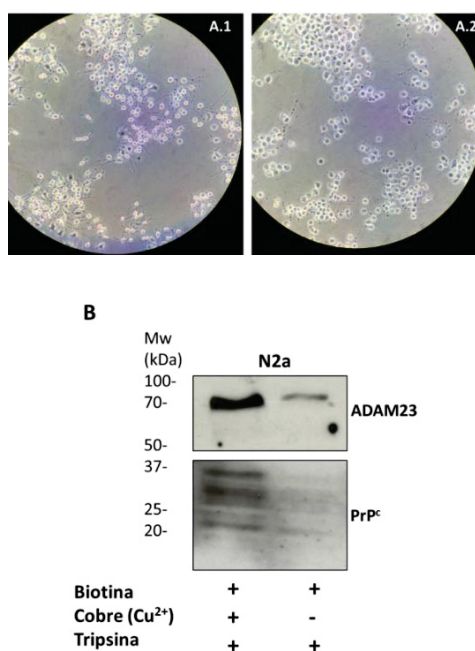


FIGURA 25 - A ENDOCITOSE DA PROTEÍNA ADAM23 É TAMBÉM MEDIADA PELO ÍON COBRE - As células ($2,0 \times 10^4$) Neuro-2a foram submetidas ao processo de marcação da superfície pela ação da biotina (0,2 mg/ml) por 30 min a 4°C. Depois as células foram divididas em 2 grupos: A.1) grupo sem tratamento e o A.2) grupo tratado com o íon Cu^{2+} (1000 μM) por 1 hora em estufa de CO_2 a 37°C. Após esse período as células foram tripsinizadas para digestão das proteínas da superfície (5 min a 37°C) com o respectivo bloqueio da mesma com soro fetal bovino. B) As células foram então lisadas e as amostras (1,0 mg) de proteína total foram levadas a cromatografia de afinidade a avidina agarose por 3 horas a 4°C. Observamos que nas células que sofreram o tratamento com o cobre as proteínas foram internalizadas e então protegidas da ação da tripsina apresentando-se numa maior quantidade daquelas em que não foram tratadas tendo ambas as proteínas mais presentes na superfície e, conseqüentemente sofreram uma ação maior da digestão enzimática.

FONTE: A AUTORA, 2016.

4.4.2 PROCESSO DE ENDOCITOSE DE ADAM23 E PRP^c E O TRÂNSITO NOS LIPIDS RAFTS

É sabido que a proteína prion celular é residente dos microdomínios *lipid rafts* (KESHET *et al.*, 2000). E uma das vias endocíticas desta molécula requer que a mesma saia destes domínios para ser internalizada via vesículas de clatrina (SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005). Nesse sentido, realizamos um estudo do trânsito de PrP^c no neuroblastoma Neuro-2a, mediante o tratamento com o íon Cu^{2+}

(PERERA & HOOPER, 2001). Em seguida, foi feita a purificação dos *lipid rafts* (NASLAVSKY *et al.*, 1997) e observado seu deslocamento dos domínios de membrana detergente-insolúvel (*rafts*) para a região não-*rafts* (Figura 26, comparar painel superior PrP^c com o inferior PrP^c + Cobre). Utilizamos a própria proteína prion celular como marcador de *lipid rafts* e a proteína β -actina como marcador de região não-*raft*.

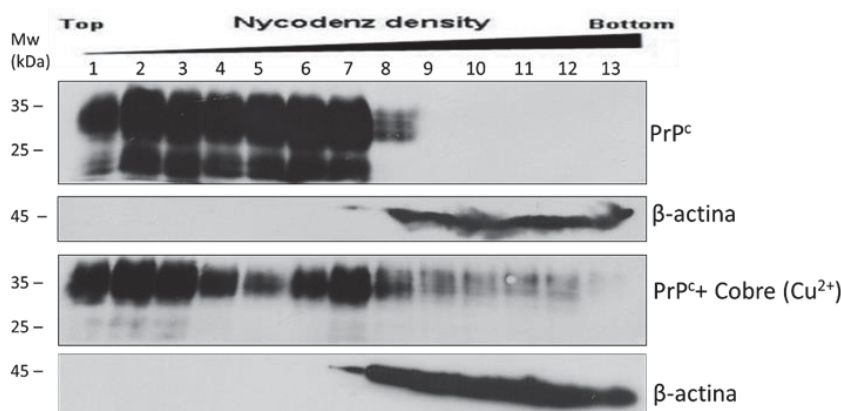


FIGURA 26 - A PROTEÍNA PRION CELULAR É DESLOCADA PARA FORA DOS MICRODOMÍNIOS *LIPID RAFTS* PELA AÇÃO DO ÍON COBRE - Foram submetidos 1,4 mg de proteína total do extrato das células Neuro-2a tratadas e não tratadas com 1000 μ M cobre (Cu^{2+}) à preparação dos *lipid rafts*. Após esse processo foram coletadas 13 frações e, em seguida, as amostras foram precipitadas independentemente por metanol-clorofórmio. Nas linhas 1 a 7 temos as frações que correspondem aos *lipid rafts* resolvidas pelo SDS-PAGE em sua totalidade. Nas linhas 8 a 13 as frações não-*rafts* que foram submetidas em apenas 10% do seu total amostral. A proteína prion celular foi utilizada como marcador de *lipid rafts* por ser residente destes microdomínios. Observa-se que ocorre um deslocamento de PrP^c para fora dos *lipids rafts* nas células que foram tratadas com o cobre. Esse resultado evidencia que o íon cobre (Cu^{2+}) é capaz de deslocar uma porção da referida proteína do seu microdomínio residente.

FONTE: A AUTORA, 2016.

O resultado acima corrobora os dados prévios encontrados na literatura que descrevem o íon cobre como agente capaz de promover a internalização da proteína prion celular (LEE *et al.*, 2001; PERERA & HOOPER, 2001; MAGALHAES *et al.*, 2002; CAETANO *et al.*, 2008), e que tal fenômeno implica na saída da PrP^c dos *lipid rafts* para entrada na célula (TAYLOR *et al.*, 2005; CAETANO *et al.*, 2008).

Como encontrado no nosso resultado da figura 25, ambas as proteínas ADAM23 e PrP^c estão em concentrações diminuídas na superfície celular após o tratamento com o íon cobre. Sendo assim, resolveu-se investigar se a molécula ADAM23 é deslocada na superfície da membrana plasmática mediante o tratamento do íon cobre. As células

Neuro-2a foram submetidas ao tratamento com o Cu^{2+} com acima descrito e posteriormente purificação dos *lipid rafts*. As amostras foram resolvidas e analisadas por SDS-PAGE (Figura 27).

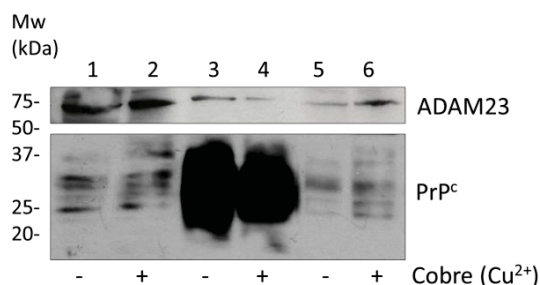


FIGURA 27 - AS PROTEÍNAS ADAM23 E PRP^c TRANSITAM PARA FORA DOS MICRODOMÍNIOS *LIPID RAFTS* MEDIANTE A AÇÃO DO ÍON COBRE - Foram submetidos 1,4 mg de proteína total dos extratos das células Neuro-2a tratadas e não tratadas com 1000 μM cobre à preparação dos *lipid rafts*. Após esse processo as frações foram combinadas em frações *rafts* (01-06) e frações não-*rafts* (08-13) e, em seguida, as amostras foram precipitadas por metanol-clorofórmio. Nas linhas 1 e 2 temos os inputs (100 μg de proteína total). Nas linhas 3 e 4 temos as frações que correspondem aos *lipid rafts* resolvidas pelo SDS-PAGE em sua totalidade. Nas linhas 5 e 6 as frações não-*rafts* que foram submetidas em apenas 10% do seu total amostral. As linhas ímpares (1,3 e 5) correspondem as amostras não tratadas com o íon cobre e as linhas pares (2,4 e 6) tratadas. A proteína prion celular foi utilizada como marcador de *lipid rafts* por ser residente destes microdomínios. Observa-se que ocorre uma diminuição na presença de ambas as proteínas ADAM23 e PrP^c dentro dos *lipids rafts* e que as mesmas aparecem numa quantidade maior fora deste domínios. Esse resultado evidencia que o íon cobre (Cu^{2+}) é capaz de deslocar as referidas proteínas para fora dos *lipid rafts*.
FONTE: A AUTORA, 2016.

As proteínas ADAM23 e PrP^c mostraram comportamento semelhante frente ao tratamento com o íon cobre. Ambas sofreram redistribuição na membrana plasmática, ou seja, passaram de domínios *raft* para não-*raft*. Para a proteína prion celular a ligação ao íon Cu^{2+} é consistente com uma função de seu transporte da superfície da célula para dentro de vesículas endossomais (LEE *et al.*, 2001; PERERA & HOOPER, 2001). E nossos resultados anteriores evidenciam o mesmo (Figuras 25 e 26). Contudo, a influência do íon cobre no trânsito de ADAM23 não havia sido anteriormente descrita, sugerindo que o íon possa atuar diretamente na proteína ADAM23 ou em seus ligantes, levando a fenomenologia observada. A fim de esclarecer se ADAM23 estaria sendo endocitada pela ação do íon Cu^{2+} , resolvemos realizar experimentos complementares que mostrassem o caminho da molécula pós-internalização.

4.4.3 PROCESSO DE ENDOCITOSE DE ADAM23 E PRP^C E VIAS DE RECICLAGEM

Após deslocamento lateral para fora dos *lipid rafts*, PrP^C é internalizado, podendo retornar rapidamente à superfície via endossomos de reciclagem ou seguir para degradação em lisossomos (CAMPANA *et al.*, 2005). Nesse sentido resolvemos investigar se o processo de internalização de ADAM23 seguia por essa mesma via endocítica, já que a mesma apresentou comportamento semelhante ao da proteína prion celular frente ao agente Cu²⁺. As células da linhagem neuronal Neuro-2a foram cultivadas e tratadas com o íon cobre por 0,15 e 30 min (LEE *et al.*, 2001; CAETANO *et al.*, 2008). Em seguida, as proteínas ADAM23, PrP^C e Rab11 (endossomos de reciclagem, (ULLRICH *et al.*, 1996) foram detectadas por ensaio de imunofluorescência e microscopia confocal. O resultado obtido revelou que o cobre é capaz de mobilizar a molécula ADAM23 da membrana e direcionar a mesma para endossomos de reciclagem numa resposta tempo-dependente. Tendo seu auge de localização nessa via aos 15 minutos de tratamento. Já a proteína prion celular é enviada para outra rota endocítica. Apresentou um perfil de localização diminuído na via de reciclagem numa resposta tempo-dependente (Figura 28).

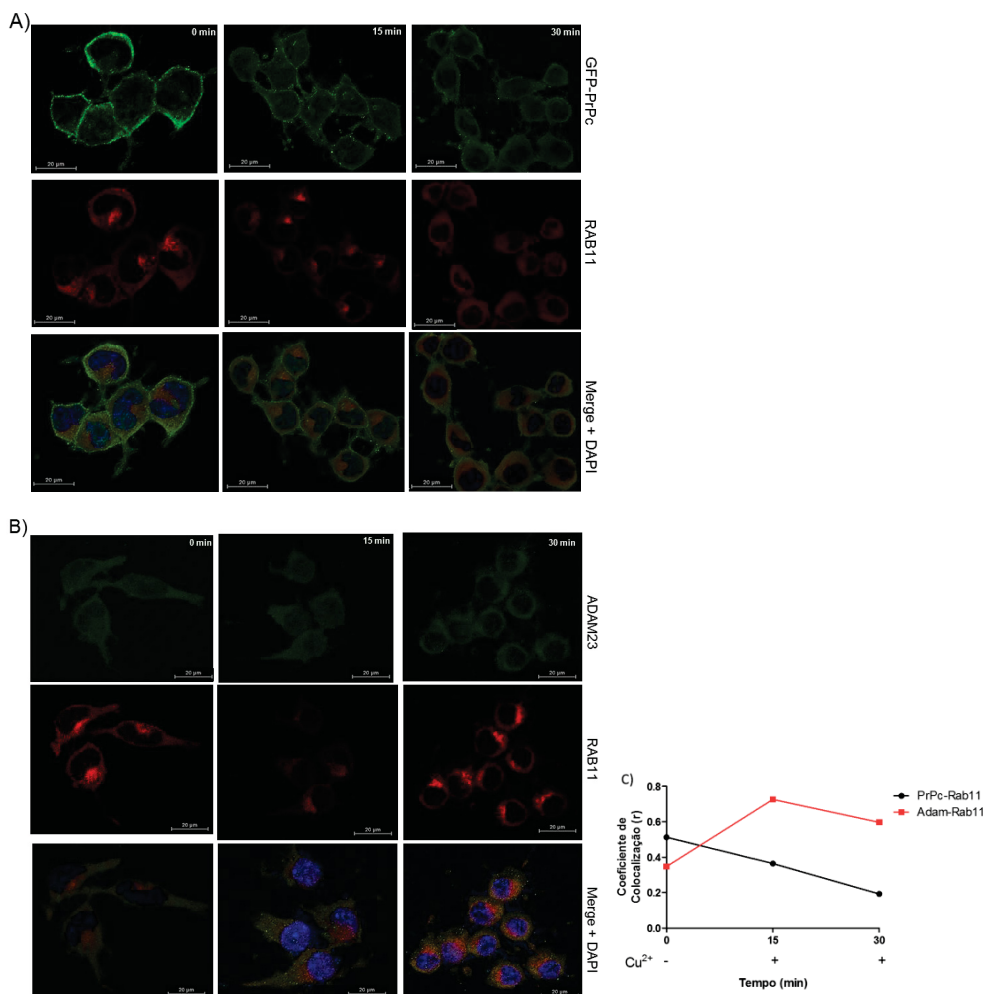


FIGURA 28 –ADAM23 ENTRA NA VIA DE RECICLAGEM NÃO MEDIANTE O TRATAMENTO COM ÍON COBRE - Células Neuro-2a (2×10^4 cél.) foram plaqueadas e mantidas por 48 horas (5% de CO_2 a 37°C). Após esse período foram tratadas com íon (Cu^{2+}) a $1000 \mu\text{m}$. Os tempos do tratamento foram 0, 15 e 30 min de exposição ao íon em meio HBSS. Em seguida as células foram fixadas por 20 min em paraformaldeído (4%) e submetidas as reações de imunofluorescência com os anticorpos anti-PrP^c policlonal (1:100), o monoclonal DCL11 (ADAM23 – sobrenadante de cultura) e o anti-RAB11 Cell Signaling (1:50) para marcar endossomos de reciclagem. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse FITC e anti-rabbit texas red Molecular Probes (1:500). A) Apresentam o perfil da não co-localização das proteínas PrP^c e RAB11 após o tratamento com o cobre. B) As figuras mostram o perfil da co-localização das proteínas ADAM23 e RAB11 após o referido tratamento. C) O gráfico apresenta o coeficiente de co-localização entre as proteínas aqui analisadas. A PrP^c parte no tempo estacionário (0 min) de um coeficiente de co-localização com os endossomos de reciclagem (RAB11) de $r=0,5$. A medida que as células foram submetidas a ação do íon essa co-localização sofreu um drástico decaimento para $r=0,2$ em função do tempo. Já a proteína ADAM23 apresentou um comportamento distinto frente a ação do cobre. O seu coeficiente de co-localização com os endossomos (RAB11) no tempo estacionário foi de $r=0,36$. Atingiu um pico máximo de $r=0,7$ aos 15 min de tratamento e sofreu um leve decaimento aos 30 min de exposição ao íon cobre obtendo um $r=0,6$. Fica evidenciado com esse resultado um comportamento distinto no caminho de internalização de PrP^c e ADAM23 frente a ação do íon cobre (Cu^{2+}).

FONTE: A AUTORA, 2016.

4.4.4 EFEITO GLOBAL DO ÍON COBRE (Cu^{2+}) NA EXPRESSÃO E PROCESSAMENTO DE ADAM23 E PrP^c

Com base nos distintos resultados da via endocítica de ADAM23 e PrP^c mediada pelo íon Cu^{2+} (Figura 28) resolveu-se investigar se esse agente teria efeito no perfil de expressão total de ambas proteínas. É sabido que a ligação da PrP^c ao cobre tem um efeito antioxidante (BROWN, 2000), já que o cobre livre é altamente citotóxico, e deve ser minimizado; pois reações redox que o envolvem geram espécies reativas de oxigênio (BERLETT & STADTMAN, 1997). A resposta de internalização das moléculas foi tempo-dependente, sendo assim realizou-se a análise da expressão de acordo com o tempo e a concentração do íon. Mais uma vez o resultado da ação do Cu^{2+} frente ADAM23 e PrP^c foi distinto. No primeiro caso a resposta dose-tempo-dependente refletiu-se no processamento da molécula da sua forma imatura (100 kDa) para madura (70 kDa). Ocorreu um acúmulo de ADAM23 na sua forma não processada (Compare tempos 0 e 60 min sem tratamento com tempos 15, 30 e 60 min em ambas concentrações). Já a PrP^c mostrou-se acumulada de forma tempo-dose-dependente de cobre (Comparar controles 0 e 60 minutos com amostras tratadas) (Figura 29).

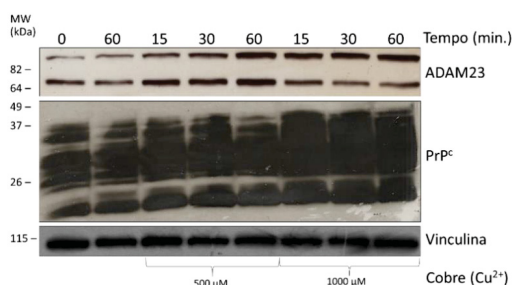


FIGURA 29 – ALTERAÇÕES NO PROCESSAMENTO DE ADAM23 E ACÚMULO DE PrP^c PELA AÇÃO DO ÍON COBRÉ – As células ($2,0 \times 10^4$) Neuro-2a foram tratadas com o íon (Cu^{2+}) nas concentrações (500 e 1000 μM) e tempos distintos (15, 30 e 60 min). O tempo 0 min foram as células sem nenhuma alteração (mantidas em meio DMEM com 10% de SFB). O tempo 60 min foram as células mantidas em meio HBSS. Os tempos seguintes de 15, 30 e 60 min tratados com cobre em meio HBSS. Todas as células permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Foram resolvidos por SDS-PAGE 100 μg de proteína total por linha. Os anticorpos primários utilizados foram o mAb ADAM23, o anti-PrP^c (1:1000) e o anti-vinculina Sigma (1:4000), normalizador proteico da reação. O anticorpo secundário foi o anti-mouse Sigma (1:4000). O padrão de expressão de ADAM23 apresenta modificação no perfil de processamento da forma 100 kDa para a forma 70 kDa, o qual se acumula na forma imatura. Já na expressão de proteína prion celular é observado uma alteração da quantidade global desta molécula que apresenta-se levemente aumentado.
FONTE: A AUTORA, 2016.

A fim de verificar se a presença da proteína prion celular poderia influenciar no processamento de ADAM23 frente a ação do cobre, foi analisada na linhagem neuronal CF-10 (derivada do animal nocaute para PrP^c) o perfil de expressão global da referida proteína. Utilizaram-se as mesmas condições experimentais do resultado anterior (Figura 29). O resultado obtido refletiu uma ausência quase total do processamento de ADAM23 da sua forma imatura (100 kDa) para sua forma madura (70 kDa) (Compare os tempos 0 e 60 – controles com os tempos tratados). Houve uma inversão no perfil normal de expressão da molécula que passou a expressar numa maior quantidade sua forma não processada. A presença de PrP^c parece influenciar no processamento de ADAM23 induzido pelo tratamento com cobre, levando a uma maior presença da forma madura de ADAM23 quando se compara ao perfil obtido na ausência de PrP^c (comparar Figura 29 com 30).

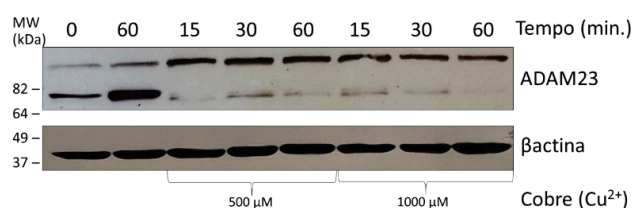


FIGURA 30 – ALTERAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ADAM23 MEDIANTE A AÇÃO DO ÍON COBRE E NA AUSÊNCIA DA PRP^c - As células ($2,0 \times 10^4$) CF-10 (nocautes para PrP^c) foram submetidas ao tratamento com o íon cobre (Cu^{2+}) em duas diferentes concentrações (500 e 1000 μM) por 15, 30 e 60 min. As amostras controle nas duas primeiras linhas (0 e 60 min) foram mantidas em meio DMEN com 10% de SFB e meio HBSS respectivamente em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO_2 . Os tempos seguintes de 15, 30 e 60 min de tratamento com cobre foram realizados nas células mantidas em meio HBSS. Foram resolvidos por SDS-PAGE 100 μg de proteína total em cada linha. O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal DCL11 (ADAM23 – líquido ascítico 1:1000) e o anti- β -actina Sigma (1:10000) que foi utilizado como normalizador de quantidade proteica na reação. O anticorpo secundário foi o anti-mouse Sigma (1:4000). O processamento da proteína ADAM23 na sua forma imatura (100 kDa) para a forma madura (70 kDa) foi diminuído drasticamente pela ação do íon cobre (Cu^{2+}) e potencializado pela ausência de PrP^c.

FONTE: A AUTORA, 2016.

5 DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ADAM23 E SUA LOCALIZAÇÃO NOS LIPID RAFTS

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, ADAM23 mostra uma distribuição em diferentes partes do encéfalo, incluindo a expressão relativa das formas processada e não processada. Nossos resultados obtidos nas culturas de neurônios cerebelar P7, cortical e hipocampo E18 (Figuras 17A e 17B) concordam com dados de pesquisas prévias mostrando que ambas são expressas nestas regiões do encéfalo durante o desenvolvimento do embrião de galinha (MARKUS *et al.*, 2011). No entanto, ADAM23 (70 kDa) é a principal forma detectada em cerebelo de camundongo adulto e homogeneizados do córtex (Figuras 15 e 16) e uma presença relativamente alta de ADAM23 (100 kDa) é observada em homogeneizados do córtex de camundongo nocaute para PrP^c, neurônios cerebelares e células de neuroblastoma (Fig. 17B, 18B e 19). Isso sugere que diferentes tipos de células dentro do tecido podem contribuir para um aumento na relação ADAM23 (70 kDa) / ADAM23 (100 kDa) ou a taxa de processamento pode ser diferente em aves e espécies de mamíferos. Além disso, o status de expressão de ADAM23 em cada tipo de célula, dentro de um tecido, provavelmente está relacionado ao seu papel biológico. Este parece ser o caso no câncer invasivo de mama, onde a heterogeneidade da expressão intra-tumoral de ADAM23 é crítica para manutenção desse fenótipo, uma vez que as células ADAM23-negativas promovem o crescimento e a metástase do tumor aumentando a proliferação e invasão de células adjacentes que expressam ADAM23 (COSTA *et al.*, 2015).

As proteínas ADAMs são tipicamente expressas na superfície celular, incluindo os membros mais estreitamente relacionados ADAM11, ADAM22 e ADAM23. Como ADAM23 parece ser processada por pro-proteínas convertases e a forma madura direcionada para a superfície celular (GOLDSMITH *et al.*, 2004), argumentamos que as linhagens celulares estabelecidas também processaram a ADAM23 de forma semelhante. De fato, as cinco linhagens celulares analisadas neste trabalho expressam ambas formas ADAM23 em diferentes proporções (Fig. 14A e 14B) e a forma imatura também parece estar altamente expressa na superfície celular (Figura

14C). Este perfil de expressão difere do descrito para neurônios isolados em cultura primária, que expressam principalmente ADAM23 (70 kDa) (linha 1, Figuras 17A e B; linhas 1 e 2, Figura 17C) (GOLDSMITH *et al.*, 2004; KEGEL *et al.*, 2014).

Além disso, embora ambas as formas tenham sido previamente encontradas na superfície celular de células granulares cerebelares (GOLDSMITH *et al.*, 2004), apenas uma presença residual de ADAM23 (100 kDa) foi evidenciada, sugerindo que ADAM23 (70 kDa) é muito mais abundante na superfície celular do que ADAM23 (100 kDa) em neurônios. As diferenças entre as linhagens celulares neuronais (ou não – CHO-k1) e as culturas primárias em relação ao total e a expressão das formas da superfície celular pode ser resultado do processo de imortalização adquirido pela linhagens celulares durante a aquisição do fenótipo tumoral. Na verdade, apenas ADAM23 (100 kDa) foi detectada em tumores da mama (COSTA *et al.*, 2004), do cérebro (COSTA *et al.*, 2005) e em linhagens tumorais estabelecidas (HU *et al.*, 2011), embora ADAM23 (70 kDa) seja proeminentemente expressa em sistema nervoso normal (Figuras 17A, 17B e 17C) (GOLDSMITH *et al.*, 2004; MARKUS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; KEGEL *et al.*, 2014), tecido adiposo (KIM *et al.*, 2012) e na linhagem celular embrionária P19 (SUN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012). Isso sugere que a expressão ADAM23 (70 kDa) está relacionada às células em seu estado fisiológico enquanto a expressão ADAM23 (100 kDa) poderia estar associada às suas condições patológicas. Se o comportamento das células tumorais e a agressividade podem estar relacionados à expressão aberrante da ADAM23 imatura na superfície celular ou outros compartimentos celulares será investigado posteriormente.

Devido à sua composição bioquímica, a membrana plasmática pode ser dividida em macro e micro regiões, que são separadas por microdomínios funcionalmente especializados, como *lipid rafts* (NICOLSON, 2014). Esses microdomínios de membrana especializados são caracterizados por uma aumento da quantidade de colesterol e glicosíngolipídeos em sua composição, que promove uma estrutura espacial organizada e concisa entre lipídeos e proteínas de membrana. Consequentemente, os *lipid rafts* atuam como plataformas de membrana especializadas para a transdução de sinais (PIKE, 2003; SIMONS & VAZ, 2004). Várias proteínas que interagem com ADAM23 foram descritas, incluindo a integrina $\alpha V\beta 3$ (CAL *et al.*, 2000), um subconjunto de receptores de integrina $\alpha 4$ (WANG *et al.*,

2017), membros da família LGI (SAGANE *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2012) revisado por (KEGEL *et al.*, 2014), a proteína prion celular (COSTA *et al.*, 2009) e a proteína associada ao contactina-2 (CHEN *et al.*, 2015). Curiosamente, a maioria dos parceiros moleculares ADAM23 listados acima são residentes ou localizados de forma transitória em *rafts*. Nossos dados mostram que a ADAM23 também está presente neste regiões especializadas da membrana plasmática (Figuras 15-19). Isto é particularmente interessante, já que apenas os membros cataliticamente ativos da família ADAM foram descritos como residentes de *lipid rafts*. Assim sendo, esses microdomínios parecem restringir a proteólise e a consequente clivagem de substratos das ADAMs. Nos neurônios, ADAM19 medeia a clivagem da proteína neuregulina1- β 1. Sua localização dentro dos *rafts* é fundamental, uma vez que a interrupção da região de ancoragem da membrana ADAM19 ou a depleção farmacológica de colesterol leva a uma acumulação de neuroregulina1 não processada na membrana celular (WAKATSUKI *et al.*, 2004). Além disso, a forma madura de ADAM17 também foi encontrada dentro de *lipid rafts*, onde ela cliva tanto o fator de necrose tumoral (TNF) como seus receptores TNFR1 e TNFR2 (TELLIER *et al.*, 2006; D'ALESSIO *et al.*, 2012). Uma vez que ADAM23 não tem atividade catalítica e seus ligantes descritos estão presentes em diferentes proporções de *lipid rafts*, especulamos que a entrada de cada parceiro molecular nesses microdomínios de membrana pode ser especificamente regulada pela ADAM23, limitando a ativação de seus ligantes, como observado para a integrina de α V β 3 (VERBISCK *et al.*, 2009) e a proteína prion celular (JEONG *et al.*, 2012). Em conjunto, esses dados dão suporte a hipótese de que um dos mecanismos que regulam a função ADAM23 podem envolver a distribuição de proteínas em *lipid rafts*.

5.2 PAPEL BIOLÓGICO PARA INTERAÇÃO ENTRE ADAM23 E PrP^c

Existem vários mecanismos de endocitose utilizados pelas células de mamíferos. Dentre eles os principais são: clatrina mediados, clatrina independentes, caveolina associados e flotilina associados. Contudo, a via mediada por vesículas de clatrina destaca-se dentre as outras por envolver muitas proteínas e ser amplamente estudada, revisado por (DOHERTY & MCMAHON, 2009; ELKIN *et al.*, 2016). Nosso resultado com a linhagem celular de neuroblastoma murino (Neuro-2a) (Figura 26) corrobora achados de pesquisas anteriores em que a PrP^c é endocitada via clatrina quando estimulada pela ligação ao íon cobre (Cu²⁺), sofrendo movimentação para fora dos *lipid rafts* em neuroblastoma humano SH-SY5Y (TAYLOR *et al.*, 2005). Contudo, não podemos descartar a possibilidade de existirem outros caminhos endocíticos para a molécula de PrP^c; já que sua internalização mediada pelo íon cobre via flotilina-1 também foi recentemente caracterizada nas células SK-N-SH (Neuroblastoma humano) (REN *et al.*, 2013). Como PrP^c foi descrito como parceiro molecular de ADAM23 (COSTA *et al.*, 2009) e os mecanismos que envolvem o processo de endocitose dessa proteína ainda não estão estabelecidos; investigamos se o íon cobre poderia deslocar também essa molécula para dentro da célula juntamente com a proteína prion celular. De fato, o resultado da figura 27 apresenta sua movimentação para regiões não-*rafts*. Contudo, o deslocamento na membrana não representa a sua saída da superfície celular. Nesse sentido, o resultado referente a marcação da porção externa da membrana plasmática após o tratamento com o íon cobre revela que ambas proteínas (PrP^c e ADAM23) estão diminuídas na superfície da célula Neuro-2a (Figura 25). A proteína STI-1 foi descrita como ligante de PrP^c na superfície celular (ZANATA *et al.*, 2002) e capaz de promover sua internalização (CAETANO *et al.*, 2008). Os dados da figura 20 mostram que ADAM23 também causa a retirada de PrP^c da superfície da célula. E os resultados obtidos pela co-expressão de ADAM23 e GFP-PrP^c mostrou que proteína prion celular tornou-se mais residente no meio intracelular (Comparar figuras 21 e 23). Tendo esse efeito de internalização potencializado quando essa célula foi tratada com cobre (Comparar figuras 23 e 24). Contudo, nossos achados ainda não confirmam se ambas as proteínas são internalizadas em conjunto. Assim, investigamos o caminho que elas percorrem após serem endocitadas.

Os endossomos são compartimentos túbulo-vesiculares ordenados que recebem moléculas internalizadas. Endossomos iniciais captam materiais da membrana plasmática e atuam no direcionamento: volta à superfície celular via endossomos de reciclagem, degradação via de endossomos tardios/ lisossomos, bem como, à rede trans-Golgi por transporte retrógrado (revisado por (SCOTT *et al.*, 2014). Constituindo esses variados tipos de endossomos encontramos as proteínas Rab que contribuem para a identidade estrutural e funcional do sistema endomembranar (revisado por (WANDINGER-NESS & ZERIAL, 2014). O mecanismo de endocitose mediado por clatrina está associado ao envolvimento da proteína Rab5 que constitui endossomos iniciais oriundos da membrana plasmática (PFEFFER, 2003; DEINHARDT *et al.*, 2006). Depois disso uma das possibilidades são as moléculas seguirem para endossomos de reciclagem que são constituídos pela proteína Rab11 (MEYERS & PREKERIS, 2002; JING & PREKERIS, 2009). Foi observado, portanto, que a proteína prion celular não é endereçada aos endossomos de reciclagem mediante a ação de íon cobre (Cu^{2+}) (Figura 28A). Como é sabido essa proteína é endocitada via clatrina (SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005), já foi detectada em endossomos Rab5 positivos (MAGALHAES *et al.*, 2002) e é reciclada de volta a membrana ou enviada a vias de degradação num processo constitutivo (revisado por (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). Nossos dados sugerem que PrP^c está sendo enviada durante os 30 minutos de tratamento a vias de degradação, já que nessas mesmas condições a proteína é acumulada de forma global na célula (Figura 29). Realmente, PrP^c quando tem sua expressão em excesso pelas células é direcionado a vias de degradação pelo proteossomo (MA & LINDQUIST, 2001; YEDIDIA *et al.*, 2001). Dados de pesquisas anteriores demonstraram que após 15 minutos da retirada do íon a proteína retorna a superfície assumindo as condições normais de rota biosintética (PAULY & HARRIS, 1998). De fato, nossos dados trazem um maior coeficiente de co-localização com endossomos de reciclagem nos tempos iniciais sem tratamento (Figura 28C).

Curiosamente, o resultado obtido para a proteína ADAM23 mostrou-se distinto de PrP^c. Sua marcante co-localização com endossomos de reciclagem determina que após o tratamento com o íon cobre ocorre sua internalização com posterior rota de volta a membrana plasmática (Figura 28B); já que a proteína Rab11 foi caracterizada como residente de endossomos responsáveis em carrear moléculas no caminho de volta à superfície celular (LINDSAY *et al.*, 2002). Como ADAM23 é descrita por estar

envolvida no sistema nervoso em processos de mielinização e epilepsia por meio de seus ligantes LGI-1 e LGI-4; (SAGANE *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009) e o cobre é liberado na fenda sináptica durante a despolarização (KARDOS *et al.*, 1989); essas moléculas podem estar envolvidas em processos de sinalização neuronal. O envolvimento de PrP^c com cobre já foi descrito como importante na recuperação desse íon dentro do terminal pré-sináptico após a despolarização (VASSALLO & HERMS, 2003) talvez ADAM23 possa também estar associada a esse mecanismo. Porém, após o tratamento com o íon cobre PrP^c e ADAM23 estão seguindo rotas endocíticas diferentes dentro da célula; se são internalizados de forma conjunta ou separada são necessários mais estudos com outros marcadores de rotas endocíticas.

O processo de endocitose da proteína prion celular é amplamente dinâmico. Até os dias atuais não existe um consenso em relação a qual via endocítica essa molécula é principalmente internalizada na célula. Talvez pelo fato de que essa proteína utilize a maquinaria celular nas suas diferentes possibilidades de caminhos endocíticos de acordo com seu contexto biológico (SARNATARO *et al.*, 2009). Assim, como a molécula de ADAM23 foi capaz de promover a retirada de PrP^c da superfície celular (Figura 20), ser deslocada dos *lipid rafts* pelo íon cobre (Figura 27) e estabilizar PrP^c dentro da célula (Figura 24 e 25), e dada a importância de ambas as proteínas no sistema nervoso (YANG *et al.*, 2006; LINDEN *et al.*, 2008; MARKUS-KOCH *et al.*, 2017); poderíamos especular que ADAM23 agiria como um agente modulador do processo de internalização da PrP^c via clatrina. Dados que corroboram tal especulação é que ADAM23 é uma molécula transmembrana e pode se comunicar como o meio intracelular, revisado por (GIEBELER & ZIGRINO, 2016) e PrP^c é ancorada à membrana por GPI, revisado por (TAYLOR & HOOPER, 2006) necessitando assim de uma proteína transmembrana como transdutor de sinal para mediar sua internalização. De fato a proteína transmembrana (LRP1) já foi descrita como responsável pela internalização de PrP^c via vesículas de clatrina (TAYLOR & HOOPER, 2007; PARKYN *et al.*, 2008) e também foi encontrada residindo de forma transiente em *lipid rafts* (WU & GONIAS, 2005). Nosso estudo sugere que ADAM23 tem função semelhante que a de LRP1 no contexto da internalização da PrP^c e contribui para uma melhor compreensão da fisiologia dessas proteínas.

O processamento global de ADAM23 na sua forma imatura (100 kDa) para madura (70 kDa) frente a ação do íon cobre mostrou-se diminuído (Figura 29). Devido ao tratamento com o referido íon foi observado que a mesma é internalizada (Figura 27) e encontra-se em rota de volta a membrana plasmática numa velocidade aumentada (Figuras 28B). Sendo assim insuficiente o tempo necessário para que ocorra o processamento satisfatório da molécula; já que o mesmo parece ocorrer no citoplasma (GOLDSMITH *et al.*, 2004). ADAM23 é uma molécula que se liga a PrP^c (COSTA *et al.*, 2009) e possivelmente está auxiliando a entrada de cobre dentro da célula. Fica evidenciado no resultado da figura 30 que esse mecanismo propiciou uma sobrecarga de ADAM23 na ausência de PrP^c. Refletindo-se numa diminuição ainda mais significativa de seu processamento (Comparar figuras 29 e 30). Entretanto, importante frisar que ADAM23 não possui seu domínio de ligação a metal ativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000). Dessa forma, outra molécula mediadora ligante de cobre deve estar envolvida nesse processo. Dados na literatura acerca da função biológica da proteína ADAM23 são escassos, contudo nossos achados auxiliam no esclarecimento de sua rota biosintética. Primeiro com os resultados de que ambas as formas não-processada e processada encontram-se na membrana plasmática (Figura 14C). Depois os achados referente a sua localização nos *lipid rafts* (Figuras 14-18) e seu deslocamento para fora desses domínios (Figura 27); estando reduzida na superfície celular (Figura 25) mediante a ação do cobre (Cu²⁺). Bem como, ainda em resposta ao tratamento com o referido íon destina-se em endossomos de reciclagem (Figura 28B) e deixa de ser processada (Figuras 29 e 30) para possivelmente retornar a membrana. Algumas dessas características vão ao encontro daquelas também observadas para a proteína prion celular. Ambas estão nos mesmos microdomínios de membrana (*lipid rafts*) e na porção externa da membrana plasmática sofrem ação semelhante ao íon cobre (Figuras 25 e 27). Isso sugere que essas moléculas são parceiras biológicas envolvidas em processos de metabolização desse íon, visto que PrP^c já foi descrito como responsável em internalizá-lo na célula (PERERA & HOOPER, 2001). Entretanto, para esclarecer de que forma específica uma atua sobre a outra serão necessários estudos adicionais.

6 CONCLUSÕES

- I. A molécula de ADAM23 é expressa nas suas formas imatura (100 kDa) e matura (70 kDa) em todas as linhagens neuronais aqui analisadas (Neuro-2a, SH-SY5Y, CHLA-20 e CF-10), bem como, na CHO-k1. E ambas as formas foram encontradas na superfície celular;
- II. A forma madura de ADAM23 (70 kDa) foi encontrada de forma transiente nos microdomínios de membrana *lipid rafts* em encéfalos de camundongos selvagens e nocautes para PrP^c;
- III. As culturas primárias de neurônios (córtex, cerebelo e hipocampo) e o neuroblastoma Neuro-2a apresentaram a ADAM23 como molécula residente de *lipid rafts*. De maneira mais significativa foi vista presente nesses domínios a sua forma imatura (70 kDa). Sendo a forma imatura (100 kDa) encontrada na cultura primária de cerebelo e do neuroblastoma Neuro-2a;
- IV. Ambas as proteínas PrP^c e ADAM23 são internalizados pela ação do íon cobre (Cu²⁺). Contudo, a via endocítica envolvida é distinta visto que dentro da célula seguem rotas diferentes. ADAM23 parece ser direcionada para endossomos de reciclagem para um possível retorno a membrana plasmática, enquanto PrP^c não foi encontrado nessas vesículas;
- V. O íon cobre (Cu²⁺) inibe o processamento de ADAM23 da sua forma imatura (100 kDa) para madura (70 kDa) causando o acúmulo daquela. E sob a PrP^c promove um aumento de sua expressão global. No caso da linhagem Neuro-2a o padrão do processamento da molécula de ADAM23 ocorreu de maneira mais sutil quando comparado a linhagem CF-10 que apresentou uma redução de processamento em quase sua totalidade. O papel “protetor” de PrP^c foi significativo para amenizar os efeitos do íon cobre, pois na sua ausência a molécula de ADAM23 praticamente deixou de ser processada.

Resumindo...

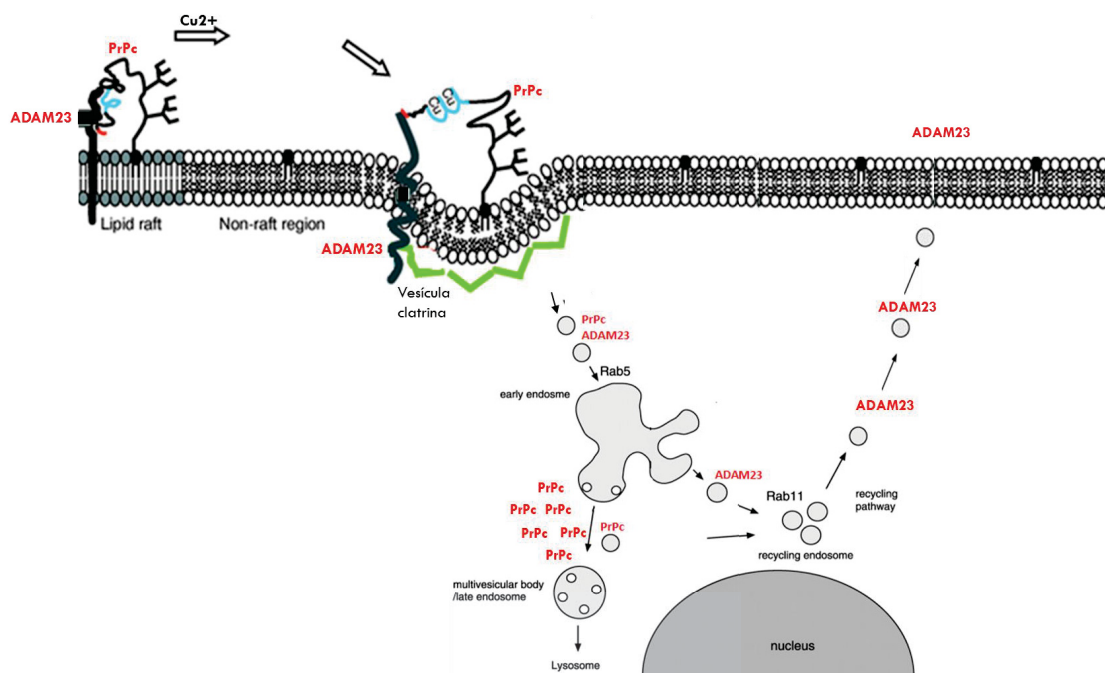


FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRÂNSITO CELULAR DE ADAM23 E PRP^C – As duas proteínas residem normalmente em *lipid rafts*. Quando o íon cobre (Cu^{2+}) liga-se a molécula de PrP^C ocorre o trânsito de ambas as proteínas para fora dos microdomínios específicos de membrana e as mesmas são internalizadas pela célula via vesículas recobertas por clatrina. Dentro da células as proteínas seguem por caminhos diferentes. ADAM23 vai para endossomos de reciclagem de volta a membrana plasmática e a proteína prion celular segue para vias de degradação via lisossomos. FONTE: A AUTORA, 2016.

REFERÊNCIAS

- AGUZZI, A.; BAUMANN, F.; BREMER, J. The prion's elusive reason for being. **Annu Rev Neurosci**, v. 31. p. 439-477, 2008.
- AGUZZI, A.; HEIKENWALDER, M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. **Nat Rev Microbiol**, v. 4. n. 10, p. 765-775, 2006.
- AGUZZI, A.; STEELE, A. D. Prion topology and toxicity. **Cell**, v. 137. n. 6, p. 994-996, 2009.
- ALICHE-DJOUDI, F., *et al.* A role for lipid rafts in the protection afforded by docosahexaenoic acid against ethanol toxicity in primary rat hepatocytes. **Food Chem Toxicol**, v. 60. p. 286-296, 2013.
- ALLEN, J. A.; HALVERSON-TAMBOLI, R. A.; RASENICK, M. M. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 8. n. 2, p. 128-140, 2007.
- ALTMIPPEN, H. C., *et al.* Lack of α -disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. **Mol Neurodegener**, v. 6. p. 36, 2011.
- ALTMIPPEN, H. C., *et al.* Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. **Am J Neurodegener Dis**, v. 1. n. 1, p. 15-31, 2012.
- BASLER, K., *et al.* Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, v. 46. n. 3, p. 417-428, 1986.
- BAVARI, S., *et al.* Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. **J Exp Med**, v. 195. n. 5, p. 593-602, 2002.
- BAX, D. V., *et al.* Integrin $\alpha(5)\beta(1)$ and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279. n. 21, p. 22377-22386, 2004.
- BENDHEIM, P. E., *et al.* Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. **Neurology**, v. 42. n. 1, p. 149-156, 1992.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 272. n. 33, p. 20313-20316, 1997.
- BREMER, J., *et al.* Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. **Nat Neurosci**, v. 13. n. 3, p. 310-318, 2010.
- BROWN, D. A.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 14. p. 111-136, 1998.
- BROWN, D. R. PrP^{Sc}-like prion protein peptide inhibits the function of cellular prion protein. **Biochem J**, v. 352 Pt 2. p. 511-518, 2000.
- BROWN, D. R.; NICHOLAS, R. S.; CANEVARI, L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **J Neurosci Res**, v. 67. n. 2, p. 211-224, 2002.
- BUELER, H., *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73. n. 7, p. 1339-1347, 1993.
- CAETANO, F. A., *et al.* Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. **J Neurosci**, v. 28. n. 26, p. 6691-6702, 2008.
- CAL, S., *et al.* ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha v \beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11. n. 4, p. 1457-1469, 2000.

- CALMON, M. F., *et al.* Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 173. n. 1, p. 31-37, 2007.
- CAMPANA, V.; SARNATARO, D.; ZURZOLO, C. The highways and byways of prion protein trafficking. **Trends Cell Biol**, v. 15. n. 2, p. 102-111, 2005.
- CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A.; HEGDE, R. S. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. **Trends Biochem Sci**, v. 34. n. 6, p. 287-295, 2009.
- CHATTERJEE, S.; MAYOR, S. The GPI-anchor and protein sorting. **Cell Mol Life Sci**, v. 58. n. 14, p. 1969-1987, 2001.
- CHEN, N., *et al.* Interaction proteomics of canonical Caspr2 (CNTNAP2) reveals the presence of two Caspr2 isoforms with overlapping interactomes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1854. n. 7, p. 827-833, 2015.
- CHEN, S., *et al.* Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 22. n. 2, p. 227-233, 2003.
- CHENG, Z. J., *et al.* Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. **Mol Membr Biol**, v. 23. n. 1, p. 101-110, 2006.
- CHESEBRO, B. BSE and prions: uncertainties about the agent. **Science**, v. 279. n. 5347, p. 42-43, 1998.
- CHIARINI, L. B., *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J**, v. 21. n. 13, p. 3317-3326, 2002.
- CHOI, J. S., *et al.* Promoter hypermethylation of the ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. **Int J Cancer**, v. 124. n. 6, p. 1258-1262, 2009.
- CISSE, M. A., *et al.* The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. **J Biol Chem**, v. 280. n. 49, p. 40624-40631, 2005.
- COSTA, E. T., *et al.* Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LGI4 and nitric oxide signals. **Oncogene**, v. 34. n. 10, p. 1270-1279, 2015.
- COSTA, F. F., *et al.* ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neurosci Lett**, v. 380. n. 3, p. 260-264, 2005.
- COSTA, F. F., *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23. n. 7, p. 1481-1488, 2003.
- COSTA, F. F., *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23. n. 7, p. 1481-1488, 2004.
- COSTA, M. D., *et al.* Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neurosci Lett**, v. 461. n. 1, p. 16-20, 2009.
- COSTA, M. D. M., *et al.* Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461. n. 1, p. 16-20, 2009.
- CRONIER, S., *et al.* Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. **Biochem J**, v. 416. n. 2, p. 297-305, 2008.
- CUI, T., *et al.* Mapping the functional domain of the prion protein. **Eur J Biochem**, v. 270. n. 16, p. 3368-3376, 2003.
- D'ALESSIO, A., *et al.* Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. **J Cell Mol Med**, v. 16. n. 3, p. 627-636, 2012.

- DAMBERGER, F. F., *et al.* Cellular prion protein conformation and function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108. n. 42, p. 17308-17313, 2011.
- DAS, A. S.; ZOU, W. Q. Prions: Beyond a Single Protein. **Clin Microbiol Rev**, v. 29. n. 3, p. 633-658, 2016.
- DEINHARDT, K., *et al.* Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. **Neuron**, v. 52. n. 2, p. 293-305, 2006.
- DHAUNCHAK, A. S., *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.
- DJOUAD, F., *et al.* Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. **Arthritis Res Ther**, v. 9. n. 2, p. R33, 2007.
- DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annu Rev Biochem**, v. 78. p. 857-902, 2009.
- DOMINGUES, C. C., *et al.* Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes. **J Membr Biol**, v. 234. n. 3, p. 195-205, 2010.
- DONALDSON, J. G.; PORAT-SHLIOM, N.; COHEN, L. A. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. **Cell Signal**, v. 21. n. 1, p. 1-6, 2009.
- DRABER, P.; DRABEROVA, L. Lipid rafts in mast cell signaling. **Mol Immunol**, v. 38. n. 16-18, p. 1247-1252, 2002.
- EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, v. 29. n. 5, p. 258-289, 2008.
- ELKIN, S. R.; LAKODUK, A. M.; SCHMID, S. L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. **Wien Med Wochenschr**, v. 166. n. 7-8, p. 196-204, 2016.
- ETO, K., *et al.* Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha(9)beta(1) - Implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277. n. 20, p. 17804-17810, 2002.
- ETO, K., *et al.* RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **J Biol Chem**, v. 275. n. 45, p. 34922-34930, 2000.
- EVANS, W. E. T., *et al.* Characterization of membrane rafts isolated from rat sertoli cell cultures: caveolin and flotillin-1 content. **J Androl**, v. 24. n. 6, p. 812-821, 2003.
- FEUK-LAGERSTEDT, E., *et al.* Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule. **Proteomics**, v. 7. n. 2, p. 194-205, 2007.
- FIVAZ, M., *et al.* Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. **EMBO J**, v. 21. n. 15, p. 3989-4000, 2002.
- FRA, A. M., *et al.* A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. **FEBS Lett**, v. 375. n. 1-2, p. 11-14, 1995.
- FRIDRICHOVA, I., *et al.* CXCL12 and ADAM23 hypermethylation are associated with advanced breast cancers. **Transl Res**, v. 165. n. 6, p. 717-730, 2015.
- FUKATA, Y., *et al.* The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. **Neurosci Res**, v. 116. p. 39-45, 2017.
- GHILARDI, C., *et al.* Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **Bmc Genomics**, v. 9. 2008.
- GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins (Basel)**, v. 8. n. 4, p. 122, 2016.

- GLEBOV, O. O.; BRIGHT, N. A.; NICHOLS, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. **Nat Cell Biol**, v. 8. n. 1, p. 46-54, 2006.
- GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78. n. 5, p. 647-658, 2004.
- GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol Biotechnol**, v. 24. n. 2, p. 157-202, 2003.
- GRANER, E., *et al.* Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 76. n. 1, p. 85-92, 2000.
- HAGIHARA, A., *et al.* Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. **Oncogene**, v. 23. n. 53, p. 8705-8710, 2004.
- HAIJ, G. N., *et al.* Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci**, v. 120. n. Pt 11, p. 1915-1926, 2007.
- HARAGUCHI, T., *et al.* Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 274. n. 1, p. 1-13, 1989.
- HARRIS, D. A. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. **Br Med Bull**, v. 66. p. 71-85, 2003.
- HARRIS, T. J.; SIU, C. H. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. **Bioessays**, v. 24. n. 11, p. 996-1003, 2002.
- HEAD, B. P.; PATEL, H. H.; INSEL, P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838. n. 2, p. 532-545, 2014.
- HEAD, M. W., *et al.* Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. **Am J Pathol**, v. 164. n. 1, p. 143-153, 2004.
- HOLLOWKA, D.; SHEETS, E. D.; BAIRD, B. Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 6). p. 1009-1019, 2000.
- HOOPER, N. M.; TAYLOR, D. R.; WATT, N. T. Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. **Biochem Soc Trans**, v. 36. n. Pt 6, p. 1272-1276, 2008.
- HU, C., *et al.* The expression of ADAM23 and its correlation with promoter methylation in non-small-cell lung carcinoma. **Int J Exp Pathol**, v. 92. n. 5, p. 333-339, 2011.
- HUANG, J.; BRIDGES, L. C.; WHITE, J. M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. **Mol Biol Cell**, v. 16. n. 10, p. 4982-4991, 2005.
- HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol Life Sci**, v. 54. n. 6, p. 527-540, 1998.
- HUANG, Z., *et al.* Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91. n. 15, p. 7139-7143, 1994.
- IBA, K., *et al.* The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **J Cell Biol**, v. 149. n. 5, p. 1143-1156, 2000.

- JEONG, J. K., *et al.* Translocation of cellular prion protein to non-lipid rafts protects human prion-mediated neuronal damage. **Int J Mol Med**, v. 29. n. 3, p. 387-392, 2012.
- JIMENEZ-HUETE, A., *et al.* Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. **Am J Pathol**, v. 153. n. 5, p. 1561-1572, 1998.
- JING, J.; PREKERIS, R. Polarized endocytic transport: the roles of Rab11 and Rab11-FIPs in regulating cell polarity. **Histol Histopathol**, v. 24. n. 9, p. 1171-1180, 2009.
- KANG, Y. S., *et al.* Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. **J Cell Sci**, v. 122. n. Pt 22, p. 4062-4069, 2009.
- KARDOS, J., *et al.* Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. **Neurosci Lett**, v. 103. n. 2, p. 139-144, 1989.
- KEGEL, L., *et al.* Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. **Development**, v. 141. n. 8, p. 1749-1756, 2014.
- KESHET, G. I., *et al.* The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. **J Neurochem**, v. 75. n. 5, p. 1889-1897, 2000.
- KIM, H. A., *et al.* Leucine-rich glioma inactivated 3 regulates adipogenesis through ADAM23. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821. n. 6, p. 914-922, 2012.
- KIRKHAM, M., *et al.* Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. **J Cell Biol**, v. 168. n. 3, p. 465-476, 2005.
- KIRKHAM, M.; PARTON, R. G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1746. n. 3, p. 349-363, 2005.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. **J Proteome Res**, v. 10. n. 1, p. 17-33, 2011.
- KURZCHALIA, T. V.; PARTON, R. G. Membrane microdomains and caveolae. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11. n. 4, p. 424-431, 1999.
- LAFFONT-PROUST, I., *et al.* The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. **FEBS Lett**, v. 579. n. 28, p. 6333-6337, 2005.
- LAKHAN, S. E.; SABHARANJAK, S.; DE, A. Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **J Biomed Sci**, v. 16. p. 93, 2009.
- LAWSON, V. A., *et al.* Prion protein glycosylation. **J Neurochem**, v. 93. n. 4, p. 793-801, 2005.
- LEE, K. S., *et al.* Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem**, v. 79. n. 1, p. 79-87, 2001.
- LEIGHTON, P. A., *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., *et al.* Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. **Dev Dyn**, v. 239. n. 4, p. 1246-1254, 2010.

- LINDEN, R., *et al.* Physiology of the prion protein. **Physiol Rev**, v. 88. n. 2, p. 673-728, 2008.
- LINDSAY, A. J., *et al.* Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. **J Biol Chem**, v. 277. n. 14, p. 12190-12199, 2002.
- LOPES, M. H., *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**, v. 25. n. 49, p. 11330-11339, 2005.
- LU, D., *et al.* Integrin binding characteristics of the disintegrin-like domain of ADAM-15. **Thromb Haemost**, v. 96. n. 5, p. 642-651, 2006.
- MA, J.; LINDQUIST, S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98. n. 26, p. 14955-14960, 2001.
- MACHADO, C. F., *et al.* Disease-associated mutations in the prion protein impair laminin-induced process outgrowth and survival. **J Biol Chem**, v. 287. n. 52, p. 43777-43788, 2012.
- MADORE, N., *et al.* Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. **EMBO J**, v. 18. n. 24, p. 6917-6926, 1999.
- MAGALHAES, A. C., *et al.* Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem**, v. 277. n. 36, p. 33311-33318, 2002.
- MANSON, J. C., *et al.* 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol**, v. 8. n. 2-3, p. 121-127, 1994.
- MARELLA, M., *et al.* Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. **J Biol Chem**, v. 277. n. 28, p. 25457-25464, 2002.
- MARKUS-KOCH, A., *et al.* ADAM23 promotes neuronal differentiation of human neural progenitor cells. **Cell Mol Biol Lett**, v. 22. p. 16, 2017.
- MARKUS, A., *et al.* Quantitative and dynamic expression profile of premature and active forms of the regional ADAM proteins during chicken brain development. **Cell Mol Biol Lett**, v. 16. n. 3, p. 431-451, 2011.
- MARTINS, V. R., *et al.* Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol**, v. 12. n. 2, p. 63-86, 2010.
- MATTEI, V., *et al.* Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. **FEBS Lett**, v. 560. n. 1-3, p. 14-18, 2004.
- MEYER, R. K., *et al.* Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83. n. 8, p. 2310-2314, 1986.
- MEYERS, J. M.; PREKERIS, R. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. **J Biol Chem**, v. 277. n. 50, p. 49003-49010, 2002.
- MILLA, M. E.; GONZALES, P. E.; LEONARD, J. D. The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. **Cell Biochem Biophys**, v. 44. n. 3, p. 342-348, 2006.
- MINOGUE, S.; WAUGH, M. G. Lipid rafts, microdomain heterogeneity and inter-organelle contacts: impacts on membrane preparation for proteomic studies. **Biol Cell**, v. 104. n. 10, p. 618-627, 2012.
- MITCHELL, K. J., *et al.* Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nat Genet**, v. 28. n. 3, p. 241-249, 2001.

- MURPHY, G. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20. n. 2, p. 138-145, 2009.
- NASLAVSKY, N., *et al.* Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. **J Biol Chem**, v. 272. n. 10, p. 6324-6331, 1997.
- NICOLSON, G. L. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838. n. 6, p. 1451-1466, 2014.
- NICOT, S.; BARON, T. G. Strain-specific proteolytic processing of the prion protein in prion diseases of ruminants transmitted in ovine transgenic mice. **J Gen Virol**, v. 91. n. Pt 2, p. 570-574, 2010.
- NISHINO, J., *et al.* Lgi4 promotes the proliferation and differentiation of glial lineage cells throughout the developing peripheral nervous system. **J Neurosci**, v. 30. n. 45, p. 15228-15240, 2010.
- NOTARI, S., *et al.* Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. **J Biol Chem**, v. 279. n. 16, p. 16797-16804, 2004.
- NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **J Clin Neurosci**, v. 11. n. 3, p. 227-235, 2004.
- NUNZIANTE, M.; GILCH, S.; SCHATZL, H. M. Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. **J Biol Chem**, v. 278. n. 6, p. 3726-3734, 2003.
- OWEN, J. P., *et al.* Use of thermolysin in the diagnosis of prion diseases. **Mol Biotechnol**, v. 35. n. 2, p. 161-170, 2007.
- OWUOR, K., *et al.* LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42. n. 4, p. 448-457, 2009.
- PARK, W. J., *et al.* Leucine-rich glioma inactivated 3 associates with syntaxin 1. **Neurosci Lett**, v. 444. n. 3, p. 240-244, 2008.
- PARK, W. J., *et al.* Leucine-rich glioma inactivated 3 induces neurite outgrowth through Akt and focal adhesion kinase. **Neurochem Res**, v. 35. n. 5, p. 789-796, 2010.
- PARKYN, C. J., *et al.* LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. **J Cell Sci**, v. 121. n. Pt 6, p. 773-783, 2008.
- PARTON, R. G.; SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8. n. 3, p. 185-194, 2007.
- PAULY, P. C.; HARRIS, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J Biol Chem**, v. 273. n. 50, p. 33107-33110, 1998.
- PAYNE, C. K., *et al.* Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. **Traffic**, v. 8. n. 4, p. 389-401, 2007.
- PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, v. 3. n. 5, p. 311-320, 2002.
- 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. **Curr Biol**, v. 11. n. 7, p. 519-523, 2001.
- PETERS, P. J., *et al.* Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **J Cell Biol**, v. 162. n. 4, p. 703-717, 2003.
- PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods Enzymol**, v. 91. p. 95-119, 1983.

- PETIT, C. S., *et al.* Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. **Tissue Barriers**, v. 1. n. 2, p. e24377, 2013.
- PETRAKIS, S.; SKLAVIADIS, T. Identification of proteins with high affinity for refolded and native PrPC. **Proteomics**, v. 6. n. 24, p. 6476-6484, 2006.
- PFEFFER, S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. **Cell**, v. 112. n. 4, p. 507-517, 2003.
- PIKE, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. **J Lipid Res**, v. 44. n. 4, p. 655-667, 2003.
- PIKE, L. J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. **Biochem J**, v. 378. n. Pt 2, p. 281-292, 2004.
- PIKE, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. **J Lipid Res**, v. 47. n. 7, p. 1597-1598, 2006.
- PIMPINELLI, F.; LEHMANN, S.; MARIDONNEAU-PARINI, I. The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. **Eur J Neurosci**, v. 21. n. 8, p. 2063-2072, 2005.
- PRADO, M. A., *et al.* PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. **J Neurochem**, v. 88. n. 4, p. 769-781, 2004.
- PRAG, S., *et al.* Activated ezrin promotes cell migration through recruitment of the GEF Dbl to lipid rafts and preferential downstream activation of Cdc42. **Mol Biol Cell**, v. 18. n. 8, p. 2935-2948, 2007.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet**, v. 16. n. 2, p. 83-87, 2000.
- PRUSINER, S. B. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95. n. 23, p. 13363-13383, 1998.
- RAJENDRAN, L., *et al.* Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100. n. 14, p. 8241-8246, 2003.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metalloproteinases. **Methods Enzymol**, v. 248. p. 183-228, 1995.
- REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20. n. 2, p. 126-137, 2009.
- REN, K., *et al.* Flotillin-1 mediates PrPc endocytosis in the cultured cells during Cu(2)(+) stimulation through molecular interaction. **Mol Neurobiol**, v. 48. n. 3, p. 631-646, 2013.
- RESH, M. D. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. **Prog Lipid Res**, v. 63. p. 120-131, 2016.
- RIEK, R., *et al.* NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). **Nature**, v. 382. n. 6587, p. 180-182, 1996.
- SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **Int J Biol Sci**, v. 4. n. 6, p. 387-396, 2008.
- SAGANE, K., *et al.* Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J**, v. 334 (Pt 1). p. 93-98, 1998.
- SANTUCCIONE, A., *et al.* Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol**, v. 169. n. 2, p. 341-354, 2005.

- SARNATARO, D., *et al.* PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. **Mol Biol Cell**, v. 15. n. 9, p. 4031-4042, 2004.
- SARNATARO, D., *et al.* Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells. **PLoS One**, v. 4. n. 6, p. e5829, 2009.
- SCHMITT-ULMS, G., *et al.* Time-controlled transcatheter perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. **Nat Biotechnol**, v. 22. n. 6, p. 724-731, 2004.
- SCOTT, C. C.; VACCA, F.; GRUENBERG, J. Endosome maturation, transport and functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 31. p. 2-10, 2014.
- SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev**, v. 17. n. 1, p. 7-30, 2003.
- SEPULVEDA, M. R., *et al.* The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. **J Biol Chem**, v. 281. n. 1, p. 447-453, 2006.
- SEZGIN, E., *et al.* The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18. n. 6, p. 361-374, 2017.
- SHYNG, S. L., *et al.* The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **J Biol Chem**, v. 270. n. 24, p. 14793-14800, 1995.
- SILVEIRA, E. S. A. M., *et al.* Lipid rafts in mast cell biology. **J Lipids**, v. 2011. p. 752906, 2011.
- SIMONS, K.; GERL, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11. n. 10, p. 688-699, 2010.
- SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1. n. 1, p. 31-39, 2000.
- SIMONS, K.; VAZ, W. L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 33. p. 269-295, 2004.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175. n. 4023, p. 720-731, 1972.
- STAHL, N., *et al.* Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell**, v. 51. n. 2, p. 229-240, 1987.
- STEELE, A. D.; LINDQUIST, S.; AGUZZI, A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. **Prion**, v. 1. n. 2, p. 83-93, 2007.
- SUN, Y., *et al.* ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochem Res**, v. 32. n. 7, p. 1217-1223, 2007.
- SUN, Y. P., *et al.* Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene**, v. 325. p. 171-178, 2004.
- SUNYACH, C., *et al.* The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **EMBO J**, v. 22. n. 14, p. 3591-3601, 2003.
- SUZUKI, T., *et al.* Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. **J Neurochem**, v. 119. n. 1, p. 64-77, 2011.
- TAKADA, H., *et al.* ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**, v. 24. n. 54, p. 8051-8060, 2005.

- TAKEDA, M., *et al.* Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100. n. 25, p. 14610-14617, 2003.
- TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824. n. 1, p. 164-176, 2012.
- TARABOULOS, A., *et al.* Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. **J Cell Biol**, v. 129. n. 1, p. 121-132, 1995.
- TAYLOR, D. R.; HOOPER, N. M. The prion protein and lipid rafts. **Mol Membr Biol**, v. 23. n. 1, p. 89-99, 2006.
- TAYLOR, D. R.; HOOPER, N. M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. **Biochem J**, v. 402. n. 1, p. 17-23, 2007.
- TAYLOR, D. R., *et al.* Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. **J Cell Sci**, v. 118. n. Pt 21, p. 5141-5153, 2005.
- TELLIER, E., *et al.* The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. **Exp Cell Res**, v. 312. n. 20, p. 3969-3980, 2006.
- TURK, E., *et al.* Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. **Eur J Biochem**, v. 176. n. 1, p. 21-30, 1988.
- ULLRICH, O., *et al.* Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. **J Cell Biol**, v. 135. n. 4, p. 913-924, 1996.
- URBINATI, C., *et al.* Substrate-immobilized HIV-1 Tat drives VEGFR2/alpha(v)beta(3)-integrin complex formation and polarization in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32. n. 5, p. e25-34, 2012.
- VASSALLO, N.; HERMS, J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. **J Neurochem**, v. 86. n. 3, p. 538-544, 2003.
- VERBISCK, N. V., *et al.* ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. **Cancer Res**, v. 69. n. 13, p. 5546-5552, 2009.
- VEY, M., *et al.* Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93. n. 25, p. 14945-14949, 1996.
- VILES, J. H., *et al.* Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96. n. 5, p. 2042-2047, 1999.
- VINCENT, B., *et al.* The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. **J Biol Chem**, v. 276. n. 41, p. 37743-37746, 2001.
- WAKATSUKI, S.; KURISAKI, T.; SEHARA-FUJISAWA, A. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. **J Neurochem**, v. 89. n. 1, p. 119-123, 2004.
- WANDINGER-NESS, A.; ZERIAL, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6. n. 11, p. a022616, 2014.
- WANG, L., *et al.* Multiple non-catalytic ADAMs are novel integrin alpha4 ligands. **Mol Cell Biochem**, v., 2017.

- WANG, Y.; SUN, Y.; QIAO, S. ADAM23 knockdown promotes neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by up-regulating P27KIP1 expression. **Cell Biol Int**, v. 36. n. 12, p. 1275-1279, 2012.
- WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15. n. 5, p. 598-606, 2003.
- WILSON, R., *et al.* Squalestatin alters the intracellular trafficking of a neurotoxic prion peptide. **BMC Neurosci**, v. 8. p. 99, 2007.
- WOLFSBERG, T. G., *et al.* ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol**, v. 131. n. 2, p. 275-278, 1995.
- WU, L.; GONIAS, S. L. The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. **J Cell Biochem**, v. 96. n. 5, p. 1021-1033, 2005.
- YANG, P.; BAKER, K. A.; HAGG, T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Prog Neurobiol**, v. 79. n. 2, p. 73-94, 2006.
- YEDIDIA, Y., *et al.* Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. **EMBO J**, v. 20. n. 19, p. 5383-5391, 2001.
- ZANATA, S. M., *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v. 21. n. 13, p. 3307-3316, 2002.
- ZHANG, X. P., *et al.* Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alpha v beta 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273. n. 13, p. 7345-7350, 1998.
- ZHAO, Z., *et al.* Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin alpha7beta1. **Exp Cell Res**, v. 298. n. 1, p. 28-37, 2004.
- ZIGRINO, P., *et al.* Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. **J Biol Chem**, v. 282. n. 42, p. 30785-30793, 2007.